



ResistancePlus[®] MG

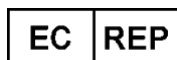
Multiplex realtids-PCR-assay til identifikation af *Mycoplasma genitalium* og påvisning af mutationer forbundet med resistens over for azithromycin



Produkt	Platform	Størrelse (reaktioner)	Katalognr.
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

Tilbehørsprodukter – Analysesoftware

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



MedEnvoy
Prinses Margrietplantsoen 33 – Suite 123
2595 AM Haag
Nederlandene



SpeedX Pty Ltd
Suite 102 National Innovation Centre
4 Cornwallis Street, Eveleigh
NSW 2015, Australien
Tlf.: +61 2 9209 4170, E-mail: tech@speedx.com.au

KUN TIL PROFESSIONEL ANVENDELSE

Ikke beregnet til salg i USA

Indhold

1	Produktbeskrivelse.....	5
2	Anvendelsesformål.....	5
3	Oplysninger om patogener.....	5
4	Sættets indhold.....	6
5	Transport og opbevaring.....	7
6	Advarsler og forholdsregler.....	7
6.1	Generelt.....	7
6.2	Laboratorie.....	7
6.3	Prøvehåndtering.....	7
6.4	Assay.....	8
6.5	Sikkerhedsforanstaltninger.....	8
6.6	Assay-plugins: Advarsler/Forholdsregler/Begrænsninger.....	8
7	Tilknyttede produkter og forbrugsvarer.....	8
8	Princip for teknologien.....	11
9	Procedureoversigt.....	13
10	Detaljeret procedure.....	14
10.1	Prøveindsamling, transport og opbevaring.....	14
10.1.1	Godkendte prøvetagningsenheder.....	14
10.1.2	Ufortyndet urinopsamling, transport og opbevaring.....	14
10.1.3	Opsamling, transport og opbevaring af tør podning.....	14
10.1.4	Opsamling, transport og opbevaring af Multi-Collect-prøvetagningssæt (Abbott, kat.nr. 9K12-01).....	14
10.1.5	Aptima® urinprøvetagningssæt (Hologic, kat.nr. 301040) opsamling, transport og opbevaring.....	15
10.1.6	Aptima® unisex podeprøvetagningssæt (Hologic, kat.nr. 301041) opsamling, transport og opbevaring.....	15
10.1.7	Prøvetagning, transport og opbevaring af DeltaSwab ViCUM® 2 mL + Standard flocced swab (deltalab, kat.nr. 304278) 16	16
10.1.8	Opsamling, transport og opbevaring af Vacumed® urin uden konserveringsmiddel (FL Medical, kat.nr. 44950).....	16
10.1.9	Prøvetagning, transport og opbevaring af UTM™-medie (Copan kat.nr. 359C).....	16
10.1.10	Opsamling, transport og opbevaring af cobas® PCR-medie (Roche, kat.nr. 06466281190).....	16
10.1.11	Godkendte prøvetagningsekstrakter.....	17
10.2	Prøvebehandling.....	17
10.3	Internal Control (intern kontrol) (IC).....	17
10.3.1	Internal Control (intern kontrol) på MagNA Pure 96.....	17
10.3.2	Internal Control (intern kontrol) på MICROLAB STARlet IVD.....	18
10.3.3	Internal Control (intern kontrol) på QIASymphony® SP.....	18
10.3.4	Intern kontrol på easyMAG®.....	19
10.4	Klargøring af realtids-PCR.....	20
10.4.1	Klargøring af masterblanding.....	20
10.4.2	Masterblandingsens stabilitet.....	20
10.5	Klargøring af PCR med ekstraherede nukleinsyrer (reflex-workflow).....	21
11	Programmering og analyse.....	21
12	Fortolkning af resultater.....	22
13	Begrænsninger.....	22
14	Kvalitetskontrol.....	23

15	Anvisninger om ResistancePlus® MG Positive Control.....	23
15.1	Brugsanvisning.....	23
16	Præstationskarakteristika.....	24
16.1	Klinisk præstation.....	24
16.1.1	Klinisk studie 1.....	24
16.1.2	Klinisk studie 2.....	26
16.1.3	Klinisk studie 3.....	26
16.1.4	Klinisk studie 4.....	28
16.1.5	Klinisk studie 5.....	29
16.1.6	Klinisk studie 6.....	30
16.1.7	Klinisk studie 7.....	32
16.2	Analytisk præstation.....	33
16.2.1	Reproducerbarhed og repeterbarhed.....	33
16.2.2	Analytisk følsomhed.....	36
16.2.3	Analytisk specificitet.....	36
16.2.4	Potentielt interfererende stoffer.....	37
17	Kundesupport og teknisk support.....	39
18	Referencer.....	40
19	Appendix 1: LightCycler® 480 instrument II.....	41
19.1	Programmering af LightCycler® 480 Instrument II (LC480 II).....	41
19.2	Colour Compensation (farvekompensation) for LightCycler® 480 Instrument II.....	45
19.3	Fortolkning af resultater.....	46
20	Appendix 2: cobas z 480-analyser.....	47
20.1	Programmering af cobas z 480-analyser.....	47
20.2	Colour Compensation (farvekompensation) for cobas z 480-analyser.....	51
20.3	Fortolkning af resultater.....	52
21	Appendix 3: Applied Biosystems® 7500 Fast.....	53
21.1	Programmering af Applied Biosystems® 7500 Fast.....	53
21.2	Fortolkning af resultater.....	55
22	Appendix 4: Applied Biosystems 7500 Fast Dx.....	56
22.1	Programmering af Applied Biosystems® 7500 Fast Dx.....	56
22.2	Fortolkning af resultater.....	60
23	Appendix 5: Bio-Rad CFX96™ Dx og CFX96 Touch™ Real-Time PCR System.....	61
23.1	Programmering af CFX96™ Dx og CFX96 Touch™ Real-time PCR System.....	61
23.2	Fortolkning af resultater.....	63
24	Appendix A: Resultatfortolkning.....	64
24.1	FastFinder-platform – Minimums IT-krav.....	64
24.2	Device set up (opsætning af enhed) (ny bruger eller ny enhed).....	65
24.2.1	Farvekompensation.....	65
24.3	Assay-plug-in (ny bruger).....	66
24.4	Navngivning af prøver.....	66
24.5	Tilføjelse af lotnumre for blandinger.....	67
24.6	Analyse.....	67

24.7	Resultater.....	69
24.8	Referencekurve.....	70
24.9	Oversigt over resultater.....	71
24.10	Eksport af resultater.....	71
24.11	Eksempel på grafer for kontrol.....	72
24.11.1	<i>M. M genitalium</i> , 23S rRNA-mutantkontrol (Pa).....	72
24.11.2	<i>M. M genitalium</i> , 23S rRNA-vildtypekontrol (Pb).....	72
24.11.3	<i>M. genitalium</i> -negativ kontrol (N) (negativ prøve).....	73
24.12	Eksempler.....	73
24.12.1	Eksempel 1. Høj kopi <i>M. genitalium</i> , 23S rRNA-vildtypeprøve.....	73
24.12.2	Eksempel 2. Lav kopi <i>M. genitalium</i> , 23S rRNA-vildtypeprøve.....	74
24.12.3	Eksempel 3. Høj kopi <i>M. genitalium</i> , 23S rRNA-mutantprøve.....	74
24.12.4	Eksempel 4. Lav kopi <i>M. genitalium</i> , 23S rRNA-mutantprøve.....	74
24.12.5	Eksempel 5. Negativ prøve.....	75
24.12.6	Eksempel 6. Ugyldig prøve.....	75
24.12.7	Eksempel 7. Prøver der skal afklares – negativt signal.....	75
24.12.8	Eksempel 8. Prøver der skal afklare – Inkonklusivt signal.....	77
25	Ordliste.....	78

1 Produktbeskrivelse

ResistancePlus[®] MG-sættet detekterer samtidigt *M. genitalium* og 5 mutationer i position 2058 og 2059 i 23S rRNA-genet (*E. coli*-nummerering), der er forbundet med resistens over for azithromycin (makrolidbaseret antibiotikum). **ResistancePlus**[®] MG-sættet er et 1-brønds reeltids-PCR-multiplex bestående af 3 aflæsninger. Aflæsning 1 angiver tilstedeværelsen eller fraværet af *M. genitalium* gennem påvisning af MgPa-genet; aflæsning 2 angiver tilstedeværelsen af en mutation af A2058G, A2059G, A2058T, A2058C eller A2059C i 23S rRNA-genet; og aflæsning 3 er en intern kontrol til at monitorere ekstraktionseffektivitet og qPCR-hæmning. **ResistancePlus**[®] MG-sættet bruger **PlexZyme**[®] and **PlexPrime**[®] til specificitet og højeffektiv multiplexing. Assayet valideres på prøver ekstraheret med MagNA Pure 96 System (Roche), MICROLAB STARlet IVD (Hamilton), QIASymphony[®] SP (QIAGEN), NUCLISENS[®] easyMAG[®] (Biomérieux) og påvisning i realtid på Roche LightCycler[®] 480 Instrument II (LC480 II), cobas z 480 analyser (z480), Applied Biosystems[®] 7500 Fast (7500 Fast), Applied Biosystems[®] 7500 Fast Dx (7500 Fast Dx) og Bio-Rad CFX96[™] Dx (CFX96 IVD) og CFX96 Touch[™] (CFX96 Touch) Real-time PCR Detection Systems.

2 Anvendelsesformål

ResistancePlus[®] MG-sættet er en kvalitativ multiplexeret in vitro-diagnostisk PCR-test i realtid til identifikation af *M. genitalium* og detektion af 5 mutationer i 23S rRNA-genet (A2058G, A2059G, A2058T, A2058C og A2059C, *Escherichia coli*-nummerering), der er forbundet med resistens over for azithromycin (makrolidbaseret antibiotikum). Det er beregnet til at hjælpe med diagnosen af *M. genitalium* og til at detektere mutationer forbundet med resistens over for azithromycin i *M. genitalium* og bør bruges sammen med klinisk og anden laboratorieinformation.

ResistancePlus[®] MG-sættet kan bruges med følgende prøvetyper: urinprøver fra mænd og kvinder og anale, rektale, cervikale, endocervikale, vaginale, urethrale, penile, penile meatale og pharyngeale podninger fra symptomatiske og asymptomatiske patienter.

Negative resultater udelukker ikke *M. genitalium*-infektioner og giver ikke bekræftelse på modtagelighed over for azithromycin, da der kan være andre mekanismer for behandlingssvigt.

ResistancePlus[®] MG-sættet er beregnet til anvendelse i professionelle miljøer, såsom hospitaler eller referencelaboratorier eller offentlige laboratorier. Det er ikke beregnet til selvtest, hjemmebrug eller brug på behandlingsstedet.

3 Oplysninger om patogener

M. genitalium er en lille bakterie, der findes i urinrøret hos mennesker. *M. genitalium* har været forbundet med en række seksuelt overførte infektioner (STI'er). Hos mænd er det den næst hyppigste årsag til ikke-gonokok urethritis (NGU) og er også forbundet med prostatitis, epididymitis og balanoposthitis, betændelse i glans penis og forhud¹. Hos kvinder er det forbundet med cervicitis, underlivsbetændelse (PID), herunder endometritis (betændelse i livmoderslimhinden) og salpingitis (betændelse i æggelederne)^{1,2,3}.

Azithromycin bruges almindeligvis til behandling af *M. genitalium* og til syndromisk behandling af STI'er som NGU og cervicitis. Azithromycin tilhører den makrolide klasse af antibiotika og virker ved at binde til 23S rRNA for at hæmme proteinsyntese. Punktmutationer i 23S rRNA-genet af *M. genitalium*, A2058G, A2059G, A2058T, A2058C og A2059C (*E. coli*-nummerering) har været forbundet med behandlingssvigt og/eller *in vitro*-resistens over for azithromycin^{4,5}. De mest almindelige mutationer er A2058G og A2059G, der bidrager med 89 % af makrolidresistensmutationer i et nyligt forsøg⁶.

4 Sættets indhold

Tabel 1. Indhold af <i>ResistancePlus</i> [®] MG-sæt				
Hættefarve	Indhold	Beskrivelse	Kat. nr. 20001L-01 (100 reaktioner)	Kat. nr. 2000125 (25 reaktioner)
Blå	<i>Plex</i> Mastermix (<i>Plex</i> -masterblanding), 2x	Masterblanding, der indeholder nødvendige komponenter til qPCR, herunder dNTP'er, MgCl ₂ , DNA-polymerase og buffer	1 x 1 mL	1 x 250 µL
Brun	MG+23S Mix (MG+23S-blanding), 20x	Blanding indeholdende oligonukleotider [^] til amplifikation og påvisning af <i>M. genitalium</i> og 23S rRNA-mutationer	1 x 100 µL	1 x 25 µL
Hvid	Control Mix 1 (Kontrolblanding 1), 20x	Blanding indeholdende oligonukleotider [^] til amplifikation og påvisning af internt kontrolassay for LC480 II og z 480	1 x 100 µL	1 x 25 µL
Rød	Internal Control cells (Interne kontrolceller) [#]	Interne kontrolceller indeholdende DNA-skabelon til intern kontrol til at monitorere ekstraktions- og amplifikationseffektivitet	1 x 500 µL	1 x 100 µL
Neutral	Nuclease Free Water (Nukleasefrit vand)	Vand af PCR-kvalitet	1 x 1 mL	1 x 1 mL

Skabelonrør skal opbevares adskilt fra oligoblandinger, dvs. i rummet til håndtering af skabeloner eller nukleinsyre

[^] Oligonukleotider er PCR-primerpar (inklusive *PlexPrime*[®]-primers), *PlexZyme*[®]-enzymmer og fluorescensprobe

Tabel 2. Indhold af <i>ResistancePlus</i> [®] MG ₍₅₅₀₎ -sæt				
Hættefarve	Indhold	Beskrivelse	Kat. nr. 2000201 (100 reaktioner)	Kat. nr. 2000225 (25 reaktioner)
Blå	<i>Plex</i> Mastermix (<i>Plex</i> -masterblanding), 2x	Masterblanding, der indeholder nødvendige komponenter til qPCR, herunder dNTP'er, MgCl ₂ , DNA-polymerase og buffer	1 x 1 mL	1 x 250 µL
Brun	MG+23S Mix (MG+23S-blanding), 20x	Blanding indeholdende oligonukleotider [^] til amplifikation og påvisning af <i>M. genitalium</i> og 23S rRNA-mutationer	1 x 100 µL	1 x 25 µL
Hvid	Control Mix 2 (Kontrolblanding 2), 20x	Blanding indeholdende oligonukleotider [^] til amplifikation og påvisning af internt kontrolassay for 7500 Fast og 7500 Fast Dx	1 x 100 µL	1 x 25 µL
Rød	Internal Control cells (Interne kontrolceller) [#]	Interne kontrolceller indeholdende DNA-skabelon til intern kontrol til at monitorere ekstraktions- og amplifikationseffektivitet	1 x 500 µL	1 x 100 µL
Neutral	Nuclease Free Water (Nukleasefrit vand)	Vand af PCR-kvalitet	1 x 1 mL	1 x 1 mL

Skabelonrør skal opbevares adskilt fra oligoblandinger, dvs. i rummet til håndtering af skabeloner eller nukleinsyre

[^] Oligonukleotider er PCR-primerpar (inklusive *PlexPrime*[®]-primers), *PlexZyme*[®]-enzymmer og fluorescensprobe

Tabel 3. Indhold af <i>ResistancePlus</i> [®] MG ₍₆₇₅₎ kits				
Hættefarve	Indhold	Beskrivelse	Kat. nr. 2000301 (100 reaktioner)	Kat. nr. 2000325 (25 reaktioner)
Blå	<i>Plex</i> Mastermix (<i>Plex</i> -masterblanding), 2x	Masterblanding, der indeholder nødvendige komponenter til qPCR, herunder dNTP'er, MgCl ₂ , DNA-polymerase og buffer	1 x 1 mL	1 x 250 µL
Brun	MG+23S Mix (MG+23S-blanding), 20x	Blanding indeholdende oligonukleotider [^] til amplifikation og påvisning af <i>M. genitalium</i> og 23S rRNA-mutationer	1 x 100 µL	1 x 25 µL
Hvid	Control Mix 3 (Kontrolblanding 3), 20x	Blanding indeholdende oligonukleotider [^] til amplifikation og påvisning af internt kontrolassay for CFX96 Dx og CFX96 Touch	1 x 100 µL	1 x 25 µL
Rød	Internal Control cells (Interne kontrolceller) [#]	Interne kontrolceller indeholdende DNA-skabelon til intern kontrol til at monitorere ekstraktions- og amplifikationseffektivitet	1 x 500 µL	1 x 100 µL
Neutral	Nuclease Free Water (Nukleasefrit vand)	Vand af PCR-kvalitet	1 x 1 mL	1 x 1 mL

Skabelonrør skal opbevares adskilt fra oligoblandinger, dvs. i rummet til håndtering af skabeloner eller nukleinsyre

[^] Oligonukleotider er PCR-primerpar (inklusive *PlexPrime*[®]-primers), *PlexZyme*[®]-enzymmer og fluorescensprobe

5 Transport og opbevaring

- Komponenterne i *ResistancePlus*[®] MG-sættene leveres på tøris eller isposer med gel. Efter modtagelse skal alle komponenter opbevares ved -25 °C til -15 °C. Det anbefales, at fryse-/optøningscyklusser begrænses til 15.
- Ved opbevaring under de anbefalede forhold og ved korrekt håndtering bibeholdes sættets aktive egenskaber indtil den udløbsdato, der er angivet på etiketten. Må ikke bruges efter udløbsdatoen.
- Enhver alvorlig hændelse skal indberettes til SpeedX ved at kontakte tech@speedx.com.au

6 Advarsler og forholdsregler

6.1 Generelt

- Kun til *in vitro* diagnostisk brug.
- Læs denne brugsanvisning omhyggeligt før brug. Følg procedurerne nøje som beskrevet for at sikre troværdigheden af testresultaterne. Enhver afvigelse fra disse procedurer kan påvirke testens resultater.
- Brugere skal være tilstrækkeligt uddannet i brugen af *ResistancePlus*[®] MG-assayet.
- Enhver alvorlig hændelse skal indberettes til fabrikanten og den kompetente myndighed i den medlemsstat, hvor brugeren og/eller patienten er etableret.

6.2 Laboratorie

- Det anbefales at udføre prøveklargøring/-ekstraktion, klargøring af masterblanding, tilsætning og termocykling af prøver i rumligt adskilte områder. Som minimum skal PCR-instrumentet ideelt være i et rum, der er adskilt fra områder, hvor reaktioner klargøres.
- Det anbefales at følge rutinemæssige laboratorieforholdsregler. Brug hensigtsmæssigt personligt beskyttelsesudstyr som f.eks. handsker, beskyttelsesbriller og kittel ved håndtering af reagenser.
- Patogene organismer kan forekomme i klinisk prøvemateriale. Behandl alle biologiske prøver som potentielt smittefarlige, og følg institutionens sikkerhedsprocedurer for håndtering af kemiske og biologiske prøver.
- Følg institutionens procedurer for bortskaffelse af farligt affald ved bortskaffelse af prøver, reagenser og andre potentielt kontaminerede materialer.

6.3 Prøvehåndtering

- Prøver skal indsamles, transporteres og opbevares med brug af standardmetoder for laboratorier eller i overensstemmelse med anvisningerne i indsamlingssættet.

6.4 Assay

- Grundlæggende forholdsregler til at undgå kontaminering af PCR-reaktioner omfatter brug af pipettespidser med sterilt filter, brug af en ny pipettespids til hver pipetteringshandling og adskillelse af arbejdsflow.
- PCR-test kan let blive kontamineret fra tidligere PCR-produkter. Åbn aldrig reaktionsbeholdere efter udførelse af PCR.
- Analysereagenser indeholder IDTE-buffer, som kan forårsage alvorlig øjenirritation. Det anbefales, at brug sker i et godt ventileret område, og at der bæres passende personlige værnemidler såsom handsker, beskyttelsesbriller og laboratoriekittel ved håndtering af reagenser.

6.5 Sikkerhedsforanstaltninger

- Sikkerhedsdatablade (SDS) kan fås efter anmodning. Kontakt tech@speedx.com.au for at få flere oplysninger.

6.6 Assay-plugins: Advarsler/Forholdsregler/Begrænsninger

- SpeedX-software kan kun kontrollere analysen af rådata genereret fra testsættet, når det bruges med dets respektive PCR-instrument. Den kontrollerer ikke forberedelse af prøver, reaktioner, programmering af udstyr eller levering af behandling.
- Brugere skal være tilstrækkeligt trænet i brugen af analysesoftwarens **ResistancePlus**[®] MG, og adgangen bør begrænses til hver enkelt autoriseret bruger
- Det anbefales at implementere brugergodkendelsesadgang og cybersikkerhedskontroller såsom antivirussoftware eller brug af en firewall i IT-systemet og infrastrukturen, der bruger softwaren
- Ved opdagelse af en cybersikkerhedshændelse såsom uautoriseret adgang og ransomware-angreb, kontakt venligst tech@speedx.com.au for yderligere support.

7 Tilknyttede produkter og forbrugsvarer

Positivt kontrolmateriale

- **ResistancePlus**[®] MG-positivt kontrolsæt (SpeedX, kat.nr. 95001)

Almindelige forbrugsvarer til laboratorier

- Handsker og rene kitler
- Vortexmixer
- Centrifuge til laboratoriebord til 0,5 mL og 1,5 mL rør
- Mikropipetter
- Sterile aerosol-resistente pipettespidser
- 0,5 mL rør og 1,5 mL rør (PCR-kvalitet)
- 2,0 mL rør (til fortynding af interne kontrolceller)

Til MagNA Pure 96 Instrument

- 1x fosfatbufferet saltvand (PBS)
- MagNA Pure 96 Internal Control Tube (Rør til intern kontrol) (Roche, kat. nr. 00374905001)
- MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit (Roche, kat. nr. 06543588001)
- MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Large Volume Kit (Roche, kat. nr. 06374891001)
- MagNA Pure 96 System Fluid (ekstern) (Roche, kat. nr. 06640729001)
- MagNA Pure 96 Processing Cartridge (Roche, kat. nr. 06241603001)
- MagNA Pure 96 Pure tip 1000 uL (Roche, kat. nr. 6241620001)
- MagNA Pure 96 Output Plate (Roche, kat. nr. 06241611001)
- MagNA Pure Sealing Foil (Roche, kat. nr. 06241638001)

Til MICROLAB STARlet Instrument

- 1x fosfatbufferet saltvand (PBS)
- STARMag 96 X 4 Universal Cartridge kit (384T) kit (Seegene, kat. nr. 744300.4.UC384)
- 2,0 mL rør

Til QIASymphony® SP-instrument

- 1x fosfatbufferet saltvand (PBS)
- Prøveklargøringskassetter, 8 brønde (Qiagen, kat. nr. 997002)
- Overtræk til 8 stænger (Qiagen, kat. nr. 997004)
- Filterspidser, 200 µL og 1500 µL (Qiagen, kat. nr. 990332 og 997024)
- 2 mL-rør (Sarstedt, kat. nr. 72.639 eller 72.694)
- 14 mL polystyrenrør (Corning, kat. nr. 352051)
- DSP Virus/Pathogen Mini Kit (QIAGEN, kat. nr. 937036)

For NucliSENS® easyMAG® instrument

- 1x fosfatbufferet saltvand (PBS)
- NucliSENS® easyMAG® Lysis Buffer 4X1L (Biomérieux, kat. nr. 280134)
- NucliSENS® easyMAG® Lysis Buffer 2ML 48T (Biomérieux, kat. nr. 200292)
- NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica (Biomérieux, kat. nr. 280133)
- NucliSENS® easyMAG® Extraction buffer 1 (Biomérieux, kat. nr. 280130)
- NucliSENS® easyMAG® Extraction buffer 2 (Biomérieux, kat. nr. 280131)
- NucliSENS® easyMAG® Extraction buffer 3 (Biomérieux, kat. nr. 280132)
- NucliSENS® easyMAG® Disposables (Biomérieux, kat. nr. 280135)

Til LightCycler® 480 Instrument II og cobas z 480 analyser

- **PlexPCR®** Colour Compensation (CC)-sæt (SpeedX, kat. nr. 90001)
- LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 (Roche, kat. nr. 04729692001)
- LightCycler® 480 Sealing Foil (Roche, kat. nr. 04729757001)

For Applied Biosystems® 7500 Fast og 7500 Fast Dx

- MicroAmp® Optical 96-well reaction plates (ThermoFisher Scientific, kat. nr. 4316813)
- MicroAmp® Optical Adhesive Film (ThermoFisher Scientific, kat. nr. 4360954)

For Bio-Rad CFX96™ Dx og CFX96 Touch™ Real-time PCR Detection System

- Multiplate™ 96-well PCR plates (Bio-Rad, kat. nr. MLP9601)
- Microseal® 'B' PCR Plate Sealing Film, adhesive, optical (Bio-Rad, kat. nr. MSB1001)

Prøvetagningsenheder

- Multi-Collect prøvetagningssæt (Abbott, Cat no 9K12-01)
- Aptima® urinprøvetagningssæt (Hologic, kat.nr. 301040)
- Aptima® unisex podeprøvetagningssæt (Hologic, kat.nr. 301041)
- DeltaSwab ViCUM® 2 mL + Standard flocked swab (deltalab, kat.nr. 304278)
- Vacumed® urin uden konserveringsmiddel (FL medical, kat.nr. 44950)
- Regular FLOQSwab™ i 1 mL UTM™ medie (Copan kat.nr. 359C)
- cobas® PCR-medie (Roche, kat.nr. 06466281190)

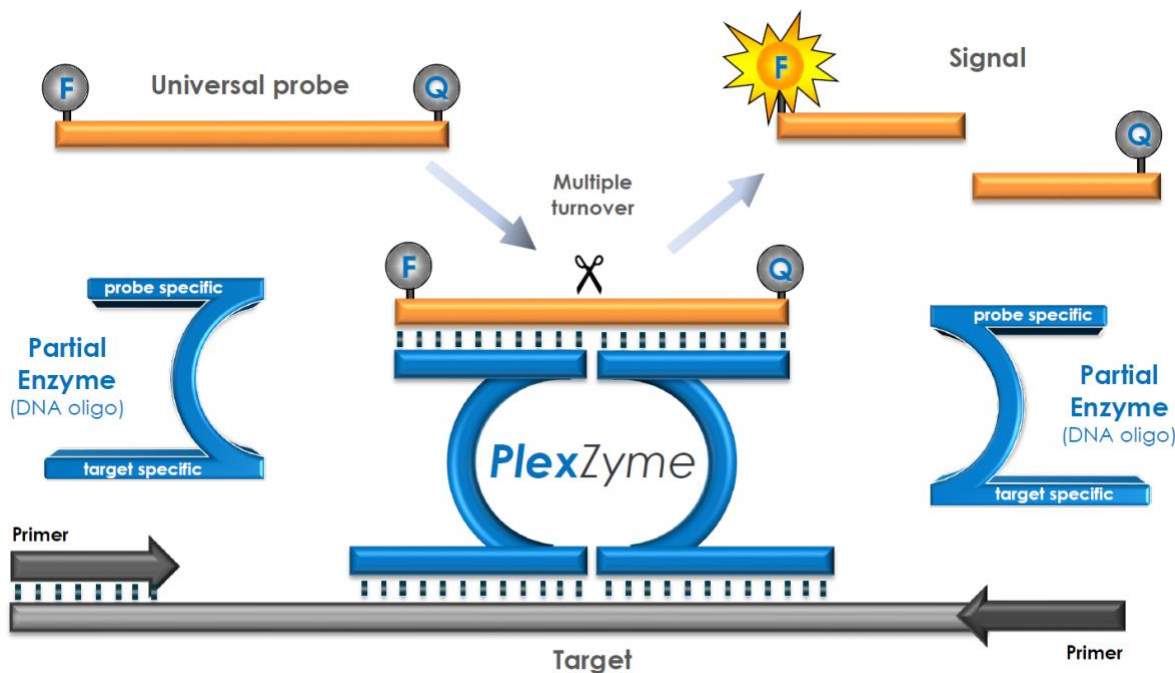
8 Princip for teknologien

PCR (qPCR) i realtid kan bruges til at amplificere og påvise specifikke målnukleinsyrer fra patogener. **PlexPCR**[®] is a qPCR-teknologi, der benytter **PlexZyme**[®]-enzymet som påviser og rapporterer det amplificerede produkt ved at generere et fluorescenssignal (**Figur 1**). **PlexPrime**[®]-primere til specifik amplifikation af mutantsekvenser, som er kombineret med mutantspecifik **PlexZyme**[®]-påvisning (**Figur 2**).

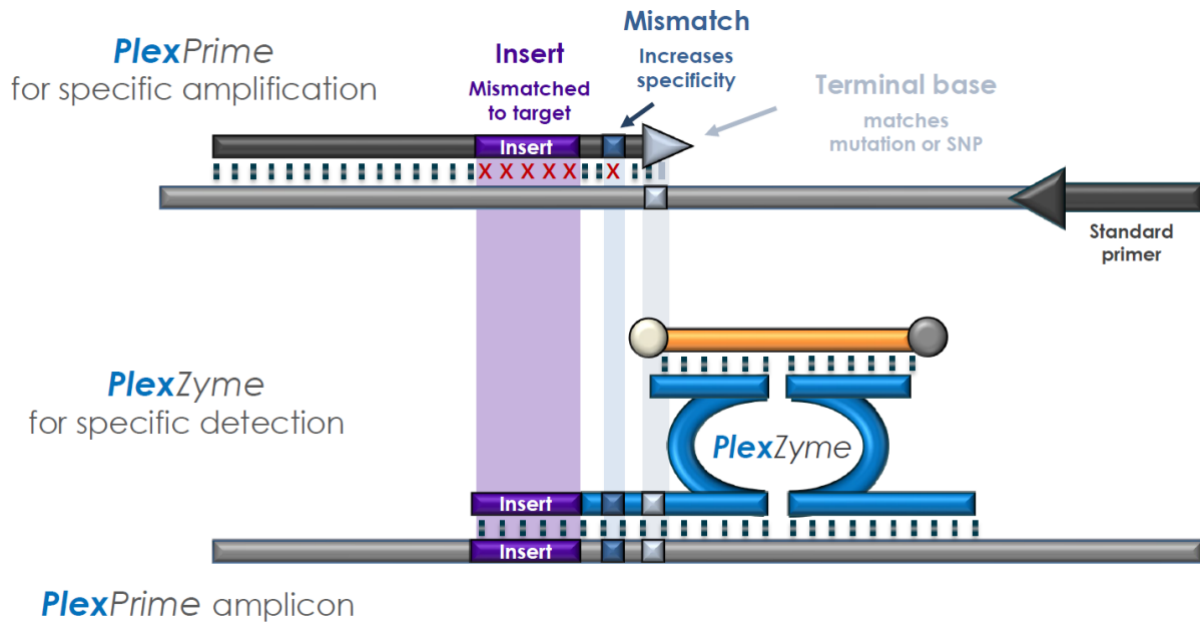
PlexZyme[®]-enzymet er katalytiske DNA-komplekser bestående af to DNA-oligoer, der betegnes "partielle enzymer". Hvert partielt enzym har en målspecifik region, en katalytisk kerne og en region til binding af en universalprobe. Når målproduktet er til stede, bindes de to partielle enzymer ved siden af hinanden og danner det aktive **PlexZyme**[®], som har katalytisk aktivitet med henblik på at kløve en mærket probe. Kløvning adskiller fluorofor- og dæmpningsfarverne, så der fremkommer et fluorescenssignal, der kan monitoreres i realtid. **PlexZyme**[®]-enzymet har yderligere specificitet i forhold til andre påvisningsteknologier, idet der kræves binding af to partielle enzymer for at foretage påvisning. **PlexZyme**[®]-enzymet er også et enzym med multiple reaktioner, og der kan kløves multiple prober under hver PCR-cyklus, hvilket giver et kraftigt og følsomt signal. **PlexZyme**[®]-assays er yderst følsomme og specifikke, og de er ideelt egnede til den multiplekserede påvisning af patogener.

PlexPrime[®]-primere har tre funktionelle regioner. Den lange 5'-region forankrer primeren til et bestemt sted, og den korte 3'-region er selektivt rettet mod forlængelser fra den mutante base. En indsættelsessekvens ligger mellem 5'- og 3'-regionerne og fungerer som en forbindelsesstruktur, der indsætter en måluafhængig sekvens i den resulterende amplikon og øger det selektive tryk fra 3'-regionen. I multiplex er hver **PlexPrime**[®] primer designet til at være rettet mod en specifik mutant base og inkorporerer en unik indsættelsessekvens, hvilket frembringer særlige mutante amplikonsekvenser. I modsætning til andre probebaserede påvisningsteknologier kan **PlexZyme**[®] enzymet overlappes med **PlexPrime**[®] primeren og rettes mod den specifikke mutantamplikon, som indeholder den mutante base og inkorporerede indsættelsessekvens. Den unikke kombination af **PlexPrime**[®] primere forbundet med **PlexZyme**[®] enzymer gør det muligt at foretage specifik amplifikation af mutante sekvenser og følsom og specifik påvisning i multiplex.

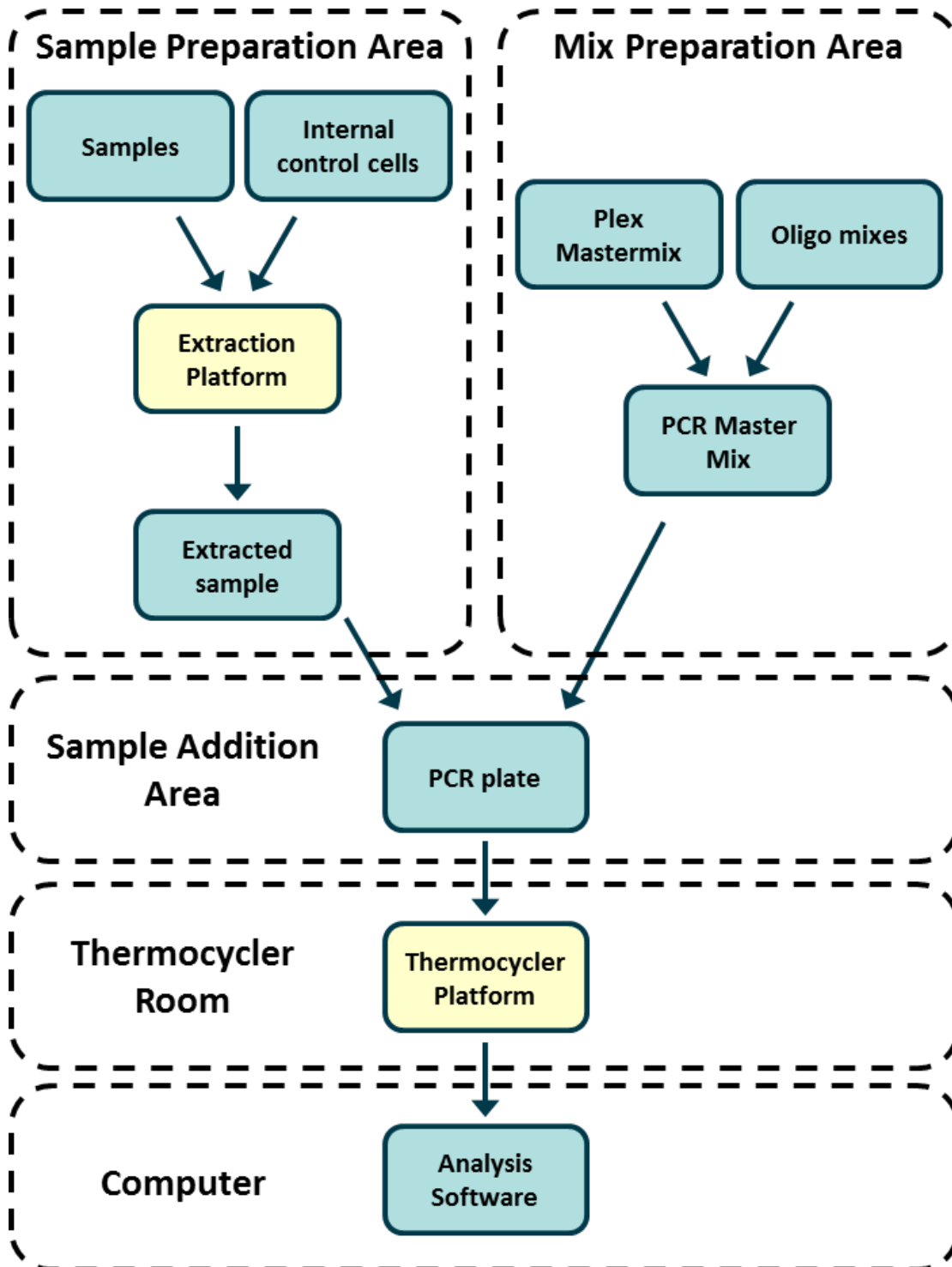
Figur 1. Skematisk fremstilling af **PlexZyme**[®] påvisning og universel signalering



Figur 2. Schematisk fremstilling af *PlexPrime*[®]-primeren kombineret med *PlexZyme*[®]-påvisning. *PlexPrime*[®] primeren amplificerer specifikt mutantsekvens, og *PlexZyme*[®] enzymer påviser specifikt ampliconet.



9 Procedureoversigt



10 Detaljeret procedure

Bemærk: Navne på medfølgende reagenser angives i kursiv og efterfølges af farven på rørets hætte i parentes.

10.1 Prøveindsamling, transport og opbevaring

Urinprøver fra mænd, urinprøver fra kvinder, urethrale, anale, rektale, pharyngeale, penile, penile meatale, cervikale, endocervikale og vaginale podninger, fra symptomatiske eller asymptomatiske patienter, skal indsamles, transporteres og opbevares efter standardmetoder for laboratorier eller i overensstemmelse med anvisningerne i indsamlingssættet.

10.1.1 Godkendte prøvetagningsenheder

Utilstrækkelig eller ukorrekt prøvetagning, opbevaring og transport vil sandsynligvis føre til falske prøvesvar. Undervisning i korrekt prøvetagning er stærkt anbefalet for at sikre prøvens kvalitet og stabilitet.

Prøvetagningsenheder, der er godkendt med **ResistancePlus**[®] MG-sættet, er anført nedenfor med en kort vejledning mht. instruktioner til prøvetagning, -håndtering og -transport fra enhedens producent. Disse instruktioner har ikke til hensigt at erstatte eller træde i stedet for eventuelle instruktioner, som producenten tilvejebringer. Der henvises altid til instruktionerne fra prøvetagningsenhedens producent i forbindelse med korrekte prøvetagningsmetoder.

Før ibrugtagning af en prøvetagningsmetode skal uddannet personale sikre korrekt forståelse af enheden og metoden. Gennemgå som det mindste testbeskrivelsen for følgende: angivelse af prøvetype, tilstrækkelig volumen, procedure(r), nødvendigt prøvetagningsmateriale, klargøring af patient samt korrekte håndterings- og opbevaringsinstruktioner.

10.1.2 Ufortyndet urinopsamling, transport og opbevaring

1. Det anbefales at anvende et gennemsigtigt urinopsamlingsbæger uden konserveringsmidler eller transportmedier til patientens egen opsamling.
2. Patienten bør opsamle 20-50 mL af den allerførste urin ved vandladning og sætte eller -skruer låget godt på.
3. Det anbefales at bruge to poser samt absorberende materiale til transport af urinprøven. Urinprøvens opbevaringstemperatur afhænger af den tilsligtede behandlingstid.

10.1.3 Opsamling, transport og opbevaring af tør podning

Tør podning kan anvendes til forskellige prøveopsamlinger foretaget af kliniker eller patient. På grund af variabiliteten henvises til producentens indlægsseddel angående passende prøvetyper og opsamlingsmetoder.

10.1.4 Opsamling, transport og opbevaring af Multi-Collect-prøvetagningssæt (Abbott, kat.nr. 9K12-01)

Retningslinjerne er opsummeret nedenfor mht. opsamling og transport af urin-, vaginal podeprøver og uretralpodning fra mænd med Multi-Collect-prøvetagningssæt (Abbott, kat.nr. 9K12-01).

10.1.4.1 Opsamling, transport og opbevaring af urinprøver

1. Patienten bør ikke have urineret i mindst én time før prøvetagning.
2. Kassér podeprøveopsamlingsspinden. Den er ikke påkrævet til urinprøvetagning.
3. Patienten skal bruge et urinprøveopsamlingsbæger og opsamle de første 20 til 30 mL ved vandladning (den første del af strålen).
4. Skru hættens af transportrøret, og vær forsigtig ikke at spilde den indeholdte transportbuffer.
5. Hættens og røret skal håndteres forsigtigt for at undgå kontaminering.
6. Brug plastikoverførselspipetten til at overføre urin fra opsamlingsbægeret til transportrøret, indtil væskenniveauet i røret falder inden for det klare påfyldningsvindue på transportrørets etiket, ellers skal der tages en ny prøve. Må ikke overfyldes. Det kan være nødvendigt med lidt mere end én fuld klemning af overførselspipetten for at overføre den nødvendige mængde urinprøve.
7. Sæt omhyggeligt hættens tilbage på transportrøret. Sørg for, at hættens sidder helt tæt.
8. Sæt en klæbemærkat på transportrøret med prøveidentifikationsoplysninger, herunder dato for opsamling. Vær opmærksom på ikke at tildække transportrørets påfyldningsvindue.
9. Efter opsamling skal røret transporteres og kan opbevares ved 2 °C til 30 °C i op til 14 dage. Hvis længere opbevaring er nødvendig, kan de opbevares ved -10° C eller derunder i op til 90 dage.

10.1.4.2 Opsamling, transport og opbevaring af vaginal podeprøve

1. Kasser engangsoverførselspipetten. Den er ikke påkrævet til vaginal podeprøveopsamling.

2. Fjern den sterile podepind fra indpakningen, og vær forsigtig ikke at røre noget med podespidsen eller lægge den ned på en overflade.
3. Indfør podeprøveopsamlingsspindens hvide spids ca 5 cm (to tommer) ind i skedeåbningen.
4. Drej forsigtigt podepinden i 15 til 30 sekunder mod skedens sider.
5. Træk forsigtigt podepinden tilbage.
6. Hætten og røret skal håndteres forsigtigt for at undgå kontaminering.
7. Skru hætten til transportrøret af, og anbring straks podeprøveopsamlingsspinden i transportrøret, så den hvide spids vender nedad.
8. Bryd forsigtigt podepinden ved skaftets rillede linje. Vær forsigtig, så indholdet ikke spildes.
9. Sæt hætten på transportrøret igen. Sørg for, at hætten sidder helt tæt.
10. Sæt en klæbemærkat på transportrøret med prøveidentifikationsoplysninger, herunder dato for opsamling.
11. Efter indsamling kan transportglas transporteres og opbevares ved 2° C til 30° C i op til 14 dage. Hvis længere opbevaring er nødvendig, kan de opbevares ved -10° C eller derunder i op til 90 dage.

10.1.4.3 Prøvetagning, transport og opbevaring af uretralpodning fra mænd

1. Patienten bør ikke have urineret i mindst én time før prøvetagning.
2. Kasser engangsoverførselspipetten. Den er ikke påkrævet til uretralpodningsopsamling fra mænd.
3. Fjern den sterile podepind fra indpakningen, og vær forsigtig ikke at røre noget med podespidsen eller lægge den ned på en overflade.
4. Indfør podeprøveopsamlingsspindens hvide spids 2 til 4 cm (3/4 til 1,5 tommer) ind i urinrøret.
5. Drej forsigtigt podepinden i 2 til 3 sekunder for at sikre tilstrækkelig prøvetagning.
6. Træk forsigtigt podepinden tilbage.
7. Hætten og røret skal håndteres forsigtigt for at undgå kontaminering.
8. Skru hætten til transportrøret af, og anbring straks podeprøveopsamlingsspinden i transportrøret, så den hvide spids vender nedad.
10. Bryd forsigtigt podepinden ved skaftets rillede linje. Vær forsigtig, så indholdet ikke spildes.
11. Sæt hætten på transportrøret igen. Sørg for, at hætten sidder helt tæt.
12. Sæt en klæbemærkat på transportrøret med prøveidentifikationsoplysninger, herunder dato for opsamling.
13. Efter indsamling kan transportglas transporteres og opbevares ved 2° C til 30° C i op til 14 dage. Hvis længere opbevaring er nødvendig, kan de opbevares ved -10° C eller derunder i op til 90 dage.

10.1.5 Aptima® urinprøvetagningssæt (Hologic, kat.nr. 301040) opsamling, transport og opbevaring

Retningslinjerne er opsummeret nedenfor mht. opsamling af urinprøver med Aptima®-urinprøvetagningssæt fra mænd og kvinder.

1. Det anbefales at anvende et gennemsigtigt urinopsamlingsbæger uden konserveringsmidler eller transportmedier til patientens egen opsamling.
2. Patienten anvises i at levere 20-30 mL af den allerførste urin ved vandladning i det medfølgende urinopsamlingsbæger. Kvindelige patienter bør ikke rengøre labialområdet før prøveopsamling.
3. Brug pipetten og transportrøret, der følger med Aptima®-urinopsamlingssættet, og overfør 2 mL urin med pipetten til transportrøret uden hætte. En urinvolumenlinje er korrekt, når den følger de sorte påfyldningslinjer på urintransportrøret. Urin skal overføres fra det gennemsigtige sterile urinbæger til Aptima-urinprøvetagningstrøret inden for 24 timer efter opsamling.
4. Sæt hætten godt fast på urintransportrøret.
5. Efter opsamling skal behandlede urinprøver i Aptima-urinprøvetransportrør transporteres og opbevares ved 2 °C til 30 °C, indtil de testes. Der henvises til producentens instruktioner for detaljeret oplysninger om optimeret opbevaring.

10.1.6 Aptima® unisex podeprøvetagningssæt (Hologic, kat.nr. 301041) opsamling, transport og opbevaring

Retningslinjerne er opsummeret nedenfor mht. opsamling og transport af endocervikale podeprøver og uretralpodning fra mænd med Aptima® unisex podeprøvetagningssæt (Hologic, kat.nr. 301041).

10.1.6.1 Endocervikal podeprøvetagning, transport og opbevaring

1. Fjern overskydende slim fra livmoderhalsen og den omgivende slimhinde med rensesepdepinden (podepind med hvidt skaft i pakken med rød skrift). Kassér denne podepind. Bemærk: For at fjerne overskydende slim fra livmoderhalsen kan man anvende en podepind med stort hoved (medfølger ikke).
2. Indfør podeprøveopsamlingsspinden (podepind med blått skaft i pakken med grøn skrift) i livmoderhalskanalen.
3. Drej forsigtigt podepinden med uret i 10 til 30 sekunder i livmoderhalskanalen for at sikre tilstrækkelig prøvetagning.
4. Træk podepinden forsigtigt tilbage. Undgå enhver form for kontakt med vaginalslimhinden.
5. Fjern hætten fra podeprøvetagningstransportrøret, og anbring straks podeprøveopsamlingspinden i transportrøret.
6. Bræk forsigtigt podepindens skaft af mod siden af røret ved linjen, og kassér den øverste del af podepindens skaft. Vær forsigtig, så indholdet ikke spildes.
7. Sæt hætten godt fast på podeprøvetransportrøret. Efter opsamling skal podeprøven transporteres og opbevares i podeprøvetransportrøret ved 2 °C til 30 °C, indtil testen.

10.1.6.2 Prøvetagning, transport og opbevaring af uretralpodning fra mænd

1. Patienten bør ikke have urineret i mindst 1 time før prøvetagning.
2. Indfør podeprøveopsamlingspinden (blåt skaft i pakken med grøn skrift) 2 til 4 cm i urinrøret.
3. Drej forsigtigt podepinden med uret i 2 til 3 sekunder i urinrøret for at sikre tilstrækkelig prøvetagning.
4. Træk forsigtigt podepinden tilbage.
5. Fjern hæften fra podeprøvetagningstransportrøret, og anbring straks podeprøveopsamlingspinden i transportrøret.
6. Bræk forsigtigt podepindens skaft af mod siden af justeringslinjen, og kassér den øverste del af podepindens skaft. Vær forsigtig, så indholdet ikke spildes.
7. Sæt hæften godt fast på podeprøvetransportrøret. Efter opsamling skal podeprøven transporteres og opbevares i podeprøvetransportrøret ved 2 °C til 30 °C, indtil testen.

10.1.7 Prøvetagning, transport og opbevaring af DeltaSwab ViCUM® 2 mL + Standard flocced swab (deltalab, kat.nr. 304278)

Retningslinjerne er opsummeret nedenfor mht. opsamling og transport af vaginal-, cervikal-, uretral-, svælg- og rektale podeprøver med DeltaSwab ViCUM® 2 mL + Standard flocced swab (deltalab, kat.nr. 304278).

1. Åbn peel-pakningen med begge hænder ved at trække i hver sin ende.
2. Omryst røret med blide bevægelser.
3. Åbn pose, og opsaml prøven med podepinden.
4. Åbn røret med den anden hånd, og anbring podepinden indeni, så den er dækket med medie.
5. Sørg for, at podepindens brudpunkt er ud for rørets top, og tryk podepinden let ned. Bryd podepinden ved brudpunktet ved at støtte den på rørets indvendige kant.
6. Kassér det overskydende stykke af pinden. Skru hæften godt på, og ryst prøven for at eluere den i mediet.
8. Efter opsamling skal podeprøven transporteres og opbevares i podeprøvetransportrøret ved 4 °C til 25 °C, indtil testen.

10.1.8 Opsamling, transport og opbevaring af Vacumed® urin uden konserveringsmiddel (FL Medical, kat.nr. 44950)

Retningslinjerne er opsummeret nedenfor mht. opsamling og transport af urin fra mænd og kvinder med Vacumed® urinopsamlingsrør uden konserveringsmiddel (FL Medical, kat.nr. 44950)

1. Åbn urinopsamlingsbeholderens hætte, og læg den omvendt på en ren overflade.
2. Rør ikke ved beholderens og hættens indvendige overflader.
3. Opsaml urinprøven. Fyld beholderen op til ¾ af dens kapacitet.
4. Sæt hæften på, og drej den stramt i urets retning, så den er tæt.
5. Ryst forsigtigt prøven.
6. Løft beskyttelsesmærkaten delvist (den må ikke fjernes helt).
7. Indfør prøverøret, og tryk let til. Hold røret tilsluttet, indtil det er fyldt (tilstrømning afsluttet).
8. Fjern prøverøret, og sæt beskyttelsesmærkaten helt på igen.
9. Opbevar prøveglasset mellem 4 °C til 25 °C, indtil testen.

10.1.9 Prøvetagning, transport og opbevaring af UTM™-medie (Copan kat.nr. 359C)

Retningslinjer er opsummeret nedenfor mht. opsamling og transport af vaginal podeprøver med Regular FLOQSwab™ i 1 mL UTM™-medie (Copan kat.nr. 359C)

1. Åbn UTM-sættets pakke, og fjern mediets prøverør samt den indvendige pose med den sterile podepind.
2. Tag den sterile podepind ud af posen, og opsaml den kliniske prøve. Sørg for, at podespidsen kun kommer i kontakt med opsamlingsstedet for at undgå risiko for kontaminering.
3. Efter prøvetagning skrues hæften af prøverøret. Vær omhyggelig med ikke at spilde mediet.
4. Indfør podepinden i prøverøret, indtil brudpunktet er lige ud for prøverørets åbning.
5. Bøj og bryd podepinden ved brudpunktet ved at holde prøverøret væk fra ansigtet, og kassér den overskydende del.
6. Skru hæften tilbage på prøverøret, og forsegl det hermetisk.
7. Behandl prøven i UTM i 48 timer fra opsamling. Opbevar prøverøret ved 2-25 °C.
8. Før behandling, skal den ophvirvles i 20 sekunder for at fremme prøvens frigørelse fra podepinden og for at homogenisere mediet.

10.1.10 Opsamling, transport og opbevaring af cobas® PCR-medie (Roche, kat.nr. 06466281190)

Retningslinjerne er opsummeret nedenfor mht. opsamling og transport af urin fra mænd og kvinder med cobas® PCR-medie (Roche, kat.nr. 06466281190).

1. Bland og overfør urinen til cobas® PCR-medie vha. en engangspipette (medfølger ikke). Bemærk: Urin kan opbevares ved 2 °C til 30 °C i op til 24 timer før overførsel til cobas® PCR-medierør.
2. Den korrekte mængde urin er tilføjet, når væskestanden ligger mellem de to sorte linjer på rørmærkaten.
3. Sæt hæften godt fast på cobas® PCR-medierøret.
4. Vend prøveglasset på hovedet 5 gange for at blande. Prøven er nu klar til transport og testning.

5. Transportér og opbevar cobas® PCR-medierøret med den stabiliserede urinprøve ved 2 °C til 30 °C.

10.1.11 Godkendte prøvetagningsekstrakter

Prøvetagningsekstrakter godkendt til brug omfatter:

- cobas® x480 (fra CT/NG-protokol)

Se **afsnit 10.5** angående instruktioner i klargøring af PCR med ekstraherede nukleinsyrer (reflex-workflow).

10.2 Prøvebehandling

ResistancePlus® MG-sættet er blevet valideret på følgende ekstraktionsinstrumenter i **Tabel 4**.

Se **afsnit 10.3** for anvisninger om brug med Internal Control (intern kontrol).

Tabel 4. Validerede ekstraktionsprotokoller				
Instrument	Ekstraktionssæt	Prøvevolumen	Protokol	Elueringsvolumen
MagNA Pure 96 ^a	MagNA Pure 96 DNA og Viral NA Small Volume Kit	200 µL	Pathogen Universal 200	50 µL eller 100 µL
MagNA Pure 96 ^a	MagNA Pure 96 DNA og Viral NA Large Volume Kit	1000 µL [^]	Viral NA Universal LV 1000 3.1	100 µL
MICROLAB STARlet IVD ^b	STARMag 96 X 4 universalkassettesæt (Seegene)	300 µL	10 µL opløste Interne kontrolceller tilføjet pr. prøve Vælg 'Pause before PCR setup' (hold pause før PCR-opsætning) for kun at foretage prøveekstraktion	100 µL
QIAAsymphony SP ^c	DSP Virus/Pathogen Mini Kit	200 µL	Complex200_V6_DSP	110 µL
NucliSENS® easyMAG ^{®d}	NucliSENS® easyMAG [®] reagenser	200 µL podning	Generelt 2.01; "On-board" arbejdsflow	100 µL
		1000 µL urin	Generelt 2.01; "Off-board" arbejdsflow	100 µL

^a Se 10.3.1 forklarer, hvordan den interne kontrol anvendes med MagNA Pure 96

^b Se 10.3.2 forklarer, hvordan den interne kontrol bruges med STARlet IVD

^c Se 10.3.3 forklarer, hvordan den interne kontrol bruges med QIAAsymphony SP

^d Se 10.3.4 forklarer, hvordan den interne kontrol bruges med NucliSENS® easyMAG[®]

[^] Øg input af prøvevolumen for prøver indsamlet i medier (f.eks. Aptima Collection-sæt)

10.3 Internal Control (intern kontrol) (IC)

Sættet indeholder en intern kontrol til at monitorere ekstraktionseffektivitet og qPCR-hæmning. Det interne kontrolassay leveres i form af en *Control Mix* (kontrolblanding) (**HVID**) og *Internal Control Cells* (interne kontrolceller) (**RØD**). *Control Mix* (kontrolblanding) tilsættes PCR Master Mix (PCR-masterblanding) (**Tabel 11**). De *Internal Control Cells* (interne kontrolceller) indeholder DNA-skabelonen for intern kontrol. De *Internal Control Cells* (interne kontrolceller) fortyndes og behandles som angivet nedenfor for specifikke ekstraktionsinstrumenter. Derfor co-ekstraheres DNA-skabelonen for intern kontrol med prøven og co-amplificeres i reaktionen.

10.3.1 Internal Control (intern kontrol) på MagNA Pure 96

Fortynd de *interne kontrolceller* (**RØD**) 1 i 200 i 1x PBS (**Tabel 5**). Juster volumen efter behov med samme fortyndingsfaktor (se manualen til ekstraktionssættet for mindste volumen for det krævede antal prøver). De fortyndede interne kontrolceller fyldes i det interne kontrolrør på MagNA Pure 96:

- Til sættet MagNA Pure 96 DNA og Viral NA Small Volume (Protokol: Pathogen Universal 200) tilføjes automatisk 20 µL til hver prøve (standard).

- Til sætterne MagNA Pure 96 DNA og Viral NA Large Volume (Viral NA Universal LV 1000 3.1 protokol) opdeles prøvevolumen og forarbejdes i to separate brønde i MagNA Pure 96 forarbejdningspatronen. Der tilføjes automatisk i alt 40 µL fortyndede interne kontrolceller til hver prøve (20 mL pr. brønd i forarbejdningspatronen).

Bemærk: Fortyndede Internal Control Cells (interne kontrolceller) må IKKE opbevares

Tabel 5. Fortynding af Internal Control Cells (interne kontrolceller) til MagNA Pure 96 (1 ud af 200 fortynding)			
Interne kontrolceller (RØD) (µL)	1x PBS (µL)	Samlet volumen (µL)	Volumen tilsat prøven (µL)
18	3582	3600	20

10.3.2 Internal Control (intern kontrol) på MICROLAB STARlet IVD

Fortynd *Internal Control Cells* (de interne kontrolceller) (RØD) 1:200 i 1x PBS (Tabel 6). Juster volumen efter behov ved hjælp af den samme fortyndingsfaktor (se vejledningen til ekstraktionssættet med hensyn til minimumvolumen for det påkrævede antal prøver). De fortyndede interne kontrolceller sættes i et 2 mL rør og placeres på reagensstativet, hvor hver prøve automatisk tilsættes 10 µL.

Bemærk: Fortyndede Internal Control Cells (interne kontrolceller) må IKKE opbevares

Tabel 6. Fortynding af Internal Control Cells (interne kontrolceller) til MICROLAB STARlet IVD (1:20 fortynding)			
Interne kontrolceller (RØD) (µL)	1x PBS (µL)	Samlet volumen (µL)	Volumen tilsat prøven (µL)
50	950	1000	10

10.3.3 Internal Control (intern kontrol) på QIASymphony® SP

Fortynd *Internal Control Cells* (de interne kontrolceller) (RØD) 1:200 i 1x PBS (Tabel 7). Juster volumen efter behov med brug af samme fortyndingsfaktor i forhold til det ønskede antal prøver.

Bemærk: Fortyndede Internal Control Cells (interne kontrolceller) må IKKE opbevares

Tabel 7. Fortynding af Internal Control Cells (interne kontrolceller) til QIASymphony® SP (fortynding 1:50)		
Interne kontrolceller (RØD) (µL)	1x PBS (µL)	Samlet volumen (µL)
40	1950	2000

De fortyndede *Internal Control cells* (interne kontrolceller) bruges derefter til at klargøre en intern kontrol-carrier RNA-Buffer AVE-blanding som vist i Tabel 8 nedenfor. Juster volumen efter behov med brug af den samme fortyndingsfaktor ud fra det ønskede antal prøver (se vejledningen til ekstraktionssættet med hensyn til minimumvolumen for det påkrævede antal prøver). Den interne kontrol-carrier RNA-buffer AVE-blanding skal klargøres umiddelbart før start på kørslen.

Den interne kontrol-carrier RNA-buffer AVE-blanding sættes i et rør, der placeres i en rørbærer og lægges i slot A i prøveskuffen i QIASymphony® SP. 120 µL (standard) af blandingen tilsættes til hver prøve.

Tabel 8. Klargøring af Internal Control (intern kontrol)-carrier RNA-buffer AVE-blanding til QIASymphony SP

Rørtype	Antal prøver	Volumen af fortyndede IC-celler (µL)	Stock carrier RNA (µL)	Buffer AVE (µL)	Samlet volumen (µL)
-	1	10	3	107	120
2 mL	1 + dødvolumen [^]	40	12	428	480
14 mL	1 + dødvolumen [#]	60	18	642	720

[^] 2 mL rør kræver 3 ekstra prøver (360 µL) af hensyn til dødvolumen

[#] 14 mL tube kræver 5 ekstra prøver (600 µL) af hensyn til dødvolumen

10.3.4 Intern kontrol på easyMAG[®]

Fortynd *Internal Control Cells* (de interne kontrolceller) (**RØD**) 1:200 i 1x PBS (**Tabel 9**). Juster volumen efter behov med brug af samme fortyndingsfaktor. Klargør en "forblanding" af fortyndede interne kontrolceller og NucliSENS[®] easyMAG[®] Magnetic Silica til det ønskede antal prøver (**Tabel 10**). Der kræves 100 µL forblanding pr. prøve.

Bemærk: Fortyndede Internal Control Cells (interne kontrolceller) må IKKE opbevares

Tabel 9. Fortynding af Internal Control Cells (interne kontrolceller) til NucliSENS[®] easyMAG[®] (fortynding 1:200)

Interne kontrolceller (RØD) (µL)	1x PBS (µL)	Samlet volumen (µL)	Fortyndingsfaktor
10	1990	2000	200

Tabel 10. Forblanding af NucliSENS[®] easyMAG[®] Magnetic Silica og fortyndede, interne kontrolceller

Antal prøver	Volumen af fortyndede IC-celler (µL)	Volumen af Magnetic Silica (µL)	Volumen tilsat prøven (µL)
1	50	50	100

"On-board" eller "off-board" arbejdsflow vil blive anvendt afhængigt af prøvetypen. "Off-board" arbejdsflow bruges til optimal nukleinsyre-inddrivelse af urinprøver. Se NucliSENS[®] easyMAG[®] brugervejledningen for flere oplysninger.

"On-board" arbejdsflow (podepinde)

Overfør prøverne til prøvebeholderen.

Indfør prøvebeholderne i easyMAG.

Programmér følgende ekstraktionsanmodninger:

Protokol: Generel 2.0.1 (for software version 2.0)

Matrix: Anden

Volumen (mL): 0,200

Eluat (µL): 100 µL

Type: Primær

Efter on-board lysis tilføjes 100 µL af det forblandede silica til hver prøve.

Fortsæt ekstraktionsprocessen.

"Off-board" arbejdsflow (urin)

Spin NucliSENS Lysis Buffer-røret kortvarigt ned, og tilføj 1000 µL urin. Vortex-røret.

Lad blandingen stå ved stuetemperatur i 10 minutter.

Efter lysis overføres lysaterne til prøvebeholderne og indføres i easyMAG.

Tilføj 100 µL af det forblandede silica til hver prøve.

Programmér følgende ekstraktionsanmodninger:

Protokol: Generel 2.0.1 (for software version 2.0)

Matrix: Anden

Volumen (mL): 1.000

Eluat (µL): 100 µL

Type: Lyseret

Fortsæt ekstraktionsprocessen.

10.4 Klargøring af realtids-PCR

Bemærk: Før brug af reagenserne skal de optøs fuldstændig og blandes grundigt ved kortvarig brug af vortexmixer

Se **Tabel 1 - Tabel 3** for en beskrivelse af sættets indhold.

10.4.1 Klargøring af masterblanding

Fremstil masterblandingen som angivet i **Tabel 11**.

Til et 20 µL reaktionsvolumen skal der bruges 15 µL masterblanding og 5 µL prøve. Pipetter masterblandingen over i PCR-pladen, og tilsæt derefter den ekstraherede prøve til reaktionen.

Der skal inkluderes en ikke-skabelonkontrol (NTC) i hver kørsel. Til NTC-reaktionen tilsættes *Nuclease Free Water* (nukleasefrit vand) (**NEUTRAL**) i stedet for prøve.

Forsegl pladen, centrifuger den og overfør den til termocykler.

Tabel 11. Masterblanding		
Reagens	Koncentration	Volumen pr. 20 µL reaktion (µL)
Nuclease Free Water (Nukleasefrit vand) (NEUTRAL)	Ikke relevant	3.0
Plex -masterblanding (BLÅ)	2x	10.0
MG+23S blanding (BRUN)	20x	1.0
Control Mix (kontrolblanding)* (HVID)	20x	1.0
Samlet volumen (µL)		15.0
Tilsæt 5 µL prøve, så det afsluttende volumen bliver 20 µL		

* Control Mix (kontrolblandingen), der leveres med hvert sæt, er specifik for det anvendte PCR-instrument. Se i **Tabel 1 - Tabel 3**, hvilken Control Mix (kontrolblanding) det er korrekt at bruge

10.4.2 Masterblandingsens stabilitet

Masterblandingen kan klargøres i stor mængde og opbevares ved -20 °C i op til 4 uger eller opbevares ved 4 °C i op til 1 uge.

10.5 Klargøring af PCR med ekstraherede nukleinsyrer (reflex-workflow)

Nukleinsyreekstrakter opnået uden tilsætning af *Interne kontrolceller* (RØD) til prøver kan testes ved hjælp af **ResistancePlus**[®] MG-sættet.

Denne procedure skal kun følges for ekstrakter, der:

tidligere er blevet testet på en alternativ analyseplatform i henhold til producentens brugsanvisning, og hvor den tidligere udførte test genererede et gyldigt resultat.

Masterblanding skal fremstilles i henhold til **afsnit 10.4.1**. I forbindelse med reflekstest findes den interne kontrol ikke i prøveekstraktet. Kontrolblandingen skal dog inkluderes som beskrevet i afsnit **10.4.1**.

Se **Tabel 1 - Tabel 3** for en beskrivelse af sættets indhold.

Fremstil reaktionsblandingen som angivet i **Tabel 11**. Til et 20 µL reaktionsvolumen skal der bruges 15 µL masterblanding og 5 µL prøve. Pipetter masterblandingen over i PCR-pladen, og tilsæt derefter den ekstraherede prøve til reaktionen.

Der skal inkluderes en ikke-skabelonkontrol (NTC) i hver kørsel. Til NTC-reaktionen tilsættes *Nuclease Free Water* (nukleasefrit vand) (**NEUTRAL**) i stedet for prøve. Forsegl pladen, centrifuger den, og overfør den til termocykler.

11 Programmering og analyse

Oplysninger om programmering og analyse er beskrevet i **afsnit 19 - afsnit 23**.

ResistancePlus[®] MG-sættet bruger tre kanaler til påvisning af *M. genitalium*, 23S rRNA-mutation and intern kontrol (**Tabel 12**).

ResistancePlus[®] MG-softwaren er begrænset til analyse af resultater svarende til nukleinsyreekstrakter opnået ved tilsætning af *Internal Control Cells* (interne kontrolceller) (RØD) til prøver.

For nukleinsyreekstrakter opnået uden tilsætning af *interne kontrolceller* (RØD) til prøver skal **ResistancePlus**[®] MG-softwaren anvendes. The REFLEX **ResistancePlus**[®] MG-softwaren har to kanaler til påvisning af *M. genitalium* og 23S rRNA-mutation (**Tabel 13**).

Denne procedure skal kun følges for ekstrakter, der:

tidligere er blevet testet på en alternativ analyseplatform i henhold til producentens brugsanvisning, og hvor den tidligere udførte test genererede et gyldigt resultat.

Tabel 12. Kanaler til ResistancePlus [®] MG-mål			
Instrument	Kanal A	Kanal B	Kanal C
	<i>M. genitalium</i> -påvisning (MgPa)	23S rRNA-mutation	Intern Control (intern kontrol)
LC480 II	465-510	533-580	533-640
z 480	465-510	540-580	540-645
7500 Fast og 7500 Fast Dx	FAM	JOE	TAMRA
CFX96 Dx og CFX Touch	FAM	HEX	Quasar 705

Tabel 13. Kanaler til ResistancePlus [®] MG-mål til reflex-workflow		
Instrument	Kanal A	Kanal B
	<i>M. genitalium</i> -påvisning (MgPa)	23S rRNA-mutation
LC480 II	465-510	533-580
z 480	465-510	540-580
7500 Fast og 7500 Fast Dx	FAM	JOE
CFX96 Dx og CFX Touch	FAM	HEX

12 Fortolkning af resultater

Datafortolkning kræver **ResistancePlus**[®] MG-analysesoftwaren. Mens **PlexPrime**[®] primere giver højere specificitet end andre allel-specifikke primere, kan en vis ikke-specifik amplifikation fra 23S rRNA-mutationsassayet ses i prøver, der indeholder høje koncentrationer af *M. genitalium*-vildtype 23S rRNA. **ResistancePlus**[®] MG-analysesoftwaren automatiserer datafortolkningen af amplifikationsresultater og gør arbejdsflowet mere effektivt. Anvisninger i brug af analysesoftwaren er beskrevet i **afsnit 24**.

Se **Tabel 14** for den relevante analysesoftware til hvert realtids-PCR-instrument. Analysesoftwaren kan leveres efter anmodning. Kontakt tech@speedx.com.au for at få flere oplysninger.

Tabel 14. ResistancePlus [®] MG-analysesoftware		
Kat. nr.	Analysesoftware*	Realtids-PCR-instrument
99003	ResistancePlus [®] MG (LC480)	LC480 II
99018	ResistancePlus [®] MG (z 480)	z 480
99002	ResistancePlus [®] MG (7500)	7500 Fast og 7500 Fast Dx
99008	ResistancePlus [®] MG (CFX)	CFX96 Dx og CFX96 Touch
99023	REFLEX ResistancePlus [®] MG (LC480)	LC480 II
99024	REFLEX ResistancePlus [®] MG (z480)	z 480
99026	REFLEX ResistancePlus [®] MG (7500)	7500 Fast og 7500 Fast Dx
99025	REFLEX ResistancePlus [®] MG (CFX)	CFX96 Dx og CFX96 Touch

* Se websitet <https://plexpcr.com/products/sexually-transmitted-infections/resistanceplus-mg/#resources> for at sikre, at du bruger den nyeste version af analysesoftwaren

13 Begrænsninger

- **ResistancePlus**[®] MG-assayet målretter *MgPa*-genet for *M. genitalium* og mutationer i position 2058 og 2059 i 23S rRNA-genet (A2058G, A2059G, A2058T, A2058C, A2059C, *E. coli*-nummerering), der er forbundet med resistens over for azithromycin (makrolidbaseret antibiotikum).
- **ResistancePlus**[®] MG-assayet må kun udføres af personale, der er uddannet i proceduren, og skal udføres i overensstemmelse med denne brugsanvisning.
- Pålidelige resultater afhænger af adækvat indsamling, opbevaring, transport og behandling af prøverne. Manglende overholdelse af de korrekte procedurer i ethvert af disse trin kan føre til fejlagtige resultater.
- **ResistancePlus**[®] MG-assayet er et kvalitativt assay og leverer ikke kvantitative værdier eller oplysninger om belastning af organismen.
- Resultaterne fra testen skal ses i sammenhæng med de kliniske, epidemiologiske data, laboratoriedata og andre data, der er tilgængelige for klinikerne.
- Prævalensen af *M. genitalium* og macrolidresistensen vil påvirke assayets positive og negative prædiktive værdier.
- Påvisning af antibiotikaresistensmarkører korrelerer ikke nødvendigvis med fænotypiske genudtryk.
- Behandlingens virkning eller manglende virkning kan ikke afgøres på baggrund af assay-resultaterne, da der fortsat kan være nukleinsyre efter korrekt antimikrobiel behandling.
- Negative resultater udelukker ikke muligheden for infektion på grund af forkert prøveindsamling, tekniske fejl, tilstedeværelse af inhibitorer, ombytning af prøver eller lave antal organismer i den kliniske prøve.
- Negative resultater for resistensmarkører giver ingen indikation for modtageligheden af de påviste mikroorganismer, da der kan være resistensmarkører eller andre potentielle mekanismer for antibiotikaresistens, som ikke måles af assayet.
- Falsk positive resultater kan skyldes krydskontaminering af målorganismer, deres nukleinsyrer eller amplificeret produkt.

14 Kvalitetskontrol

ResistancePlus[®] MG-sættet indeholder en intern kontrol til at monitorere ekstraktionseffektivitet og qPCR-hæmning (**afsnit 10.3**).

Ved udførelse af refleks-test er **ResistancePlus**[®] MG-sættets interne kontrolceller ikke blevet tilføjet i ekstraktionsprocessen. Refleks-test kan kun udføres på prøver, der tidligere var fundet gyldige med et andet system, hvilket sikrede, at ekstraktionseffektiviteten og qPCR-hæmning var blevet overvåget.

ResistancePlus[®] MG positivt kontrolsæt (kat. nr. 95001) anbefales som positivt kontrolmateriale til nukleinsyreamplifikation. Se **afsnit 15** for anvisninger om brug af **ResistancePlus**[®] MG Positive Controls. Det anbefales at anvende en kendt negativ prøve som negativ kontrol.

15 Anvisninger om ResistancePlus[®] MG Positive Control

The **ResistancePlus**[®] MG Positive Control-sættet indeholder positivt kontrolmateriale til *M. genitalium* 23S rRNA-mutanter og en *M. genitalium*-vildtype 23S rRNA (**Tabel 15**).

Tabel 15. Indhold af ResistancePlus [®] MG positivt kontrolsæt (kat. nr. 95001)			
Hættefarve	Indhold	Beskrivelse	Quantity (Mængde) (10 reaktioner)
Neutral	MG, 23S rRNA vildtype	Positiv kontrolskabelon til påvisning af <i>M. genitalium</i> , 23S rRNA-vildtype	1 x 50 µL
Grøn	MG, 23S rRNA A2058G	Positiv kontrolskabelon til påvisning af <i>M. genitalium</i> , 23S rRNA A2058G-mutation	1 x 50 µL
Rød	MG, 23S rRNA A2058G	Positiv kontrolskabelon til påvisning af <i>M. genitalium</i> , 23S rRNA A2059G-mutation	1 x 50 µL
Blå	MG, 23S rRNA A2058T	Positiv kontrolskabelon til påvisning af <i>M. genitalium</i> , 23S rRNA A2058T-mutation	1 x 50 µL
Gul	MG, 23S rRNA A2058G	Positiv kontrolskabelon til påvisning af <i>M. genitalium</i> , 23S rRNA A2058C-mutation	1 x 50 µL
Violet	MG, 23S rRNA A2058G	Positiv kontrolskabelon til påvisning af <i>M. genitalium</i> , 23S rRNA A2059G-mutation	1 x 50 µL

15.1 Brugsanvisning

Klargør qPCR-reaktioner som beskrevet i **afsnit 10.4** med brug af positiv kontrol som prøve.

Datafortolkning kræver **ResistancePlus**[®] MG-analysesoftwaren, se **afsnit 24.11** for eksempel på resultater.

16 Præstationskarakteristika

16.1 Klinisk præstation

16.1.1 Klinisk studie 1

Der blev udført et prospektivt-retrospektivt klinisk studie på Royal Women's Hospital (RWH) i Melbourne i Australien. Der blev indsamlet prøver fra maj 2016 til juni 2016, og baseret på de kliniske laboratorieresultater blev der valgt 111 *M. genitalium* positive and 100 fortløbende *M. genitalium* negative prøver til studiet. De 211 prøver bestod af 84 urinprøver, 7 anale podninger, 1 urogenital podning (intet sted specificeret (nss)), 1 rektal podning og 1 urethrapodning fra mænd, og 33 urinprøver, 33 cervixpodninger, 16 endocervikale podninger, 14 vaginalpodninger, 13 "high" vaginalpodninger (HVS), og 8 urogenitale podninger (nss) fra kvinder. For at bestemme ydelsen af **ResistancePlus**[®] MG-sættet, blev *M. genitalium*-påvisningen sammenlignet med de kliniske laboratorieresultater fra et veletableret 16S rRNA qPCR, der blev brugt til rutinemæssig diagnostik ved RWH², og 23S rRNA-mutantpåvisning blev sammenlignet med Sanger-sekventering³. **ResistancePlus**[®] MG-sættet blev udført på LC480 II efter prøveudtagning på MagNA Pure 96 Instrument ved hjælp af MagNA Pure 96 DNA og Viral NA Small Volume Kit med Universal Pathogen 200-protokollen. Til påvisning af *M. genitalium* blev der anvendt en sammensat reference til uoverensstemmende prøver ved brug af en tredje qPCR-reaktion, som var rettet mod MgPa-genet². Til påvisning af 23S rRNA mutant blev Sanger-sekventering antaget som det sande resultat. Løste resultater og sensitivitet og specificitet af **ResistancePlus**[®] MG-sættet til *M. genitalium*-påvisning og 23S rRNA-mutantpåvisning er vist i **Tabel 16**. To prøver blev ekskluderet, da resultatet af Internal Control (den interne kontrol) var ugyldigt (1 urinprøve fra kvinde og 1 urinprøve fra mand). Analyse af 23S rRNA-mutationspåvisning omfatter kun prøver, hvor mutantstatus kan bestemmes. Analyse af resultater i henhold til prøvetype er vist i **Tabel 17**. 23S rRNA-mutationsanalysen er vist i **Tabel 18**.

Tabel 16. Klinisk evaluering af ResistancePlus[®] MG-sættet (klinisk studie 1)

		<i>M. genitalium</i> -påvisning 16S rRNA qPCR		23S rRNA mutant-påvisning Sekventering		
		Positiv	Negativ	Mutant	Vildtype	
ResistancePlus[®] MG	Positiv	106	0	Mutant påvist	68	2
	Negativ	4	99 [^]	Mutant ikke påvist	2	31
Følsomhed		96,4 % (95 % CI 91,0-99,0 %)		Følsomhed		97,1 % (95 % CI 90,1-99,7 %)
Specificitet		100,0 % (95 % CI 96,3-100,0 %)		Specificitet		93,8 % (95 % CI 79,2-99,2 %)

95 % CI – 95 % konfidensinterval; Mutant – 23S rRNA-mutation i positionerne A2058G, A2059G, A2058T, A2058C og A2059C (*E. coli*-nummerering); Vildtype – fravær af mutation i disse positioner

[^] **ResistancePlus**[®] MG-sættet påviste 1 sand *M. genitalium* negativ ved hjælp af en sammensat referencetabel, som repræsenterer de løste resultater

Tabel 17. Klinisk resultatanalyse i henhold til prøve[^] (klinisk studie 1)

Prøve	Forventet <i>M. genitalium</i> negativ	Forventet <i>M. genitalium</i> 23S rRNA-vildtype	Forventet <i>M. genitalium</i> 23S rRNA-mutant
Urin fra mænd	28/28	8/10 ¹	41/42 ¹
Urin fra kvinder	12/13	11/11	4/6 ²
Cervixpodning	21/21	5/5	7/7 ³
Endocervikal podning	10/10	3/3	3/3 ⁴
Vaginalpodning	8/8	1/1	2/2 ⁵
"High" vaginalpodning	9/9	1/1	4/4 ⁶
Anal podning fra mænd	3/3	0/0	5/5 ⁷
Podning fra kvinder (nss)	5/5	2/2	1/1 ⁸
Podning fra mænd (nss)	0/0	0/0	1/1 ⁹
Rektal podning fra mænd	1/1	0/0	0/0
Urethral podning fra mænd	1/1	0/0	0/0

Mutant – 23S rRNA-mutation i positionerne A2058G, A2059G, A2058T, A2058C og A2059C (*E. coli*-nummerering); Vildtype – fravær af mutation i disse positioner

[^] 2 urinprøve fra kvinder, 3 urinprøver fra mænd, 1 vaginalpodning ekskluderet, da sekventering mislykkedes, og mutantstatus ikke kunne bestemmes

¹ Urin fra mænd: 2 *M. genitalium*-vildtype misdøbt som *M. genitalium*-mutant påvist, 18 A2058G, 20 A2059G, 3 A2058T korrekt påvist; 1 A2058G misdøbt som *M. genitalium* ikke påvist

² Urin fra kvinder: 1 A2058G, 3 A2059G korrekt påvist; 2 A2059G misdøbt som *M. genitalium* påvist, mutant ikke påvist

³ Cervikalpodning: 1 A2058G, 6 A2059G korrekt påvist

⁴ Endocervikalpodning: 2 A2059G, 1 A2058T korrekt påvist

⁵ Vaginalpodning: 3 A2058G, 1 A2059G korrekt påvist

⁶ Høj vaginalpodning: 2 A2059G korrekt påvist

⁷ Analpodning fra mand: 1 A2058G, 3 A2059G, 1 A2058T korrekt påvist.

⁸ Podning fra kvinde (intet sted specificeret (no site specified, nss)): 1 A2059G korrekt påvist

⁹ Podning fra mand (nss): 1 A2059G korrekt påvist

Tabel 18. *M. genitalium* 23S rRNA-mutationsanalyse (klinisk studie 1)

Referenceresultat [^]	ResistancePlus [®] MG-resultat
Vildtype	31/33 ¹
A2058G	24/25 ²
A2059G	39/41 ³
A2058T	5/5

[^] For *M. genitalium* positiv prøver udelukkende

¹ Vildtype: 2 Urin fra mænd misdøbt som *M. genitalium*-mutant påvist

² A2058G: 1 Urin fra mænd misdøbt som *M. genitalium* ikke påvist

³ A2059G: 2 Urin fra kvinder misdøbt som *M. genitalium*-mutant ikke påvist

16.1.2 Klinisk studie 2

En undergruppe af de ekstraherede prøver fra studie 1 blev kørt på 7500 Fast. Resultaterne blev sammenlignet med det kliniske resultat fra 16S rRNA qPCR (Twin 2011) og Sanger-sekventering (Twin 2012). Uoverensstemmende prøver til påvisning af *M. genitalium* blev gentaget med 16S rRNA qPCR (Twin 2011) på grund af formodet prøveforringelse. Løste resultater og sensitivitet og specificitet af **ResistancePlus**[®] MG₍₅₅₀₎-sættet til *M. genitalium*-påvisning og 23S rRNA-mutantpåvisning er vist i **Tabel 19**. Analyse af 23S rRNA-mutationspåvisning omfatter kun prøver, hvor mutantstatus kan bestemmes.

Tabel 19. Klinisk evaluering af ResistancePlus [®] MG ₍₅₅₀₎ -sættet (klinisk studie 2)						
		<i>M. genitalium</i> -påvisning 16S rRNA qPCR		23S rRNA mutant-påvisning Sekventering		
		Positiv	Negativ	Mutant	Vildtype	
ResistancePlus [®] MG	Positiv	99	0 [^]	Mutant påvist	62	0
	Negativ	2	81 [#]	Mutant ikke påvist	5	30
Følsomhed		98.0 % (95 % CI 93.0-99.8 %)		Følsomhed		92.5 % (95 % CI 83.4-97.5 %)
Specificitet		100.0 % (95 % CI 95.6-100.0 %)		Specificitet		100.0 % (95 % CI 88.4-100.0 %)

95% CI – 95 % konfidensinterval; Mutant – 23S rRNA-mutation i positionerne A2058G, A2059G, A2058T, A2058C og A2059C (*E. coli*-nummerering); Vildtype – fravær af mutation i disse positioner

[^] **ResistancePlus**[®] MG₍₅₅₀₎-sættet påviste 1 sand *M. genitalium* positiv ved hjælp af en referencetest, tabellen repræsenterer de løste resultater

[#] **ResistancePlus**[®] MG₍₅₅₀₎-sættet påviste 10 sandt negative *M. genitalium*-prøver med referencetest. Tabellen viser de afklarede resultater

16.1.3 Klinisk studie 3

Et retrospektivt, klinisk studie blev udført på Canterbury Health Laboratories (CHL), Christchurch, New Zealand på karakteriserede, arkiverede prøver fra 2016-2016, bestående af 103 *M. genitalium* positiv og 61 *M. genitalium* negativ prøver, indsamlet med multi-Collect Specimen Collection Kit (Abbott). De 164 prøver bestod af 110 urinprøver og 4 rektale podninger fra mænd, og 11 urinprøver, 17 cervixpodninger, 15 vaginalpodninger, 1 urethral podning, 1 urethral/vaginalpodning 1 vaginal/cervixpodning og 4 prøver fra ukendte steder fra kvinder. For at bestemme ydelsen af **ResistancePlus**[®] MG-sættet blev *M. genitalium*-påvisning sammenlignet med det kliniske laboratorieresultat fra en veletableret MgPa qPCR, som også bruges til rutinemæssig diagnostik ved CHL (Jensen 2004), og 23S rRNA mutant-påvisning blev sammenlignet med Sanger-sekventering (Jensen 2008). **ResistancePlus**[®] MG-sættet blev udført på LC480 II efter prøveudtagning på MagNA Pure 96 Instrument ved hjælp af MagNA Pure 96 DNA og Viral NA Small Volume Kit med Universal Pathogen 200-protokollen. Til påvisning af *M. genitalium* blev den rutinemæssige MgPa-test gentaget for ikke-overensstemmende prøver. Til påvisning af 23S rRNA mutant blev Sanger-sekventering antaget som det sande resultat. Følsomheden og specificiteten af **ResistancePlus**[®] MG-sættet til *M. genitalium*-påvisning og 23S rRNA-mutantpåvisning er vist i **Tabel 20**. Fem prøver blev ekskluderet, da Internal Control (intern kontrol) -resultatet var ugyldigt. Analyse af 23S rRNA-mutationspåvisning omfatter kun prøver, hvor mutantstatus kan bestemmes. Analyse af resultater i henhold til prøvetype er vist i **Tabel 21**. 23S rRNA-mutationsanalysen er vist i **Tabel 22**.

Tabel 20. Klinisk evaluering af *ResistancePlus*[®] MG-sættet (klinisk studie 3)

		<i>M. genitalium</i> -påvisning 16S rRNA qPCR		23S rRNA mutant-påvisning Sekventering		
		Positiv	Negativ	Mutant	Vildtype	
<i>ResistancePlus</i> [®] MG	Positiv	90	0	Mutant påvist	61	1
	Negativ	7	67 [^]	Mutant ikke påvist	6	22
Følsomhed		92,8 % (95 % CI 85,7-97,1 %)		Følsomhed	91,0 % (95 % CI 81,5-96,6 %)	
Specificitet		100,0 % (95 % CI 94,6-100,0 %)		Specificitet	95,6 % (95 % CI 79,7-99,9 %)	

95 % CI – 95 % konfidensinterval; Mutant – 23S rRNA-mutation i positionerne A2058G, A2059G, A2058T, A2058C og A2059C (*E. coli*-nummerering); Vildtype – fravær af mutation i disse positioner

[^] *ResistancePlus*[®] MG-sættet påviste 7 sande *M. genitalium* negativer, tabellen repræsenterer de løste resultater

Tabel 21. Klinisk resultatanalyse i henhold til prøve (klinisk studie 3)

Prøve	Forventet <i>M. genitalium</i> negativ	Forventet <i>M. genitalium</i> vildtype	Forventet <i>M. genitalium</i> 23S rRNA-mutant
Urin fra mænd	45/45	17/18 ¹	38/47 ¹
Urin fra kvinder	4/4	1/1	6/6 ²
Cervixpodning	5/5	3/3	8/9 ³
Vaginalpodning	6/6	1/1	8/8 ⁴
Rektal podning fra mænd	3/3	0/0	0/1 ⁵
Kvinde (ukendt sted)	1/1	1/1	1/2 ⁶
Urethral podning, kvinde	1/1	0/0	0/0
Urethral-/vaginalpodning	1/1	0/0	0/0
Vaginal-/cervixpodning	1/1	0/0	0/0

Mutant – 23S rRNA-mutation i positionerne A2058G, A2059G, A2058T, A2058C og A2059C (*E. coli*-nummerering); Vildtype – fravær af mutation i disse positioner

¹ Urin fra mænd: 1 *M. genitalium*-vildtype misdøbt som *M. genitalium*-mutant påvist, 4 A2058G, 32 A2059G, 1 A2058T, 1 A2058C, 1 A2059C, korrekt påvist; 1 A2058G, 1 A2059G og 1 A2059C misdøbt som *M. genitalium* ikke påvist, 3 A2058G og 2 A2059G misdøbt som *M. genitalium*-mutant ikke påvist

² Urinprøve fra en kvinde: 2 A2058G, 4 A2059G korrekt påvist

³ Cervixpodning: 3 A2058G, 4 A2059G, 1 A2058C korrekt påvist; 1 A2059G misdøbt som *M. genitalium* ikke påvist

⁴ Vaginal podning: 1 A2058G, 7 A2059G korrekt påvist

⁵ Rektal podning fra mænd: 1 A2059G misdøbt som *M. genitalium* ikke påvist

⁶ Kvinde (ukendt sted): 1 A2059G korrekt påvist; 1 A2059G misdøbt som *M. genitalium*-mutant ikke påvist

Tabel 22. *M. genitalium* 23S rRNA-mutationsanalyse (klinisk studie 3)

Referenceresultat [^]	ResistancePlus [®] MG-resultat
Vildtype	22/23 ¹
A2058G	10/13 ²
A2059G	47/50 ³
A2058T	1/1
A2058C	2/2
A2059C	1/1

[^] For *M. genitalium* positiv prøver udelukkende

¹ Vildtype: 1 Urin fra mænd misdøbt som *M. genitalium*-mutant påvist

² A2058G: 3 Urin fra mænd misdøbt som *M. genitalium*-mutant ikke påvist

³ A2059G: 2 Urin fra mænd misdøbt som *M. genitalium*-mutant ikke påvist,
1 Prøve fra kvinde (ukendt sted) misdøbt som *M. genitalium*-mutant ikke påvist

16.1.4 Klinisk studie 4

Et retrospektivt klinisk studie blev udført på Vall d'Hebron Universitetshospital (HUVH), Barcelona, Spanien for at evaluere ydeevnen af **ResistancePlus[®] MG₍₆₇₅₎**-sættet til påvisning af *M. genitalium* og azithromycin-resistens-associerede mutationer i retrospektive prøver indsamlet mellem december 2017 og april 2018. Prøverne omfattede 92 *M. genitalium* positive and 108 fortløbende *M. genitalium* negative prøver, indsamlet ved hjælp af DeltaSwab ViCUM[®] (Deltalab, Spanien) til podepinde eller Vacumed[®] Urine (FL medical, Italien) til urin fra mænd og kvinder. De 200 prøver bestod af 46 urinpodninger, 30 vaginale podninger, 30 urethrale podninger, 40 cervikale podninger, 8 pharyngeale podninger og 46 rektale podninger. Prøverne blev ekstraheret med STARlet IVD (Hamilton) og kørt på CFX96 Dx (Bio-Rad)-instrumentet. For at vurdere ydeevnen blev *M. genitalium*-påvisning sammenlignet med Allplex[™] STI Essential (Seegene) samt med **ResistancePlus[®] MG**-sættet (SpeedX) på LC480 II til både *M. genitalium*-påvisning og 23S rRNA-status. Følsomheden og specificiteten af **ResistancePlus[®] MG₍₆₇₅₎**-sættet til *M. genitalium*-påvisning sammenlignet med Allplex[™] STI Essential (Seegene) er vist i **Tabel 23**. Følsomheden og specificiteten af **ResistancePlus[®] MG₍₆₇₅₎**-sættet til *M. genitalium*-påvisning var 100,0 % (95 % CI 95,9-100,0 %) og 97,4 % (95 % CI 92,4-99,5 %), og for påvisning af 23S rRNA-mutant var den som vist i **Tabel 24**. Analyse af resultater i henhold til prøvetype er vist i **Tabel 25**.

Tabel 23. Sammenligning mellem ResistancePlus[®] MG₍₆₇₅₎-sættet og Allplex[™] STI essential (klinisk studie 4)

		<i>M. genitalium</i> -påvisning Allplex [™] STI Essential	
		Positiv	Negativ
ResistancePlus [®] MG ₍₆₇₅₎	Positiv	89	1
	Negativ	3	107
Følsomhed		96,7 % (95 % CI 90,8-99,3 %)	
Specificitet		99,1 % (95 % CI 94,95-100,0 %)	

Tabel 24. Klinisk evaluering af *ResistancePlus*[®] MG₍₆₇₅₎-sættet (klinisk studie 4)

		<i>M. genitalium</i> -påvisning <i>ResistancePlus</i> [®] MG (LC480 II)		23S rRNA mutant-påvisning [#] <i>ResistancePlus</i> [®] MG (LC480 II)	
		Positiv	Negativ	Mutant påvist	Mutant ikke påvist
<i>ResistancePlus</i> [®] MG ₍₆₇₅₎	Positiv	87	3	Mutant påvist	42 [^]
	Negativ	0	110	Mutant ikke påvist	2
Følsomhed		100,0 % (95 % CI 95,9-100,0 %)		Følsomhed	
Specificitet		97,4 % (95 % CI 92,4-99,5 %)		Specificitet	
				95,5 % (95 % CI 84,5-99,4 %)	
				100,0 % (95 % CI 91,6-100,0 %)	

95 % CI – 95 % konfidensinterval; Mutant – 23S rRNA-mutation i positionerne A2058G, A2059G, A2058T, A2058C og A2059C (*E. coli*-nummerering); Vildtype – fravær af mutation i disse positioner

[^] *ResistancePlus*[®] MG₍₆₇₅₎-sættet påviste 1 sand *M. genitalium*-mutant ved hjælp af en referencetest, tabellen repræsenterer de løste resultater

^{*} *ResistancePlus*[®] MG₍₆₇₅₎-sættet påviste 1 sand *M. genitalium* negativ ved hjælp af en referencetest, tabellen repræsenterer de løste resultater

[#] 1 prøve udelukkede fra analyse, da denne var sekventeret som blandet vildtype og mutant

Tabel 25. Klinisk resultatanalyse i henhold til prøve (klinisk studie 4)

Prøve	Forventet <i>M. genitalium</i> negativ	Forventet <i>M. genitalium</i> 23S rRNA-vildtype	Forventet <i>M. genitalium</i> 23S rRNA-mutant
Urin fra mænd	26/26	5/5	15/15
Urethral podning fra mænd	15/15	3/3	11/12 ¹
Cervikal podning, kvinder	16/16	11/11	2/3 ³
Vaginal podning, kvinder	20/20	15/15	5/5
Rektal podning fra mænd	19/22 ¹	5/5	8/8
Rektal podning, kvinder	7/7	3/3	0/0
Pharyngeal podning, mænd	5/5	0/0	1/1
Pharyngeal podning, kvinder	2/2	0/0	0/0

¹ Rektal prøve fra en mand: 3 *M. genitalium* negativ misdøbt som *M. genitalium* positiv

² Urethral podning fra mænd: 1 *M. genitalium* 23S rRNA-mutation positiv misdøbt som *M. genitalium* 23S rRNA-mutation negativ

³ Cervikal podning fra kvinder: 1 *M. genitalium* 23S rRNA-mutation positiv misdøbt som *M. genitalium* 23S rRNA-mutation negativ

16.1.5 Klinisk studie 5

Et retrospektivt klinisk studie blev udført på Royal Women's Hospital (RWH) i Melbourne i Australien med anvendelse af urin og podninger opsamlet med Aptima[®] mellem juni 2017 og november 2017. Matchede patientprøver bestod af 98 *M. genitalium* positive and 87 fortløbende *M. genitalium* negativt, indsamlet som ren urin (rutineprøve) eller med Aptima[®] Urine Specimen Collection kit (Hologic) eller som tørpodning (rutineprøve) eller med Aptima[®] Unisex Swab Specimen Collection kit (Hologic). De 185 prøver bestod af 122 urin, 18 rektale podninger, 15 cervikale podninger og 25 vaginale podninger. For at bestemme ydelsen af Aptima[®]-indsamlede prøver med *ResistancePlus*[®] MG-sættet blev *M. genitalium* og 23S rRNA mutant-påvisning sammenlignet med de kliniske diagnostiske resultater opnået fra *ResistancePlus*[®] MG-sættet (SpeedX) med rutineprøven. Testning af indhentede Aptima[®] prøver udførtes på LC480 II, efter prøveekstraktion på MagNA Pure 96 Instrument ved hjælp af MagNA Pure 96 DNA og Viral NA Small Volume Kit og ved anvendelse af Viral NA Universal LV 1000-protokollen. Kliniske diagnostiske resultater fra RWH, indhentet fra en matchet diagnostisk prøve testet med *ResistancePlus*[®] MG-sættet (SpeedX), blev betragtet som det sande resultat for *M. genitalium*. Med hensyn til påvisning af 23S rRNA-mutant blev resultatet sammenlignet med det diagnostiske resultat og Sanger-sekventering.

Følsomheden og specificiteten af **ResistancePlus**[®] MG-sættet til *M. genitalium*-påvisning og 23S rRNA-mutantpåvisning er vist i **Tabel 26**. Analyse af 23S rRNA-mutationspåvisning omfatter kun prøver, hvor mutantstatus kan bestemmes. Analyse af resultater i henhold til prøvetype er vist i **Tabel 27**.

Tabel 26. Klinisk evaluering af ResistancePlus [®] -sættet (klinisk studie 5)						
		<i>M. genitalium</i> -påvisning ResistancePlus [®] MG (rutineprøve)		23S rRNA mutant-påvisning ResistancePlus [®] MG (rutineprøve)		
		Positiv	Negativ	Mutant	Vildtype	
ResistancePlus [®] MG (med 1 mL Aptima-prøve)	Positiv	94	3	Mutant påvist	65	0
	Negativ	4	84	Mutant ikke påvist	1*	28
Følsomhed		95,9 % (95 % CI 89,9-98,9 %)		Følsomhed		98,5 % (95 % CI 91,8-100,0 %)
Specificitet		96,6 % (95 % CI 90,3-99,3 %)		Specificitet		100,0 % (95 % CI 87,7-100,0 %)

* Prøven kunne ikke sekventeres

Tabel 27. Klinisk resultatanalyse i henhold til prøvetype (klinisk studie 5)			
Prøve	Forventet <i>M. genitalium</i> negativ	Forventet <i>M. genitalium</i> vildtype	Forventet <i>M. genitalium</i> 23S rRNA-mutant
Urin	50/52 ¹	21/22 ¹	45/48 ¹
Cervixpodning	11/11	1/1	3/3
Vaginalpodning	14/15 ²	3/4 ²	6/6
Rektal podning	9/9	3/3	5/6 ³
Anal podning	0/0	0/0	5/5

Mutant – 23S rRNA-mutation i positionerne A2058G, A2059G, A2058T, A2058C, A2059C (*E.coli*-nummerering); Vildtype – fravær af mutation i disse positioner

¹ Urin: 2 *M. genitalium* negativ misdøbt som *M. genitalium*-vildtype og mutant; 1 *M. genitalium*-vildtype misdøbt som *M. genitalium* negativ; 2 *M. genitalium*-mutanter misdøbt som *M. genitalium*-vildtype, 1 *M. genitalium*-mutant misdøbt som *M. genitalium* negativ

² Vaginal prøve: 1 *M. genitalium* negativ misdøbt som *M. genitalium*-vildtype; 1 *M. genitalium*-vildtype misdøbt som *M. genitalium* negativ

³ Rektal podning: 1 *M. genitalium*-mutant misdøbt som *M. genitalium* negativ

16.1.6 Klinisk studie 6

Et retrospektivt klinisk studie blev udført på University of Queensland Center for Klinisk forskning (UQCCR), Australien, med brug af cobas[®] x480-ekstrakter fra urin- og podningsprøver indsamlet februar 2017-februar 2019. Prøverne bestod af 85 *M. genitalium* positive og 84 *M. genitalium* negative ekstrakter, oprindeligt indsamlet som ufortyndet urin eller med cobas[®] PCR mediesamlingsæt (Roche) og ekstraheret på cobas[®] x480 (cobas[®] 4800, Roche) instrumentet med brug af "Full Workflow (fuldt arbejdsflow)" og "CT/NG" protokol, uden tilsætning af SpeedX interne kontrolceller. De 169 ekstrakter bestod af 28 rektalpodninger, 13 vaginalpodninger, 5 high vaginalpodninger, 15 cervixpodninger, 1 ectocervixpodning, 5 urethrale podninger, 5 pharyngeale podninger, 1 penil podning, 1 penil meatal, 1 mundpodning, samt 83 urinprøver fra mænd og 11 urinprøver fra kvinder.

For at bestemme ydeevnen af cobas[®]-ekstrakter med **ResistancePlus**[®] MG₍₅₅₀₎-sættet blev *M. genitalium* påvisning sammenlignet med det rutinemæssige diagnostiske resultat (MgPa PCR-assay (Trembizki *et al.*, 2017)), og 23S rRNA-mutantpåvisning blev sammenlignet med Sanger-sekventering. **ResistancePlus**[®] MG₍₅₅₀₎-sættet blev udført på ABI 7500 Fast Dx. Følsomheden og specificiteten af **ResistancePlus**[®] MG₍₅₅₀₎-sættet til *M. genitalium*-påvisning og 23S rRNA-mutantpåvisning er vist i **Tabel 28**. Analyse af 23S rRNA-mutationspåvisning omfatter kun prøver, hvor mutantstatus kan bestemmes. Analyse af resultater i henhold til prøvetype er vist i **Tabel 29**. 23S rRNA-mutationsanalysen er vist i **Tabel 30**.

Tabel 28. Klinisk evaluering af *ResistancePlus*[®] MG₍₅₅₀₎-sættet (klinisk studie 6)

		<i>M. genitalium</i> -påvisning MgPa qPCR		23S rRNA mutant-påvisning Sanger-sekventering		
		Positiv	Negativ	Mutant	Vildtype	
<i>ResistancePlus</i> [®] MG ₍₅₅₀₎	Positiv	80	0	Mutant påvist	49 [^]	0
	Negativ	5	84	Mutant ikke påvist	0	25
Følsomhed		94,1 % (95 % CI 86,8-98,1 %)		Følsomhed		100,0 % (95 % CI 92,8-100,0 %)
Specifisitet		100,0 % (95 % CI 95,7-100,0 %)		Specifisitet		100,0 % (95 % CI 86,3-100,0 %)

[^] 1 vaginal prøve returnerede et blandet vildtype/A2059G sekvenseringsresultat, som blev korrekt identificeret som mutant af *ResistancePlus*[®] MG₍₅₅₀₎-assayet

Tabel 29. Klinisk resultatanalyse i henhold til prøve (klinisk studie 6) *

Prøve	Forventet <i>M. genitalium</i> negativ	Forventet <i>M. genitalium</i> 23S rRNA-vildtype	Forventet <i>M. genitalium</i> 23S rRNA-mutant
Urin fra mænd	42/42	13/13	26/27 ¹
Urin fra kvinder	6/6	1/1	3/3 ²
Cervixpodning	5/5	6/6	2/2 ³
Ectocervixpodning	1/1	-	-
Vaginalpodning	1/1	1/2	7/7 ^{4^}
"High" vaginalpodning	2/2	2/2	1/1 ⁵
Rektal podning fra mænd	17/17	1/1	7/8 ⁶
Rektal podning, kvinder	1/1	-	-
Urethral podning fra mænd	3/3	-	2/2 ⁷
Pharyngeal fra mænd	5/5	-	-
Penil podning	-	1/1	-
Penil meatal podning	-	-	1/1 ⁸
Mundpodning, mænd	1/1	-	-

* 6 prøver blev ikke medregnet, da sekventeringen mislykkedes, og ægte 23S-status ikke kunne bestemmes, inklusive: 2 cervikal, 2 urin, 1 vaginal og 1 rektal

¹ Urin fra mand: 8 A2058G, 3 A2058T 1 og 15 A2059G korrekt identificeret, 1 A2058T blev fejlagtigt identificeret som *M. genitalium* ikke påvist

² Urinprøve fra en kvinde: 2 A2058G, 1 A2059G korrekt påvist

³ Cervikalpodning: 2 A2058G korrekt påvist

⁴ Vaginalpodning: 3 A2058G, 2 A2058T og 1 A2059G korrekt identificeret, [^] 1 vaginalpodning blev identificeret som en blanding WT/A2059G

⁵ Høj vaginalpodning: 1 A2059G korrekt påvist

⁶ Rektal podning fra mænd: 5 A2059G, 1 A2058T 1 og A2058G korrekt identificeret, 1 A2058G blev fejlagtigt identificeret som *M. genitalium* ikke påvist

⁷ Urethralpodning fra mand: 2 A2059G korrekt identificeret

⁸ Penil meatalpodning: 1 A2059G korrekt identificeret

Tabel 30. *M. genitalium* 23S rRNA-mutationsanalyse (klinisk studie 6)

Referenceresultat [^]	ResistancePlus [®] MG-resultat
Vildtype	25/26 ¹
A2058G	16/17 ²
A2059G	27/27 ³
A2058T	6/7 ⁴
A2058C	-
A2059C	-

[^] For *M. genitalium* positiv prøver udelukkende

¹ Vildtype: 1 vaginalpodning misdøbt som *M. genitalium* ikke påvist

² A2058G: 1 rektal podning misdøbt som *M. genitalium* ikke påvist

³ A2059G: 1 vaginalpodning blandet med vildtype/A2059G korrekt identificeret som *M. genitalium*, 23S rRNA mutation påvist

⁴ A2058T: 1 Urin fra mænd misdøbt som *M. genitalium* ikke påvist

16.1.7 Klinisk studie 7

Et retrospektivt studie blev udført på Microbiological Diagnostic Unit Public Health Unit (MDU), Victoria, Australien, med brug af tørre podepinde og uforyndet urin indsamlet oktober 2018-januar 2019. Prøverne bestod af 59 *M. genitalium* positiv og 31 *M. genitalium* negative prøver, herunder 15 analpodninger, 19 vaginalpodninger, 2 høje vaginalpodninger, 8 cervikalpodninger, 1 urethralpodninger samt 45 urinprøver fra mænd.

ResistancePlus[®]--sættet blev udført på LC480 II, efter prøveekstraktion på QIASymphony SP (QIAGEN) instrumentet med brug af DSP-Virus/Patogen Mini-sæt og Complex200_V6_DSP-protokollen. Resultaterne blev sammenlignet med de rutinemæssige diagnostiske resultater fra **ResistancePlus[®] MG-sættet** (SpeedX) med brug af prøver ekstraheret på MagNA Pure 96 Instrument (MP96). For uoverensstemmende resultater blev der udført en 16S rRNA qPCR (Twin 2011) test for *M. genitalium*-påvisning, og Sanger-sekventering (Twin 2012) blev udført til 23S rRNA mutantpåvisning. Følsomheden og specificiteten af **ResistancePlus[®] MG-sættet** til *M. genitalium*-påvisning og 23S rRNA-mutantpåvisning er vist i **Tabel 31**. Analyse af 23S rRNA-mutationspåvisning omfatter kun prøver, hvor mutantstatus kan bestemmes. Analyse af resultater i henhold til prøvetype er vist i **Tabel 32**.

Tabel 31. Klinisk evaluering af ResistancePlus[®] MG-sættet (klinisk studie 7)

		<i>M. genitalium</i> -påvisning ResistancePlus [®] MG (MP96)		23S rRNA mutant-påvisning ResistancePlus [®] MG (MP96)		
		Positiv	Negativ	Mutant	Vildtype	
ResistancePlus [®] MG (QIASymphony SP)	Positiv	54	0 [*]	Mutant påvist	28	1 [#]
	Negativ	1 [*]	34	Mutant ikke påvist	1 [#]	22
Følsomhed		98,2 % (95 % CI 90,3-100,0 %)		Følsomhed		96,6 % (95 % CI 82,2-99,9 %)
Specificitet		100,0 % (95 % CI 89,7-100,0 %)		Specificitet		95,7 % (95 % CI 78,1-99,9 %)

^{*} **ResistancePlus[®] MG-sættet** påviste 6 sande *M. genitalium* negative prøver, som var positive med referencetest, tabellen repræsenterer de løste resultater

[%] **ResistancePlus[®] MG-sættet** påviste 2 sande *M. genitalium* positive prøver, som var negative med referencetest, tabellen repræsenterer de løste resultater

[#] 2 uoverensstemmende urinprøver kunne ikke afklares, da sekvensering mislykkedes

Tabel 32. Klinisk resultatanalyse i henhold til prøve (klinisk studie 7) [#]			
Prøve	Forventet <i>M. genitalium</i> negativ	Forventet <i>M. genitalium</i> 23S rRNA-vildtype	Forventet <i>M. genitalium</i> 23S rRNA-mutant
Urin fra mænd	17/17	9/9	12/14 ¹
Urin fra kvinder	1/1	1/2 ²	1/1
Cervixpodning	3/3	2/2	3/3
Vaginalpodning	8/8 [#]	7/7	3/3
"High" vaginalpodning	1/1	1/1	-
Anal podning fra mænd	4/4	2/2	8/8
Urethral podning fra mænd	-	-	1/1

[#] 1 vaginal podning blev udelukket, da den producerede et ugyldigt resultat med **ResistancePlus**[®] MG-sættet

¹ Urin fra mænd: 1 *M. genitalium* 23S rRNA vildtype blev forkert identificeret som *M. genitalium* ikke påvist; 1 *M. genitalium* 23S rRNA mutant blev forkert identificeret som *M. genitalium* påvist, 23S mutation ikke påvist

² Urin fra kvinde: 1 forkert identificeret som *M. genitalium* påvist, 23S rRNA mutation påvist

16.2 Analytisk præstation

16.2.1 Reproducerbarhed og repeterbarhed

Reproducerbarheden og repeterbarheden af **ResistancePlus**[®] MG-sættet på LC480 II blev vurderet ved hjælp af en kvantificeret syntetisk skabelon til *M. genitalium* MgPa og 23S rRNA-mål (A2058G, A2059G, A2058T, A2058C og A2059C) ved 10.000 og 3x LOD-kopier pr. reaktion ved anvendelse af 6 replikater (medmindre andet er angivet). Eksperimenterne udførtes på LC480 II.

For at bestemme lot-til-lot-variabilitet blev to lot testet ved kørsel på én maskine udført af én operatør (**Tabel 33**). De to lot viste god reproducerbarhed med en variationskoefficient (% CV) på 0,35-2,37 % for alle mål.

Tabel 33. Lot-til-lot variabilitet				
	Middel Cq	STAFV	% CV	Antal prøver
MgPa 10.000 kopier	16.9	0.15	0.89	12/12
MgPa 30 kopier	25.5	0.52	2.05	12/12
A2058G 10.000 kopier	20.4	0.48	2.37	12/12
A2058G 36 kopier	27.8	0.43	1.54	12/12
A2059G 10.000 kopier	18.0	0.06	0.35	12/12
A2059G 30 kopier	25.6	0.50	1.94	12/12
A2058T 10.000 kopier	18.7	0.09	0.46	12/12
A2058T 30 kopier	26.2	0.30	1.14	12/12
A2058C 10.000 kopier	17.7	0.13	0.75	12/12
A2058C 30 kopier	25.4	0.29	1.15	12/12
A2059C 10.000 kopier	19.2	0.08	0.42	12/12
A2059C 45 kopier	25.0	0.26	1.03	12/12

For at bestemme variabiliteten dage imellem udførtes der testning over tre dage af én operatør på den samme maskine (**Tabel 34**). De tre kørsler viste god reproducerbarhed mellem forskellige dage med en variationskoefficient (% CV) på 0,44-2,31 % for alle mål.

Tabel 34. Variabilitet dage imellem				
	Middel Cq	STAFV	% CV	Antal prøver
MgPa 10.000 kopier	17.0	0.18	1.09	18/18
MgPa 30 kopier	25.6	0.59	2.31	18/18
A2058G 10.000 kopier	20.2	0.37	1.83	18/18
A2058G 36 kopier	27.9	0.51	1.84	18/18
A2059G 10.000 kopier	18.1	0.24	1.34	18/18
A2059G 30 kopier	25.7	0.32	1.23	18/18
A2058T 10.000 kopier	18.7	0.23	1.22	18/18
A2058T 30 kopier	26.3	0.31	1.17	18/18
A2058C 10.000 kopier	17.8	0.16	0.88	18/18
A2058C 30 kopier	25.5	0.31	1.22	18/18
A2059C 10.000 kopier	19.2	0.08	0.44	18/18
A2059C 45 kopier	25.0	0.46	1.82	18/18

For at bestemme variabiliteten kørsler imellem sammenlignedes tre qPCR-kørsler udført på samme dag af den samme operatør (Tabel 35). De tre kørsler viste god reproducerbarhed med en variationskoefficient på 0,40-3,20 % for alle mål.

Tabel 35. Variabilitet mellem kørsler				
	Middel Cq	STAFV	% CV	Antal prøver
MgPa 10.000 kopier	17.0	0.07	0.40	18/18
MgPa 30 kopier	25.7	0.47	1.83	18/18
A2058G 10.000 kopier	19.8	0.63	3.20	18/18
A2058G 36 kopier	27.5	0.51	1.85	18/18
A2059G 10.000 kopier	18.4	0.11	0.61	18/18
A2059G 30 kopier	25.7	0.39	1.52	18/18
A2058T 10.000 kopier	18.7	0.22	1.18	18/18
A2058T 30 kopier	26.4	0.42	1.59	18/18
A2058C 10.000 kopier	17.8	0.08	0.46	18/18
A2058C 30 kopier	25.5	0.31	1.22	18/18
A2059C 10.000 kopier	19.2	0.15	0.76	18/18
A2059C 45 kopier	25.2	0.40	1.57	18/18

For at bestemme variabilitet mellem operatører sammenlignedes to kørsler fra to operatører (Tabel 36). De to kørsler fra forskellige operatører viste god reproducerbarhed med en variationskoefficient (% CV) på 0,54-1,86 % for alle mål.

Tabel 36. Variabilitet mellem operatører				
	Middel Cq	STAFV	% CV	Antal prøver
MgPa 10.000 kopier	16.8	0.12	0.73	12/12
MgPa 30 kopier	25.3	0.41	1.61	12/12
A2058G 10.000 kopier	20.2	0.24	1.21	12/12
A2058G 36 kopier	27.9	0.45	1.62	12/12
A2059G 10.000 kopier	17.9	0.10	0.58	12/12
A2059G 30 kopier	25.5	0.39	1.53	12/12
A2058T 10.000 kopier	18.6	0.10	0.54	12/12
A2058T 30 kopier	26.1	0.31	1.20	12/12
A2058C 10.000 kopier	17.7	0.13	0.71	12/12
A2058C 30 kopier	25.2	0.27	1.06	12/12
A2059C 10.000 kopier	19.1	0.16	0.83	12/12
A2059C 45 kopier	24.9	0.46	1.86	12/12

For at bestemme variabiliteten instrumenter imellem sammenlignedes to kørsler fra to maskiner udført af den samme operatør (Tabel 37). Kørslerne fra forskellige instrumenter viste god reproducerbarhed med en variationskoefficient (% CV) på 0,21-2,62 % for alle mål.

Tabel 37. Variabilitet mellem instrumenter				
	Middel Cq	STAFV	% CV	Antal prøver
MgPa 10.000 kopier	16.7	0.10	0.60	12/12
MgPa 30 kopier	25.4	0.67	2.62	12/12
A2058G 10.000 kopier	20.0	0.07	0.33	12/12
A2058G 36 kopier	27.8	0.51	1.82	12/12
A2059G 10.000 kopier	17.8	0.05	0.30	12/12
A2059G 30 kopier	25.3	0.36	1.41	12/12
A2058T 10.000 kopier	18.5	0.09	0.50	12/12
A2058T 30 kopier	25.9	0.30	1.16	12/12
A2058C 10.000 kopier	17.6	0.13	0.75	12/12
A2058C 30 kopier	25.3	0.36	1.44	12/12
A2059C 10.000 kopier	18.9	0.04	0.21	12/12
A2059C 45 kopier	24.8	0.46	1.85	12/12

For at bestemme variabilitet inden for kørsler sammenlignedes tre eksperimenter, der var sat op separat af den samme operatør, som kørte hvert mål på den samme plade (Tabel 38). De tre eksperimenter viste god reproducerbarhed med en variationskoefficient på 0,57-3,12 % for alle mål.

Tabel 38. Variabilitet inden for kørsler				
	Middel Cq	STAFV	% CV	Antal prøver
MgPa 10.000 kopier	17.3	0.36	2.09	18/18
MgPa 30 kopier	25.9	0.81	3.12	18/18
A2058G 10.000 kopier	20.2	0.11	0.57	18/18
A2058G 36 kopier	28.0	0.65	2.31	18/18
A2059G 10.000 kopier	17.9	0.15	0.83	18/18
A2059G 30 kopier	25.8	0.38	1.46	18/18
A2058T 10.000 kopier	18.8	0.12	0.66	18/18
A2058T 30 kopier	26.8	0.38	1.41	18/18
A2058C 10.000 kopier	17.8	0.15	0.83	18/18
A2058C 30 kopier	25.5	0.36	1.41	18/18
A2059C 10.000 kopier	19.0	0.14	0.76	18/18
A2059C 45 kopier	25.0	0.42	1.66	18/18

16.2.2 Analytisk følsomhed

Den analytiske følsomhed af **ResistancePlus**[®] MG-sættet på LC480 II blev bestemt ved at køre begrænsede fortyndingsserier ved hjælp af en kvantificeret syntetisk skabelon til *M. genitalium* MgPa og 23S rRNA-mål (A2058G, A2059G, A2058T, A2058C og A2059C). Følsomheden for hvert mål bestemtes som antallet af kopier pr. reaktion med ≥ 95 % påvisning som vist i **Tabel 39**.

Tabel 39. Analytisk følsomhed	
	Analytisk følsomhed (kopier/reaktion)
MgPa	10
A2058G	12
A2059G	10
A2058T	10
A2058C	10
A2059C	15

16.2.3 Analytisk specificitet

Dette studie blev udført for at evaluere **ResistancePlus**[®] MG-sættet, når ikke-målorganismer var tilstede i høje koncentrationer. Et panel af 65 mikroorganismer (4 vira, 2 protozoer, 4 svampe og 55 bakterier), som repræsenterer patogener eller flora, der almindeligvis er til stede i det urogenitale system, eller nært beslægtet med *M. genitalium*, blev evalueret. Hver bakteriestamme blev testet ved 1×10^6 genomer/mL, medmindre andet er angivet. Virale stammer blev testet ved 1×10^5 genomer/mL, medmindre andet er angivet. Alle andre organismer blev testet ved de angivne koncentrationer. Alle organismer blev kvantificeret med brug af qPCR, undtagen dem, der blev kvantificeret som kolonidannende enheder (CFU) eller plaquedannende enheder (PFU) (**Tabel 40**). Alle mikroorganismene blev testet med tre prøver. Alle testede mikroorganismer blev fortyndet i negativ klinisk matrix (enten urin eller vaginal podning).

Resultaterne viste, at ingen af disse organismer frembragte falske positive resultater i *M. genitalium* negativ-matricerne (**Tabel 40**).

En *in silico*-analyse blev også udført for at evaluere, om oligonukleotider i **ResistancePlus**[®] MG-assayet kunne amplificere og påvise nukleinsyresekvenser fra ikke-målorganismer tilgængelige i BLAST. Ingen signifikante interaktioner blev påvist.

Tabel 40. Mikroorganismer testet for analytisk specificitet

Organisme	Koncentration (genomer/mL)	Organisme	Koncentration (genomer/mL)	Organisme	Koncentration (genomer/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-celler) [^]	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
Herpes simplex virus I	1 x 10 ⁶	<i>Mycoplasma orale</i>	1 x 10 ⁶		
Herpes simplex virus II	1 x 10 ⁶	<i>Mycoplasma penetrans</i>	1 x 10 ⁶		

* tal i parentes angiver antal testede stammer

[^] kvantificeret som PFU/mL

[#] kvantificeret som CFU/mL

16.2.4 Potentielt interfererende stoffer

En undersøgelse af interfererende stoffer blev udført for at undersøge, om stoffer eller tilstande, som kan være til stede i urin eller vaginale podningsprøver, kan påvirke **ResistancePlus**[®] MG-assayet. Panelet bestod af endogene stoffer såsom blod, mucin, leukocytter og medicin (receptpligtig og håndkøb), som kan bruges til behandling af urogenitale tilstande. Alle stoffer blev evalueret gennem udførelse af de interne kontroller, som overvåger ekstraktion og qPCR-hæmning. Alle testprøver blev testet tre gange. Stofferne blev fortyndet i negativ klinisk matrix (enten urin eller vaginal podning) som relevant.

Resultaterne viste, at ingen af stofferne eller tilstandene interfererede med påvisning af den interne kontrol eller producerede falskt positive resultater.

Resultaterne er opsummeret i **Tabel 41** and **Tabel 42**.

Tabel 41. Potentielt interfererende stoffer i urinprøver

Klasse/stof	Produktnavn	Testkoncentration
Fuldblod	--	1 % v/v
Sæd	--	5,0 % v/v
Slim	Mucin	0,8 % vægt/v
Antibiotika	Azithromycin	1,8 mg/mL
	Doxycyklin	3,6 mg/mL
Analgetika	Aspirin	40 mg/mL
	Paracetamol	3,2 mg/mL
Intravaginale hormoner	--	7 mg/mL progesteron + 0,07 mg/mL beta estradiol
Leukocytter	--	10 ⁵ celler/mL
Albumin	Bovint serumalbumin	10 mg/mL
Glukose	--	10 mg/mL
Sur urin (pH 4,0)	Urin + N-acetyl-L-cystein	pH 4,0
Alkalisk urin (pH 9,0)	Urin + ammoniumcitrat	pH 9,0
Bilirubin	--	1 mg/mL

Tabel 42. Potentielt interfererende stoffer i vaginalpodninger

Klasse/stof	Produktnavn	Testkoncentration
Blod	--	60 % v/v
Sædvæske	--	5,0 % v/v
Slim	Mucin	0,8 % vægt/v
Vaginale produkter og prævention, som fås i håndkøb	Vagisil Anti-Itch Crème (1,0 oz)	0,25 % w/v
	K-Y Jelly (4,0 oz)	0,25 % w/v
	Options Gynol II Vaginal Contraceptive Gel	0,25 % w/v
	Walgreens Clotrimazole Vaginal Cream (1,5 oz)	0,25 % w/v
	Vagisil Sensitive Skin Formula Maximum Strength Anti-Itch Creme with Oatmeal (1,0 oz)	0,25 % w/v
	Vagisil ProHydrate Natural Feel Internal Moisturizing Gel (0,2 oz x 8-pak)	0,25 % w/v
	Vagisil Daily Intimate Deodorant Powder (8,0 oz)	0,25 % w/v
	Summer's Eve Medicated Douche	0,25 % v/v
Deodorant og puder	Summer's Eve Deodorant spray (2,0 oz)	0,25 % v/v
Hæmorroidecreme	Preparation H Hemorrhoidal Cream (0.9 oz)	0,25 % w/v
Receptpligtig medicin	Metronidazole Vaginal Gel, 0,75 %	0,25 % w/v
	Estrace® (estradiol-vaginalcreme, USP 0.01%)	0,25 % w/v
Leukocytter	--	10 ⁵ celler/mL
Intravaginale hormoner	--	7 mg/mL progesteron + 0,07 mg/mL beta estradiol

17 Kundesupport og teknisk support

Kontakt teknisk support for spørgsmål vedrørende opsætning af reaktioner, cyklingsforhold og andre forespørgsler.

Tel: +61 2 9209 4169, Email: tech@speedx.com.au

18 Referencer

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.

19 Appendix 1: LightCycler® 480 instrument II

Følgende oplysninger er baseret på LightCycler® 480 Software (version 1.5).

ResistancePlus® MG-sættet indeholder farver til LightCycler® 480 Instrument II. **PlexPCR®** Colour Compensation-sættet (Cat no 90001) skal køres og anvendes til LC480 II-analyse (se afsnit 19.2). Dette sæt kan leveres efter anmodning.

19.1 Programmering af LightCycler® 480 Instrument II (LC480 II)

Detection Format (påvisningsformat)

Opret et brugerdefineret **Detection Format** (påvisningsformat)

Åbn Tools (Værktøjer) > Detection Formats (påvisningsformater)

Opret et nyt påvisningsformat og navn 'SpeedX PlexPCR' (kan oprettes under genereringen af SpeedX Colour Compensation (farvekomensation)-fil) (se Figur 3).

For **Filter Combination Selection** (valg af filterkombination) vælges følgende (excitering-emission):

Tabel 43. Filterkombinationer [^]						
LC480 II	440-488	465-510	533-580	533-610	533-640	618-660

[^] Disse filterkombinationer er standardnavnene for kanalerne

Sæt **Selected Filter Combination List** (listen over valgte filterkombinationer) for alle kanaler til:

Melt Factor (smeltefaktor): 1

Quant Factor (kvantefaktor): 10

Max Integration Time (sec) (maks. integrationstid (sek.)): 1

Figur 3. Brugertilpasset SpeedX-påvisningsformat

Filter Combination Selection

		Emission					
		488	510	580	610	640	660
Excitation	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

Instrument Settings (instrumentindstillinger)

Opret et brugerdefineret **Detection Format** (påvisningsformat)

Åbn Tools (Værktøjer) > Instruments (instrumenter)

For **Instrument Settings** (instrumentindstillinger) > vælges **Barcode Enabled** (stregkode aktiveret)

Experiment setup (opsætning af eksperiment)

Vælg **New Experiment** (nyt eksperiment)

På fanen **Run Protocol** (kør protokol)

Til **Detection Format** (påvisningsformat) vælges den brugertilpassede '**SpeedX PlexPCR**' (Figur 4)

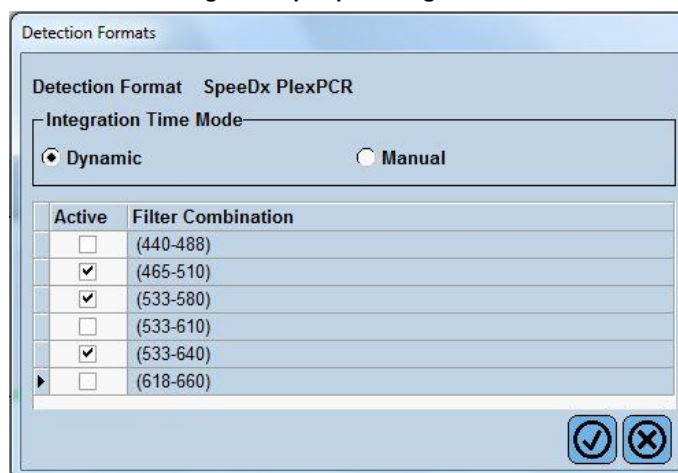
Vælg **Brugerdefineret** >

Vælg **Integration Time Mode** (tilstanden Integrationstid) > **Dynamic** (dynamisk)

Vælg følgende aktive **Filter Combinations** (filterkombinationer) vist i **Tabel 44**

Tabel 44. Kanaler til <i>ResistancePlus</i> ® MG -mål		
<i>M. genitalium</i> -påvisning (MgPa)	23S rRNA-mutation	Intern Control (intern kontrol)
465-510	533-580	533-640

Figur 4. Tilpas påvisningsformat



For at aktivere automatisk prøvpåvisning i analysesoftware, tildel navnemærker til brøndene på pladen

Åbn **Sample Editor** (prøveeditor)-modulet

Vælg en brønd













Rediger **Sample Name** (prøvenavn) til at matche navnemærker defineret i Assays-modulet i analysesoftware (se afsnit 24.4)

Prøver mærkes med *Præfix_Suffiks* (som vist i **Tabel 45** og **Figur 5**) f.eks. Pa_MG

BEMÆRK: Prøvenavnemærker skelner mellem store og små bogstaver. Navnemærker skal nøjagtigt matche dem, der er tildelt i kørselsfilen.

Tabel 45. Prøvenavnemærker til analysesoftware			
Prøvetype	Præfiks (i analysesoftware)	_Suffiks (i analysesoftware)	Sample name (prøvenavn) (i LC480)
Almindelig prøve	S	_MG	S_MG
Negativ kontrol	N	_MG	N_MG
Positiv kontrol (MG, 23S rRNA mutanttype) (Pa)	Pa	_MG	Pa_MG
Positiv kontrol (MG, 23S rRNA vildtype) (Pb)	Pb	_MG	Pb_MG

Figur 5. Sample Editor (prøveeditor) – Tildeling af navnemærker til brønde

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

I **Reaction Volume** (reaktionsvolumen) til > 20 µL

Opret følgende program (vist i nærmere detaljer i **Figur 6 - Figur 9**):

Tabel 46. Thermocycling Program (program for termocykling)				
Program Name (programnavn)	Cycles (cyklusser)	Target °C (Mål C)	Hold (ventetid)	Ramp rate (°C/s) (rampefrekvens C/s) [*]
Polymerase activation (aktivering af polymerase)	1	95°C	2 min	4.4
Touchdown cycling (sænkning af cykling) ^o : Step down (trinvis ned) -0,5°C/cyklus	10	95°C	5 s (sek.)	4.4
		61°C – 56,5°C ^o	30 s	2.2
Kvantificeringscyklus ⁺ : Erhvervelse/registrering	40	95°C	5 s (sek.)	4.4
		52°C ⁺	40 s	2.2
Cooling (afkøling)	1	40°C	30 s	2.2

^{*} Standard rampefrekvens (plade med 96 brønde)

^o **Trinstørrelse:** -0,5°C/Cycle, **Andet mål:** 56°C

⁺ **Analysetilstand:** Kvantificering, **Erhvervelsetilstand:** Enkelt

Figur 6. Program for termocykling – Aktivering af polymerase

LightCycler® 480 Software release 1.5.1.62 SP2
 Instrument: 30231 / Not Connected Database: Research Database (Research)
 Window: New Experiment User: Speedx

Setup
 Detection Format: SpeedX PlexPCR Block Size: 96 Plate ID: Reaction Volume: 20
 Color Comp ID: Lot No: Test ID:

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

Figur 7. Thermocycling program (program for termocykling) – Touchdown cycling (sænkning af cykling)

LightCycler® 480 Software release 1.5.1.62 SP2
 Instrument: 30231 / Not Connected Database: Research Database (Research)
 Window: New Experiment User: Speedx

Setup
 Detection Format: SpeedX PlexPCR Block Size: 96 Plate ID: Reaction Volume: 20
 Color Comp ID: Lot No: Test ID:

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
64	None	00:00:30	2.2	50	0.5	0	0

Figur 8. Thermocycling program (program for termocykling) – Quantification cycling (kvantifikationscykling)

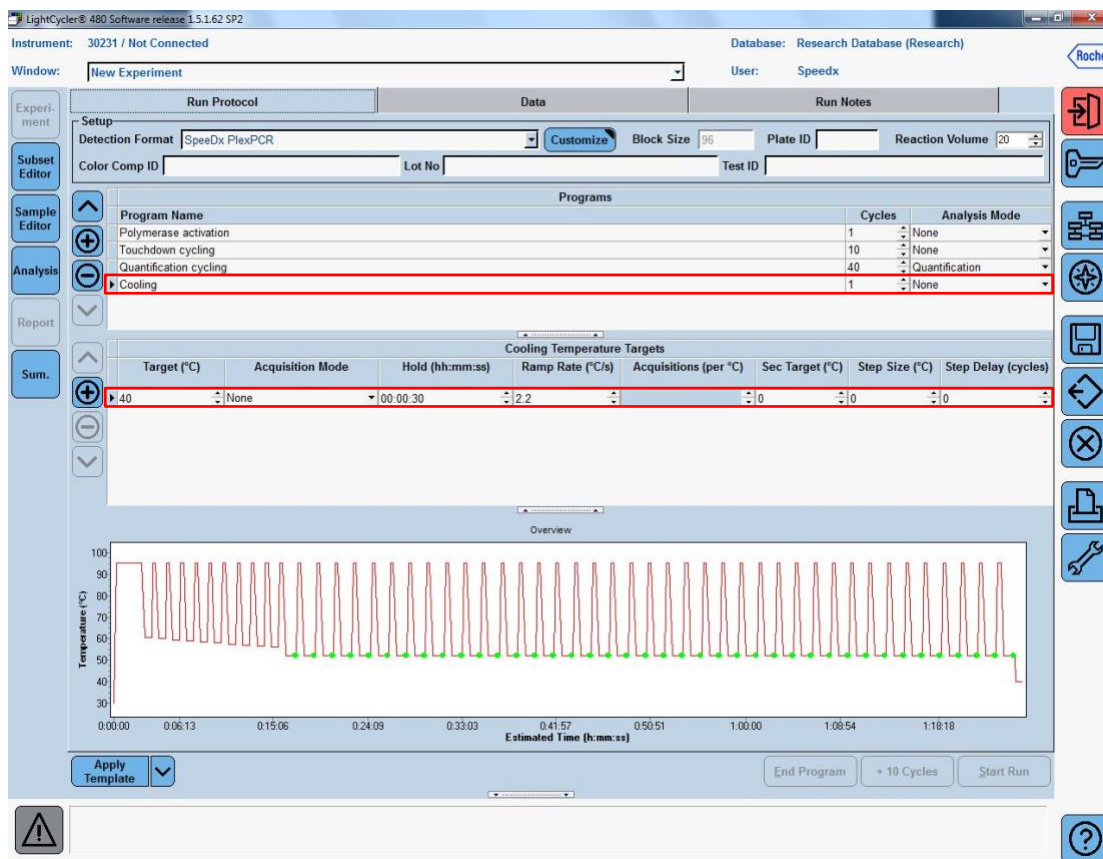
LightCycler® 480 Software release 1.5.1.62 SP2
 Instrument: 30231 / Not Connected Database: Research Database (Research)
 Window: New Experiment User: Speedx

Setup
 Detection Format: SpeedX PlexPCR Block Size: 96 Plate ID: Reaction Volume: 20
 Color Comp ID: Lot No: Test ID:

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

Figur 9. Program for termocykling – Cooling (afkøling)



> Startforløb

Når cyklusprogrammet er færdigt, skal der eksporteres en .ixo- fil til analyse i **ResistancePlus**[®] MG (LC480) -analysesoftware.

Vælg **Export** (eksporter)

Gem den på et sted, der let kan identificeres

19.2 Colour Compensation (farvekompensation) for LightCycler[®] 480 Instrument II

BEMÆRK: **PlexPCR**[®] Colour Compensation (farvekompensation)-sættet (kat. nr. 90001) skal køres og anvendes til LC480 II-analyse. Dette sæt kan leveres efter anmodning.

Til analyse ved hjælp af softwaren skal prøvenavnet for farvekompensationsreaktionerne mærkes som vist i **Tabel 47**.

Når cyklusprogrammet er færdigt, skal der eksporteres en .ixo- fil til analyse i **ResistancePlus**[®] MG (LC480) -analysesoftware.

Vælg **Export** (eksporter)

Gem den på et sted, der let kan identificeres, under navnet "**SpeedX PlexPCR**"

Tabel 47. Prøvenavn for farvekompensationsreaktioner for analysesoftwaren

Reactions (reaktioner)							
	BLANK (TOM)	488 mix (blanding)	510 mix	580 mix	610 mix	640 mix	660 mix
Dominant Channel (dominerende kanal)	Water (vand)	440-488	465-510	533-580	533-610	533-640	618-660
Sample Name (prøvenavn)	BLANK (TOM)	440-488	465-510	533-580	533-610	533-640	618-660

19.3 Fortolkning af resultater

Datafortolkning kræver **ResistancePlus**[®] MG (LC480) analysesoftwaren. Analysesoftwaren kan leveres efter anmodning. Kontakt tech@speedx.com.au for at få flere oplysninger.

Se **afsnit 24** for instruktioner i, hvordan **ResistancePlus**[®] MG (LC480) analysesoftwaren anvendes.

20 Appendix 2: cobas z 480-analyser

Følgende oplysninger er baseret på cobas z 480-analyser Software (LightCycler 480 SW UDF 2.1.0). Kontakt din Roche-repræsentant for support i forbindelse med adgang til UDF-softwaren på din cobas z 480-analyser.

ResistancePlus® MG-sættet indeholder farvestoffer til cobas z 480-analyser. **PlexPCR®** Colour Compensation-sættet (Cat no 90001) skal køres og anvendes til z 480-analyse (se afsnit 20.2). Dette sæt kan leveres efter anmodning.

20.1 Programmering af cobas z 480-analyser

Detection Format (påvisningsformat)

Opret et brugerdefineret **Detection Format** (påvisningsformat)

Åbn Tools (Værktøjer) > Detection Formats (påvisningsformater)

Opret et nyt påvisningsformat og navn '**SpeedX PlexPCR**' (kan oprettes under genereringen af SpeedX Colour Compensation (farvekompensation)-fil) (se **Figur 10**).

For **Filter Combination Selection** (valg af filterkombination) vælges følgende (excitering-emission):

Tabel 48. Filterkombinationer [^]					
z 480	465-510	540-580	540-610	540-645	610-670

[^] Disse filterkombinationer er standardnavnene for kanalerne

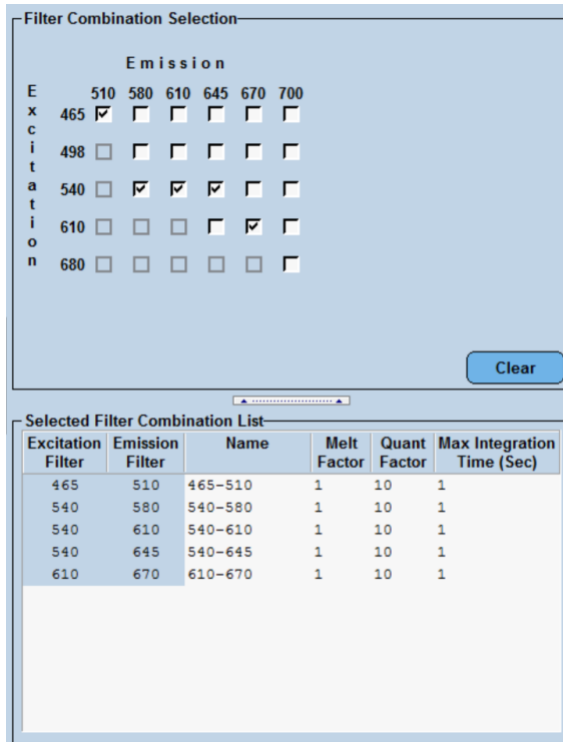
Sæt **Selected Filter Combination List** (listen over valgte filterkombinationer) for alle kanaler til:

Melt Factor (smeltefaktor): 1

Quant Factor (kvantefaktor): 10

Max Integration Time (sec) (maks. integrationstid (sek.)): 1

Figur 10. Brugertilpasset SpeedX-påvisningsformat



The screenshot shows the 'Filter Combination Selection' dialog box. It has a table with 'Excitation' filters (465, 498, 540, 610, 680) on the y-axis and 'Emission' filters (510, 580, 610, 645, 670, 700) on the x-axis. Checkmarks are present for the following combinations: (465, 510), (540, 580), (540, 610), (540, 645), and (610, 670). A 'Clear' button is at the bottom right.

Below the dialog is the 'Selected Filter Combination List' table:

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

Instrument Settings (instrumentindstillinger)

Opret et brugerdefineret **Detection Format** (påvisningsformat)

Åbn **Tools (Værktøjer) > Instruments (instrumenter)**

For **Instrument Settings** (instrumentindstillinger) > vælges **Barcode Enabled** (stregkode aktiveret)

Experiment setup (opsætning af eksperiment)

Vælg **New Experiment** (nyt eksperiment)

På fanen **Run Protocol** (kør protokol)

Til **Detection Format** (påvisningsformat) vælges den brugertilpassede '**SpeedX PlexPCR**' (**Figur 11**)

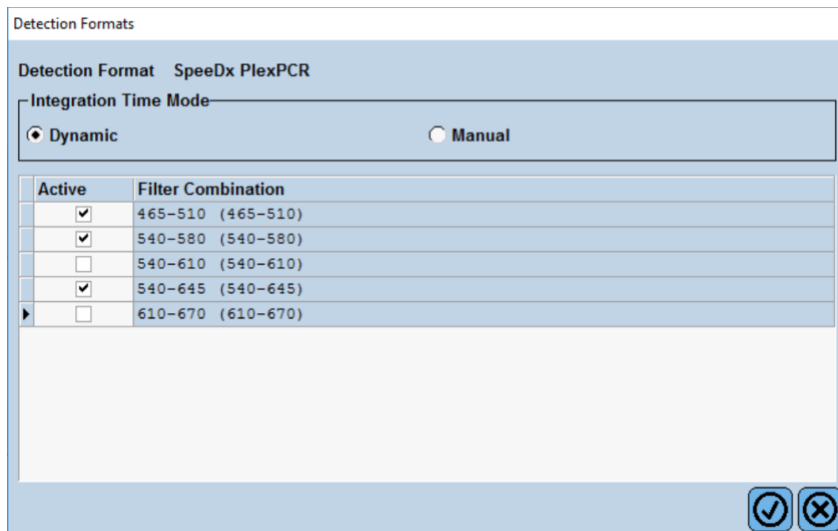
Vælg **Brugerdefineret** >

Vælg **Integration Time Mode** (tilstanden Integrationstid) > **Dynamic** (dynamisk)

Vælg følgende aktive **Filter Combinations** (filterkombinationer) vist i **Tabel 49**

Tabel 49. Kanaler til ResistancePlus® MG -mål		
M. genitalium-påvisning (MgPa)	23S rRNA-mutation	Intern Control (intern kontrol)
465-510	540-580	540-645

Figur 11. Tilpas påvisningsformat



Detection Formats

Detection Format SpeedX PlexPCR

Integration Time Mode

Dynamic Manual

Active	Filter Combination
<input checked="" type="checkbox"/>	465-510 (465-510)
<input checked="" type="checkbox"/>	540-580 (540-580)
<input type="checkbox"/>	540-610 (540-610)
<input checked="" type="checkbox"/>	540-645 (540-645)
<input type="checkbox"/>	610-670 (610-670)

For at aktivere automatisk prøvepåvisning i analysesoftware, tildel navnemærker til brøndene på pladen

Åbn **Sample Editor** (prøveditor)-modulet

Vælg en brønd

Rediger **Sample Name** (prøvenavn) til at matche navnemærker defineret i Assays-modulet i analysesoftware (se **afsnit 24.4**)

Prøverne mærkes som *Præfix_Suffiks* (som vist i **Tabel 50** og **Figur 12**) f.eks. Pa_MG

BEMÆRK: Prøvenavnemærker skelner mellem store og små bogstaver. Navnemærker skal nøjagtigt matche dem, der er tildelt i kørselsfilen.

Tabel 50. Prøvenavnemærker til analysesoftware			
Prøvetype	Præfix (i analysesoftware)	_Suffiks (i analysesoftware)	Sample name (prøvenavn) (i z 480)
Almindelig prøve	S	_MG	S_MG
Negativ kontrol	N	_MG	N_MG
Positiv kontrol (MG, 23S rRNA mutanttype) (Pa)	Pa	_MG	Pa_MG
Positiv kontrol (MG, 23S rRNA vildtype) (Pb)	Pb	_MG	Pb_MG

Figur 12. Sample Editor (prøveeditor) – Tildeling af navnemærker til brønde

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

Indstil **Reaction Volume** (reaktionsvolumen) til > 20 µL

Opret følgende program (vist i nærmere detaljer i **Figur 13 - Figur 16**):

Tabel 51. Thermocycling Program (program for termocykling)				
Program Name (programnavn)	Cycles (cyklusser)	Target °C (Mål C)	Hold (ventetid)	Ramp rate (°C/s) (rampefrekvens C/s)*
Polymerase activation (aktivering af polymerase)	1	95°C	2 min	4.4
Touchdown cycling (sænkning af cykling) ^o : Step down (trinvis ned) -0,5°C/cyklus	10	95°C	5 s (sek.)	4.4
		61°C – 56,5°C ^o	30 s	2.2
Kvantificeringscyklus ⁺ : Erhvervelse/registrering	40	95°C	5 s (sek.)	4.4
		52°C ⁺	40 s	2.2
Cooling (afkøling)	1	40°C	30 s	2.2

* Standard rampefrekvens (plade med 96 brønde)

^o **Trinstørrelse:** -0,5°C/Cycle, **Andet mål:** 56°C

⁺ **Analysetilstand:** Kvantificering, **Erhvervelsesstilstand:** Enkelt

Figur 13. Program for termocykling – Aktivering af polymerase

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

Figur 14. Thermocycling program (program for termocykling) – Touchdown cycling (sænkning af cykling)

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

Figur 15. Thermocycling program (program for termocykling) – Quantification cycling (kvantifikationscykling)

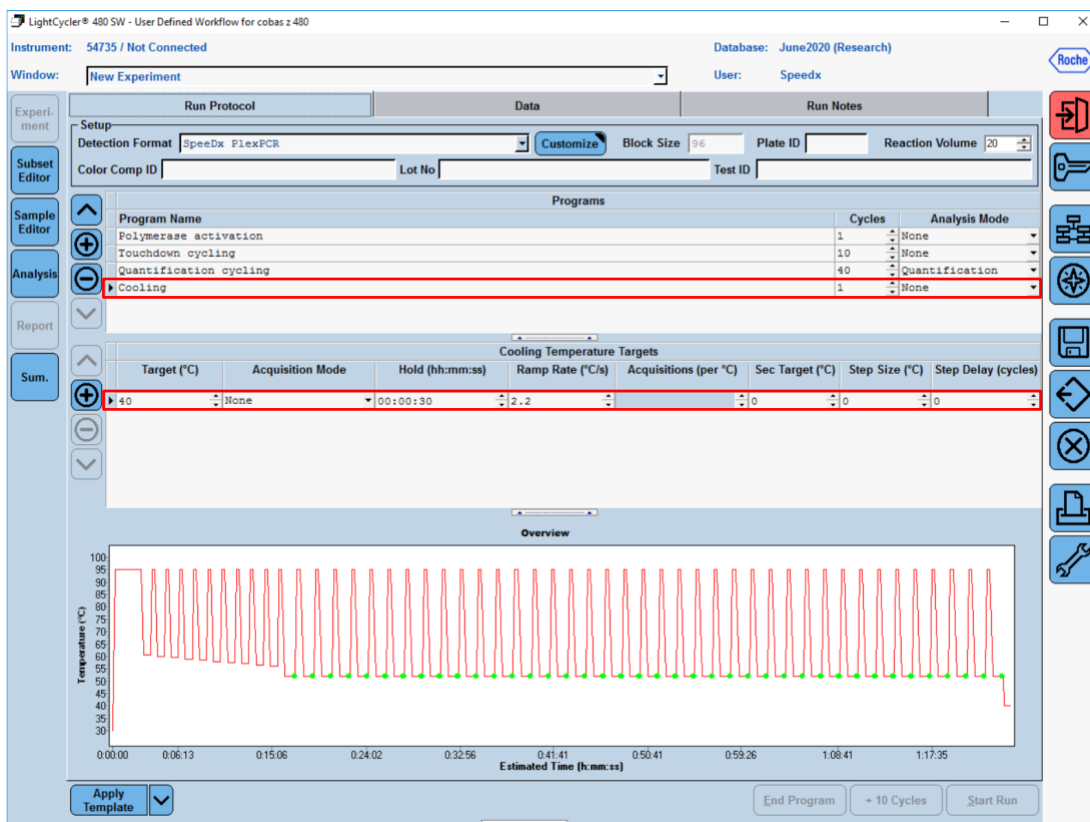
The screenshot shows the 'Programs' table with the following data:

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

Figur 16. Program for termocykling – Cooling (afkøling)



> Startforløb

Når cyklusprogrammet er færdigt, skal der eksporteres en .ixo- -fil til analyse i **ResistancePlus**[®] MG (z480) analysesoftware.

Vælg **Export** (eksporter)

Gem den på et sted, der let kan identificeres

20.2 Colour Compensation (farvekompensation) for cobas z 480-analyser

BEMÆRK: **PlexPCR**[®] Colour Compensation (farvekompensation)-sættet (kat. nr. 90001) skal køres og anvendes til z480-analyse. Dette sæt kan leveres efter anmodning.

Til analyse ved hjælp af softwaren skal prøvenavnet for farvekompensationsreaktionerne mærkes som vist i **Tabel 52**.

Når cyklusprogrammet er færdigt, skal der eksporteres en .ixo- -fil til analyse i **ResistancePlus**[®] MG (z480) analysesoftware.

Vælg **Export** (eksporter)

Gem den på et sted, der let kan identificeres, under navnet "**SpeedX PlexPCR**"

Tabel 52. Prøvenavn for farvekompensationsreaktioner for analysesoftwaren						
Reactions (reaktioner)						
	BLANK (TOM)	510 mix	580 mix	610 mix	640 mix	660 mix
Dominant Channel (dominerende kanal)	Water (vand)	465-510	540-580	540-610	540-645	610-670
Sample Name (prøvenavn)	BLANK (TOM)	465-510	540-580	540-610	540-645	610-670

20.3 Fortolkning af resultater

Datafortolkning kræver **ResistancePlus**[®] MG (z480) analysesoftwaren. Analysesoftwaren kan leveres efter anmodning. Kontakt tech@speedx.com.au for at få flere oplysninger.

Se **afsnit 24** for instruktioner i, hvordan **ResistancePlus**[®] MG (z480) analysesoftwaren anvendes.

21 Appendix 3: Applied Biosystems® 7500 Fast

Følgende oplysninger er baseret på 7500 Software v2.3.

ResistancePlus® MG₍₅₅₀₎-sættet indeholder farver til Applied Biosystems® (ABI) 7500 Fast. Der anvendes standardfarvekalibrationer til alle kanaler. Brugertilpasset kalibrering er ikke påkrævet.

21.1 Programmering af Applied Biosystems® 7500 Fast

Vælg **Advanced Setup** (avanceret opsætning)

I **Setup** (opsætning) > åbnes **Experiment Properties** (eksperimentegenskaber) og følgende vælges

Name the experiment (navngiv eksperimentet)

Instrument > 7500 Fast (96 brønde)

Type of experiment (eksperimenttype) > Quantitation (kvantificering) – Standard Curve (standardkurve)

Reagenser > Andre

Ramp Speed (rampehastighed) > Standard

I **Setup** (opsætning) > åbnes **Plate Setup** (opsætning af plade)

Under fanen **Define Targets and Samples** (definer mål og prøver) >

Define Targets (definer mål) som vist herunder (definer farver efter behov)

Tabel 53. Define Targets (definer mål)		
Target name (målnavn)	Reporter	Quencher (dæmpning)
MgPa	FAM	None (ingen)
23S rRNA-mutation	JOE	None (ingen)
IC	TAMRA	None (ingen)

For at aktivere automatisk prøvepåvisning i analysesoftwarens skal der tildeles navnemærker til brøndene på pladen

I **Setup** (opsætning) > åbnes **Plate Setup** (opsætning af plade)

Under fanen **Define Targets and Samples** (definer mål og prøver) >

Define Samples (definer prøver)

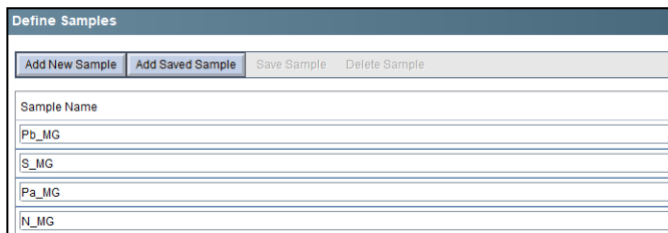
Rediger **Sample Name** (prøvenavn) til at matche navnemærker defineret i Assays-modulet i analysesoftwarens (se **afsnit 24.4**)

Prøver mærkes med *Præfix_Suffiks* (som vist i **Tabel 54** og **Figur 17**) f.eks. Pa_MG

BEMÆRK: Prøvenavnemærker skelner mellem store og små bogstaver. Navnemærker skal nøjagtigt matche dem, der er tildelt i kørselsfilen.

Tabel 54. Prøvenavnemærker til analysesoftware			
Prøvetype	Præfix (i analysesoftware)	_Suffiks (i analysesoftware)	Sample name (prøvenavn) (i 7500 Fast)
Almindelig prøve	S	_MG	S_MG
Negativ kontrol	N	_MG	N_MG
Positiv kontrol (MG, 23S rRNA mutanttype) (Pa)	Pa	_MG	Pa_MG
Positiv kontrol (MG, 23S rRNA vildtype) (Pb)	Pb	_MG	Pb_MG

Figur 17. Sample Editor (prøveeditor) – Tildeling af navnemærker til brønde



Under fanen **Assign Targets and Samples** (tildel mål og prøver) >

Vælg brønde, og tildel mål og prøver til de valgte brønde

Vælg **Passive reference** (passiv reference) > None (ingen)

Under **Setup** (opsætning) > Åbn **Run Method** (kørselsmetode)

Indstil **Reaktionsvolumen pr. brønd** > 20 µL

Opret følgende program (vist mere detaljeret i Graphical View (grafisk visning) (Figur 18 og Figur 19) og tabelvisning) **Figur 20**):

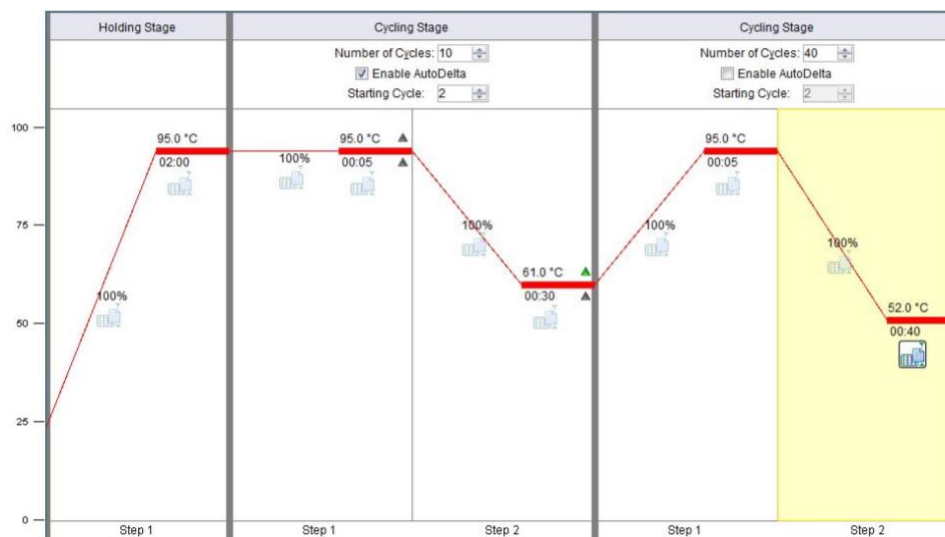
Tabel 55. Thermocycling Program (program for termocykling)				
Program Name (programnavn)	Cycles (cyklusser)	Target °C (Mål C)	Hold (ventetid)	Ramp (rampe)*
Polymerase activation (aktivering af polymerase)	1	95°C	2 min	100 %
Touch down cycling (sænkning af cykling): Step down (trinvis ned) -0,5°C/cyklus ^o	10	95°C	5 s (sek.)	100 %
		61°C – 56,5°C ^o	30 s	100 %
Quantification cycling (kvantifikationscykling)*: Acquisition/Detection (opsamling/påvisning)	40	95°C	5 s (sek.)	100 %
		52°C ⁺	40 s	100 %

* Standard rampefrekvens

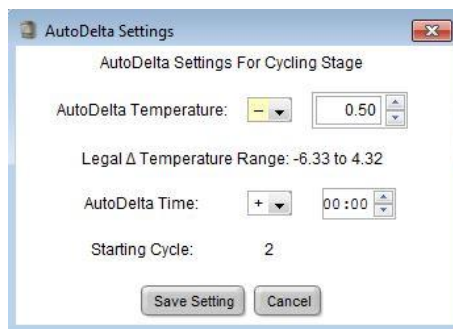
^o Aktiver AutoDelta: -0,5°C/cyklus

⁺ Collect data on hold (indsaml tilbageholdte data)











Figur 18. Run Method (kørselsmetode) – Graphical View (grafisk visning)



Figur 19. Run method (kørselsmetode) – Graphical view (grafisk visning) – Enable AutoDelta (aktiver AutoDelta)



Figur 20. Run method (kørselsmetode) – Tabular View (tabelvisning)

	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					
Collect Data on Hold					
	Step 1	Step 1	Step 2	Step 1	Step 2

Under **Setup** (opsætning) > Åbn **Run Method** (kørselsmetode)

Vælg **Start Run** (start kørsel)

21.2 Fortolkning af resultater

Datafortolkning kræver **ResistancePlus**® MG (7500) analysesoftware. Analysesoftware kan leveres efter anmodning. Kontakt tech@speedx.com.au for at få flere oplysninger.

Se **afsnit 24** for instruktioner i, hvordan **ResistancePlus**® MG (7500) analysesoftware anvendes.

22 Appendix 4: Applied Biosystems 7500 Fast Dx

Følgende oplysninger er baseret på SDS Software v1.4.1 til 7500 Fast Dx.

ResistancePlus[®] MG₍₅₅₀₎-sættet indeholder farver til Applied Biosystems[®] (ABI) 7500 Fast Dx. Der anvendes standardfarvekalibrationer til alle kanaler. Brugertilpasset kalibrering er ikke påkrævet.

22.1 Programmering af Applied Biosystems[®] 7500 Fast Dx

Vælg Create New Document (opret nyt dokument)

I **New Document Wizard** (guiden nyt dokument) vælges følgende (**Figur 21**):

Assay > Standard Curve (standardkurve) (Absolute Quantification (absolut kvantificering))

Container (beholder) > 96-Well Clear

Template (skabelon) > Tomt dokument

Run mode (kørselstilstand) > Standard 7500

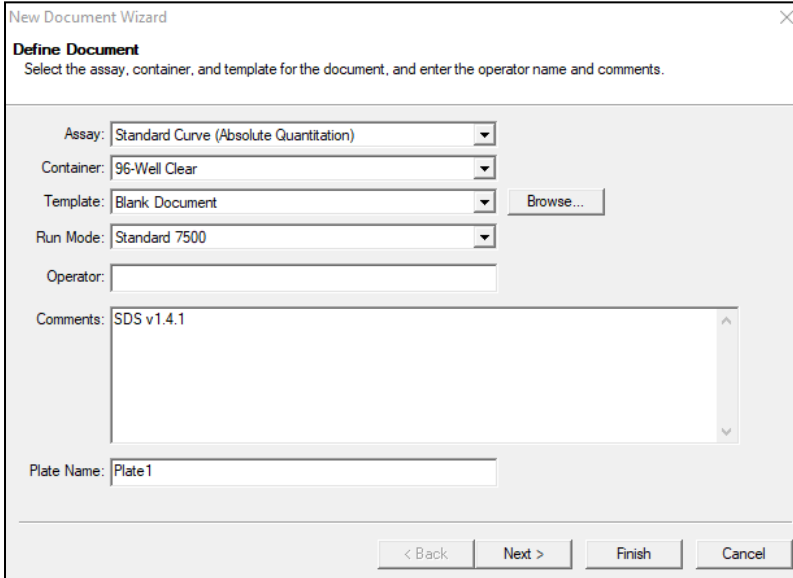
Operator (operatør) > Indtast operatørens navn

Comments (kommentarer) > Indtast eventuelle kommentarer eller yderligere bemærkninger til kørselsfilen

Plate Name (pladenavn) > Tildel et entydigt navn til kørselsfilen

Vælg **Next** (næste)

Figur 21. Vinduet New Document Wizard (guiden nyt dokument)



I **Select Detectors** (vælg detektorer) > vælg **New Detector** (ny detektor)

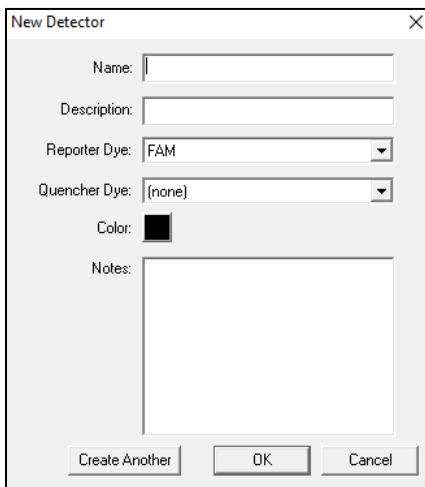
Definer detektorer som vist herunder (definer farver efter behov) (**Tabel 56**

og **Figur 22**)

Tabel 56. Define detectors (definer detektorer)			
Detektorer	Detektornavn	Reporter dye	Quencher (dæmpning)
Detektor 1	MgPa	FAM	None (ingen)
Detektor 2	23S rRNA-mutation	JOE	None (ingen)
Detektor 3	IC	TAMRA	None (ingen)

Vælg **OK**

Figur 22. Vinduet Ny detektor

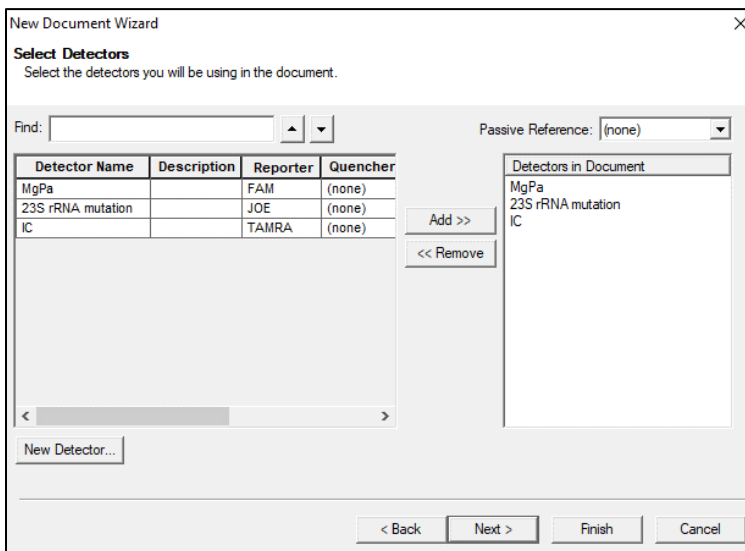


Vælg Detektorer (Figur 23)

Vælg detektorer, og **Add** (tilføj) til dokument

Vælg **Passive reference** (passiv reference) > **None** (ingen)

Figur 23. Vinduet Select Detectors (vælg detektorer)



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

Detectors in Document
MgPa
23S rRNA mutation
IC

I **Set Up** (opsæt) prøveplade >

Vælg brønde, og tildel 4 detektorer til de valgte brønde

- MgPa
- 23S rRNA-mutation
- IC

Vælg **Next** (næste)

For at aktivere automatisk prøvopvisning i analysesoftwaren, tildel navnemærker til brøndene på pladen

I **Setup** (opsæt) > Fanen **Plate** (plade)

Højreklik på brønden, og vælg **Well Inspector** (brøndinspektør) > Indtast **Sample Name** (prøvenavn)

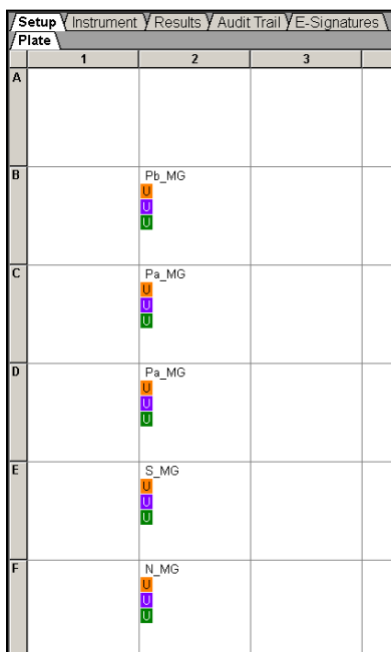
Rediger **Sample Name** (prøvenavn) til at matche navnemærker defineret i Assays-modulet i analysesoftwaren (se **afsnit 24.4**)

Prøver mærkes med *Præfiks_Suffiks* (som vist i **Tabel 57** og **Figur 24**) f.eks. Pb_MG

BEMÆRK: Prøvenavnemærker skelner mellem store og små bogstaver. Navnemærker skal nøjagtigt matche dem, der er tildelt i kørselsfilen.

Tabel 57. Prøvenavnemærker til analysesoftware			
Prøvetype	Præfiks_ (i analysesoftware)	_Suffiks (i analysesoftware)	Sample name (prøvenavn) (i 7500 Fast Dx)
Almindelig prøve	S	_MG	S_MG
Negativ kontrol	N	_MG	N_MG
Positiv kontrol (MG, 23S rRNA mutanttype) (Pa)	Pa	_MG	Pa_MG
Positiv kontrol (MG, 23S rRNA vildtype) (Pb)	Pb	_MG	Pb_MG

Figur 24. Visningen Setup plate (opsæt plade) – Tildel navnemærker til brønde



Setup Plate	1	2	3
A			
B		Pb_MG U U U	
C		Pa_MG U U U	
D		Pa_MG U U U	
E		S_MG U U U	
F		N_MG U U U	

Vælg **Next** (næste)

I fanen **Instrument**

I boksen **Settings** (indstillinger)

For **Sample Volume (prøvevolumen) (µL)**: Indtast 20 µL

Opret følgende termocyclerprotokol (Tabel 58 og Figur 25 og Figur 26)

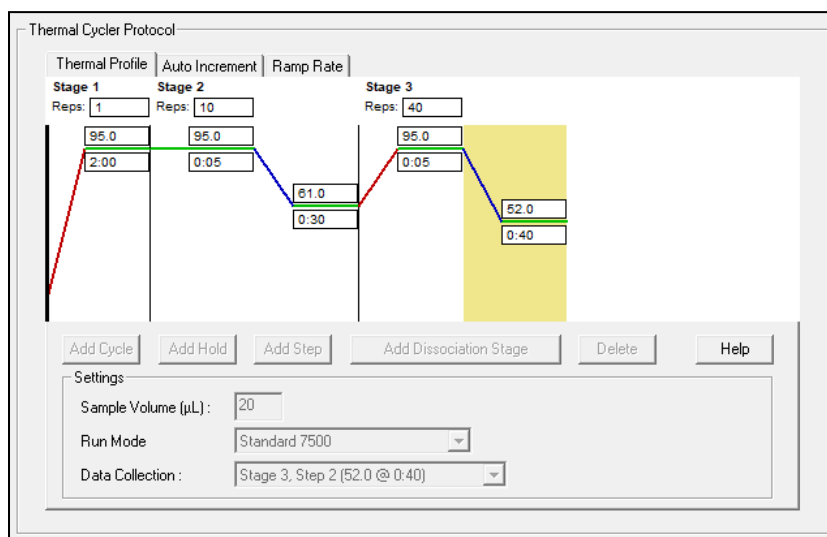
Tabel 58. Termocyclerprotokol				
Program Name (programnavn)	Cycles (cyklusser)	Target °C (Mål C)	Hold (ventetid)	Ramp [‡]
Polymerase activation (aktivering af polymerase)	1	95°C	2 min	100 %
Touch down cycling (sænkning af cykling): Step down (trinvis ned) -0,5°C/cyklus [§]	10	95°C	5 s (sek.)	100 %
		61°C – 56,5°C [§]	30 s	100 %
Kvantificeringscyklus ⁺ : Erhvervelse/registrering	40	95°C	5 s (sek.)	100 %
		52°C ⁺	40 s	100 %

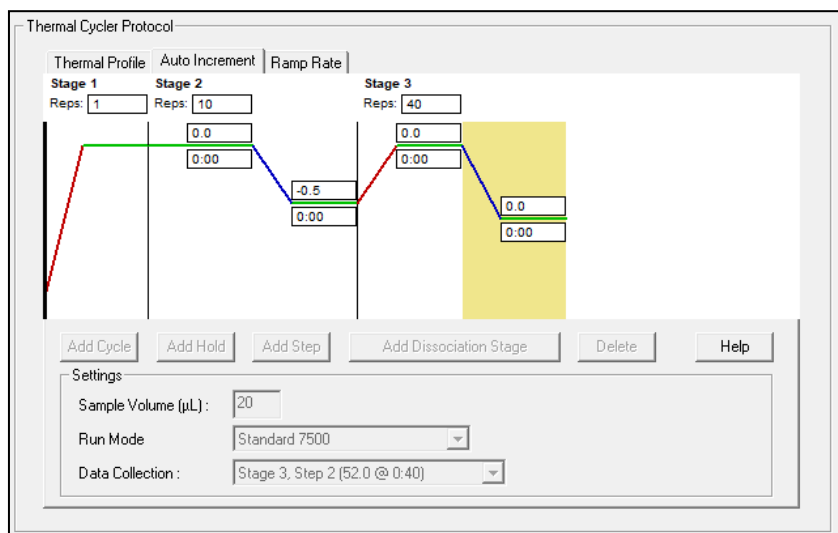
[‡] Standard rampefrekvens

[§] Aktiver AutoDelta: -0,5°C/cyklus

⁺ Collect data on hold (indsaml tilbageholdte data)

Figur 25. Thermal cycler protocol (termocyclerprotokol) – Thermal profile (termisk profil)



Figur 26. Thermal cycler protocol (termocyklerprotokol) – Auto increment (automatisk forøgelse)

22.2 Fortolkning af resultater

Datafortolkning kræver **ResistancePlus**® MG (7500) analysesoftware. Analysoftwaren kan leveres efter anmodning. Kontakt tech@speedx.com.au for at få flere oplysninger.

Se **afsnit 24** for instruktioner i, hvordan **ResistancePlus**® MG (7500) analysesoftwaren anvendes.

23 Appendix 5: Bio-Rad CFX96™ Dx og CFX96 Touch™ Real-Time PCR System

Følgende oplysninger er baseret på Bio-Rad CFX Manager v3.1

ResistancePlus® MG₍₆₇₅₎-sættet indeholder farver til CFX96 Real-Time PCR System. Der anvendes standardfarvekalibrationer til alle kanaler. Brugertilpasset kalibrering er ikke påkrævet.

23.1 Programmering af CFX96™ Dx og CFX96 Touch™ Real-time PCR System

Vælg **View** (vis) > Åbn **Run Setup** (kørselsopsætning)

I **Run Setup** (kørselsopsætning) > fanen **Protocol** (protokol) > vælges **Create New** (opret ny)

I **Protokoleditor** (se **Figur 27**):

Indstil **Sample Volume** (prøvevolumen) > 20 µL

Opret følgende termocyklingsprogram, og gem det som '**SpeedX PCR**'. Denne protokol kan vælges til fremtidige kørsler.

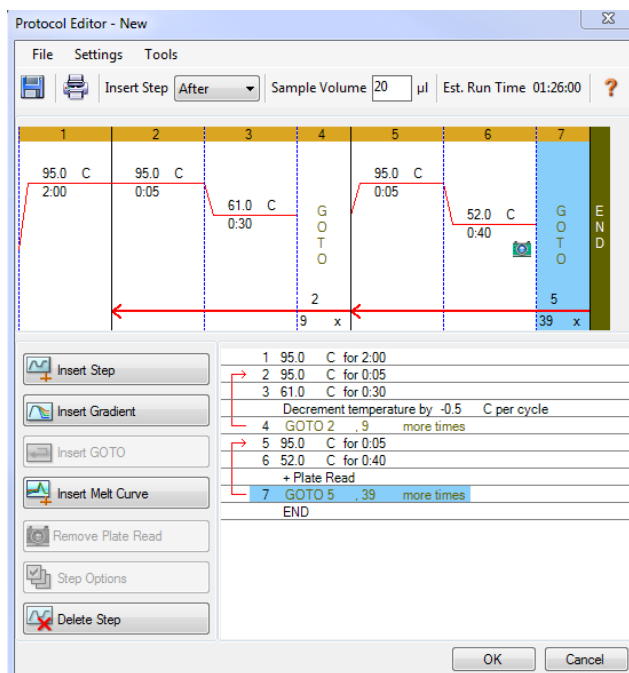
For Touch down-cykling skal man vælge trin 3 og vælge **Step options** (trinvalg) > Forøgelse: -0,5°C/cyklus (vist mere detaljeret i **Figur 28**).

Tabel 59. Thermocycling Program (program for termocykling)			
Program Name (programnavn)	Cycles (cyklusser)	Target °C (Mål C)	Hold (ventetid)
Polymerase activation (aktivering af polymerase)	1	95°C	2 min
Touchdown cycling (sænkning af cykling) ^δ : Step down (trinvis ned) -0,5°C/cyklus	10	95°C	5 s (sek.)
		61°C – 56,5°C ^δ	30 s
Kvantificeringscyklus ⁺ : Erhvervelse/registrering	40	95°C	5 s (sek.)
		52°C ⁺	40 s

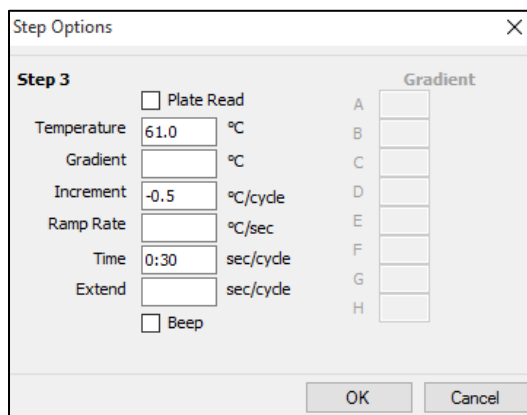
^δ **Trinhandlinger** > Forøgelse: -0,5°C/cyklus

⁺ **Føj plade aflæsning til trin**

Figur 27. Thermocycling Protocol – Graphical view (Protokol for termocykling – grafisk visning)



Figur 28. Step options (trinvalgmuligheder)



The 'Step Options' dialog box is shown for Step 3. It has the following fields and options:

- 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
- Gradient: A, B, C, D, E, F, G, H (checkboxes)

I **Run Setup** (kørselsopsætning) > Fanen **Plate** (plade)

Vælg **Create New** (opret ny)

Vælg **Settings** (indstillinger) > **Plate Type** (pladetype) > Vælg **BR Clear** (BR klar)

Indstil **Scan mode** (scanningstilstand) > **All channels** (alle kanaler)

Vælg **Fluorophores** (fluoroforer) > FAM, HEX, Quasar 705 (se **Tabel 60**)

Vælg brønde, der indeholder prøver, tildel **Sample Type** (prøvetype), og afmærk **Load** (indlæs) for fluoroforer (FAM, HEX, Quasar 705)

Gem pladen

Tabel 60. Kanaler til ResistancePlus® MG ₍₆₇₅₎ -mål		
M. genitalium-påvisning (MgPa)	23S rRNA-mutation	Intern control (intern kontrol)
FAM	HEX	Quasar 705

I **Run Setup** (kørselsopsætning) > Fanen **Start Run** (start kørsel)

Vælg en blok

Start Run (start kørsel)

For at aktivere automatisk prøvoplysning i analysesoftware, tildel navnemærker til brøndene på pladen

Åbn modulet **Plate Setup** (pladeopsætning)

Vælg en brønd

Rediger **Sample Name** (prøvenavn) til at matche navnemærker defineret i Assays-modulet i analysesoftware (se **afsnit 24.4**)

Prøver mærkes med *Præfiks_Suffiks* (som vist i **Tabel 61** og **Figur 29**) f.eks. Pb_MG

BEMÆRK: Prøvenavnemærker skelner mellem store og små bogstaver. Navnemærker skal nøjagtigt matche dem, der er tildelt i kørselsfilen.

Tabel 61. Prøvenavnemærker til analysesoftware			
Prøvetype	Præfiks_ (i analysesoftware)	Suffiks (i analysesoftware)	Sample name (prøvenavn) (i CFX96)
Almindelig prøve	S	_MG	S_MG
Negativ kontrol	N	_MG	N_MG
Positiv kontrol (MG, 23S rRNA mutanttype) (Pa)	Pa	_MG	Pa_MG
Positiv kontrol (MG, 23S rRNA vildtype) (Pb)	Pb	_MG	Pb_MG

Figur 29. Sample Editor (prøveeditor) – Tildeling af navnemærker til brønde

	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		

23.2 Fortolkning af resultater

Datafortolkning kræver **ResistancePlus**® MG (CFX) analysesoftware. Analysesoftware kan leveres efter anmodning. Kontakt tech@speedx.com.au for at få flere oplysninger.

Se **afsnit 24** for instruktioner i, hvordan **ResistancePlus**® MG (CFX) analysesoftware anvendes.

24 Appendix A: Resultatfortolkning

Datafortolkning kræver **ResistancePlus**[®] MG analysesoftware. Mens **PlexPrime**[®] primere giver højere specificitet end andre allel-specifikke primere, kan en vis ikke-specifik amplifikation fra 23S rRNA-mutationsassayet ses i prøver, der indeholder høje koncentrationer af *M. genitalium*-vildtype 23S rRNA. **ResistancePlus**[®] MG-analysesoftware automatiserer datafortolkningen af amplifikationsresultater og gør arbejdsflowet mere effektivt.

Se **Tabel 62** for den relevante analysesoftware til hvert realtids-PCR-instrument. Analysesoftware kan leveres efter anmodning. Kontakt tech@speedx.com.au for at få flere oplysninger.

Tabel 62. ResistancePlus [®] MG-analysesoftware		
Kat. nr.	Analysis software (analysesoftware)*	Realtids-PCR-instrument
99003	ResistancePlus [®] MG (LC480)	LC480 II
99018	ResistancePlus [®] MG (z480)	z 480
99002	ResistancePlus [®] MG (7500)	7500 Fast og 7500 Fast Dx
99008	ResistancePlus [®] MG (CFX)	CFX96 Dx og CFX96 Touch
99023	REFLEX ResistancePlus [®] MG (LC480)	LC480 II
99024	REFLEX ResistancePlus [®] MG (z480)	z 480
99026	REFLEX ResistancePlus [®] MG (7500)	7500 Fast og 7500 Fast Dx
99025	REFLEX ResistancePlus [®] MG (CFX)	CFX96 Dx og CFX96 Touch

* Se websitet <https://plexpcr.com/products/sexually-transmitted-infections/resistanceplus-mg/#resources> for at sikre, at du bruger den nyeste version af analysesoftware

BEMÆRK: Følg standardlaboratoriepraksis for overførsel, rapportering og opbevaring af resultater for at forhindre tab af prøveoplysninger.

24.1 FastFinder-platform – Minimums IT-krav

Analysesoftware er tilgængelig på FastFinder-platformen (<https://www.ugentec.com/fastfinder/analysis>). Minimums IT-krav for installation af FastFinder-platformen er opstillet nedenfor.

Krav til hardware

PC (Mac computere understøttes ikke)

Processor: 2 GHz, 2 GB RAM

Diskplads: 10Gb

Internetforbindelse Kabel eller DSL, proxy understøttes ikke

Min. skærmopløsning: 1366x768 pixels

Understøttet kundeoperativsystem

Operativsystem: Understøttede udgaver

Windows 10 32-bit og 64-bit

Windows 8.1 32-bit, 64-bit, og ARM

Windows 8 32-bit, 64-bit, og ARM

Windows 7 SP1 32-bit og 64-bit

Windows Vista SP2 32-bit og 64-bit

Understøttede browsere

Til FastFinder-brugere med administratorkonto kræves en af følgende browsere:

- Internet Explorer 11 eller nyere
- Microsoft Edge 25 eller nyere
- Firefox 45 eller nyere
- Google Chrome 47 eller nyere.

Det kan eventuelt køre på ældre versioner, men disse understøttes ikke officielt.

Softwarekrav

For at anvende FastFinder-softwaren kræves mindst .NET 4.6.1. Yderligere oplysninger om .NET framework findes på Microsoft Windows hjælpesider.

Antivirussoftware kan sætte FastFinder installationsprogrammet (UgenTec.FastFinder.Installer.exe) i karantæne. Tilføj denne fil til antivirus-hvidlisten. Eksempel: Symantec (Risk: WS.Reputation.1)

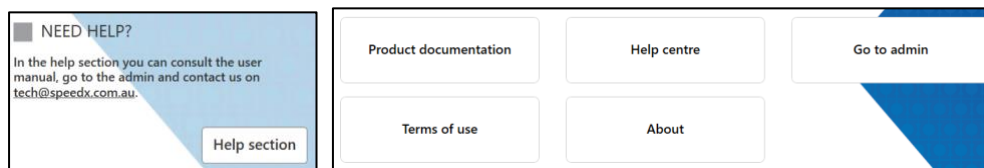
Krav til firewall

https-forbindelser bør tillades til *.fastfinderplatform.com:443

For yderligere detaljerede oplysninger om **FastFinder**-platformen, se **FastFinder-brugsanvisningen**, som findes under menuen **Hjælp**.

Sådan kommer du til hjælpemenuen

- Åbn startmenuen 
- Vælg  eller **Hjælpeafsnittet**, og vælg derefter **Produktdokumentation** efterfulgt af **Brugsanvisning**



24.2 Device set up (opsætning af enhed) (ny bruger eller ny enhed)


Se **FastFinder-brugsanvisningen** for detaljerede instruktioner i, hvordan enheden opsættes. Den er tilgængelig via menuen **Hjælp**
Åbn **FastFinder**

- Vælg **Enheder** på arbejdsflowlinjen
 - > Vælg **Add** (tilføj)
 - > Vælg en fil (kørselsfil) for den nye enhed
- Sådan ændres Current directory (aktuel mappe)
 - > Vælg **Browse** (gennemse), og vælg mappen med de relevante filer
 - > Vælg **Next** (næste)
- Tilføj oplysninger om enheden
 - > Vælg **Save** (gem)

24.2.1 Farvekomensation

BEMÆRK: Se **afanir 19.2** og **afanir 20.2** for yderligere oplysninger om Colour Compensation (farvekomensation)


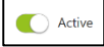
For **LC480 II** og **z 480**-enheder skal der være tilføjet en farvekomensationsfil til enheden

- Vælg LC480 II eller z 480-enheden
 - > I afsnittet **Colour Compensation** (farvekomensation) vælges 

- > Vælg farvekompensationsfilen for enheden fra mappen
- Sådan ændres Current directory (aktuel mappe)
 - > Vælg **Browse** (gennemse), og vælg mappen med de relevante filer
- Vælg **Next** (næste)
- Vælg **ResistancePlus MG (LC480)**, **ResistancePlus MG (z480)**, **REFLEX ResistancePlus MG (LC480)** eller **REFLEX ResistancePlus MG (z480)** fra listen for at linke til dette assay
- Vælg **Save** (gem)

Nye eller yderligere Colour Compensation (farvekompensation)-filer kan føjes til en enhed eller deaktiveres efter behov.

I afsnittet Colour Compensation (farvekompensation) for enheden

- Vælg ud for filnavnet 
- Vælg  for at aktivere eller deaktivere en farvekompensationsfil for et assay
- Vælg **Save** (gem)



24.3 Assay-plug-in (ny bruger)

Se **FastFinder-brugsanvisningen** for detaljerede instruktioner i, hvordan assays opsættes. Den er tilgængelig via menuen **Hjælp**

Åbn **FastFinder**

- Vælg **Assays** på arbejdsflowlinjen
- Vælg **Add** (tilføj)
 - > For LC480 II > Vælg **ResistancePlus MG (LC480)** fra listen
 - > For z 480 > Vælg **ResistancePlus MG (z480)** fra listen
 - > For 7500 Fast og 7500 Fast Dx > Vælg **ResistancePlus MG (7500)** fra listen
 - > For CFX96 Dx og CFX96 Touch > Vælg **ResistancePlus MG (CFX)** fra listen
 - > Til analyse af prøver ekstraheret uden IC i z 480 (reflex-workflow)> Vælg **REFLEX ResistancePlus® MG (LC480)** fra listen
 - > Til analyse af prøver ekstraheret uden IC i z 480 (reflex-workflow)> Vælg **REFLEX ResistancePlus® MG (z480)** fra listen
 - > Til analyse af prøver ekstraheret uden IC i 7500 Fast og 7500 Fast Dx (reflex-workflow)> Vælg **REFLEX ResistancePlus® MG (7500)** fra listen
 - > Til analyse af prøver ekstraheret uden IC i CFX96 Dx og CFX96 Touch (reflex-workflow)> Vælg **REFLEX ResistancePlus® MG (CFX)** fra listen
- Vælg **Add** (tilføj)





Aktivering eller deaktivering af versioner af assay-plug-in'en

- I General assay information (generelle assayoplysninger)
 - > Vælg  Versions (versioner)
 - > Vælg  for at aktivere eller deaktivere assayversionen
 - > Vælg **Save** (gem)

24.4 Navngivning af prøver

Der kan tildeles prøvenavnemærker til en assay-plug-in med henblik på at automatisere påvisning af brønde og prøvetyper til analyse.

Vælg **Assays** på arbejdsflowlinjen


- Vælg under Prøvetypes navnemærker (præfiks) 
 - > Vælg  for tilføje et navnemærke til at angive prøvetype-navnemærker (negativ kontrol, positiv kontrol/s og almindelig prøve)
 - > Tilføj et ønsket ord, akronym eller bogstav i tekstfeltet
 - > Vælg **Save** (gem)
- Vælg under Blandingsdefinitions navnemærker (suffiks) 
 - > Vælg  for at tilføje et navnemærke til at definere blandingsnavnet
 - > Tilføj et ønsket ord, akronym eller bogstav i tekstfeltet
 - > Vælg **Save** (gem)
- Tildel samme navnemærke til de relevante brønde i instrumentsoftwaren (før eller efter kørslen er gennemført)
 - > For **LC480 II**, se **afsnit 19** eller for vejledning i programmering af prøvenavnemærker i kørselsfilen
 - > For **z 480** se **afsnit 20** for vejledning i programmering af prøvenavnemærker i kørselsfilen
 - > For **7500 Fast** se **afsnit 21** for vejledning i programmering af prøvenavnemærker i kørselsfilen
 - > For **7500 Fast Dx** se **afsnit 22** for vejledning i programmering af prøvenavnemærker i kørselsfilen
 - > For **CFX96 Dx** og **CFX96 Touch** se **afsnit 23** for vejledning i programmering af prøvenavnemærker i kørselsfilen

BEMÆRK: Prøvenavnemærker skelner mellem store og små bogstaver. Navnemærker skal nøjagtigt matche dem, der er tildelt i kørselsfilen.

24.5 Tilføjelse af lotnumre for blandinger

Lotnumre for blandinger kan tildeles til assayet for at muliggøre reagensers sporbarhed

- Vælg **Assays** på arbejdsflowlinjen
 - > I **Assay Lot**: Vælg  for at tilføje et nyt lot, eller vælg  for at redigere et eksisterende lot
 - > Når lotnumrene er tilføjet, vil de blive tilgængelige i analysemodulet

Vælg  for at få vist alle lotnumre eller kun aktive lotnumre

24.6 Analyse

Vælg **Analyses** (analyser) i arbejdsflowlinjen for at starte en ny analyse

1 Select datafile

Søg efter den fil, der skal uploades til analyse fra en angiven mappe

- Sådan ændres **Current directory** (aktuel mappe)
 - > Vælg **Browse** (gennemse), og vælg mappen med de relevante filer
- Vælg kørsels (data)-filen fra listen
 - > Vælg **Next step** (næste trin)


2 Assign assay(s)

Tildel assayoplysningerne til pladen manuelt, hvis navngivning af prøver ikke er blevet opsat i modulet Assays


- For **LC480 II** > Vælg **ResistancePlus MG (LC480)**
- For **z 480** > Vælg **ResistancePlus MG (z480)**

- For **7500 Fast** og **7500 Fast Dx** > Vælg **ResistancePlus MG (7500)**
- For **CFX96 Dx** og **CFX96 Touch** > Vælg **ResistancePlus MG (CFX)**
- Til analyse af prøver ekstraheret uden IC i **LC480** (reflex-workflow) > Vælg **REFLEX ResistancePlus® MG (LC480)**
- Til analyse af prøver ekstraheret uden IC i **z 480** (reflex-workflow) > Vælg **REFLEX ResistancePlus® MG (z480)**
- Til analyse af prøver ekstraheret uden IC i **7500 Fast** og **7500 Fast Dx** > Vælg **REFLEX ResistancePlus® MG (7500)**
- Til analyse af prøver ekstraheret uden IC i **CFX96 Dx** og **CFX96 Touch** > Vælg **REFLEX ResistancePlus® MG (CFX)**
- Vælg brønde, og tildel dem som:
 - > Almindelig prøve (S)
 - > Negativ kontrol (N)
 - > Positiv kontrol (MG, 23S rRNA mutanttype) (Pa)
 - > Positiv kontrol (MG, 23S rRNA vildtype) (Pb)
- Vælg **Next step** (næste trin)

Gemning af pladelayout som skabelon til fremtidig brug

- Vælg brønde, og tildel prøvetyper
 - > Vælg  for at gemme en skabelon
- Angiv skabelonnavn til fremtidig brug
 - > Vælg **Save** (gem)

Indlæsning af en tidligere gemt pladeskabelon

- Vælg  for at indlæse en pladeskabelon
 - > Vælg skabelon fra rullemenuen
 - > Markér feltet for at indlæse prøvetyper, der er angivet inden for pladeskabelonen
 - > Vælg **Load** (indlæs)

3 Configure assay(s)

- For **LC480 II** > Vælg **ResistancePlus MG (LC480)**
 - > Vælg den relevante farvekompensationsfil fra rullemenuen
 - > Vælg **Assay Lot** fra rullemenuen
 - > Vælg **Analysér**
- For **z 480** > Vælg **ResistancePlus MG (z480)**
 - > Vælg den relevante farvekompensationsfil fra rullemenuen
 - > Vælg **Assay Lot** fra rullemenuen
 - > Vælg **Analysér**
- For **7500 Fast** og **7500 Fast Dx** > Vælg **ResistancePlus MG (7500)**
 - > Vælg **Assay Lot** fra rullemenuen
 - > Vælg **Analysér**

- For **CFX96 Dx** og **CFX96 Touch** > Vælg **ResistancePlus MG (CFX)**
 - > Vælg **Assay Lot** fra rullemenuen
 - > Vælg **Analysér**

- Til prøver ekstraheret uden IC (reflex-workflow) i **LC480 II** > Vælg **REFLEX ResistancePlus MG (LC480)**
 - > Vælg den relevante farvekompensationsfil fra rullemenuen
 - > Vælg **Assay Lot** fra rullemenuen
 - > Vælg **Analysér**

- Til prøver ekstraheret uden IC (reflex-workflow) i **z 480** > Vælg **REFLEX ResistancePlus MG (z480)**
 - > Vælg den relevante farvekompensationsfil fra rullemenuen
 - > Vælg **Assay Lot** fra rullemenuen
 - > Vælg **Analysér**

- For prøver ekstraheret uden IC (reflex-workflow) i **7500 Fast** og **7500 Fast Dx** > Vælg **REFLEX ResistancePlus MG (7500)**
 - > Vælg **Assay Lot** fra rullemenuen
 - > Vælg **Analysér**

- For prøver ekstraheret uden IC (reflex-workflow) i **CFX96 Dx** og **CFX96 Touch** > Vælg **REFLEX ResistancePlus MG (CFX)**
 - > Vælg **Assay Lot** fra rullemenuen
 - > Vælg **Analysér**

24.7 Resultater

Se **Tabel 63** for en oversigt over mulige rapporterede prøveresultater.

BEMÆRK: Det anbefales kraftigt, at amplifikationskurver bekræftes for alle positive prøver.

Sådan afklares eventuelle uklare resultater 

- Vælg fanen **Resolve** (afklar)
- Vælg prøven, der skal afklares
- Gennemse amplifikationskurver for uklare resultater
 - > Vælg for at indtegne en referencekurve på grafen
 - > Vælg for at indtegne en positiv kontrol på grafen
 - > Vælg for at indtegne en negativ kontrol på grafen
 - > Vælg for at bekræfte det foreslåede resultat, eller vælg en anden valgmulighed
- Bekræft som **Negative** (negativt) eller **Inconclusive** (inkonklusivt), og tilføj bemærkninger


BEMÆRK: Ved inkonklusive prøver gentages ekstrahering og test én gang. Hvis prøveresultatet fortsat er inklusivt, skal der indsamles en ny prøve til gentagen test.

For at færdiggøre analysen og forhindre yderligere brugerredigeringer

- > Vælg **Authorise Analysis** (godkend analyse)
- > Vælg **Yes** (ja) for at bekræfte
- Sådan afvises eller genstartes en analyse
 - > Vælg **Restart Analysis** (genstart analyse) eller **Reject Analysis** (afvis analyse)
 - > Vælg valgmuligheden for at bekræfte

24.8 Referencekurve

En referencekurve kan gemmes og bruges til at sammenligne med prøver på den samme plade eller på tværs af forskellige plader

- Vælg den ønskede prøve i menuen **Brøndoplysninger** eller **Måloplysninger**
- I menuen for amplifikationsgrafene > Vælg 
 - > Vælg afkrydsningsfeltet for kanalen af interesse, og tilføj en etiket
 - > Vælg **Save** (gem) for at tilføje et signal som referencekurve

Referencekurven vil nu blive vist som tilknyttet assayet i menuen Assays og kan når som helst inaktiveres.

24.9 Oversigt over resultater

Tabel 63. Resultatfortolkning <i>ResistancePlus</i> [®] MG analysesoftware (fanen Results Overview (resultatoversigt))						
	Brønd	Navn	Assay	Resultat	Cq-værdier [^]	Samlede resultater
	A1	Prøve 1	ResistancePlus MG	Negativ	KANAL C: 25.31	Prøve 1 - Negativ M. M. genitalium ikke påvist, IC gyldig
	A2	Prøve 2	ResistancePlus MG	Positiv	KANAL A: 13.35 KANAL B: 24.22 KANAL C: 24.36	Prøve 2 - Positiv M. genitalium påvist, 23S rRNA mutation ikke påvist
	A3	Prøve 3	ResistancePlus MG	Positiv	KANAL A: 23.32 KANAL B: 31.64	Prøve 3 - Positiv M. genitalium påvist, 23S rRNA mutation ikke påvist
	A4	Prøve 4	ResistancePlus MG	Positiv	KANAL A: 21.32 KANAL B: 23.22 KANAL C: 24.30	Prøve 4 - positiv M. genitalium, 23S rRNA mutation påvist
	A5	Prøve 5	ResistancePlus MG	Positiv	KANAL A: 23.16 KANAL B: 24.31	Prøve 5 - positiv M. genitalium, 23S rRNA mutation påvist
	A6	Prøve 6	ResistancePlus MG	Ugyldig	KANAL C: 35.02	Prøve 6 - Ugyldig IC ugyldig, gentag test ¹
ⓘ	A7	Prøve 7 (Markeret til afklaring)	ResistancePlus MG	Positiv	KANAL A: 26.27 KANAL B: 28.11 ² KANAL C: 28.92	Prøve 7 - Positiv ² M. genitalium, 23S rRNA mutation påvist
⊕	A7	Prøve 7 (Afklar som inkonklusiv)	ResistancePlus MG	Ugyldig	KANAL A: 26.27 KANAL C: 28.92	Prøve 7 - Ugyldig ³ Inkonklusivt resultat, gentag testen ¹
	B2	Pa (Mutantpositiv kontrol)	ResistancePlus MG	Positiv	KANAL A: 25.01 KANAL B: 24.23	Pa - Positiv Positiv kontrol gyldig
	B3	Pb (Vildtype positiv kontrol)	ResistancePlus MG	Positiv	KANAL A: 25.90	Pb - Positiv Positiv kontrol gyldig
	B4	N (Negativ kontrol)	ResistancePlus MG	Negativ	KANAL C: 26.25	N - Negativ Negativ kontrol gyldig

[^] Se Tabel 12 for kanalnavne for forskellige instrumenter

¹ Ved ugyldige og inkonklusive IC-prøver gentages ekstrahering og test

² En prøve med usikker Cq markeres til afklaring med ⓘ

³ En prøve afklaret som værende inkonklusiv markeres med ⊕

24.10 Eksport af resultater

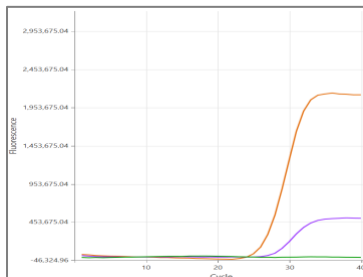
- Eksport af resultater
 - > Vælg **Exports** (eksporter) på arbejdsflowlinjen
 - > Eksporter en eller flere af følgende rapporttyper: **Cq-værdiliste (CSV)**, **Resultater (CSV)**, **Generisk amplifikation CSV** eller den relevante LIS-integrationsfil.
 - > Vælg **Exports** (eksporter)
- Download af eksporter
 - > Vælg **Reports** (rapporter) i arbejdsflowlinjen
 - > Vælg filerne, og gem dem
- Som alternativ kan der eksporteres en brugertilpasset rapport
 - > Eksporter **Amplification Curve Analysis (PDF)** (analyse af amplifikationskurve (PDF))
 - > Vælg de oplysninger, der ønskes inkluderet (grafer, auditspor, resultatoversigt)

- > Vælg de ønskede rapportindstillinger for at brugerdefinere prøverækkefølgen
- Vælg **Exports** (eksporter)
 - > Åbn den i **Report Viewer** (rapportvisning) for at vise, gemme og udskrive

24.11 Eksempel på grafer for kontrol

I de følgende eksempler vises amplifikationskurverne (baselinekorrigerede amplifikationskurver) og resultatoversigten fra **ResistancePlus MG (7500)**-analyse-softwaren for de forskellige kontrolprøvetyper.

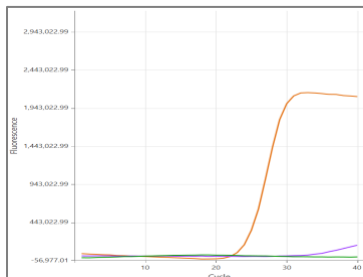
24.11.1 *M. M genitalium*, 23S rRNA-mutantkontrol (Pa)



KANAL A KANAL B KANAL C

Brønd	Navn	Assay	Resultat	Cq-værdier	Samlede resultater
B1	Pa	ResistancePlus MG	Positiv	KANAL A: 26.36 KANAL B: 27.38	Pa - Positiv Positiv kontrol gyldig

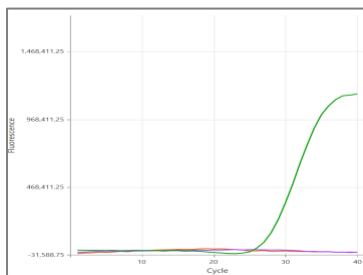
24.11.2 *M. M genitalium*, 23S rRNA-vildtypekontrol (Pb)



KANAL A KANAL B KANAL C

Brønd	Navn	Assay	Resultat	Cq-værdier	Samlede resultater
D12	Pb	ResistancePlus MG	Positiv	KANAL A: 24.30 KANAL B: 34.29	Pb - Positiv Positiv kontrol gyldig

24.11.3 *M. genitalium*-negativ kontrol (N) (negativ prøve)



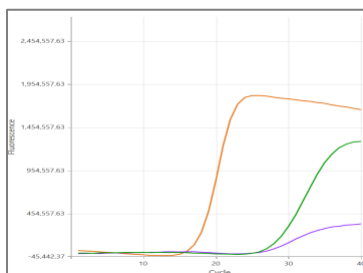
KANAL A KANAL B KANAL C

Brønd	Navn	Assay	Resultat	Cq-værdier	Samlede resultater
D12	N	ResistancePlus MG	Negativ	KANAL C: 27.65	N - Negativ Negativ kontrol gyldig

24.12 Eksempler

I de følgende eksempler vises amplifikationskurverne (baselinekorrigerede amplifikationskurver) og resultatoversigten fra **ResistancePlus MG (7500)**-analyseprogrammet for forskellige prøver.

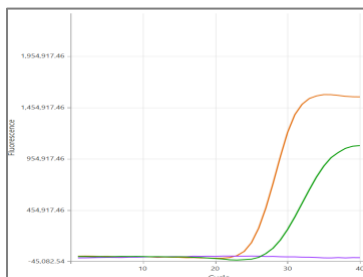
24.12.1 Eksempel 1. Høj kopi *M. genitalium*, 23S rRNA-vildtypeprøve



KANAL A KANAL B KANAL C

Brønd	Navn	Assay	Resultat	Cq-værdier	Samlede resultater
D2	Prøve 12	ResistancePlus MG	Positiv	KANAL A: 16.34 KANAL B: 26.59 KANAL C: 26.00	Prøve 12 - Positiv M. genitalium påvist, 23S rRNA mutation ikke påvist

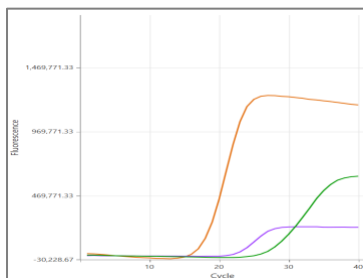
24.12.2 Eksempel 2. Lav kopi *M. genitalium*, 23S rRNA-vildtypeprøve



KANAL A KANAL B KANAL C

Brønd	Navn	Assay	Resultat	Cq-værdier	Samlede resultater
F1	Prøve 6	ResistancePlus MG	Positiv	KANAL A: 29.90 KANAL C: 28.11	Prøve 6 – positiv M. genitalium påvist, 23S rRNA mutation ikke påvist

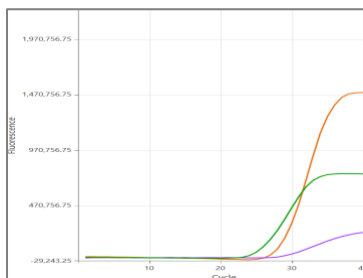
24.12.3 Eksempel 3. Høj kopi *M. genitalium*, 23S rRNA-mutantprøve



KANAL A KANAL B KANAL C

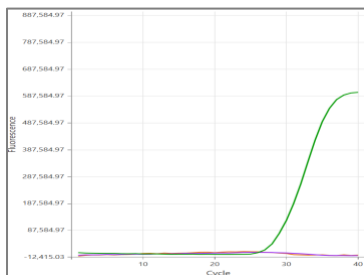
Brønd	Navn	Assay	Resultat	Cq-værdier	Samlede resultater
G3	Prøve 9	ResistancePlus MG	Positiv	KANAL A: 18.08 KANAL B: 22.31 KANAL C: 28.03	Prøve 9 – Positiv M. genitalium, 23S rRNA mutation påvist

24.12.4 Eksempel 4. Lav kopi *M. genitalium*, 23S rRNA-mutantprøve



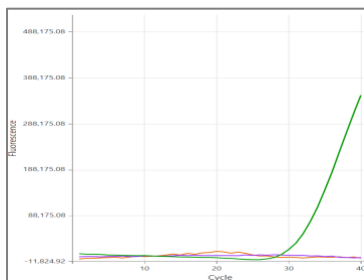
KANAL A KANAL B KANAL C

Brønd	Navn	Assay	Resultat	Cq-værdier	Samlede resultater
E3	Prøve 21	ResistancePlus MG	Positiv	KANAL A: 29.08 KANAL B: 29.23 KANAL C: 26.13	Prøve 21 - Positiv M. genitalium, 23S rRNA mutation påvist

24.12.5 Eksempel 5. Negativ prøve

KANAL A KANAL B KANAL C

Brønd	Navn	Assay	Resultat	Cq-værdier	Samlede resultater
E3	Prøve 73	ResistancePlus MG	Negativ	KANAL C: 29.23	Prøve 73 - Negativ M. M. genitalium ikke påvist, IC gyldig

24.12.6 Eksempel 6. Ugyldig prøve

KANAL A KANAL B KANAL C







Brønd	Navn	Assay	Resultat	Cq-værdier	Samlede resultater
E3	Prøve 35	ResistancePlus MG	Ugyldig	KANAL C: 31.16	Prøve 35 - Ugyldig IC invalid, repeat test (IC ugyldig, gentag test)

I dette eksempel er IC-signalet uden for kanalens cut-off-værdi. Ved IC ugyldig-prøver gentages ekstrahering og test.

24.12.7 Eksempel 7. Prøver der skal afklares – negativt signal

I dette eksempel er KANAL B (JOE) markeret til afklaring, og softwaren foreslår, at prøven er negativ (**Figur 30**).

Figur 30. Prøver der skal afklares som set i analysesoftwarens afklaringsmenu

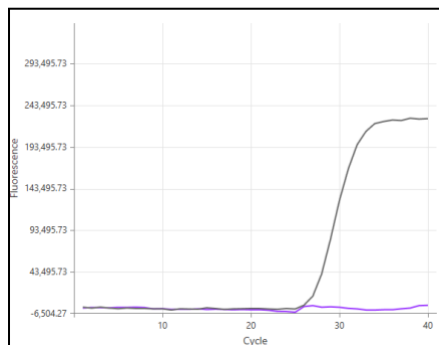
Target	Channel	Cq	Curve result	Info	
MgPa	FAM	21.32	Positive 	M. genitalium detected	
 23S rRNA mutation	JOE	—	Negative  	Mutant not detected	
IC	TAMRA	27.31	Positive 		

For at bestemme, hvordan afklaringen skal foretages, kan der indtegnes en anden prøve eller kontrol til signalsammenligning

- Vælg for at indtegne en positiv referencekurve (tidligere gemt) for KANAL B (JOE)
- Vælg for at indtegne en positiv kontrol fra kørslen

- Vælg for at indtegne en negativ kontrol fra kørslen

KANAL B



Ved eftersyn af amplifikationskurverne (vist herover) ses det, at der ikke er nogen amplifikation i kanalen.

Resultatet afklares ved at vælge -ikonet for at bekræfte softwarens forslag om en negativ prøve. Det løste resultat vises i **Figur 31** nedenfor.

Figur 31. Afklaret resultat som set i analysesoftwarens afklaringsmenu

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		

24.12.8 Eksempel 8. Prøver der skal afklare – Inkonklusivt signal

I dette eksempel er KANAL B (JOE) markeret til afklaring, og softwaren foreslår, at prøven er positiv (**Figur 32**).

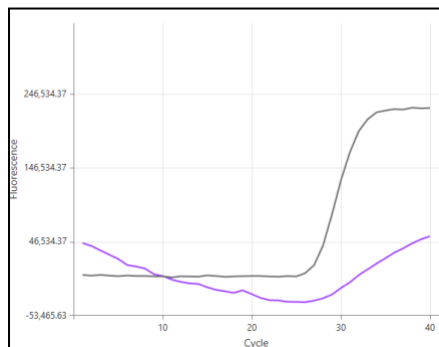
Figur 32. Prøver der skal afklares som set i analysesoftwarens afklaringsmenu

	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		


For at bestemme, hvordan afklaringen skal foretages, kan der indtegnes en anden prøve eller kontrol til signalsammenligning

- Vælg **Ref** for at indtegne en positiv referencekurve (tidligere gemt) for KANAL B (JOE)
- Vælg **P** for at indtegne en positiv kontrol fra kørslen
- Vælg **N** for at indtegne en negativ kontrol fra kørslen

KANAL B



Ved eftersyn af amplifikationskurverne (vist herover) er der potentiel amplifikation i kanalen.

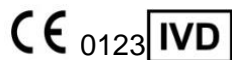
Det anbefales at afklare til inkonklusivt ved at vælge -ikonet og vælge Inconclusive (inkonklusivt) i rullemenuen. Kommentarer kan tilføjes i prøvens auditspor. Prøven skal ekstraheres og testes igen. Det løste resultat vises i **Figur 33** nedenfor.

Se **Tabel 63**, prøve 7, for hvordan resultaterne vises før og efter afklaring i fanen **Results Overview** (resultatoversigt).

Figur 33. Afklaret resultat som set i analysesoftwarens afklaringsmenu

	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		

25 Ordliste



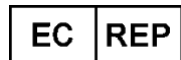
Europæisk konformitet
Til *in vitro*-diagnostisk brug



Katalognummer



Batchkode



Fabrikantens bemyndigede
Repræsentant I Det
Europæiske Fællesskab



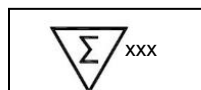
Fabrikant



Fremstillingsdato



Temperaturbegrænsning



Indeholder tilstrækkeligt
xxx bestemmelser



Anvendes inden



Europæisk importør



Storbritanniens
overensstemmelsesmærke

SpeedX-produkter kan dækkes af en eller flere lokale eller udenlandske patenter. Se www.plexpcr.com/patents for udførlig patentinformation.

PlexPCR[®], **ResistancePlus**[®], **PlexPrime**[®] og **PlexZyme**[®] er varemærker tilhørende SpeedX. Andre ophavsrettigheder og varemærker tilhører de respektive ejere.

© Copyright 2022 SpeedX Pty. Ltd.