



ResistancePlus® MG

Dosaggio PCR multiplex in tempo reale per l'identificazione del *Mycoplasma genitalium* e il rilevamento di mutazioni associate alla resistenza all'azitromicina



Prodotto	Piattaforma	Capacità (reazioni)	N. catalogo
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

Prodotti accessori – Software di analisi

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 L'Aia
Paesi Bassi



SpeedX Pty Ltd
Suite 102 National Innovation Centre
4 Cornwallis Street, Eveleigh
NSW 2015, Australia
Tel: +61 2 9209 4170, Email: tech@speedx.com.au

ESCLUSIVAMENTE PER USO PROFESSIONALE

Non per la vendita negli Stati Uniti

Contenuto

1	Descrizione del prodotto	5
2	Usò previsto.....	5
3	Informazioni sui patogeni	5
4	Contenuto del kit.....	6
5	Spedizione e conservazione	7
6	Avvertenze e precauzioni	8
6.1	Generalità	8
6.2	Laboratorio.....	8
6.3	Manipolazione dei campioni	8
6.4	Test.....	8
6.5	Precauzioni di sicurezza.....	8
6.6	Plugin del test: Avvertenze/Precauzioni/Limiti.....	8
7	Prodotti e materiali di consumo associati.....	9
8	Principi della tecnologia	11
9	Panoramica della procedura	13
10	Procedura dettagliata	14
10.1	Raccolta, trasporto e conservazione del campione.....	14
10.1.1	Dispositivi di raccolta campioni convalidati	14
10.1.2	Raccolta, trasporto e conservazione dell'urina pura	14
10.1.3	Raccolta, trasporto e conservazione del tampone secco	14
10.1.4	Raccolta, trasporto e conservazione del Multi-Collect Specimen Collection Kit (Abbott, n. cat. 9K12-01).....	14
10.1.5	Raccolta, trasporto e conservazione del kit di raccolta delle urine Aptima® (Hologic, n. cat. 301040).....	15
10.1.6	Raccolta, trasporto e conservazione del kit di raccolta di campioni con tampone Aptima® Multitest (Hologic, n. cat. 03546)	15
10.1.7	Raccolta, trasporto e conservazione di DeltaSwab ViCUM® 2 mL + tampone floccato standard (deltalab, n. cat. 304278)	16
10.1.8	Raccolta, trasporto e conservazione di Vacumed® Urine senza conservanti (FL medical, n. cat. 44950)	16
10.1.9	Raccolta, trasporto e conservazione di Regular FLOQSwab™ in 1 mL di terreno UTM™ (Copan n. cat. 359C)	16
10.1.10	Raccolta, trasporto e conservazione di cobas® PCR Media (Roche, n. cat. 06466281190).....	16
10.1.11	Estratti di campioni convalidati.....	17
10.2	Elaborazione del campione	17
10.3	Controllo interno (IC).....	18
10.3.1	Controllo interno su MagNA Pure 96	18
10.3.2	Controllo interno sul MICROLAB STARlet IVD	18
10.3.3	Controllo interno su QIASymphony® SP	18
10.3.4	Controllo interno su easyMAG®	19
10.4	Preparazione della PCR in tempo reale.....	20
10.4.1	Preparazione della Master Mix	20
10.4.2	Stabilità della Master Mix.....	21
10.5	Preparazione di PCR con acidi nucleici estratti (flusso di lavoro reflex)	21
11	Programmazione e analisi.....	22
12	Interpretazione dei risultati	23
13	Limiti	24
14	Controllo qualità	25

15	Istruzioni per <i>ResistancePlus</i> [®] MG Positive Control	25
15.1	Istruzioni per l'uso	25
16	Caratteristiche di prestazione	26
16.1	Prestazione clinica	26
16.1.1	Studio clinico 1	26
16.1.2	Studio clinico 2	27
16.1.3	Studio clinico 3	28
16.1.4	Studio clinico 4	29
16.1.5	Studio clinico 5	31
16.1.6	Studio clinico 6	32
16.1.7	Studio clinico 7	33
16.2	Prestazione analitica	34
16.2.1	Riproducibilità e ripetibilità	34
16.2.2	Sensibilità analitica	37
16.2.3	Specificità analitica	37
16.2.4	Sostanze potenzialmente interferenti	38
16.2.5	Reazione incrociata con altre mutazioni di rRNA 23S	40
17	Assistenza clienti e assistenza tecnica	40
18	Bibliografia	41
19	Appendice 1: LightCycler [®] 480 instrument II	42
19.1	Programmazione del LightCycler [®] 480 Instrument II (LC480 II)	42
19.2	Colour Compensation (compensazione del colore) per LightCycler [®] 480 Instrument II	46
19.3	Interpretazione dei risultati	47
20	Appendice 2: analizzatore cobas z 480	48
20.1	Programmazione dell'analizzatore cobas z 480	48
20.2	Compensazione del colore per l'analizzatore cobas z 480	52
20.3	Interpretazione dei risultati	53
21	Appendice 3: Applied Biosystems [®] 7500 Fast	54
21.1	Programmazione di Applied Biosystems [®] 7500 Fast	54
21.2	Interpretazione dei risultati	57
22	Appendice 4: Applied Biosystems [®] 7500 Fast Dx	58
22.1	Programmazione dell'Applied Biosystems [®] 7500 Fast Dx	58
22.2	Interpretazione dei risultati	62
23	Appendice 5: Sistema di PCR in tempo reale Bio-Rad CFX96 [™] Dx e CFX96 Touch [™]	63
23.1	Programmazione dei sistemi PCR in tempo reale CFX96 [™] Dx e CFX96 Touch [™]	63
23.2	Interpretazione dei risultati	65
24	Appendice A: interpretazione dei risultati	66
24.1	Piattaforma FastFinder – Requisiti IT minimi	66
24.2	Device set up (impostazione del dispositivo) (nuovo utente o dispositivo)	67
24.2.1	Compensazione del colore	67
24.3	Plug-in di dosaggio (nuovo utente)	68
24.4	Denominazione dei campioni	68
24.5	Aggiunta dei numeri di lotto delle miscele	69

24.6	Analisi	69
24.7	Risultati	71
24.8	Curva di riferimento	72
24.9	Panoramica dei risultati	73
24.10	Esportazione dei risultati	73
24.11	Grafici di esempio dei controlli	74
24.11.1	<i>M. genitalium</i> , controllo mutante 23S rRNA (Pa).....	74
24.11.2	<i>M. genitalium</i> , controllo di 23S rRNA tipo selvaggio (Pb)	74
24.11.3	<i>M. genitalium</i> controllo negativo (N) (campione negativo).....	75
24.12	Esempi	75
24.12.1	Esempio 1. Campione alta copia di <i>M. genitalium</i> , rRNA 23S di tipo selvaggio	75
24.12.2	Esempio 2. Campione bassa copia di <i>M. genitalium</i> , rRNA 23S di tipo selvaggio	76
24.12.3	Esempio 3. Campione alta copia di <i>M. genitalium</i> , mutante rRNA 23S	76
24.12.4	Esempio 4. Campione bassa copia di <i>M. genitalium</i> , mutante rRNA 23S.....	76
24.12.5	Esempio 5. Campione negativo	77
24.12.6	Esempio 6. Campione non valido	77
24.12.7	Esempio 7. Campioni da risolvere – Segnale negativo	77
24.12.8	Esempio 8. Campioni da risolvere – Segnale inconcludente	79
25	Glossario	80

1 Descrizione del prodotto

Il kit **ResistancePlus**[®] MG rileva contemporaneamente *M. genitalium* e 4 mutazioni alle posizioni 2058 e 2059 nel gene rRNA 23S (numerazione di *E. coli*) che sono associate alla resistenza all'azitromicina (antibiotico della classe dei macrolidi). Il kit **ResistancePlus**[®] MG è un multiplex PCR in tempo reale a 1 pozzetto composto da 3 letture. La lettura 1 indica la presenza o l'assenza di *M. genitalium* attraverso il rilevamento del gene MgPa; la lettura 2 indica la presenza di una mutazione A2058G, A2059G, A2058T o A2058C nel gene rRNA 23S; la lettura 3 è un controllo interno per monitorare l'efficienza di estrazione e l'inibizione della qPCR. Il kit **ResistancePlus**[®] MG utilizza **PlexZyme**[®] e **PlexPrime**[®] per una specificità e una capacità di multiplexing superiori. Il test è convalidato su campioni estratti utilizzando il sistema MagNA Pure 96 (Roche), MICROLAB STARlet IVD (Hamilton), QIASymphony[®] SP (QIAGEN), NUCLISENS[®] easyMAG[®] (Biomérieux) e il rilevamento in tempo reale sullo strumento Roche LightCycler[®] 480 II (LC480 II), sull'analizzatore cobas z 480 (z480), sull'Applied Biosystems[®] 7500 Fast (7500 Fast), sull'Applied Biosystems[®] 7500 Fast Dx (7500 Fast Dx) e sui sistemi di rilevamento PCR in tempo reale Bio-Rad CFX96[™] Dx (CFX96 Dx) e CFX96 Touch[™] (CFX96 Touch).

2 Uso previsto

Il kit **ResistancePlus**[®] MG è un test PCR diagnostico *in vitro* multiplex qualitativo in tempo reale per l'identificazione di *M. genitalium* e il rilevamento di 4 mutazioni nel gene rRNA 23S (A2058G, A2059G, A2058T e A2058C), numerazione di *Escherichia coli* associati alla resistenza all'azitromicina (antibiotico della classe dei macrolidi). È pensato per facilitare la diagnosi di *M. genitalium*, rileva le mutazioni associate alla resistenza all'azitromicina nel *M. genitalium* e deve essere utilizzato in concomitanza con le informazioni cliniche e di laboratorio.

Il kit **ResistancePlus**[®] MG può essere utilizzato con i seguenti tipi di campioni: urina maschile e femminile e tamponi vaginali, di pazienti sintomatici e asintomatici.

Risultati negativi non escludono infezioni da *M. genitalium* e non confermano la sensibilità all'azitromicina, in quanto potrebbero esserci altri meccanismi che determinano il fallimento del trattamento.

Il kit **ResistancePlus**[®] MG è pensato per l'uso in contesti professionali quali ospedali, laboratori di riferimento o laboratori statali. Non è destinato all'autodiagnosi, all'uso domestico o al point of care.

3 Informazioni sui patogeni

Il *M. genitalium* è un piccolo batterio che si trova nel tratto urogenitale umano. Il *M. genitalium* è stato associato a una molteplicità di infezioni sessualmente trasmissibili (IST). Negli uomini, è la seconda causa più comune di uretrite non gonococcica (NGU), ed è anche associato a prostatite, epididimite e balanopostite, infiammazione del glande e del prepuzio¹. Nelle donne, è associato a cervicite, malattia infiammatoria pelvica (PID), tra cui endometrite (infiammazione del rivestimento endometriale) e salpingite (infiammazione delle tube di Falloppio)^{1,2,3}.

L'azitromicina viene comunemente utilizzata nel trattamento di *M. genitalium* e nella gestione sindromica delle IST come la NGU e la cervicite. L'azitromicina appartiene alla classe degli antibiotici macrolidi e agisce legandosi all'rRNA 23S per inibire la sintesi proteica. Le mutazioni puntiformi a carico del gene rRNA 23S del *M. genitalium*, A2058G, A2059G, A2058T, A2058C e A2059C (numerazione di *E. coli*) sono state associate al fallimento del trattamento e/o alla resistenza *in vitro* all'azitromicina^{4,5}. Le mutazioni più comuni sono A2058G e A2059G, che, secondo un recente studio, contribuiscono all'89% delle mutazioni di resistenza ai macrolidi⁶.

4 Contenuto del kit

Tabella 1. Contenuto dei kit <i>ResistancePlus</i> [®] MG				
Colore del tappo	Contenuto	Descrizione	N. cat. 20001L-01 (100 reazioni)	N. cat. 2000125 (25 reazioni)
Blu	<i>Plex</i> Mastermix, 2x	Mastermix contenente componenti necessari per la qPCR tra cui dNTP, MgCl ₂ , DNA polimerasi e tampone	1 x 1 mL	1 x 250 µL
Marrone	Miscela MG+23S, 20x	Miscela contenente oligonucleotidi [^] per l'amplificazione e il rilevamento di <i>M. genitalium</i> e delle mutazioni dell'rRNA 23S.	1 x 100 µL	1 x 25 µL
Bianco	Miscela di controllo 1, 20x	Miscela contenente oligonucleotidi [^] per l'amplificazione e il rilevamento del test di controllo interno per LC480 II e z 480	1 x 100 µL	1 x 25 µL
Rosso	Cellule di Controllo interno [#]	Cellule di controllo interno contenenti il template di DNA di controllo interno per monitorare l'efficienza di estrazione e amplificazione	1 x 500 µL	1 x 100 µL
Neutro	Acqua priva di nucleasi	Acqua di grado PCR	1 x 1 mL	1 x 1 mL

Conservare le provette di template separatamente dalle miscele di oligonucleotidi, ovvero nella sala di manipolazione degli acidi nucleici o del template

[^] Gli oligonucleotidi sono coppie di primer PCR (compresi primer *PlexPrime*[®]), enzimi *PlexZyme*[®] e sonda fluorescente

Tabella 2. Contenuto dei kit <i>ResistancePlus</i> [®] MG ₍₅₅₀₎				
Colore del tappo	Contenuto	Descrizione	N. cat. 2000201 (100 reazioni)	N. cat. 2000225 (25 reazioni)
Blu	<i>Plex</i> Mastermix, 2x	Mastermix contenente componenti necessari per la qPCR tra cui dNTP, MgCl ₂ , DNA polimerasi e tampone	1 x 1 mL	1 x 250 µL
Marrone	Miscela MG+23S, 20x	Miscela contenente oligonucleotidi [^] per l'amplificazione e il rilevamento di <i>M. genitalium</i> e delle mutazioni dell'rRNA 23S.	1 x 100 µL	1 x 25 µL
Bianco	Miscela di controllo 2, 20x	Miscela contenente oligonucleotidi [^] per l'amplificazione e il rilevamento del test di controllo interno per 7500 Fast and 7500 Fast Dx	1 x 100 µL	1 x 25 µL
Rosso	Cellule di Controllo interno [#]	Cellule di controllo interno contenenti il template di DNA di controllo interno per monitorare l'efficienza di estrazione e amplificazione	1 x 500 µL	1 x 100 µL
Neutro	Acqua priva di nucleasi	Acqua di grado PCR	1 x 1 mL	1 x 1 mL

Conservare le provette di template separatamente dalle miscele di oligonucleotidi, ovvero nella sala di manipolazione degli acidi nucleici o del template

[^] Gli oligonucleotidi sono coppie di primer PCR (compresi primer *PlexPrime*[®]), enzimi *PlexZyme*[®] e sonda fluorescente

Tabella 3. Contenuto dei kit *ResistancePlus*[®] MG₍₆₇₅₎

Colore del tappo	Contenuto	Descrizione	N. cat. 2000301 (100 reazioni)	N. cat. 2000325 (25 reazioni)
Blu	<i>Plex</i> Mastermix, 2x	Mastermix contenente componenti necessari per la qPCR tra cui dNTP, MgCl ₂ , DNA polimerasi e tampone	1 x 1 mL	1 x 250 µL
Marrone	Miscela MG+23S, 20x	Miscela contenente oligonucleotidi [^] per l'amplificazione e il rilevamento di <i>M. genitalium</i> e delle mutazioni dell'rRNA 23S.	1 x 100 µL	1 x 25 µL
Bianco	Miscela di controllo 3, 20x	Miscela contenente oligonucleotidi [^] per l'amplificazione e il rilevamento del test di controllo interno per CFX96 Dx e CFX96 Touch	1 x 100 µL	1 x 25 µL
Rosso	Cellule di Controllo interno [#]	Cellule di controllo interno contenenti il template di DNA di controllo interno per monitorare l'efficienza di estrazione e amplificazione	1 x 500 µL	1 x 100 µL
Neutro	Acqua priva di nucleasi	Acqua di grado PCR	1 x 1 mL	1 x 1 mL

[#] Conservare le provette di template separatamente dalle miscele di oligonucleotidi, ovvero nella sala di manipolazione degli acidi nucleici o del template

[^] Gli oligonucleotidi sono coppie di primer PCR (compresi primer *PlexPrime*[®]), enzimi *PlexZyme*[®] e sonda fluorescente

5 Spedizione e conservazione

- I componenti dei kit *ResistancePlus*[®] MG vengono spediti in confezioni contenenti ghiaccio secco o gel refrigerante. Tutti i componenti devono essere conservati a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C dopo il loro ricevimento. Si raccomanda di limitare i cicli di congelamento/scongelo a 15.
- Se conservato nelle condizioni raccomandate e maneggiato correttamente, il kit mantiene la sua attività fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta. Non utilizzare dopo la data di scadenza.
- Eventuali incidenti gravi devono essere segnalati a SpeedX scrivendo all'indirizzo tech@speedx.com.au

6 Avvertenze e precauzioni

6.1 Generalità

- Solo per uso diagnostico *in vitro*.
- Leggere attentamente le presenti Istruzioni per l'uso prima di utilizzare il prodotto. Per garantire l'affidabilità dei risultati dei test, attenersi scrupolosamente alle procedure descritte. Qualsiasi deviazione da queste procedure può influire sulle prestazioni del test.
- Gli utilizzatori devono essere adeguatamente formati sull'uso del test **ResistancePlus**[®] MG.
- Eventuali incidenti gravi devono essere segnalati al produttore e all'autorità competente dello Stato membro in cui risiede l'utilizzatore e/o il paziente.

6.2 Laboratorio

- Si raccomanda di eseguire la preparazione/estrazione del campione, la preparazione del mastermix, l'aggiunta del campione e il termociclaggio in spazi separati. Lo strumento PCR dovrebbe idealmente trovarsi almeno in una stanza separata dalle aree in cui vengono preparate le reazioni.
- Si raccomanda di seguire le normali precauzioni di laboratorio. Durante la manipolazione dei reagenti, indossare adeguati dispositivi di protezione individuale, quali guanti, occhiali protettivi e camice da laboratorio.
- Nei campioni clinici potrebbero essere presenti organismi patogeni. Trattare tutti i campioni biologici come potenzialmente infettivi e seguire le procedure di sicurezza del proprio istituto per la manipolazione di prodotti chimici e campioni biologici.
- Seguire le procedure di smaltimento dei rifiuti pericolosi del proprio istituto per il corretto smaltimento di campioni, reagenti e altri materiali potenzialmente contaminati.

6.3 Manipolazione dei campioni

- I campioni devono essere raccolti, trasportati e conservati adottando le tecniche di laboratorio standard o secondo le istruzioni del kit di raccolta.

6.4 Test

- Le precauzioni di base per evitare la contaminazione delle reazioni PCR comprendono l'uso di puntali per pipette con filtro sterili, l'uso di un nuovo puntale per pipette per ogni azione di pipettaggio e la separazione del flusso di lavoro.
- I test PCR sono soggetti a contaminazione da precedenti prodotti PCR. Non aprire mai i contenitori di reazione dopo il completamento del test PCR.
- I reagenti del test contengono tampone IDTE che può causare grave irritazione oculare. Durante la manipolazione dei reagenti, si raccomanda di utilizzare il prodotto in un'area ben ventilata e di indossare adeguati dispositivi di protezione individuale, quali guanti, occhiali protettivi e camice da laboratorio.

6.5 Precauzioni di sicurezza

- Le schede di dati di sicurezza (SDS) sono disponibili su richiesta. Per maggiori informazioni, scrivere all'indirizzo tech@speedx.com.au.

6.6 Plugin del test: Avvertenze/Precauzioni/Limiti

- Il software SpeedX può controllare l'analisi dei dati grezzi generati dal kit di test solo se utilizzato con il rispettivo strumento PCR. Non controlla la preparazione dei campioni, le reazioni, la programmazione delle attrezzature o la somministrazione del trattamento.
- Gli utilizzatori devono essere adeguatamente addestrati all'uso del software di analisi **ResistancePlus**[®] MG e l'accesso deve essere limitato a ogni singolo utilizzatore assegnato.
- Si consiglia di implementare l'accesso tramite autenticazione degli utilizzatori e controlli di sicurezza informatica come software antivirus o l'uso di un firewall all'interno del sistema IT e dell'infrastruttura che utilizza il software.
- In caso di rilevamento di un incidente di sicurezza informatica come accessi non autorizzati e attacchi ransomware, contattare tech@speedx.com.au per ulteriore assistenza.

7 Prodotti e materiali di consumo associati

Materiale di Controllo Positivo

- Kit di Controllo positivo **ResistancePlus**[®] MG (SpeedX, numero catalogo 95001)

Materiali di consumo generali per laboratorio

- Guanti e camici puliti
- Miscelatore Vortex
- Centrifuga da tavolo per provette da 0,5 mL e 1,5 mL
- Micropipettatori
- Puntali per pipette sterili resistenti agli aerosol
- Provette da 0,5 mL e provette da 1,5 mL (grado PCR)
- Provette da 2,0 mL (per la prediluizione delle cellule di controllo interno)

Per MagNA Pure 96 Instrument

- 1x Soluzione fisiologica tamponata con fosfato (PBS)
- MagNA Pure 96 Internal Control Tube (provetta di controllo interno) (Roche, N. di cat. 06374905001)
- MagNA Pure 96 DNA e Viral NA Small Volume Kit (kit per piccoli volumi) (Roche, N. di cat. 06543588001)
- MagNA Pure 96 DNA e Viral NA Large Volume Kit (kit per grandi volumi) (Roche, N. di cat. 06374891001)
- MagNA Pure 96 System Fluid (liquido di sistema, esterno) (Roche, N. di cat. 06640729001)
- MagNA Pure 96 Processing Cartridge (cartuccia di trattamento) (Roche, N. di cat. 06241603001)
- Puntali MagNA Pure 96 Pure (Roche, N. di cat. 6241620001)
- MagNA Pure 96 Output Plate (piastra di uscita) (Roche, N. di cat. 06241611001)
- MagNA Pure Sealing Foil (foglio di alluminio sigillante) (Roche, N. di cat. 06241638001)

Per lo strumento MICROLAB STARlet

- 1x Soluzione fisiologica tamponata con fosfato (PBS)
- Kit STARMag 96 X 4 Universal Cartridge kit (384T) (kit cartuccia universale) (Seegene, N. di cat. 744300.4.UC384)
- Provette da 2,0 mL

Per lo strumento QIASymphony[®] SP

- 1x Soluzione fisiologica tamponata con fosfato (PBS)
- Sample Prep Cartridges, 8-well (cartucce di preparazione dei campioni a 8 pozzetti) (Qiagen, N. di cat. 997002)
- 8-Rod Covers (coperchi per 8 barre) (Qiagen, N. di cat. 997004)
- Puntali con filtro, 200 µL e 1500 µL (Qiagen, N. di cat. 990332 e 997024)
- Provette da 2 mL (Sarstedt, N. di cat. 72.639 o 72.694)
- Provette in polistirolo da 14 mL (Corning, N. di cat. 352051)
- DSP Virus/Pathogen Mini Kit (mini kit per virus/organismi patogeni) (QIAGEN, N. di cat. 937036)

Per lo strumento NucliSENS® easyMAG®

- 1x Soluzione fisiologica tamponata con fosfato (PBS)
- NucliSENS® easyMAG® Lysis Buffer (tampone di lisi) 4X1L (Biomérieux, N. di cat. 280134)
- NucliSENS® easyMAG® Lysis Buffer (tampone di lisi) 2ML 4BT (Biomerieux, N. di cat. 200292)
- NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica (silice magnetica) (BioMérieux, N. di cat. 280133)
- NucliSENS® easyMAG® Extraction Buffer 1 (tampone di estrazione 1) (Biomerieux, N. di cat. 280130)
- NucliSENS® easyMAG® Extraction Buffer 2 (tampone di estrazione 1) (Biomerieux, N. di cat. 280131)
- NucliSENS® easyMAG® Extraction buffer 3 (tampone di estrazione 3) (Biomerieux, N. di cat. 280132)
- NucliSENS® easyMAG® Disposables (articoli monouso) (Biomerieux, N. di cat. 280135)

Per il LightCycler® Instrument II e l'analizzatore cobas z 480

- Kit **PlexPCR**® Colour Compensation (CC) (compensazione del colore) (SpeedX, Cat no 90001)
- LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 (piastra multipozzetto) (Roche, N. di cat. 04729692001)
- LightCycler® 480 Sealing Foil (foglio di alluminio sigillante) (Roche, N. di cat. 04729757001)

Per Applied Biosystems® 7500 Fast e 7500 Fast Dx

- MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plates (piastre ottiche di reazione a 96 pozzetti) (ThermoFisher Scientific, N. di cat. 4316813)
- Pellicola adesiva MicroAmp® (ThermoFisher Scientific, N. di cat. 4360954)

Per sistemi di rilevamento PCR in tempo reale Bio-Rad CFX96™ Dx e CFX96 Touch™

- Multiplate™ 96-Well PCR Plates (piastre PCR a 96 pozzetti) (Bio-Rad, N. di cat. MLP9601)
- Microseal® 'B' PCR Plate Sealing Film (pellicola sigillante per piastra PCR), adesiva, ottica (Bio-Rad, N. di cat. MSB1001)

Dispositivi di raccolta dei campioni

- Kit raccolta campioni Multi-Collect (Abbott, numero catalogo 9K12-01)
- Kit raccolta urine Aptima® (Hologic, numero catalogo 301040)
- Kit raccolta campione tampone unisex Aptima® (Hologic, numero catalogo 301041)
- DeltaSwab ViCUM® 2 mL + tampone floccato standard (deltalab, numero catalogo 304278)
- Vacumed® urine senza conservante (FL medical, numero catalogo 44950)
- Regular FLOQSwab™ in 1 mL di soluzione UTM™ (Copan numero catalogo 359C)
- cobas® PCR media (Roche, numero catalogo 06466281190)

8 Principi della tecnologia

La PCR in tempo reale (qPCR) può essere utilizzata per amplificare e rilevare specifici acidi nucleici target di agenti patogeni. **PlexPCR[®]** è una tecnologia qPCR che utilizza enzimi **PlexZyme[®]** che rilevano e segnalano il prodotto amplificato attraverso la generazione di un segnale fluorescente (**Figura 1**). I primer **PlexPrime[®]** favoriscono l'amplificazione specifica delle sequenze mutanti in concomitanza con il rilevamento tramite **PlexZyme[®]** di mutanti specifici (**Figura 2**).

Gli enzimi **PlexZyme[®]** sono complessi di DNA catalitici composti da due oligonucleotidi di DNA denominati "enzimi parziali". Ogni enzima parziale ha una regione specifica per un target, un nucleo catalitico e una regione universale di legame della sonda. Quando è presente un prodotto target, i due enzimi parziali si legano in modo adiacente per formare il **PlexZyme[®]** attivo la cui attività catalitica scinde una sonda marcata. La scissione separa i coloranti fluorofori e quencher, producendo un segnale fluorescente che può essere monitorato in tempo reale. Gli enzimi **PlexZyme[®]** presentano una specificità aggiuntiva rispetto alle tecnologie di rilevamento alternative, in quanto è necessario il legame di due enzimi parziali per il rilevamento. Gli enzimi **PlexZyme[®]** sono inoltre enzimi a turnover multiplo e durante ogni ciclo di PCR possono essere scisse più sonde, con il risultato di un segnale forte e sensibile. I test **PlexZyme[®]** sono altamente sensibili e specifici e sono ideali per il rilevamento multiplex degli agenti patogeni.

I primer **PlexPrime[®]** hanno tre regioni funzionali. L'estremità 5' lunga aggancia il primer in una particolare posizione, mentre l'estremità 3' corta mira in modo selettivo l'estensione dalla base mutante. Tra le estremità 5' e 3' si trova una sequenza di Inserzione che agisce come una struttura a ponte che inserisce una sequenza indipendente dal target nell'amplicone risultante e aumenta la pressione selettiva dell'estremità 3'. In multiplex, ogni primer **PlexPrime[®]** è progettato per una specifica base mutante e incorpora una sequenza di Inserzione unica, producendo così diverse sequenze di ampliconi mutanti. Diversamente da altre tecnologie di rilevamento basate su sonda, l'enzima **PlexZyme[®]** può essere sovrapposto al primer **PlexPrime[®]** per mirare all'amplicone mutante specifico contenente la base mutante e la sequenza di Inserzione incorporata. La combinazione unica dei primer **PlexPrime[®]** accoppiati agli enzimi **PlexZyme[®]** consente l'amplificazione specifica delle sequenze mutanti e il rilevamento sensibile e specifico in multiplex.

Figura 1. Rappresentazione schematica del rilevamento con **PlexZyme[®] e della segnalazione universale**

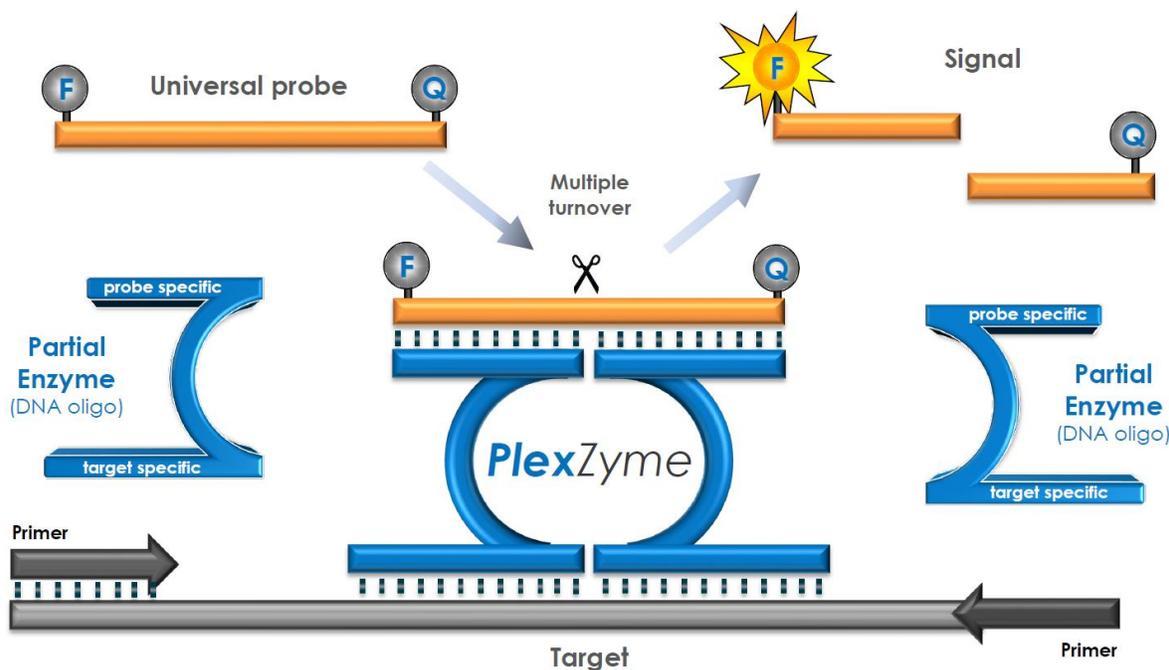
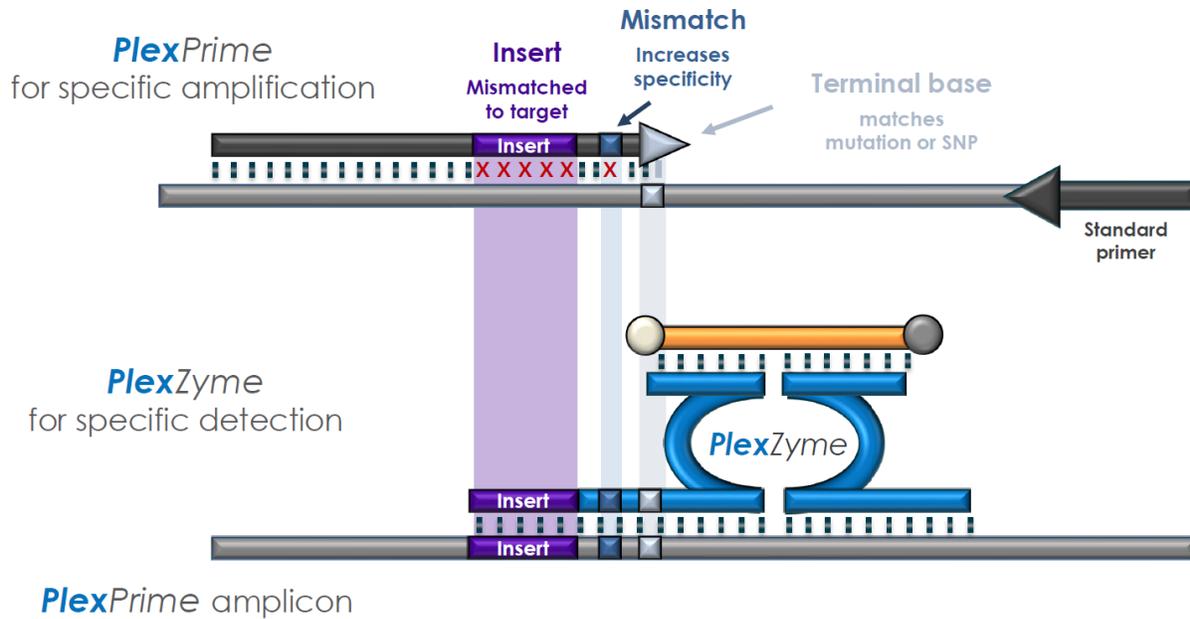
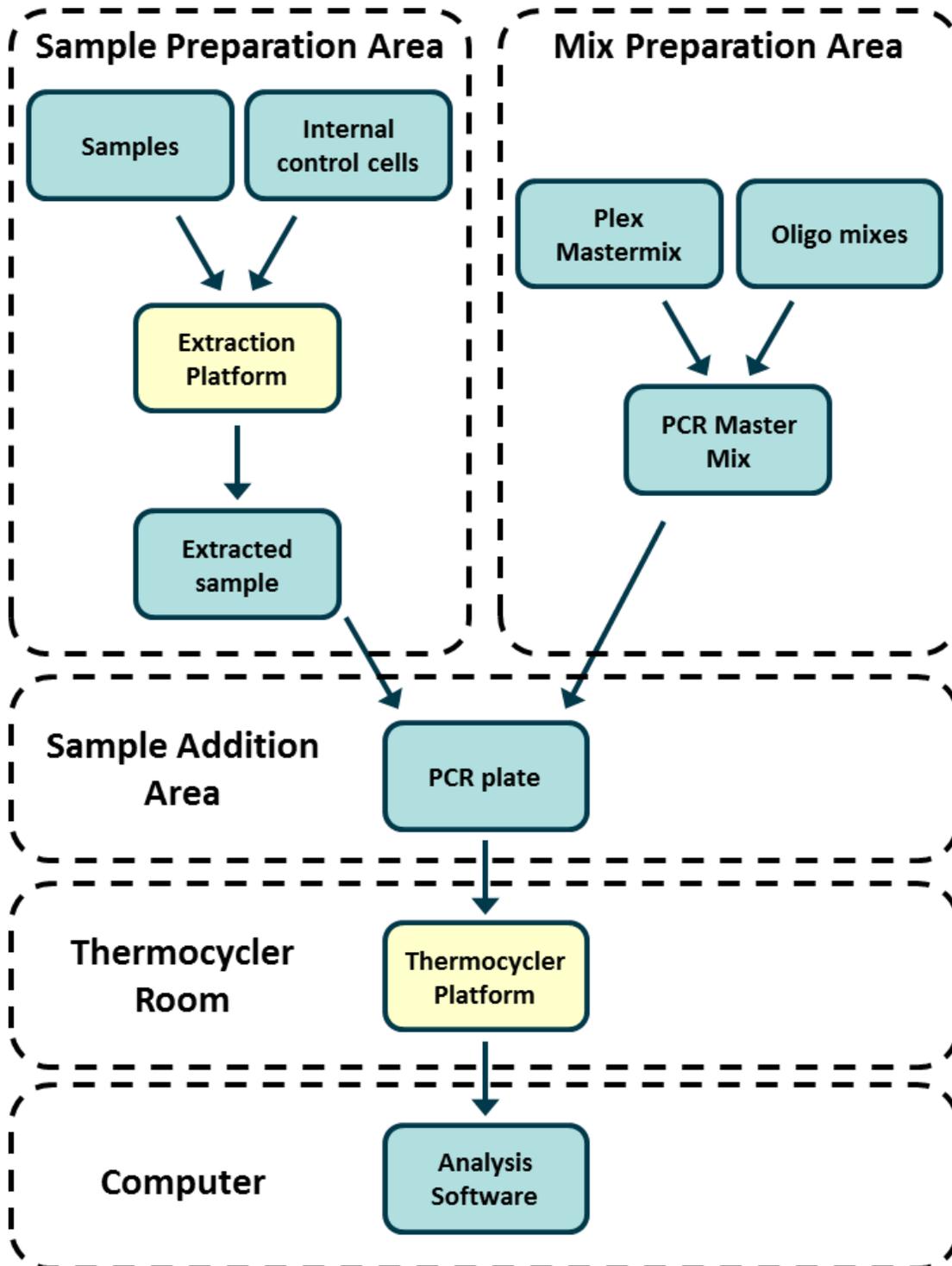


Figura 2. Rappresentazione schematica del primer *PlexPrime*[®] accoppiato all'enzima di rilevamento *PlexZyme*[®]. Il primer *PlexPrime*[®] amplifica in modo specifico la sequenza mutante e gli enzimi *PlexZyme*[®] rilevano in modo specifico l'amplicone.



9 Panoramica della procedura



10 Procedura dettagliata

Nota: i reagenti in dotazione sono indicati in corsivo e tra parentesi segue il colore del tappo della provetta.

10.1 Raccolta, trasporto e conservazione del campione

L'urina maschile, l'urina femminile e i tamponi vaginali, ottenuti da pazienti sintomatici o asintomatici devono essere raccolti, trasportati e conservati adottando le tecniche di laboratorio standard o secondo le istruzioni del kit di raccolta.

10.1.1 Dispositivi di raccolta campioni convalidati

Se la raccolta, la conservazione e il trasporto dei campioni sono inadeguati o inappropriati, si possono produrre risultati falsi dei test. Si raccomanda vivamente una formazione adeguata sulla raccolta dei campioni, al fine di garantire la qualità e la stabilità dei campioni stessi.

Di seguito sono indicati i dispositivi per la raccolta dei campioni approvati per l'uso con il kit **ResistancePlus**[®] MG, insieme a una breve guida riguardante le istruzioni fornite dal produttore del dispositivo per la raccolta, la manipolazione e il trasporto. Tali istruzioni non intendono sostituire o essere un'alternativa alle istruzioni fornite dal produttore. Fare sempre riferimento alle istruzioni del produttore del dispositivo per la raccolta dei campioni per quanto riguarda i metodi appropriati di raccolta.

Prima di adottare qualsiasi metodo di raccolta, il personale qualificato deve assicurarsi di aver compreso correttamente il dispositivo e la metodologia. Come minimo, deve rivedere la descrizione del test per verificare quanto segue: indicazione del tipo di campione, volume sufficiente, procedure, materiali di raccolta necessari, preparazione del paziente e istruzioni per la corretta manipolazione e conservazione.

10.1.2 Raccolta, trasporto e conservazione dell'urina pura

1. Per la raccolta autonoma delle urine da parte del paziente si raccomanda l'uso di un contenitore per urine sterile e trasparente, privo di conservanti o terreni di trasporto.
2. Il paziente deve raccogliere 20-50 mL del primo getto di urina e richiudere bene la provetta o avvitare il coperchio.
3. Si consiglia di inserire il campione di urina in un doppio sacchetto con tamponi assorbenti per il trasporto. La temperatura di conservazione del campione di urina dipende dal tempo di lavorazione previsto.

10.1.3 Raccolta, trasporto e conservazione del tampone secco

Per i campioni di tampone vaginale raccolti dal medico e dalla paziente è possibile utilizzare tamponi a secco. Fare riferimento al foglietto illustrativo del produttore per i metodi di raccolta appropriati, in quanto essi possono variare.

10.1.4 Raccolta, trasporto e conservazione del Multi-Collect Specimen Collection Kit (Abbott, n. cat. 9K12-01)

Di seguito sono riepilogate le istruzioni per la raccolta e il trasporto di urina e tamponi vaginali con il Multi-Collect Specimen Collection Kit (Abbott, n. cat. 9K12-01)

10.1.4.1 Raccolta, trasporto e conservazione di campioni di urina

1. Il paziente non deve aver urinato per almeno un'ora prima della raccolta del campione.
2. Eliminare il tampone per la raccolta del campione; non è necessario per la raccolta del campione di urina.
3. Utilizzando un contenitore per la raccolta delle urine, il paziente deve raccogliere i primi 20-30 mL di urina emessa (la prima parte del getto).
4. Svitare il tappo della provetta di trasporto, facendo attenzione a non far fuoriuscire il tampone di trasporto al suo interno.
5. Maneggiare con cura il tappo e la provetta per evitare contaminazioni.
6. Utilizzare la pipetta di trasferimento in plastica per trasferire l'urina dal contenitore di raccolta alla provetta di trasporto finché il livello del liquido nella provetta non raggiunge la finestra di riempimento trasparente dell'etichetta della provetta di trasporto; diversamente, sarà necessario raccogliere un nuovo campione. Non riempire oltre misura. Per trasferire il volume necessario di campione di urina potrebbe essere necessaria più di una pressione completa del bulbo della pipetta di trasferimento.
7. Richiudere con cura la provetta di trasporto. Assicurarsi che il tappo sia chiuso saldamente.
8. Etichettare la provetta di trasporto con le informazioni identificative del campione, inclusa la data di raccolta, utilizzando un'etichetta adesiva. Fare attenzione a non coprire la finestra di riempimento sulla provetta di trasporto.
9. Dopo la raccolta, trasportare e conservare la provetta di trasporto a una temperatura compresa tra 2 °C e 30 °C per un massimo di 14 giorni. Se è necessaria una conservazione più lunga, conservare a -10 °C o temperatura inferiore per massimo 90 giorni.

10.1.4.2 Raccolta, trasporto e conservazione di campioni di tampone vaginale

1. Smaltire la pipetta di trasferimento monouso; non è necessaria per la raccolta del campione tramite tampone vaginale.
2. Estrarre il tampone sterile dall'involucro, facendo attenzione a non toccarne la punta e a non appoggiarla su alcuna superficie.
3. Inserire la punta bianca del tampone per la raccolta del campione per circa 5 cm nell'apertura della vagina.
4. Ruotare delicatamente il tampone contro le pareti della vagina per 15-30 secondi.
5. Estrarre il tampone con cautela.
6. Maneggiare con cura il tappo e la provetta per evitare contaminazioni.
7. Svitare il tappo della provetta di trasporto e posizionare immediatamente il tampone per la raccolta del campione nella provetta di trasporto, con la punta bianca rivolta verso il basso.
8. Rompere con cautela il tampone all'altezza della linea incisa sull'asta; fare attenzione a non far schizzare il contenuto.
9. Richiudere la provetta di trasporto. Assicurarsi che il tappo sia chiuso saldamente.
10. Etichettare la provetta di trasporto con le informazioni identificative del campione, inclusa la data di raccolta, utilizzando un'etichetta adesiva.
11. Dopo la raccolta, trasportare e conservare la provetta di trasporto a una temperatura compresa tra 2 °C e 30 °C per un massimo di 14 giorni. Se è necessaria una conservazione più lunga, conservare a -10 °C o temperatura inferiore per massimo 90 giorni.

10.1.5 Raccolta, trasporto e conservazione del kit di raccolta delle urine Aptima® (Hologic, n. cat. 301040)

Di seguito sono riepilogate le istruzioni per la raccolta e il trasporto di campioni di urina maschile e femminile con il kit di raccolta delle urine Aptima® (Hologic, n. cat. 301040). Si noti che le prestazioni cliniche di questo dispositivo di raccolta sono state dimostrate solo con campioni estratti utilizzando lo strumento MagNA Pure 96 e il kit MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Large Volume. Fare riferimento alla **Sezione 10.2** e alla **Sezione 16.1.5** per ulteriori dettagli.

1. Per la raccolta autonoma delle urine da parte del paziente si raccomanda l'uso di un contenitore per urine sterile e trasparente, privo di conservanti o terreni di trasporto.
2. Al paziente viene chiesto di raccogliere 20-30 mL del primo getto di urina nel contenitore di raccolta delle urine fornito. Le pazienti di sesso femminile non devono detergere la zona labiale prima di fornire il campione.
3. Utilizzando la pipetta e la provetta di trasporto incluse nel kit di raccolta delle urine Aptima®, con la pipetta trasferire 2 mL di urina nella provetta di trasporto del campione non chiusa. Il volume corretto di urina deve raggiungere le linee di riempimento nere presenti sulla provetta di trasporto dell'urina. L'urina deve essere trasferita dal contenitore trasparente sterile per l'urina alla provetta per il campione di urina Aptima entro 24 ore dalla raccolta.
4. Richiudere saldamente la provetta di trasporto dell'urina.
5. Dopo la raccolta, i campioni di urina raccolti nella provetta per il trasporto dei campioni di urina Aptima devono essere trasportati e conservati a una temperatura compresa tra 2 °C e 30 °C e conservati a una temperatura compresa tra 2 °C e 30 °C fino al momento del test. Per un'ottimizzazione dettagliata della conservazione, fare riferimento alle istruzioni del produttore.

10.1.6 Raccolta, trasporto e conservazione del kit di raccolta di campioni con tampone Aptima® Multitest (Hologic, n. cat. 03546)

Di seguito sono riepilogate le istruzioni per la raccolta e il trasporto di campioni di tampone vaginale con il kit di raccolta campioni con tampone Aptima® Multitest (Hologic, n. cat. PRD-03546). Si noti che le prestazioni cliniche di questo dispositivo di raccolta sono state dimostrate solo con campioni estratti utilizzando lo strumento MagNA Pure 96 e il kit MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Large Volume. Fare riferimento alla **Sezione 10.2** e alla **Sezione 16.1.5** per ulteriori dettagli.

10.1.6.1 Raccolta, trasporto e conservazione di campioni di tampone vaginale

1. Aprire parzialmente la confezione del tampone. Estrarre il tampone. Non toccare la punta morbida e non appoggiare il tampone. Se si tocca la punta morbida, si appoggia il tampone o lo si fa cadere, utilizzare un nuovo kit di raccolta campioni con tampone Aptima Multitest.
2. Tenere fermo il tampone, posizionando il pollice e l'indice al centro dell'asta del tampone e coprendo la linea di incisione. Non tenere l'asta del tampone al di sotto della linea di incisione.
3. Inserire con cautela il tampone nella vagina per circa 5 cm dall'ingresso e ruotarlo delicatamente in senso orario per 10-30 secondi. Assicurarsi che il tampone tocchi le pareti della vagina in modo che l'umidità venga assorbita dal tampone, quindi estrarre il tampone senza toccare la pelle.
4. Tenendo il tampone nella stessa mano, svitare il tappo della provetta. Non versare il contenuto della provetta. Se il contenuto della provetta viene versato, utilizzare un nuovo kit di raccolta campioni con tampone Aptima Multitest.
5. Inserire immediatamente il tampone nella provetta di trasporto in modo che la linea di incisione si trovi nella parte superiore della provetta.
6. Rompere con cautela l'asta del tampone lungo la linea di incisione contro il bordo della provetta.
7. Smaltire subito la parte superiore dell'asta del tampone.
8. Avvitare saldamente il tappo della provetta. Dopo la raccolta del campione, trasportare e conservare il tampone nell'apposita provetta per il trasporto dei campioni a una temperatura compresa tra 2 °C e 30 °C fino al momento del test.

10.1.7 Raccolta, trasporto e conservazione di DeltaSwab ViCUM® 2 mL + tampone floccato standard (deltalab, n. cat. 304278)

Di seguito sono riepilogate le istruzioni per la raccolta e il trasporto di campioni di tampone vaginale con DeltaSwab ViCUM® 2 mL + tampone floccato standard (deltalab, n. cat. 304278).

1. Aprire il peel-pack tirando i lati opposti con entrambe le mani.
2. Agitare delicatamente la provetta.
3. Aprire il flow-pack e raccogliere il campione con il tampone.
4. Aprire la provetta con l'altra mano e posizionare il tampone al suo interno in modo che sia coperto dal terreno.
5. Allineare il punto di rottura del tampone con la parte superiore della provetta, premendo leggermente il tampone verso il basso. Rompere il tampone nel punto di rottura, appoggiandolo sul bordo interno della provetta.
6. Smaltire il pezzo di bastoncino rimasto, avvitare saldamente il tappo e agitare il campione per diluirlo nel terreno.
7. Dopo la raccolta del campione, trasportare e conservare il tampone nell'apposita provetta per il trasporto dei campioni a una temperatura compresa tra 4 °C e 25 °C fino al momento del test.

10.1.8 Raccolta, trasporto e conservazione di Vacumed® Urine senza conservanti (FL medical, n. cat. 44950)

Di seguito sono riepilogate le istruzioni per la raccolta e il trasporto di campioni di urina maschile e femminile con la provetta di raccolta Vacumed® Urine senza conservanti (FL medical, n. cat. 44950).

1. Aprire il tappo del contenitore per la raccolta dell'urina e adagiarlo capovolto su una superficie pulita
2. Non toccare le superfici interne del contenitore e del tappo
3. Prelevare il campione di urina. Riempire il contenitore fino a $\frac{3}{4}$ della sua capacità
4. Riposizionare il tappo e ruotare saldamente in senso orario per chiuderlo
5. Agitare delicatamente il campione
6. Sollevare parzialmente l'etichetta protettiva (non rimuoverla completamente)
7. Inserire la provetta del campione ed esercitare una leggera pressione. Tenere la provetta in posizione fino a quando non è piena (fine del flusso)
8. Rimuovere la provetta del campione e riattaccare completamente l'etichetta protettiva
9. Conservare la provetta del campione a una temperatura tra 4 °C e 25 °C fino al momento del test

10.1.9 Raccolta, trasporto e conservazione di Regular FLOQSwab™ in 1 mL di terreno UTM™ (Copan n. cat. 359C)

Di seguito sono riepilogate le istruzioni per la raccolta e il trasporto di campioni di tampone vaginale con Regular FLOQSwab™ in 1 ml di terreno UTM™ (Copan n. cat. 359C)

1. Aprire la confezione del kit UTM ed estrarre la provetta con il terreno e la busta interna contenente il tampone sterile.
2. Estrarre il tampone sterile dalla busta e raccogliere il campione clinico; per evitare il rischio di contaminazione, assicurarsi che la punta del tampone entri in contatto solo con il sito di raccolta.
3. Dopo aver raccolto il campione, svitare e rimuovere il tappo dalla provetta facendo attenzione a non versare il terreno.
4. Inserire il tampone nella provetta finché il punto di rottura non è a livello dell'apertura della provetta.
5. Piegare e rompere il tampone nel punto di rottura, tenendo la provetta lontana dal viso, e smaltire la parte in eccesso.
6. Riavvitare il tappo sulla provetta e chiuderla ermeticamente.
7. Eseguire l'analisi del campione contenuto nell'UTM entro 48 ore dalla raccolta conservando la provetta a 2-25 °C.
8. Prima di eseguire l'analisi, agitare per 20 secondi per favorire il rilascio del campione dal tampone e omogeneizzare il terreno.

10.1.10 Raccolta, trasporto e conservazione di cobas® PCR Media (Roche, n. cat. 06466281190)

Di seguito sono riepilogate le istruzioni per la raccolta e il trasporto di campioni di urina maschile e femminile con il terreno cobas® PCR Media (Roche, n. cat. 06466281190).

1. Miscelare e trasferire l'urina nella provetta di cobas® PCR Media utilizzando una pipetta monouso (non fornita). Nota: l'urina può essere conservata a una temperatura compresa tra 2 °C e 30 °C per un periodo massimo di 24 ore prima di essere trasferita nella provetta di cobas® PCR Media.
2. Il volume di urina introdotto nella provetta è corretto se il livello è compreso tra le due linee nere sull'etichetta della provetta.
3. Richiudere saldamente la provetta di cobas® PCR Media.
4. Capovolgere la provetta 5 volte per miscelare il contenuto. Il campione è ora pronto per il trasporto e il test
5. Trasportare e conservare la provetta di cobas® PCR Media contenente il campione di urina stabilizzato a una temperatura compresa tra 2 °C e 30 °C.

10.1.11 Estratti di campioni convalidati

Gli estratti di campioni convalidati per l'uso comprendono:

- cobas® x480 (dal protocollo CT/NG)

Vedere la **Sezione 10.5** per le istruzioni su come preparare la PCR con acidi nucleici estratti (flusso di lavoro reflex).

10.2 Elaborazione del campione

Il kit **ResistancePlus®** MG è stato convalidato sui seguenti strumenti di estrazione indicati nella **Tabella 4**.

Vedere la **Sezione 10.3** per le istruzioni per l'uso del Controllo interno.

Tabella 4. Protocolli di estrazione convalidati				
Strumento	Kit di estrazione	Volume del campione	Protocollo	Volume di eluizione
MagNA Pure 96 ^a	Kit MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume	200 µL	Pathogen Universal 200	50 µL o 100 µL
MagNA Pure 96 ^a	Kit MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Large Volume	1.000 µL [^]	Viral NA Universal LV 1000 3.1	100 µL
MICROLAB STARlet IVD ^b	Kit STARMag 96 x 4 Universal Cartridge (Seegene)	200 µL	10 µl di cellule di Controllo interno aggiunti per ogni campione Selezionare "Pausa prima di configurare la PCR" per eseguire solo l'estrazione del campione	100 µL
QIASymphony SP ^c	Mini kit DSP Virus/Pathogen	200 µL	Complex200_V6_DSP	110 µL
NucliSENS® easyMAG ^d	Reagenti NucliSENS® easyMAG®	Tampone 200 µL	Generico 2.01; flusso di lavoro "On-board"	100 µL
		Urina 1.000 µL	Generico 2.01; flusso di lavoro "Off-board"	100 µL

^a Vedere 10.3.1 per istruzioni su come utilizzare il controllo interno con MagNA Pure 96

^b Vedere 10.3.2 per istruzioni su come utilizzare il controllo interno con STARlet IVD

^c Vedere 10.3.3 per istruzioni su come utilizzare il controllo interno con QIASymphony SP

^d Vedere 10.3.4 per istruzioni su come utilizzare il controllo interno con NucliSENS® easyMAG®

[^] Le prestazioni cliniche dei campioni raccolti con il kit di raccolta delle urine Aptima® (Hologic, n. cat. 301040), il kit di raccolta dei campioni con tampone unisex Aptima® (Hologic, n. cat. 301041) e il kit di raccolta dei campioni con tampone Multitest Aptima® (Hologic, n. cat. PRD-03546) sono state dimostrate solo con questo protocollo di estrazione. Fare riferimento alla Sezione 16.1.5 per ulteriori dettagli.

10.3 Controllo interno (IC)

Il kit include un controllo interno per monitorare l'efficienza dell'estrazione e l'inibizione della qPCR. Il test del controllo interno è fornito come *Miscela di controllo (BIANCO)* e *cellule di Controllo interno (ROSSO)*. La *Miscela di controllo* viene aggiunta alla Master Mix PCR (**Tabella 11**). Le *cellule di Controllo interno* contengono il template di DNA di controllo interno. Le *cellule di Controllo interno* sono diluite e processate come indicato di seguito per specifici strumenti di estrazione. Il template di DNA di controllo interno è quindi estratto insieme al campione e amplificato con esso nella reazione.

10.3.1 Controllo interno su MagNA Pure 96

Diluire le *cellule di Controllo interno (ROSSO)* 1 a 200 in 1x PBS (**Tabella 5**). Regolare il volume come richiesto utilizzando lo stesso fattore di diluizione (vedere il manuale del kit di estrazione per il volume minimo per il numero richiesto di campioni). Le cellule di controllo interno diluite vengono caricate nella provetta di Controllo interno sul MagNA Pure 96:

- Per il kit MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume (protocollo Pathogen Universal 200), vengono aggiunti automaticamente 20 µL a ciascun campione (quantità predefinita).
- Per il kit MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Large Volume (protocollo Viral NA Universal LV 1000 3.1), il volume del campione viene suddiviso e processato in due pozzetti separati della cartuccia di trattamento MagNA Pure 96. A ciascun campione vengono aggiunti automaticamente 40 µL di cellule di controllo interno diluite (20 µL per pozzetto della cartuccia di trattamento).

Nota: NON conservare le cellule di Controllo interno diluite

Tabella 5. Diluizione delle cellule di Controllo interno per MagNA Pure 96 (diluizione 1 a 200)			
Cellule di Controllo interno (ROSSO) (µL)	1x PBS (µL)	Volume totale (µL)	Volume aggiunto al campione (µL)
18	3.582	3.600	20

10.3.2 Controllo interno sul MICROLAB STARlet IVD

Diluire le *cellule di Controllo interno (ROSSO)* 1 a 20 in 1x PBS (**Tabella 6**). Regolare il volume come richiesto utilizzando lo stesso fattore di diluizione (vedere il manuale del kit di estrazione per il volume minimo per il numero richiesto di campioni). Le cellule di controllo interno diluite vengono caricate in una provetta da 2 mL e posizionate sul rack di supporto dei reagenti, aggiungendo automaticamente 10 µL a ciascun campione.

Nota: NON conservare le cellule di Controllo interno diluite

Tabella 6. Diluizione delle cellule di Controllo interno per MICROLAB STARlet IVD (diluizione 1 a 20)			
Cellule di Controllo interno (ROSSO) (µL)	1x PBS (µL)	Volume totale (µL)	Volume aggiunto al campione (µL)
50	950	1.000	10

10.3.3 Controllo interno su QIASymphony® SP

Diluire le *cellule di Controllo interno (ROSSO)* 1 a 50 in 1x PBS (**Tabella 7**). Regolare il volume come richiesto utilizzando lo stesso fattore di diluizione in base al numero di campioni richiesti.

Nota: NON conservare le cellule di Controllo interno diluite

Tabella 7. Diluizione delle cellule di Controllo interno per QIASymphony® SP (diluizione 1 a 50)		
Cellule di Controllo interno (ROSSO) (µL)	1x PBS (µL)	Volume totale (µL)
40	1.950	2.000

Le *cellule di Controllo interno* diluite vengono quindi utilizzate per preparare una miscela di Controllo interno-RNA carrier-tampone AVE, come mostrato nella **Tabella 8** che segue. Regolare il volume come richiesto utilizzando lo stesso fattore di diluizione per il numero di campioni richiesto (vedere il manuale del kit di estrazione per il volume minimo per il numero richiesto di campioni). La miscela di Controllo interno-RNA carrier-tampone AVE deve essere preparata immediatamente prima di iniziare l'analisi.

La miscela di Controllo interno-RNA carrier-tampone AVE viene immessa in una provetta posizionata in un portaprovette e caricata nello slot A del cassetto dei campioni in QIAAsymphony® SP. A ciascun campione vengono aggiunti 120 µL (predefiniti) della miscela.

Tabella 8. Preparazione della miscela di Controllo interno- RNA carrier-tampone AVE per QIAAsymphony SP

Tipo di provetta	Numero di campioni	Volume di cellule IC diluite (µL)	Quantità di RNA carrier (µL)	Tampone AVE (µL)	Volume totale (µL)
-	1	10	3	107	120
2 mL	1 + portata a volume [^]	40	12	428	480
14 mL	1 + portata a volume [#]	60	18	642	720

[^] La provetta da 2 mL richiede 3 campioni aggiuntivi (360 µL) per portare a volume

[#] La provetta da 14 mL richiede 5 campioni aggiuntivi (600 µL) per portare a volume

10.3.4 Controllo interno su easyMAG®

Diluire le *cellule di Controllo interno* (**ROSSO**) 1 a 200 in 1x PBS (**Tabella 9**). Regolare il volume come richiesto utilizzando lo stesso fattore di diluizione. Preparare una "premiscela" di cellule di controllo interno diluite e silice magnetica NucliSENS® easyMAG® per il numero richiesto di campioni (**Tabella 10**). Sono richiesti 100 µl di silice premiscelata per campione.

Nota: NON conservare le cellule di Controllo interno diluite

Tabella 9. Diluizione delle cellule di Controllo interno per NucliSENS® easyMAG® (diluizione 1 a 200)

Cellule di Controllo interno (ROSSO) (µL)	1x PBS (µL)	Volume totale (µL)	Fattore di diluizione
10	1.990	2.000	200

Tabella 10. Premiscela di silice magnetica NucliSENS® easyMAG® e cellule di Controllo interno diluite

Numero di campioni	Volume di cellule IC diluite (µL)	Volume di silice magnetica (µL)	Volume aggiunto al campione (µL)
1	50	50	100

A seconda del tipo di campione, verrà utilizzato un flusso di lavoro "on-board" o "off-board". Il flusso di lavoro "off-board" viene utilizzato per recuperare in modo ottimale gli acidi nucleici nei campioni di urina. Per maggiori informazioni fare riferimento al manuale per l'utilizzatore di NucliSENS® easyMAG®.

Flusso di lavoro "on-board" (tamponi)

Trasferire i campioni nel contenitore per campioni.

Caricare i contenitori per campioni su easyMAG.

Programmare le seguenti richieste di estrazione:

Protocollo: Generico 2.0.1 (per la versione software 2.0)

Matrice: altro

Volume (mL): 0,200

Eluato (µL): 100 µL

Tipo: primario

Dopo la lisi on-board, aggiungere 100 µL di silice premiscelata a ciascun campione.

Proseguire con il processo di estrazione.

Flusso di lavoro "off-board" (urina)

Mescolare brevemente la provetta con tampone di lisi NucliSENS e aggiungere 1.000 µl di urina. Agitare la provetta nel vortex.

Lasciar riposare la miscela a temperatura ambiente per 10 minuti.

Dopo la lisi, trasferire i lisati nei contenitori per campioni e caricarli su easyMAG.

Aggiungere 100 µl di silice premiscelata a ciascun campione.

Programmare le seguenti richieste di estrazione:

Protocollo: Generico 2.0.1 (per la versione software 2.0)

Matrice: altro

Volume (mL): 1.000

Eluato (µL): 100 µL

Tipo: lisato

Proseguire con il processo di estrazione.

10.4 Preparazione della PCR in tempo reale

Nota: prima di utilizzare i reagenti, scongelarli completamente e mescolarli accuratamente agitandoli brevemente con il vortex

Fare riferimento a **Tabella 1 – Tabella 3** per la descrizione del contenuto del kit.

10.4.1 Preparazione della Master Mix

Preparare la Master Mix come indicato nella **Tabella 11**.

Per un volume di reazione di 20 µL, sono necessari 15 µL di Master Mix e 5 µL di campione. Pipettare la Master Mix nella piastra PCR, quindi aggiungere il campione estratto alla reazione.

Per ogni analisi occorre includere un controllo senza template (NTC). Per la reazione NTC, aggiungere *acqua priva di nucleasi (NEUTRO)* al posto del campione.

Sigillare la piastra, centrifugare e trasferire al termociclatore.

Tabella 11. Master Mix		
Reagente	Concentrazione	Volume per reazione di 20 µL (µL)
Acqua priva di nucleasi (NEUTRO)	N/A	3,0
Plex Mastermix (BLU)	2x	10,0
MG+23S Mix (MARRONE)	20x	1,0
Miscela di controllo* (BIANCO)	20x	1,0
Volume totale (µL)		15,0
Aggiungere 5 µL di campione per ottenere un volume finale di 20 µL		

* La Miscela di controllo inclusa in ogni kit è specifica per lo strumento PCR usato, fare riferimento alla **Tabella 1 - Tabella 3** per l'uso corretto della Control Mix

10.4.2 Stabilità della Master Mix

La Master Mix può essere preparata in grandi volumi e conservata a una temperatura di -20 °C per un periodo massimo di 4 settimane oppure conservata a una temperatura di 4 °C per massimo 1 settimana.

10.5 Preparazione di PCR con acidi nucleici estratti (flusso di lavoro reflex)

Gli estratti di acidi nucleici ottenuti senza l'aggiunta di *cellule di Controllo interno* (**ROSSO**) ai campioni possono essere testati utilizzando il kit **ResistancePlus**® MG.

Questa procedura deve essere eseguita solo per gli estratti che:

Sono stati testati in precedenza su una piattaforma di analisi alternativa seguendo le istruzioni per l'uso del produttore, se tale test eseguito in precedenza ha generato un risultato valido.

La Master Mix deve essere preparata come indicato nella **Sezione 10.4.1**. Nel contesto del reflex testing, il Controllo interno non è presente nell'estratto del campione. Tuttavia, la Miscela di controllo deve essere inclusa come descritto nella Sezione **10.4.1**.

Fare riferimento a **Tabella 1 - Tabella 3** per la descrizione del contenuto del kit.

Preparare la miscela di reazione come indicato nella **Tabella 11**. Per un volume di reazione di 20 µL, sono necessari 15 µL di Master Mix e 5 µL di campione. Pipettare la Master Mix nella piastra PCR, quindi aggiungere il campione estratto alla reazione.

Per ogni analisi occorre includere un controllo senza template (NTC). Per la reazione NTC, aggiungere *acqua priva di nucleasi* (**NEUTRO**) al posto del campione. Sigillare la piastra, centrifugare e trasferire al termociclatore.

11 Programmazione e analisi

I dettagli per la programmazione e l'analisi sono descritti nelle **Sezioni 19 e 23**.

Il kit **ResistancePlus**[®] MG ha tre canali che servono per il rilevamento di *M. genitalium*, della mutazione rRNA 23S e del Controllo interno (**Tabella 12**).

Il software **ResistancePlus**[®] MG si limita all'analisi di risultati corrispondenti agli estratti di acidi nucleici ottenuti senza l'aggiunta di *cellule di Controllo interno (ROSSO)* ai campioni.

Per gli estratti di acidi nucleici ottenuti senza l'aggiunta di *cellule di Controllo interno (ROSSO)* ai campioni, utilizzare il software REFLEX **ResistancePlus**[®] MG. Il software REFLEX **ResistancePlus**[®] MG ha due canali che servono per il rilevamento di *M. genitalium* e della mutazione rRNA 23S (**Tabella 13**).

Questa procedura deve essere eseguita solo per gli estratti che:

Sono stati testati in precedenza su una piattaforma di analisi alternativa seguendo le istruzioni per l'uso del produttore, se tale test eseguito in precedenza ha generato un risultato valido.

Tabella 12. Canali per i target di ResistancePlus[®] MG

Strumento	Canale A	Canale B	Canale C
	Rilevamento di <i>M. genitalium</i> (MgPa)	Mutazione di rRNA 23S	Controllo interno
LC480 II	465-510	533-580	533-640
z 480	465-510	540-580	540-645
7500 Fast e 7500 Fast Dx	FAM	JOE	TAMRA
CFX96 Dx e CFX Touch	FAM	HEX	Quasar 705

Tabella 13. Canali per i target di ResistancePlus[®] MG per il flusso di lavoro reflex

Strumento	Canale A	Canale B
	Rilevamento di <i>M. genitalium</i> (MgPa)	Mutazione di rRNA 23S
LC480 II	465-510	533-580
z 480	465-510	540-580
7500 Fast e 7500 Fast Dx	FAM	JOE
CFX96 Dx e CFX Touch	FAM	HEX

12 Interpretazione dei risultati

L'interpretazione dei dati richiede il software di analisi **ResistancePlus**[®] MG. Sebbene i primer **PlexPrime**[®] offrano una maggiore specificità rispetto ad altri primer specifici per un allele, in campioni che contengono alte concentrazioni di rRNA 23S di *M. genitalium* wild type è possibile osservare alcune amplificazioni non specifiche del test di rRNA 23S mutante. Il software di analisi **ResistancePlus**[®] MG automatizza l'interpretazione dei dati dei risultati di amplificazione e semplifica il flusso di lavoro. Le istruzioni su come utilizzare il software di analisi sono riportate nella **Sezione 24**.

Vedere la **Tabella 14** per individuare il software di analisi adatto a ciascuno strumento PCR in tempo reale. Il software di analisi può essere fornito su richiesta. Per maggiori informazioni, scrivere all'indirizzo tech@speedx.com.au.

Tabella 14. Software di analisi ResistancePlus [®] MG		
N. cat.	Software di analisi*	Strumento PCR in tempo reale
99003	ResistancePlus [®] MG (LC480)	LC480 II
99018	ResistancePlus [®] MG (z 480)	z 480
99002	ResistancePlus [®] MG (7500)	7500 Fast e 7500 Fast Dx
99008	ResistancePlus [®] MG (CFX)	CFX96 Dx e CFX96 Touch
99023	REFLEX ResistancePlus [®] MG (LC480)	LC480 II
99024	REFLEX ResistancePlus [®] MG (z480)	z 480
99026	REFLEX ResistancePlus [®] MG (7500)	7500 Fast e 7500 Fast Dx
99025	REFLEX ResistancePlus [®] MG (CFX)	CFX96 Dx e CFX96 Touch

* Per assicurarsi di utilizzare la versione più recente del software di analisi, fare riferimento al sito Web <https://plexpcr.com/products/sexually-transmitted-infections/resistanceplus-mg/#resources>

13 Limiti

- Il test **ResistancePlus**[®] MG è mirato al gene *MgPa* di *M. genitalium* e alle mutazioni nelle posizioni 2058 e 2059 nel gene rRNA 23S (A2058G, A2059G, A2058T e A2058C, numerazione di *E. coli*) che sono associate alla resistenza all'azitromicina (antibiotico della classe dei macrolidi).
- È stato dimostrato che il test **ResistancePlus**[®] MG sviluppa reazioni incrociate con le sequenze mutanti A2059C dell'rRNA 23S di *M. genitalium*.
- Gli studi sulle prestazioni cliniche di **ResistancePlus**[®] MG riassunti nella Sezione 16.1 includono test su urina maschile, urina femminile e tamponi vaginali. Sono stati testati anche altri tipi di campioni, tra cui tamponi rettali, cervicali, endocervicali, uretrali, penieni, del meato penieno e faringei; tuttavia, al momento i dati a supporto dell'uso di questi tipi di campioni sono limitati.
- Il test **ResistancePlus**[®] MG deve essere eseguito solo da personale formato sulla procedura e attenendosi alle presenti Istruzioni per l'uso.
- L'affidabilità dei risultati dipende dalla correttezza della raccolta, del trasporto, della conservazione e del trattamento dei campioni. La mancata osservanza delle procedure adeguate in uno qualsiasi di questi passaggi può determinare risultati errati.
- Il test **ResistancePlus**[®] MG è un test qualitativo e non fornisce valori quantitativi o informazioni sul carico dell'organismo.
- I risultati del test devono essere correlati con anamnesi clinica, dati epidemiologici, dati di laboratorio e qualsiasi altro dato a disposizione del medico.
- La prevalenza di *M. genitalium* e la resistenza ai macrolidi influenzeranno i valori predittivi positivi e negativi del test.
- Il rilevamento di marcatori di resistenza agli antibiotici potrebbe non essere correlato all'espressione genica fenotipica.
- Non è possibile determinare il fallimento o il successo terapeutico sulla base dei risultati del test, poiché l'acido nucleico potrebbe persistere anche dopo un'adeguata terapia antimicrobica.
- Risultati negativi non escludono la possibilità di infezione dovuta a raccolta impropria del campione, errore tecnico, presenza di inibitori, scambio di campioni o basso numero di organismi nel campione clinico.
- Risultati negativi per i marcatori di resistenza non indicano la suscettibilità dei microrganismi rilevati, poiché potrebbero essere presenti marcatori di resistenza non misurati dal test o altri potenziali meccanismi di resistenza agli antibiotici.
- È possibile che si ottengano risultati falsi positivi a causa della contaminazione incrociata da parte degli organismi bersaglio, dei loro acidi nucleici o del prodotto amplificato.

14 Controllo qualità

Il kit **ResistancePlus**[®] MG include un controllo interno per monitorare l'efficienza dell'estrazione e l'inibizione della qPCR (**Sezione 10.3**).

Durante l'esecuzione del reflex testing, le cellule di controllo interno del kit **ResistancePlus**[®] MG non vengono aggiunte al processo di estrazione. Il reflex testing può essere eseguito solo su campioni precedentemente ritenuti validi con un altro sistema, al fine di garantire che siano state monitorate l'efficienza di estrazione e l'inibizione della qPCR.

Il kit **ResistancePlus**[®] MG Positive Control (n. cat. 95001) è raccomandato come materiale di controllo positivo per l'amplificazione degli acidi nucleici. Fare riferimento alla **Sezione 15** per le istruzioni per l'uso di **ResistancePlus**[®] MG Positive Control. Si consiglia di utilizzare un campione negativo noto come controllo negativo.

15 Istruzioni per **ResistancePlus**[®] MG Positive Control

Il kit **ResistancePlus**[®] MG Positive Control contiene materiale per il controllo positivo per mutanti dell'rRNA 23S di *M. genitalium* e un rRNA 23S di *M. genitalium* wild type (**Tabella 15**).

Tabella 15. Contenuto del kit ResistancePlus [®] MG Positive Control (n. cat. 95001)			
Colore del tappo	Contenuto	Descrizione	Quantità (10 reazioni)
Neutro	MG, rRNA 23S wild type	Templato di controllo positivo per il rilevamento dell'rRNA 23S di <i>M. genitalium</i> , wild type	1 x 50 µL
Verde	MG, rRNA 23S A2058G	Templato di controllo positivo per il rilevamento della mutazione A2058G dell'rRNA 23S di <i>M. genitalium</i>	1 x 50 µL
Rosso	MG, rRNA 23S A2059G	Templato di controllo positivo per il rilevamento della mutazione A2059G dell'rRNA 23S di <i>M. genitalium</i> 23S	1 x 50 µL
Blu	MG, rRNA 23S A2058T	Templato di controllo positivo per il rilevamento della mutazione A2058T dell'rRNA 23S di <i>M. genitalium</i>	1 x 50 µL
Giallo	MG, 23S rRNA A2058C	Templato di controllo positivo per il rilevamento della mutazione A2058C dell'rRNA 23S di <i>M. genitalium</i>	1 x 50 µL

15.1 Istruzioni per l'uso

Preparare le reazioni della qPCR come descritto nella **Sezione 10.4** utilizzando il controllo positivo come campione.

L'interpretazione dei dati richiede il software di analisi **ResistancePlus**[®] MG, fare riferimento alla **Sezione 24.11** per i risultati degli esempi.

16 Caratteristiche di prestazione

16.1 Prestazione clinica

16.1.1 Studio clinico 1

Uno studio clinico prospettico-retrospettivo è stato condotto presso il Royal Women's Hospital (RWH) di Melbourne, Australia. I campioni sono stati raccolti da maggio 2016 a giugno 2016 e sulla base dei risultati clinici di laboratorio. Sono stati selezionati 144 campioni da includere nello studio. Dei 144 campioni 84 erano di urina maschile, 33 di urina femminile, 14 tamponi vaginali e 13 tamponi vaginali alti. Per determinare la prestazione del kit **ResistancePlus**[®] MG, il rilevamento di *M. genitalium* è stato confrontato con i risultati clinici di laboratorio ottenuti da una qPCR di rRNA 16S convalidata, utilizzata per diagnosi di routine presso l'istituto RWH⁷, e il rilevamento del mutante di rRNA 23S è stato confrontato con il sequenziamento Sanger⁸. Il kit **ResistancePlus**[®] MG è stato utilizzato sull'LC480 II, dopo l'estrazione del campione sullo strumento MagNA Pure 96 utilizzando il kit MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume e il protocollo Universal Pathogen 200. Per il rilevamento di *M. genitalium* è stato utilizzato un riferimento composito per i campioni discordanti utilizzando una terza reazione qPCR mirata al gene MgPa⁹. Per il rilevamento del mutante di rRNA 23S, il sequenziamento Sanger è stato considerato come il risultato vero. I risultati risolti e la sensibilità e specificità del kit **ResistancePlus**[®] MG per il rilevamento di *M. genitalium* e del mutante rRNA S23 sono mostrati nella **Tabella 16**. Due campioni sono stati esclusi poiché il risultato del Controllo interno non era valido (1 campione di urina femminile e 1 campione di urina maschile). L'analisi del rilevamento della mutazione dell'rRNA 23S include solo i campioni in cui è stato possibile determinare lo stato mutante. L'analisi dei risultati in base al tipo di campione è mostrata nella **Tabella 17**. L'analisi della mutazione dell'rRNA 23S è mostrata nella **Tabella 18**.

		Rilevamento di <i>M. genitalium</i> qPCR di rRNA 16S		Rilevamento del mutante di rRNA 23S Sequenziamento		
		Positivo	Negativo	Mutante	Wild type	
ResistancePlus [®] MG	Positivo	83	0	Mutante rilevato	52	2
	Negativo	1	58 [^]	Mutante non rilevato	2	21
Sensibilità		98,8% (IC 95% 93,5-100,0%)		Sensibilità		96,3% (IC 95% 87,3-99,6%)
Specificità		100,0% (IC 95% 93,8-100,0%)		Specificità		91,3% (IC 95% 72,0-98,9%)

IC 95%: intervallo di confidenza al 95%; Mutante: mutazione di rRNA 23S nelle posizioni A2058G, A2059G, A2058T e A2058C (numerazione di *E. coli*); Wild type: assenza di mutazioni in queste posizioni

[^] Il kit **ResistancePlus**[®] MG ha rilevato 1 vero negativo di *M. genitalium* utilizzando il riferimento composito; la tabella mostra i risultati risolti

Tabella 17. Analisi del risultato clinico in base al campione^A (Studio clinico 1)

Campione	Previsto <i>M. genitalium</i> negativo	Previsto rRNA 23S di <i>M. genitalium</i> wild type	Previsto mutante di rRNA 23S di <i>M. genitalium</i>
Urina maschile	28/28	8/10 ¹	41/42 ¹
Urina femminile	12/13	11/11	4/6 ²
Tampone vaginale	8/8	1/1	2/2 ³
Tampone vaginale alto	9/9	1/1	4/4 ⁴

Mutante: mutazione di rRNA 23S nelle posizioni A2058G, A2059G, A2058T and A2058C (numerazione di *E. coli*); Wild type: assenza di mutazioni in queste posizioni

^A 2 campioni di urina femminile, 3 campioni di urina maschile, 1 tampone vaginale esclusi perché il sequenziamento non è riuscito e non è stato possibile determinare lo stato mutante

¹ Urina maschile: 2 *M. genitalium* wild type erroneamente denominato mutante di *M. genitalium* rilevato, 18 A2058G, 20 A2059G, 3 A2058T rilevati correttamente; 1 A2058G erroneamente denominato *M. genitalium* non rilevato

² Urina femminile: 1 A2058G, 3 A2059G rilevati correttamente; 2 A2059G erroneamente denominato *M. genitalium* rilevato, mutante non rilevato

³ Tampone vaginale: 2 A2059G rilevato correttamente

⁴ Tampone vaginale alto: 3 A2058G, 1 A2059G rilevati correttamente

Tabella 18. *M. genitalium* – analisi della mutazione di rRNA 23S (Studio clinico 1)

Risultato di riferimento ^A	Risultato di <i>ResistancePlus</i> [®] MG
Wild type	21/33 ¹
A2058G	22/23 ²
A2059G	26/28 ³
A2058T	3/3

^A Per *M. genitalium* solo campioni positivi

¹ Wild type: 2 campioni di urina maschile erroneamente denominati *M. genitalium* mutanti rilevati

² A2058G: 1 campione di urina maschile erroneamente denominato *M. genitalium* non rilevato

³ A2059G: 2 campioni di urina femminile erroneamente denominati *M. genitalium* mutanti non rilevati

16.1.2 Studio clinico 2

Un sottogruppo dei campioni estratti dallo studio 1 è stato analizzato sull'ABI 7500 Fast. I risultati sono stati confrontati con il risultato clinico della qPCR di rRNA 16S (Twin 2011) e del sequenziamento Sanger (Twin 2012). I campioni discordanti per il rilevamento di *M. genitalium* sono stati nuovamente sottoposti al test della qPCR di rRNA 16S (Twin 2011) a causa di una sospetta degradazione del campione. I risultati risolti e la sensibilità e specificità del kit *ResistancePlus*[®] MG₍₅₅₀₎ per il rilevamento di *M. genitalium* e del mutante di rRNA S23 sono mostrati nella **Tabella 19**. L'analisi del rilevamento della mutazione dell'rRNA 23S include solo i campioni in cui è stato possibile determinare lo stato mutante.

Tabella 19. Valutazione clinica del kit <i>ResistancePlus</i> [®] MG ₍₅₅₀₎ (Studio clinico 2)						
		Rilevamento di <i>M. genitalium</i> qPCR di rRNA 16S		Rilevamento del mutante di rRNA 23S Sequenziamento		
		Positivo	Negativo	Mutante	Wild type	
<i>ResistancePlus</i> [®] MG	Positivo	79	0 [^]	Mutante rilevato	47	1
	Negativo	2	43 [#]	Mutante non rilevato	4	19
Sensibilità		97,5% (IC 95% 91,4-99,7%)		Sensibilità		92,2% (IC 95% 81,1-97,8%)
Specificità		100,0% (IC 95% 91,8-100,0%)		Specificità		95,0% (IC 95% 75,1-99,9%)

IC 95%: intervallo di confidenza al 95%; Mutante: mutazione di rRNA 23S nelle posizioni A2058G, A2059G, A2058T e A2058C (numerazione di *E. coli*); Wild type: assenza di mutazioni in queste posizioni

[^] Il kit *ResistancePlus*[®] MG₍₅₅₀₎ ha rilevato 1 vero positivo di *M. genitalium* utilizzando il test di riferimento, la tabella illustra i risultati risolti

[#] Il kit *ResistancePlus*[®] MG₍₅₅₀₎ ha rilevato 10 campioni veri negativi di *M. genitalium* utilizzando il test di riferimento, la tabella illustra i risultati risolti

16.1.3 Studio clinico 3

È stato condotto uno studio clinico retrospettivo presso i Canterbury Health Laboratories (CHL) di Christchurch, Nuova Zelanda, su campioni caratterizzati e archiviati dal 2010 al 2016, raccolti con il multi-Collect Specimen Collection Kit (Abbott). Dei 137 campioni 110 erano di urina maschile, 11 di urina femminile, 15 tamponi vaginali, 1 tampone vaginale/uretrale e 1 tampone vaginale/cervicale. Per determinare la prestazione del kit *ResistancePlus*[®] MG, il rilevamento di *M. genitalium* è stato confrontato con i risultati clinici di laboratorio ottenuti da una qPCR MgPa convalidata, utilizzata anche per diagnosi di routine presso l'istituto CHL (Jensen 2004), e il rilevamento del mutante di rRNA 23S è stato confrontato con il sequenziamento Sanger (Jensen 2008). Il kit *ResistancePlus*[®] MG è stato utilizzato sull'LC480 II, dopo l'estrazione del campione sullo strumento MagNA Pure 96 utilizzando il kit MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume e il protocollo Universal Pathogen 200. Per il rilevamento di *M. genitalium*, il test di routine MgPa è stato ripetuto per i campioni discordanti. Per il rilevamento del mutante di rRNA 23S, il sequenziamento Sanger è stato considerato come il risultato vero. La sensibilità e specificità del kit *ResistancePlus*[®] MG per il rilevamento di *M. genitalium* e del mutante di rRNA S23 sono mostrate nella **Tabella 20**. Un campione è stato escluso perché il risultato del Controllo interno non era valido. L'analisi del rilevamento della mutazione dell'rRNA 23S include solo i campioni in cui è stato possibile determinare lo stato mutante. L'analisi dei risultati in base al tipo di campione è mostrata nella **Tabella 21**. L'analisi della mutazione dell'rRNA 23S è mostrata nella **Tabella 22**.

Tabella 20. Valutazione clinica del kit <i>ResistancePlus</i> [®] MG (Studio clinico 3)						
		Rilevamento di <i>M. genitalium</i> qPCR di rRNA 16S		Rilevamento del mutante di rRNA 23S Sequenziamento		
		Positivo	Negativo	Mutante	Wild type	
<i>ResistancePlus</i> [®] MG	Positivo	76	0	Mutante rilevato	52	1
	Negativo	3	57 [^]	Mutante non rilevato	5	19
Sensibilità		96,2% (IC 95% 89,3-99,2%)		Sensibilità		91,2% (IC 95% 80,7-97,1%)
Specificità		100,0% (IC 95% 93,7-100,0%)		Specificità		95,0% (IC 95% 75,1-99,9%)

IC 95%: intervallo di confidenza al 95%; Mutante: mutazione di rRNA 23S nelle posizioni A2058G, A2059G, A2058T e A2058C (numerazione di *E. coli*); Wild type: assenza di mutazioni in queste posizioni

[^] La tabella illustra i risultati risolti

Tabella 21. Analisi del risultato clinico in base al campione (Studio clinico 3)

Campione	Previsto <i>M. genitalium</i> negativo	Previsto <i>M. genitalium</i> wild type	Previsto mutante di rRNA 23S di <i>M. genitalium</i>
Urina maschile	45/45	17/18 ¹	38/45 ¹
Urina femminile	4/4	1/1	6/6 ²
Tampone vaginale	6/6	1/1	8/8 ³
Tampone vaginale/uretrale	1/1	0/0	0/0
Tampone vaginale/cervicale	1/1	0/0	0/0

Mutante: mutazione di rRNA 23S nelle posizioni A2058G, A2059G, A2058T e A2058C (numerazione di *E. coli*); Wild type: assenza di mutazioni in queste posizioni

¹ Urina maschile: 1 *M. genitalium* wild type erroneamente denominato *M. genitalium* mutante rilevato, 4 A2058G, 32 A2059G, 1 A2058T rilevati correttamente; 1 A2058C e 1 A2059G erroneamente denominati *M. genitalium* non rilevati, 3 A2058G e 2 A2059G erroneamente denominati *M. genitalium* mutanti non rilevati

² Urina femminile: 2 A2058G, 4 A2059G rilevati correttamente

³ Tampone vaginale: 1 A2058G, 7 A2059G rilevati correttamente

Tabella 22. *M. genitalium* – analisi della mutazione di rRNA 23S (Studio clinico 3)

Risultato di riferimento [^]	Risultato di <i>ResistancePlus</i> [®] MG
Wild type	19/20 ¹
A2058G	7/10 ²
A2059G	43/45 ³
A2058T	1/1
A2058C	1/1

[^] Per *M. genitalium* solo campioni positivi

¹ Wild type: 1 campione di urina maschile erroneamente denominato *M. genitalium* rilevato

² A2058G: 3 campioni di urina maschile erroneamente denominati *M. genitalium* mutanti non rilevati

³ A2059G: 2 campioni di urina maschile erroneamente denominati *M. genitalium* mutanti non rilevati

16.1.4 Studio clinico 4

È stato condotto uno studio clinico retrospettivo presso il Vall d'Hebron University Hospital (HUVH), Barcellona, Spagna, per valutare le prestazioni del kit *ResistancePlus*[®] MG₍₆₇₅₎ per il rilevamento di *M. genitalium* e di mutazioni associate alla resistenza all'azitromicina in campioni retrospettivi raccolti tra dicembre 2017 e aprile 2018. I campioni sono stati raccolti utilizzando il DeltaSwab ViCUM[®] (Deltalab, Spagna) per i tamponi o il Vacumed[®] Urine (FL medical, Italia) per le urine. Degli 86 campioni, 46 erano di urina e 40 di tamponi vaginali. I campioni sono stati estratti con lo STARlet IVD (Hamilton) ed analizzati sullo strumento CFX96 Dx (Bio-Rad). Per valutarne le prestazioni, il rilevamento di *M. genitalium* è stato confrontato con Allplex[™] STI Essential (Seegene) e con il kit *ResistancePlus*[®] MG (SpeedX) su LC480 II sia per il rilevamento di *M. genitalium* sia per lo stato dell'rRNA 23S. La sensibilità e specificità del kit *ResistancePlus*[®] MG₍₆₇₅₎ per il rilevamento di *M. genitalium* rispetto ad Allplex[™] STI Essential (Seegene) sono mostrate nella **Tabella 23**. La sensibilità e la specificità di *ResistancePlus*[®] MG₍₆₇₅₎ rispetto a *ResistancePlus*[®] MG sono mostrate nella **Tabella 24**. L'analisi dei risultati in base al tipo di campione è mostrata nella **Tabella 25**.

Tabella 23. Confronto tra il kit <i>ResistancePlus</i> [®] MG ₍₆₇₅₎ e Allplex [™] STI essential (Studio clinico 4)			
		Rilevamento di <i>M. genitalium</i> Allplex [™] STI Essential	
		Positivo	Negativo
<i>ResistancePlus</i> [®] MG ₍₆₇₅₎	Positivo	40	0
	Negativo	0	46
Sensibilità		100,0% (IC 95% 91,2-100,0%)	
Specificità		100,0% (IC 95% 92,3-100,0%)	

Tabella 24. Valutazione clinica del kit <i>ResistancePlus</i> [®] MG ₍₆₇₅₎ (Studio clinico 4)							
		Rilevamento di <i>M. genitalium</i> <i>ResistancePlus</i> [®] MG (LC480 II)		Rilevamento del mutante di rRNA 23S [#] <i>ResistancePlus</i> [®] MG (LC480 II)			
		Positivo	Negativo	Mutante rilevato	Mutante non rilevato		
<i>ResistancePlus</i> [®] MG ₍₆₇₅₎	Positivo	40	0	Mutante rilevato	20	0	
	Negativo	0	46	Mutante non rilevato	1	20	
Sensibilità		100,0% (IC 95% 91,2-100,0%)		Sensibilità		100,0% (IC 95% 83,2-100,0%)	
Specificità		100,0% (IC 95% 92,3-100,0%)		Specificità		100,0% (IC 95% 83,2-100,0%)	

IC 95%: intervallo di confidenza al 95%; Mutante: mutazione di rRNA 23S nelle posizioni A2058G, A2059G, A2058T e A2058C (numerazione di *E. coli*); Wild type: assenza di mutazioni in queste posizioni

[#] 1 campione escluso dall'analisi poiché è stato sequenziato come wild type misto e mutante

Tabella 25. Analisi del risultato clinico in base al campione (Studio clinico 4)			
Campione	Previsto <i>M. genitalium</i> negativo	Previsto rRNA 23S di <i>M. genitalium</i> wild type	Previsto mutante di rRNA 23S di <i>M. genitalium</i>
Urina maschile	26/26	5/5	15/15
Tampone vaginale	20/20	15/15	5/5

16.1.5 Studio clinico 5

Uno studio clinico retrospettivo è stato condotto presso il Royal Women's Hospital (RWH), Melbourne, Australia utilizzando urina e tamponi raccolti con Aptima[®], da giugno a novembre 2017. I campioni dei pazienti abbinati sono stati raccolti come urina pura (campione di routine) o con il kit di raccolta per campioni di urina Aptima[®] (Hologic), o come tamponi a secco (campione di routine) o con il kit di raccolta dei campioni con tampone Aptima[®] Unisex (Hologic). Dei 147 campioni, 122 erano di urina e 25 di tamponi vaginali. Per determinare la prestazione dei campioni raccolti con Aptima[®] utilizzando il kit **ResistancePlus[®] MG**, il rilevamento di *M. genitalium* e del mutante rRNA 23S sono stati confrontati con i risultati diagnostici clinici ottenuti dal kit **ResistancePlus[®] MG** (SpeedX) utilizzando il campione di routine. Il test dei campioni raccolti con Aptima[®] è stato eseguito sull'LC480 II, dopo l'estrazione del campione sullo strumento MagNA Pure 96 utilizzando il kit MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume e il protocollo Viral NA Universal LV 1000. I risultati clinici diagnostici del RWH, ottenuti da un campione diagnostico abbinato testato con il kit **ResistancePlus[®] MG** (SpeedX), sono stati considerati come il risultato vero per *M. genitalium*. Per il rilevamento del mutante rRNA 23S, il risultato è stato confrontato con il risultato diagnostico e con il sequenziamento Sanger.

La sensibilità e specificità del kit **ResistancePlus[®] MG** per il rilevamento del *M. genitalium* e del mutante rRNA S23 sono mostrate nella **Tabella 26**. L'analisi del rilevamento della mutazione dell'rRNA 23S include solo i campioni in cui è stato possibile determinare lo stato mutante. L'analisi dei risultati in base al tipo di campione è mostrata nella **Tabella 27**.

Tabella 26. Valutazione clinica del kit ResistancePlus[®] MG (Studio clinico 5)							
		Rilevamento di <i>M. genitalium</i>		Rilevamento del mutante di rRNA 23S			
		ResistancePlus[®] MG (campione di routine)		ResistancePlus[®] MG (campione di routine)			
		Positivo	Negativo	Mutante	Wild type		
ResistancePlus[®] MG (con 1 ml di campione Aptima)	Positivo	77	3	Mutante rilevato	51	0	
	Negativo	3	64	Mutante non rilevato	2	24	
Sensibilità		96,3% (IC 95% 89,4-99,2%)		Sensibilità		96,2% (IC 95% 87,0-99,5%)	
Specificità		95,5% (IC 95% 87,5-99,1%)		Specificità		100,0% (IC 95% 86,0-100,0%)	

Tabella 27. Analisi del risultato clinico in base al campione (Studio clinico 5)			
Campione	Previsto <i>M. genitalium</i> negativo	Previsto <i>M. genitalium</i> wild type	Previsto mutante di rRNA 23S di <i>M. genitalium</i>
Urina	50/52 ¹	21/22 ¹	45/48 ¹
Tampone vaginale	14/15 ²	3/4 ²	6/6

Mutante: mutazione di rRNA 23S nelle posizioni A2058G, A2059G, A2058T e A2058C (numerazione di *E. coli*); Wild type: assenza di mutazioni in queste posizioni

¹ Urina: 2 *M. genitalium* negativi erroneamente denominati mutante di *M. genitalium* e wild type rispettivamente; 1 *M. genitalium* wild type erroneamente denominato *M. genitalium* negativo; 2 mutanti di *M. genitalium* erroneamente denominati *M. genitalium* wild type, 1 mutante di *M. genitalium* erroneamente denominato *M. genitalium* negativo

² Tampone vaginale: 1 *M. genitalium* negativo erroneamente denominato *M. genitalium* wild type; 1 *M. genitalium* wild type erroneamente denominato *M. genitalium* negativo

16.1.6 Studio clinico 6

È stato condotto uno studio clinico retrospettivo presso la University of Queensland Centre for Clinical Research (UQCCR), Australia, utilizzando estratti cobas® x480 da campioni di urina e tamponi raccolti tra febbraio 2017 e febbraio 2019. I campioni sono stati raccolti come urina pura o con il kit di raccolta del terreno cobas® PCR (Roche) ed estratti sullo strumento cobas® x480 (cobas® 4800, Roche) utilizzando il protocollo "Full Workflow" e "CT/NG", senza aggiunta di cellule di Controllo interno SpeedX. I 109 estratti erano 10 tamponi vaginali e 5 tamponi vaginali alti, oltre a 84 campioni di urina maschile e 10 di urina femminile.

Per determinare le prestazioni degli estratti di cobas® con il kit **ResistancePlus®** MG₍₅₅₀₎, il rilevamento di *M. genitalium* è stato confrontato con il risultato diagnostico di routine (test PCR MgPa (Trembizki *et al.*, 2017)) e il rilevamento del mutante di rRNA 23S con il sequenziamento Sanger. Il kit **ResistancePlus®** MG₍₅₅₀₎ è stato utilizzato sull'ABI 7500 Fast Dx. La sensibilità e la specificità del kit **ResistancePlus®** MG₍₅₅₀₎ per il rilevamento di *M. genitalium* e del mutante di rRNA 23S sono mostrate nella **Tabella 28**. L'analisi del rilevamento della mutazione dell'rRNA 23S include solo i campioni in cui è stato possibile determinare lo stato mutante. L'analisi dei risultati in base al tipo di campione è mostrata nella **Tabella 29**. L'analisi della mutazione dell'rRNA 23S è mostrata nella **Tabella 30**.

Tabella 28. Valutazione clinica del kit ResistancePlus® MG ₍₅₅₀₎ (Studio clinico 6)						
		Rilevamento di <i>M. genitalium</i> MgPa qPCR		Rilevamento del mutante di rRNA 23S Sequenziamento Sanger		
		Positivo	Negativo	Mutante	Wild type	
ResistancePlus® MG ₍₅₅₀₎	Positivo	54	0	Mutante rilevato	37 [^]	
	Negativo	1	51	Mutante non rilevato	17	
Sensibilità		98,2% (IC 95% 90,3-100,0%)		Sensibilità		100,0% (IC 95% 90,5-100,0%)
Specificità		100,0% (IC 95% 93,0-100,0%)		Specificità		100,0% (IC 95% 80,5-100,0%)

[^] 1 campione vaginale ha dato un risultato misto wild type/sequenziamento A2059G che è stato correttamente identificato come mutante dal test **ResistancePlus®** MG₍₅₅₀₎

Tabella 29. Analisi del risultato clinico in base al campione (Studio clinico 6) *			
Campione	Previsto <i>M. genitalium</i> negativo	Previsto rRNA 23S di <i>M. genitalium</i> wild type	Previsto mutante di rRNA 23S di <i>M. genitalium</i>
Urina maschile	42/42	13/13	26/27 ¹
Urina femminile	6/6	1/1	3/3 ²
Tampone vaginale	1/1	1/1	7/7 ^{3^}
Tampone vaginale alto	2/2	2/2	1/1 ⁴

* I seguenti 3 campioni sono stati esclusi perché il sequenziamento non è riuscito e non è stato possibile determinare il vero stato 23S: 2 campioni di urina e 1 campione vaginale

¹ Urina maschile: 8 A2058G, 3 A2058T e 15 A2059G correttamente identificati; 1 A2058T identificati erroneamente come *M. genitalium* non rilevato

² Urina femminile: 2 A2058G e 1 A2059G correttamente identificati

³ Tampone vaginale: 3 A2058G, 2 A2058T e 1 A2059G correttamente identificati; [^] 1 tampone vaginale è stato identificato come miscela di WT/A2059G

⁴ Tampone vaginale alto: 1 A2059G correttamente identificato

Tabella 30. *M. genitalium* – analisi della mutazione di rRNA 23S (Studio clinico 6)

Risultato di riferimento [^]	Risultato di <i>ResistancePlus</i> [®] MG
Wild type	17/17
A2058G	13/13
A2059G	19/19 ¹
A2058T	5/5
A2058C	-

[^] Per *M. genitalium* solo campioni positivi

¹ A2059G: 1 tampone vaginale misto wild type/A2059G correttamente identificato come mutazione di *M. genitalium*, 23S rilevato

16.1.7 Studio clinico 7

Uno studio clinico retrospettivo è stato condotto presso la Microbiological Diagnostic Unit Public Health Unit (MDU), Victoria, Australia, utilizzando tamponi a secco e urina pura raccolti da ottobre 2018 a gennaio 2019. I campioni erano 19 tamponi vaginali e 2 tamponi vaginali alti, oltre a 44 campioni di urina.

Il kit *ResistancePlus*[®] MG è stato utilizzato sull'LC480 II, dopo l'estrazione del campione sullo strumento QIA Symphony SP (QIAGEN) utilizzando il mini kit DSP Virus/Pathogen e seguendo il protocollo Complex200_V6_DSP. I risultati sono stati confrontati con i risultati diagnostici di routine ottenuti dal kit *ResistancePlus*[®] MG (SpeedX) utilizzando campioni estratti sullo strumento MagNA Pure 96 (MP96). Per i risultati discordanti, è stato eseguito un test qPCR di rRNA 16S (Twin 2011) per il rilevamento di *M. genitalium*, ed è stato eseguito un sequenziamento Sanger (Twin 2012) per il rilevamento del mutante di rRNA 23S. La sensibilità e specificità del kit *ResistancePlus*[®] MG per il rilevamento di *M. genitalium* e del mutante rRNA S23 sono mostrate nella **Tabella 31**. L'analisi del rilevamento della mutazione dell'rRNA 23S include solo i campioni in cui è stato possibile determinare lo stato mutante. L'analisi dei risultati in base al tipo di campione è mostrata nella **Tabella 32**.

Tabella 31. Valutazione clinica del kit *ResistancePlus*[®] MG (Studio clinico 7)

		Rilevamento di <i>M. genitalium</i> <i>ResistancePlus</i> [®] MG (MP96)		Rilevamento del mutante di rRNA 23S <i>ResistancePlus</i> [®] MG (MP96)		
		Positivo	Negativo	Mutante	Wild type	
<i>ResistancePlus</i> [®] MG (QIA Symphony SP)	Positivo	36	0	Mutante rilevato	16	1
	Negativo	1	27	Mutante non rilevato	1	18
Sensibilità		97,3% (IC 95% 85,8-99,9%)		Sensibilità		94,1% (IC 95% 71,3-99,9%)
Specificità		100,0% (IC 95% 87,2-100,0%)		Specificità		94,7% (IC 95% 74,0-99,9%)

Tabella 32. Analisi del risultato clinico in base al campione (Studio clinico 7) [*]			
Campione	Previsto <i>M. genitalium</i> negativo	Previsto rRNA 23S di <i>M. genitalium</i> wild type	Previsto mutante di rRNA 23S di <i>M. genitalium</i>
Urina maschile	17/17	9/9	12/14 ¹
Urina femminile	1/1	1/2 ²	1/1
Tampone vaginale	8/8 [#]	7/7	3/3
Tampone vaginale alto	1/1	1/1	-

[#] 1 tampone vaginale è stato escluso in quanto ha prodotto un risultato non valido con il kit **ResistancePlus**[®] MG

¹ Urina maschile: 1 mutante di rRNA 23S di *M. genitalium* è stato erroneamente identificato come *M. genitalium* non rilevato; 1 mutante di rRNA 23S di *M. genitalium* è stato erroneamente identificato come *M. genitalium* rilevato, mutazione 23S non rilevata

² Urina femminile: 1 erroneamente identificata come *M. genitalium* rilevato, mutazione di rRNA 23S rilevata

16.2 Prestazione analitica

16.2.1 Riproducibilità e ripetibilità

La riproducibilità e la ripetibilità del kit **ResistancePlus**[®] MG sull'LC480 II è stata valutata utilizzando il template sintetico quantificato per i target MgPa e rRNA 23S di *M. genitalium* (A2058G, A2059G, A2058T e A2058C) a 10.000 e 3x LOD copie per reazione utilizzando 6 replicati (se non diversamente specificato). Gli esperimenti sono stati eseguiti sull'LC480 II.

Per determinare la variabilità da lotto a lotto, sono stati testati due lotti, analizzati su una macchina gestita da un operatore (**Tabella 33**). I due lotti hanno mostrato una buona riproducibilità con coefficiente di variazione (%CV) compreso tra 0,35 e 2,37% per tutti i target.

Tabella 33. Variabilità da lotto a lotto				
	Media Cq	STDEV	%CV	N. campioni
MgPa 10.000 copie	16,9	0,15	0,89	12/12
MgPa 30 copie	25,5	0,52	2,05	12/12
A2058G 10.000 copie	20,4	0,48	2,37	12/12
A2058G 36 copie	27,8	0,43	1,54	12/12
A2059G 10.000 copie	18,0	0,06	0,35	12/12
A2059G 30 copie	25,6	0,50	1,94	12/12
A2058T 10.000 copie	18,7	0,09	0,46	12/12
A2058T 30 copie	26,2	0,30	1,14	12/12
A2058C 10.000 copie	17,7	0,13	0,75	12/12
A2058C 30 copie	25,4	0,29	1,15	12/12

Per determinare la variabilità da giorno a giorno, i test sono stati eseguiti per tre giorni da un solo operatore sulla stessa macchina (**Tabella 34**). Le tre analisi hanno mostrato una buona riproducibilità in giorni diversi con coefficiente di variazione compreso tra 0,88 e 2,31% per tutti i target.

Tabella 34. Variabilità da giorno a giorno				
	Media Cq	STDEV	%CV	N. campioni
MgPa 10.000 copie	17,0	0,18	1,09	18/18
MgPa 30 copie	25,6	0,59	2,31	18/18
A2058G 10.000 copie	20,2	0,37	1,83	18/18
A2058G 36 copie	27,9	0,51	1,84	18/18
A2059G 10.000 copie	18,1	0,24	1,34	18/18
A2059G 30 copie	25,7	0,32	1,23	18/18
A2058T 10.000 copie	18,7	0,23	1,22	18/18
A2058T 30 copie	26,3	0,31	1,17	18/18
A2058C 10.000 copie	17,8	0,16	0,88	18/18
A2058C 30 copie	25,5	0,31	1,22	18/18

Per determinare la variabilità da analisi ad analisi, sono state confrontate tre analisi qPCR, eseguite lo stesso giorno dallo stesso operatore (**Tabella 35**). Le tre analisi hanno mostrato una buona riproducibilità con coefficiente di variazione compreso tra 0,40 e 3,20% per tutti i target.

Tabella 35. Variabilità da analisi ad analisi				
	Media Cq	STDEV	%CV	N. campioni
MgPa 10.000 copie	17,0	0,07	0,40	18/18
MgPa 30 copie	25,7	0,47	1,83	18/18
A2058G 10.000 copie	19,8	0,63	3,20	18/18
A2058G 36 copie	27,5	0,51	1,85	18/18
A2059G 10.000 copie	18,4	0,11	0,61	18/18
A2059G 30 copie	25,7	0,39	1,52	18/18
A2058T 10.000 copie	18,7	0,22	1,18	18/18
A2058T 30 copie	26,4	0,42	1,59	18/18
A2058C 10.000 copie	17,8	0,08	0,46	18/18
A2058C 30 copie	25,5	0,31	1,22	18/18

Per determinare la variabilità da operatore a operatore, sono state confrontate due analisi di due operatori (**Tabella 36**). Le due analisi eseguite da operatori diversi hanno mostrato una buona riproducibilità con coefficiente di variazione compreso tra 0,54 e 1,62% per tutti i target.

Tabella 36. Variabilità da operatore a operatore				
	Media Cq	STDEV	%CV	N. campioni
MgPa 10.000 copie	16,8	0,12	0,73	12/12
MgPa 30 copie	25,3	0,41	1,61	12/12
A2058G 10.000 copie	20,2	0,24	1,21	12/12
A2058G 36 copie	27,9	0,45	1,62	12/12
A2059G 10.000 copie	17,9	0,10	0,58	12/12
A2059G 30 copie	25,5	0,39	1,53	12/12
A2058T 10.000 copie	18,6	0,10	0,54	12/12
A2058T 30 copie	26,1	0,31	1,20	12/12
A2058C 10.000 copie	17,7	0,13	0,71	12/12
A2058C 30 copie	25,2	0,27	1,06	12/12

Per determinare la variabilità da strumento a strumento, sono state confrontate due analisi ottenute da due macchine, eseguite dallo stesso operatore (**Tabella 37**). Le due analisi eseguite su strumenti diversi hanno mostrato una buona riproducibilità con coefficiente di variazione compreso tra 0,30 e 2,62% per tutti i target.

Tabella 37. Variabilità da strumento a strumento				
	Media Cq	STDEV	%CV	N. campioni
MgPa 10.000 copie	16,7	0,10	0,60	12/12
MgPa 30 copie	25,4	0,67	2,62	12/12
A2058G 10.000 copie	20,0	0,07	0,33	12/12
A2058G 36 copie	27,8	0,51	1,82	12/12
A2059G 10.000 copie	17,8	0,05	0,30	12/12
A2059G 30 copie	25,3	0,36	1,41	12/12
A2058T 10.000 copie	18,5	0,09	0,50	12/12
A2058T 30 copie	25,9	0,30	1,16	12/12
A2058C 10.000 copie	17,6	0,13	0,75	12/12
A2058C 30 copie	25,3	0,36	1,44	12/12

Per determinare la variabilità nell'ambito di una stessa analisi, sono stati confrontati tre esperimenti, impostati separatamente dallo stesso operatore che ha analizzato ogni target sulla stessa piastra (**Tabella 38**). I tre esperimenti hanno mostrato una buona riproducibilità con coefficiente di variazione compreso tra 0,57 e 3,12% per tutti i target.

Tabella 38. Variabilità nell'ambito di una stessa analisi				
	Media Cq	STDEV	%CV	N. campioni
MgPa 10.000 copie	17,3	0,36	2,09	18/18
MgPa 30 copie	25,9	0,81	3,12	18/18
A2058G 10.000 copie	20,2	0,11	0,57	18/18
A2058G 36 copie	28,0	0,65	2,31	18/18
A2059G 10.000 copie	17,9	0,15	0,83	18/18
A2059G 30 copie	25,8	0,38	1,46	18/18
A2058T 10.000 copie	18,8	0,12	0,66	18/18
A2058T 30 copie	26,8	0,38	1,41	18/18
A2058C 10.000 copie	17,8	0,15	0,83	18/18
A2058C 30 copie	25,5	0,36	1,41	18/18

16.2.2 Sensibilità analitica

La sensibilità analitica del kit **ResistancePlus**[®] MG sull'LC480 II è stata determinata eseguendo serie limitate di diluizioni usando un template sintetico quantificato per i target MgPa e rRNA 23S di *M. genitalium* (A2058G, A2059G, A2058T e A2058C). La sensibilità per ciascun target è stata determinata come il numero di copie per reazione con rilevamento $\geq 95\%$ come mostrato nella **Tabella 39**.

Tabella 39. Sensibilità analitica	
	Sensibilità analitica (copie/reazione)
MgPa	10
A2058G	12
A2059G	10
A2058T	10
A2058C	10

16.2.3 Specificità analitica

Lo studio è stato condotto per valutare il kit **ResistancePlus**[®] MG quando sono presenti organismi non target ad alte concentrazioni. È stato valutato un pannello di 65 microrganismi (4 virus, 2 protozoi, 4 funghi e 55 batteri) che rappresentano patogeni o flora comunemente presenti nell'apparato urogenitale o strettamente correlati a *M. genitalium*. Ogni ceppo batterico è stato testato a 1×10^6 genomi/ml, salvo diversa indicazione. I ceppi virali sono stati testati a 1×10^5 genomi/ml, salvo diversa indicazione. Tutti gli altri organismi sono stati testati alle concentrazioni indicate. Tutti gli organismi sono stati quantificati usando qPCR, eccetto quelli quantificati come unità formanti colonie (CFU) o unità formanti placca (PFU) (). Tutti i microrganismi sono stati testati in triplicato. Tutti i microrganismi testati sono stati diluiti in una matrice clinica negativa (campione di urina o tampone vaginale).

I risultati hanno indicato che nessuno di questi organismi ha prodotto risultati falsi positivi nelle matrici negative di *M. genitalium* (**Tabella 40**).

È stata inoltre eseguita un'analisi *in silico* per valutare se gli oligonucleotidi nel test **ResistancePlus**[®] MG potessero amplificare e rilevare sequenze di acidi nucleici da organismi non target disponibili in BLAST. Non sono state rilevate interazioni significative.

Tabella 40. Microrganismi testati per la specificità analitica

Organismo	Concentrazion e (genomi/ml)	Organismo	Concentrazion e (genomi/mL)	Organismo	Concentrazion e (genomi/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 tipo 18 (cellule HeLa) [^]	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		

* il numero tra parentesi indica il numero di ceppi testati

[^] quantificati come PFU/ml

[#] quantificati come CFU/ml

16.2.4 Sostanze potenzialmente interferenti

È stato condotto uno studio sulle sostanze interferenti per scoprire se le sostanze o le condizioni eventualmente presenti nei campioni di urina o nei tamponi vaginali possano incidere sulle prestazioni del test **ResistancePlus**[®] MG. Il pannello era composto da sostanze endogene quali sangue, mucina, leucociti e farmaci (da banco e da prescrizione) che potevano essere utilizzati per curare patologie urogenitali. Tutte le sostanze sono state valutate tramite l'uso del Controllo interno, che monitora l'estrazione e l'inibizione della qPCR. Tutti i campioni sono stati testati in triplicato. Le sostanze sono state diluite in una matrice clinica negativa (campione di urina o tampone vaginale) come appropriato.

I risultati hanno indicato che nessuna delle sostanze e delle condizioni ha interferito con il rilevamento del Controllo interno né ha prodotto risultati falsi positivi.

I risultati sono riassunti nella **Tabella 41** e nella **Tabella 42**.

Tabella 41. Sostanze potenzialmente interferenti nei campioni di urina		
Classe/Sostanza	Nome del prodotto	Concentrazione testata
Sangue intero	--	1% v/v
Sperma	--	5,0% v/v
Muco	Mucina	0,8% p/v
Antibiotici	Azitromicina	1,8 mg/ml
	Doxiciclina	3,6 mg/ml
Analgescici	Aspirina	40 mg/ml
	Paracetamolo	3,2 mg/ml
Ormoni intravaginali	--	7 mg/ml progesterone + 0,07 mg/ml beta estradiolo
Leucociti	--	10 ⁵ cellule/ml
Albumina	Albumina sierica bovina	10 mg/ml
Glucosio	--	10 mg/ml
Urina acida (pH 4,0)	Urina + N-acetil-L-cisteina	pH 4,0
Urina alcalina (pH 9,0)	Urina + citrato di ammonio	pH 9,0
Bilirubina	--	1 mg/ml

Tabella 42. Sostanze potenzialmente interferenti nei campioni di tampone vaginale		
Classe/Sostanza	Nome del prodotto	Concentrazione testata
Sangue	--	60% v/v
Liquido seminale	--	5,0% v/v
Muco	Mucina	0,8% p/v
Prodotti vaginali da banco e contraccettivi	Crema anti-prurito Vagisil (1,0 g)	0,25% p/v
	Gel K-Y (4,0 g)	0,25% p/v
	Gel anticoncezionale vaginale Gynol II Options	0,25% p/v
	Crema vaginale al clotrimazolo Walgreens (1,5 g)	0,25% p/v
	Crema antiprurito Vagisil Sensitive Skin Formula Maximum Strength con farina di avena (28,3 g)	0,25% p/v
	Gel idratante interno Vagisil ProHydrate Natural Feel (0,2 g x conf. 8 pz)	0,25% p/v
	Deodorante intimo giornaliero in polvere Vagisil (227 g)	0,25% p/v
	Doccia medicata Summer's Eve	0,25% v/v
Deodoranti e polveri	Deodorante spray Summer's Eve (56,7 g)	0,25% v/v
Crema per emorroidi	Crema per emorroidi Preparazione H (25,5 g)	0,25% p/v
Farmaci solo su prescrizione	Gel vaginale al metronidazolo, 0,75%	0,25% p/v
	Estrace® (crema vaginale a base di estradiolo, USP 0,01%)	0,25% p/v
Leucociti	--	10 ⁵ cellule/ml
Ormoni intravaginali	--	7 mg/ml progesterone + 0,07 mg/ml beta estradiolo

16.2.5 Reazione incrociata con altre mutazioni di rRNA 23S

La reattività incrociata del kit **ResistancePlus**® MG è stata valutata utilizzando un template sintetico quantificato per i target MgPa e rRNA 23S di *M. genitalium* (A2059C) a 10.000 e 45 copie per reazione. I risultati hanno dimostrato che il test **ResistancePlus**® MG reagisce in modo incrociato con il target rRNA 23S A2059C di *M. genitalium* con un tasso di successo del 100%.

17 Assistenza clienti e assistenza tecnica

Per domande sulla configurazione delle reazioni, sulle condizioni dei cicli e qualsiasi altro chiarimento, contattare l'assistenza tecnica.

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

18 Bibliografia

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 Appendice 1: LightCycler® 480 instrument II

Le seguenti informazioni si riferiscono al software LightCycler® 480 (versione 1.5).

Il kit **ResistancePlus®** MG contiene coloranti per il LightCycler® 480 Instrument II. Il kit **PlexPCR®** Colour Compensation (N. di cat. 90001) deve essere eseguito e applicato per l'analisi su LC480 II (consultare la **Sezione 19.2**). Questo kit è disponibile su richiesta.

19.1 Programmazione del LightCycler® 480 Instrument II (LC480 II)

Detection Format (formato di rilevamento)

Creare un **Detection Format**(formato di rilevamento) personalizzato

Open Tools (apri strumenti) > Detection Formats (formati di rilevamento)

Creare un New Detection Format (nuovo formato di rilevamento) e denominarlo '**SpeedX PlexPCR**' (può essere creato durante la generazione del file SpeedX Colour Compensation [Compensazione del colore]) (vedere la **Figura 3**).

Per **Filter Combination Selection** (selezione combinazioni di filtri) selezionare la seguente combinazione (eccitazione-emissione):

Tabella 43. Combinazioni di filtri [^]						
LC480 II	440-488	465-510	533-580	533-610	533-640	618-660

[^] Queste combinazioni di filtri sono i nomi predefiniti dei canali

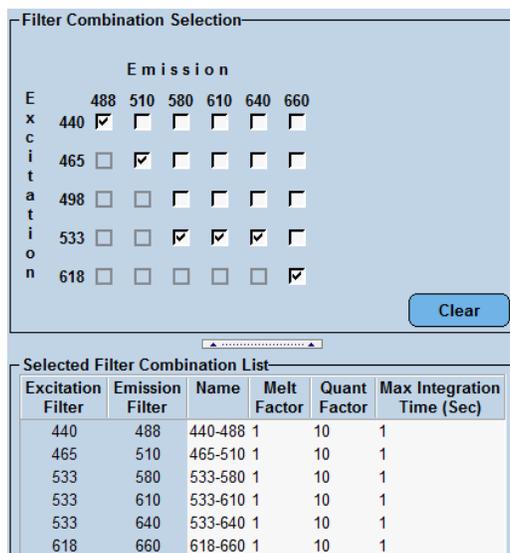
Impostare **Selected Filter Combination List** (elenco combinazioni filtri selezionati) per tutti i canali in questo modo:

Melt Factor (fattore di fusione): 1

Quant Factor (fattore di quantificazione): 10

Max Integration Time (tempo d'integrazione massimo) (sec): 1

Figura 3. Formato di rilevamento personalizzato SpeedX



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 (impostazioni strumento)

Creare un **Detection Format**(formato di rilevamento) personalizzato

Open Tools (Apri strumenti) > Instruments (strumenti)

Per **Instrument Settings** (impostazioni strumenti) > selezionare **Barcode Enabled**(codice a barra abilitato)

Experiment setup (configurazione dell'esperimento)

Selezionare **New Experiment**(nuovo esperimento)

Nella scheda **Run Protocol** (esegui protocollo)

Per **Detection Format** (formato di rilevamento), selezionare il campo personalizzato '**SpeedX PlexPCR**' (Figura 4)

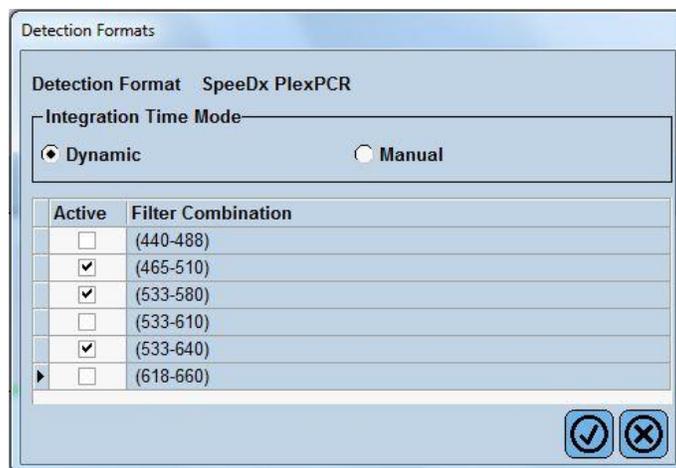
Selezionare **Customize** (Personalizza) >

Selezionare **Integration Time Mode** (modalità tempo integrazione) > **Dynamic**(dinamica)

Selezionare le seguenti **Filter Combinations** (combinazioni di filtri) attive mostrate nella **Tabella 44**

Tabella 44. Canali per i target <i>ResistancePlus</i> ® MG		
Rilevamento dell' <i>M. genitalium</i> (MgPa)	Mutazione di 23S rRNA	Internal Control (controllo interno)
465-510	533-580	533-640

Figura 4. Personalizzare formato di rilevamento



Per consentire il rilevamento automatizzato del campione nel software di analisi, è necessario assegnare nominativi ai pozzetti sulla piastra

Aprire il modulo **Sample Editor** (editor campioni)

Selezionare il pozzetto

Modificare **Sample Name** (nome del campione) in modo che corrisponda al nominativo definito nel modulo dei dosaggi del software di analisi (consultare la **Sezione 24.4**)

I campioni sono etichettati con *Prefisso_Suffisso* (come mostrato nella **Tabella 45** e nella

Figura 5) per es. Pa_MG

NOTE: nei nominativi dei campioni si fa distinzione tra maiuscole e minuscole. Il nominativo deve coincidere esattamente con quelli assegnati nel file di esecuzione.

Tabella 45. Nominativi dei campioni per il software di analisi			
Tipo di campione	Prefisso (nel software di analisi)	_Suffisso (nel software di analisi)	Nome del campione (in LC480)
Campione regolare	S	_MG	S_MG
Controllo negativo	N	_MG	N_MG
Controllo positivo (MG, 23S rRNA tipo mutante) (Pa)	Pa	_MG	Pa_MG
Controllo positivo (MG, 23S rRNA tipo selvaggio) (Pb)	Pb	_MG	Pb_MG

Figura 5. Editor campioni – Assegnazione di nominativi ai pozzetti

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

Impostare il **Reaction Volume** (volume di reazione) su > 20 µL

Creare il seguente Program (programma) (mostrato con più dettagli in **Figura 6 – Figura 9**):

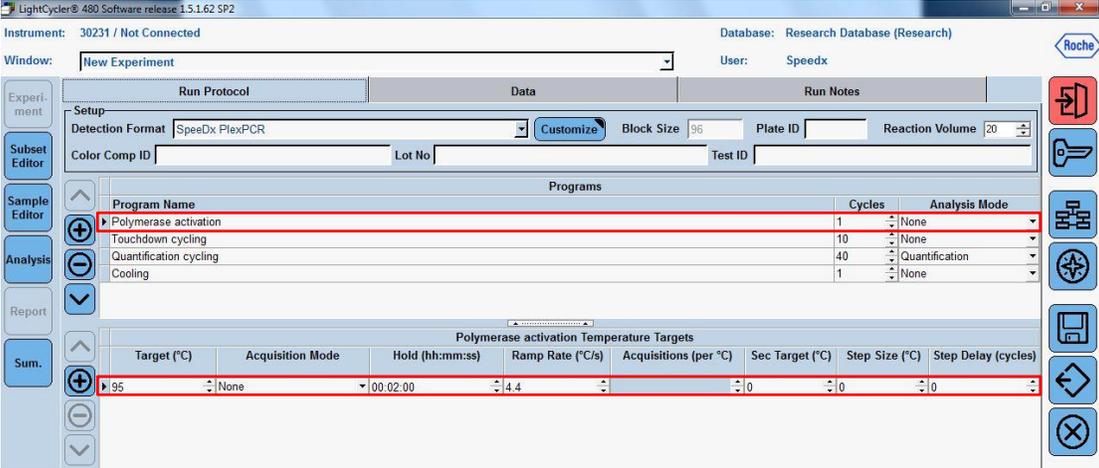
Tabella 46. Programma Thermocycling (termociclaggio)				
Program Name (nome del programma)	Cycles (cicli)	Target °C	Hold (mantenimento)	Ramp rate (velocità di rampa) (°C/s) [‡]
Polymerase activation (attivazione della polimerasi)	1	95°C	2 min	4,4
Touch down cycling (cicli di touchdown) [§] :	10	95°C	5 s	4,4
Step down (riduzione) -0,5° C/ciclo		61°C – 56,5°C [§]	30 s	2,2
Quantification cycling (cicli di quantificazione) [†] :	40	95°C	5 s	4,4
Acquisition/Detection (acquisizione/rilevamento)		52°C [†]	40 s	2,2
Cooling (raffreddamento)	1	40°C	30 s	2,2

[‡] Velocità di rampa predefinita (piastra a 96 pozzetti)

[§] **Step size (passo):** -0,5°C/Ciclo, **Sec Target (target secondario):** 56°C

[†] **Analysis mode:** (modalità di analisi): Quantification, (quantificazione) **Acquisition mode** (modalità acquisizione): Single (singola)

Figura 6. Programma termociclaggio – Attivazione della polimerasi



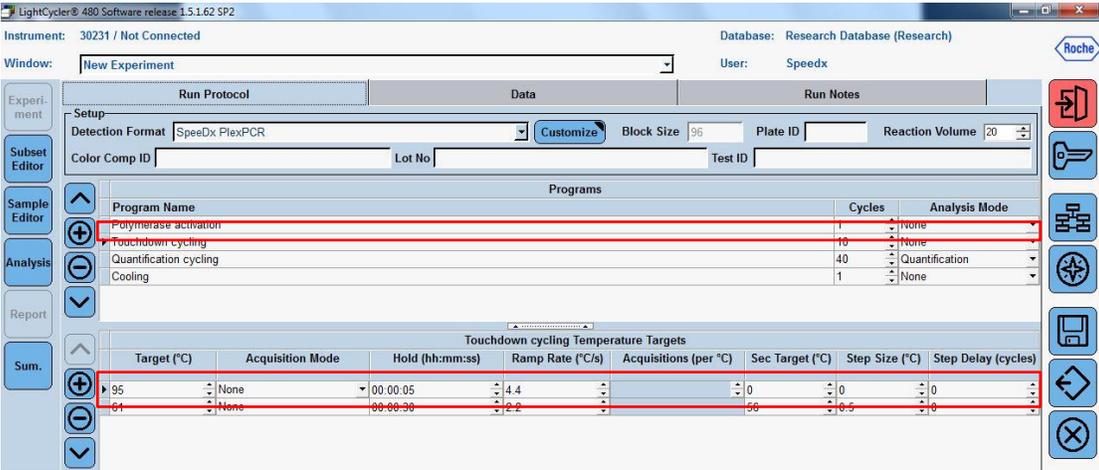
LightCycler® 480 Software release 1.5.1.62 SP2
Instrument: 30231 / Not Connected Database: Research Database (Research)
Window: New Experiment User: Speedx

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

Figura 7. Programma termociclaggio – Cicli di Touchdown



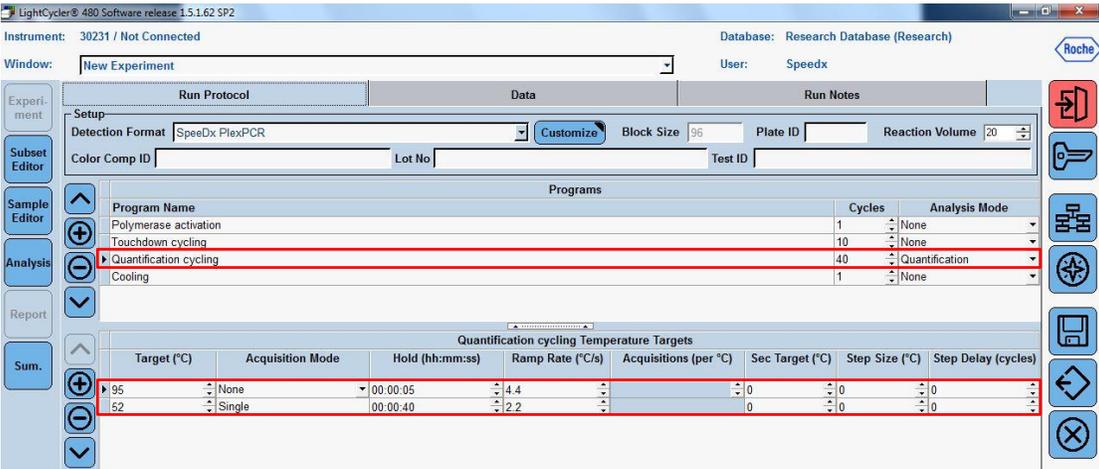
LightCycler® 480 Software release 1.5.1.62 SP2
Instrument: 30231 / Not Connected Database: Research Database (Research)
Window: New Experiment User: Speedx

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
61	None	00:00:30	2.2	56	0.5	0	0

Figura 8. Programma termociclaggio – Cicli di quantificazione



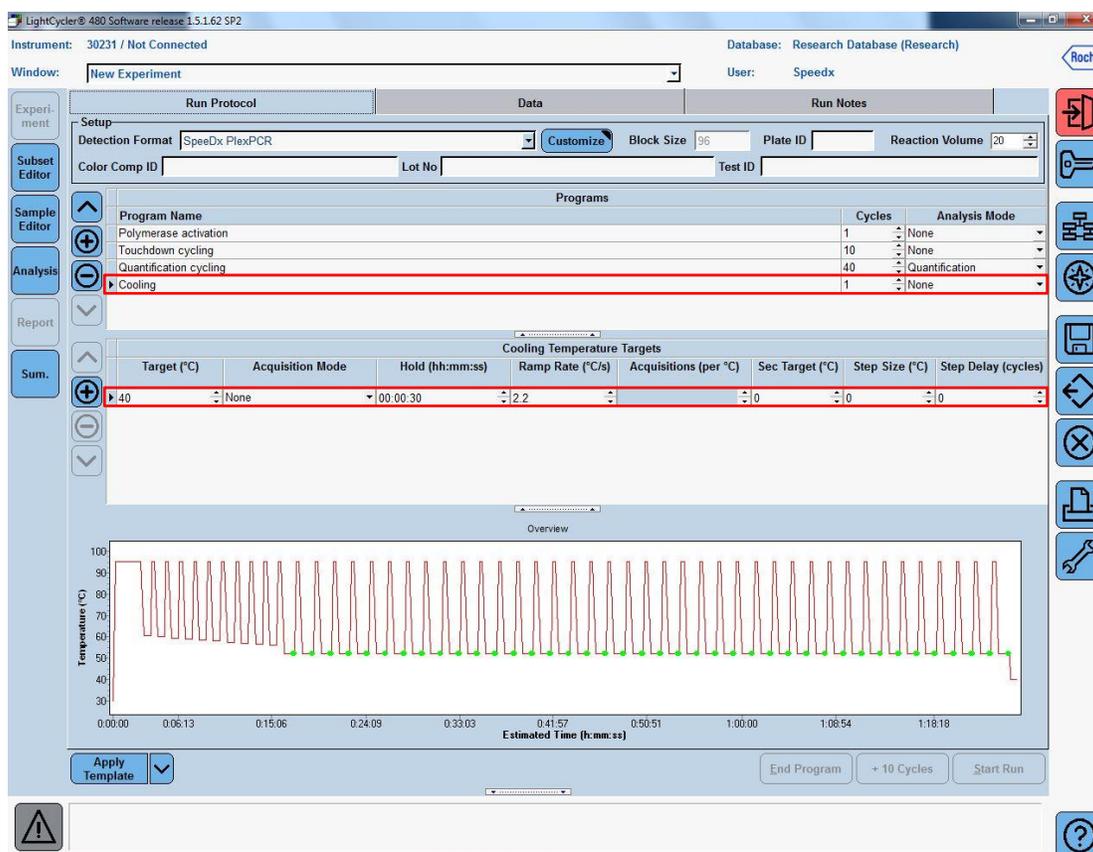
LightCycler® 480 Software release 1.5.1.62 SP2
Instrument: 30231 / Not Connected Database: Research Database (Research)
Window: New Experiment User: Speedx

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

Figura 9. Programma termociclaggio – Raffreddamento



> **Start Run** (avvia esecuzione)

Quando il programma di termociclaggio ha terminato la procedura, esportare in file .ixo per l'analisi nel software di analisi **ResistancePlus[®] MG** (LC480) .

Selezionare **Export** (esporta)

Salvare in una posizione facilmente identificabile

19.2 Colour Compensation (compensazione del colore) per LightCycler[®] 480 Instrument II

NOTA: Il kit di compensazione del colore **PlexPCR[®]**: (N. di cat. 90001) deve essere eseguito e applicato per l'analisi con LC480 II. Questo kit è disponibile su richiesta.

Per l'analisi con il software, il nome del campione delle reazioni di compensazione del colore deve essere etichettato come indicato nella **Tabella 47**.

Quando il programma di termociclaggio ha terminato la procedura, esportare in file .ixo per l'analisi nel software di analisi **ResistancePlus[®] MG** (LC480) .

Selezionare **Export** (esporta)

Salvarlo in una posizione facilmente identificabile e chiamarlo "**SpeedX PlexPCR**"

Tabella 47. Nome del campione per reazioni compensazione del colore per il software di analisi

Reazioni							
	BLANK (VUOTO)	488 mix (miscela 488)	510 mix (miscela 510)	580 mix (miscela 580)	610 mix (miscela 610)	640 mix (miscela 640)	660 mix (miscela 660)
Dominant Channel (canale dominante)	Water (acqua)	440-488	465-510	533-580	533-610	533-640	618-660
Nome del campione	BLANK (VUOTO)	440-488	465-510	533-580	533-610	533-640	618-660

19.3 Interpretazione dei risultati

Per l'interpretazione dei dati è necessario il software di analisi **ResistancePlus®** MG (LC480). Il software di analisi è disponibile su richiesta. Per ulteriori informazioni contattare tech@speedx.com.au.

Consultare la **Sezione 24** per istruzioni sull'utilizzo del software di analisi **ResistancePlus®** MG (LC480).

20 Appendice 2: analizzatore cobas z 480

Le informazioni che seguono sono basate sul software di analisi cobas z 480 (LightCycler 480 SW UDF 2.1.0). Per avere supporto con l'accesso al software UDF sul proprio analizzatore cobas z 480 contattare il proprio rappresentante Roche.

Il kit **ResistancePlus**[®] MG contiene coloranti per l'analizzatore cobas z 480. Il kit **PlexPCR**[®] Colour Compensation (Compensazione del colore) (N. di cat. 90001) deve essere eseguito e applicato per l'analisi z 480 (consultare la **Sezione 20.2**). Questo kit è disponibile su richiesta.

20.1 Programmazione dell'analizzatore cobas z 480

Detection Format (formato di rilevamento)

Creare un **Detection Format**(formato di rilevamento) personalizzato

Open Tools (apri strumenti) > Detection Formats (formati di rilevamento)

Creare un nuovo formato di rilevamento e denominarlo '**SpeedX PlexPCR**' (può essere creato durante la generazione del file SpeedX Colour Compensation [Compensazione del colore]) (vedere la **Figura 10**).

Per **Filter Combination Selection** (selezione combinazioni di filtri) selezionare la seguente combinazione (eccitazione-emissione):

Tabella 48. Combinazioni di filtri ^{^A}					
z 480	465-510	540-580	540-610	540-645	610-670

^A Queste combinazioni di filtri sono i nomi predefiniti dei canali

Impostare **Selected Filter Combination List** (elenco combinazioni filtri selezionati) per tutti i canali in questo modo:

Melt Factor (fattore di fusione): 1

Quant Factor (fattore di quantificazione): 10

Max Integration Time (tempo d'integrazione massimo) (sec): 1

Figura 10. Formato di rilevamento personalizzato SpeedX

Filter Combination Selection

		Emission					
		510	580	610	645	670	700
Excitation	465	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	498	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>				
	540	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	610	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	680	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>				
	680	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>				

Selected Filter Combination List

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 (impostazioni strumento)

Creare un **Detection Format**(formato di rilevamento) personalizzato

Open Tools (Apri strumenti) > Instruments (strumenti)

Per **Instrument Settings** (impostazioni strumenti) > selezionare **Barcode Enabled**(codice a barra abilitato)

Experiment setup (configurazione dell'esperimento)

Selezionare **New Experiment**(nuovo esperimento)

Nella scheda **Run Protocol** (esegui protocollo)

Per **Detection Format** (formato di rilevamento), selezionare il campo personalizzato '**SpeedX PlexPCR**' (**Figura 11**)

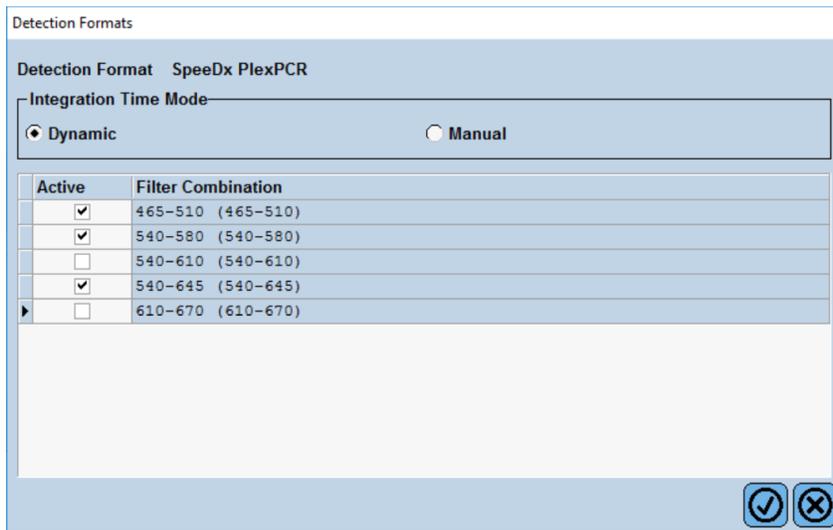
Selezionare **Customize** (Personalizza) >

Selezionare **Integration Time Mode** (modalità tempo integrazione) > **Dynamic**(dinamica)

Selezionare le seguenti **Filter Combinations** (combinazioni di filtri) attive mostrate nella **Tabella 49**

Tabella 49. Canali per i target <i>ResistancePlus</i> [®] MG		
Rilevamento dell' <i>M. genitalium</i> (MgPa)	Mutazione di 23S rRNA	Internal Control (controllo interno)
465-510	540-580	540-645

Figura 11. Personalizzare formato di rilevamento



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)

✓ ✕

Per consentire il rilevamento automatizzato del campione nel software di analisi, è necessario assegnare nominativi ai pozzetti sulla piastra

Aprire il modulo **Sample Editor** (editor campioni)

Selezionare il pozzetto

Modificare **Sample Name** (nome del campione) in modo che corrisponda al nominativo definito nel modulo dei dosaggi del software di analisi (consultare la **Sezione 24.4**)

I campioni sono marcati come *Prefisso_Suffisso* (come mostrato nella **Tabella 50** e **Figura 12**) per es. Pa_MG

NOTE: nei nominativi dei campioni si fa distinzione tra maiuscole e minuscole. Il nominativo deve coincidere esattamente con quelli assegnati nel file di esecuzione.

Tabella 50. Nominativi dei campioni per il software di analisi			
Tipo di campione	Prefisso (nel software di analisi)	_Suffisso (nel software di analisi)	Nome del campione (in z 480)
Campione regolare	S	_MG	S_MG
Controllo negativo	N	_MG	N_MG
Controllo positivo (MG, 23S rRNA tipo mutante) (Pa)	Pa	_MG	Pa_MG
Controllo positivo (MG, 23S rRNA tipo selvaggio) (Pb)	Pb	_MG	Pb_MG

Figura 12. Editor campioni – Assegnazione di nominativi ai pozzetti

Pos	Filter combination	Color	Repl Of	Sample Name	Quantification Sample Type
A12	465-510 (465)	■		S_MG	Unknown
A12	540-580 (540)	■		S_MG	Unknown
A12	540-645 (540)	■		S_MG	Unknown
B12	465-510 (465)	■		Pa_MG	Unknown
B12	540-580 (540)	■		Pa_MG	Unknown
B12	540-645 (540)	■		Pa_MG	Unknown
C12	465-510 (465)	■		Pb_MG	Unknown
C12	540-580 (540)	■		Pb_MG	Unknown
C12	540-645 (540)	■		Pb_MG	Unknown
D12	465-510 (465)	■		N_MG	Unknown
D12	540-580 (540)	■		N_MG	Unknown
D12	540-645 (540)	■		N_MG	Unknown

Impostare il **Reaction Volume** (volume di reazione) su > 20 µL

Creare il seguente Programma (mostrato con più dettagli in **Figura 13 - Figura 16**):

Tabella 51. Programma Thermocycling (termociclaggio)				
Program Name (nome del programma)	Cycles (cicli)	Target °C	Hold (mantenimento)	Ramp rate (velocità di rampa) (°C/s)*
Polymerase activation (attivazione della polimerasi)	1	95°C	2 min	4,4
Touch down cycling (cicli di touchdown) ⁵ : Step down (riduzione) -0.5°C/cycle	10	95°C	5 s	4,4
		61°C – 56.5°C ⁵	30 s	2,2
Quantification cycling (cicli di quantificazione) ⁺ : Acquisition/Detection (acquisizione/rilevamento)	40	95°C	5 s	4,4
		52°C ⁺	40 s	2,2
Cooling (raffreddamento)	1	40°C	30 s	2,2

* Velocità di rampa predefinita (piastra a 96 pozzetti)

⁵ **Step size (passo):** -0.5°C/Ciclo, **Sec Target (target secondario):** 56°C

⁺ **Analysis mode:** (modalità di analisi): Quantification, (quantificazione) **Acquisition mode** (modalità acquisizione): Single (singola)

Figura 13. Programma termociclaggio – Attivazione della polimerasi

LightCycler® 480 SW - User Defined Workflow for cobas z 480

Instrument: 54735 / Not Connected Database: June2020 (Research) User: Speedx

Window: New Experiment

Run Protocol: Setup
 Detection Format: SpeedX FlexPCR 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

Polymerase activation Temperature Targets							
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

Figura 14. Programma termociclaggio – Cicli di Touchdown

LightCycler® 480 SW - User Defined Workflow for cobas z 480

Instrument: 54735 / Not Connected Database: June2020 (Research) User: Speedx

Window: New Experiment

Run Protocol: Setup
 Detection Format: SpeedX FlexPCR 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

Touchdown cycling Temperature Targets							
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

Figura 15. Programma termociclaggio – Cicli di quantificazione

LightCycler® 480 SW - User Defined Workflow for cobas z 480

Instrument: 54735 / Not Connected Database: June2020 (Research) User: Speedx

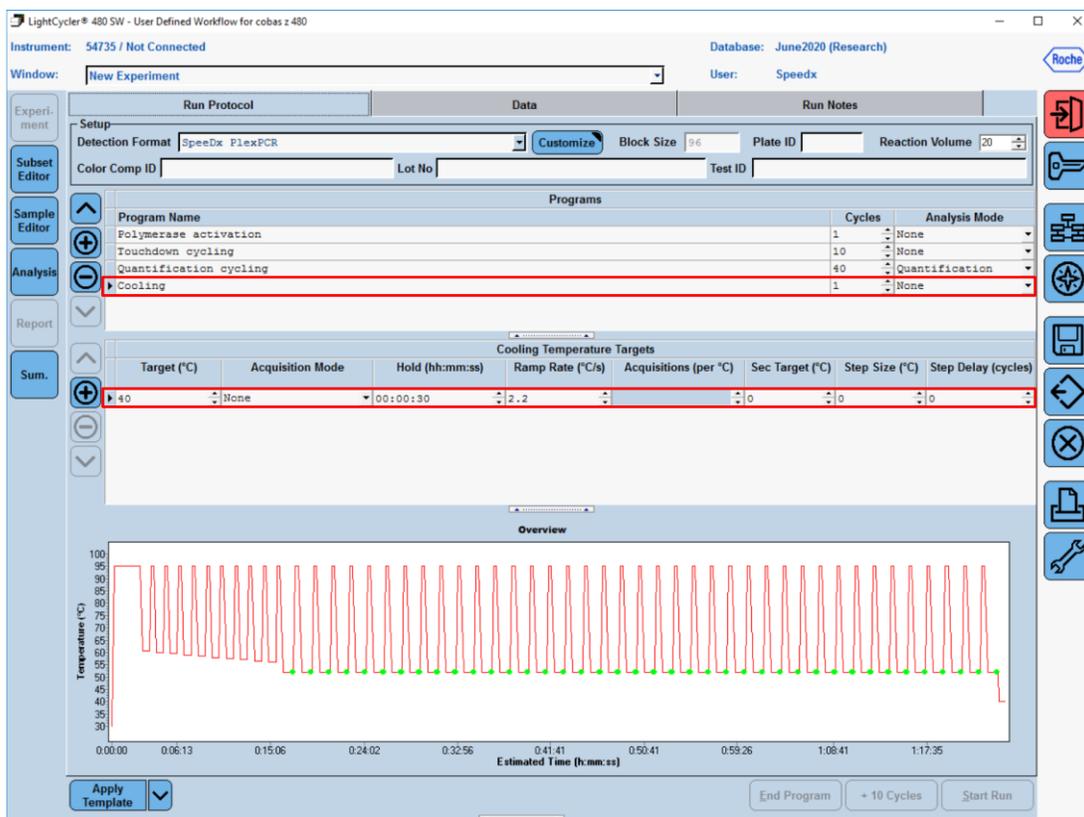
Window: New Experiment

Run Protocol: Setup
 Detection Format: SpeedX FlexPCR 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

Quantification cycling Temperature Targets							
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

Figura 16. Programma termociclaggio – Raffreddamento



> **Start Run** (avvia esecuzione)

Quando il programma di termociclaggio ha terminato la procedura, esportare in file .ixo per l'analisi nel software di analisi **ResistancePlus**® MG (z480) .

Selezionare **Export** (esporta)

Salvare in una posizione facilmente identificabile

20.2 Compensazione del colore per l'analizzatore cobas z 480

NOTA: Il kit di compensazione del colore **PlexPCR**® (N. di cat. 90001) deve essere eseguito e applicato per l'analisi con z480. Questo kit è disponibile su richiesta.

Per l'analisi con il software, il nome del campione delle reazioni di compensazione del colore deve essere etichettato come indicato nella **Tabella 52**.

Quando il programma di termociclaggio ha terminato la procedura, esportare in file .ixo per l'analisi nel software di analisi **ResistancePlus**® MG (z480) .

Selezionare **Export** (esporta)

Salvarlo in una posizione facilmente identificabile e chiamarlo “**SpeedX PlexPCR**”

Tabella 52. Nome del campione per reazioni compensazione del colore per il software di analisi						
Reazioni						
	BLANK (VUOTO)	510 mix (miscela 510)	580 mix (miscela 580)	610 mix (miscela 610)	640 mix (miscela 640)	660 mix (miscela 660)
Dominant Channel (canale dominante)	Water (acqua)	465-510	540-580	540-610	540-645	610-670
Nome del campione	BLANK (VUOTO)	465-510	540-580	540-610	540-645	610-670

20.3 Interpretazione dei risultati

Per l'interpretazione dei dati è necessario il software di analisi **ResistancePlus[®] MG (z480)**. Il software di analisi è disponibile su richiesta. Per ulteriori informazioni contattare tech@speedx.com.au.

Consultare la **Sezione 24** per istruzioni sull'utilizzo del software di analisi **ResistancePlus[®] MG (z480)**.

21 Appendice 3: Applied Biosystems® 7500 Fast

Le seguenti informazioni si basano sul software 7500 v. 2.3.

Il kit **ResistancePlus®** MG₍₅₅₀₎ contiene coloranti per l'Applied Biosystems® (ABI) 7500 Fast. Per tutti i canali vengono utilizzate calibrature dei coloranti predefinite. La calibrazione personalizzata non è necessaria.

21.1 Programmazione di Applied Biosystems® 7500 Fast

Selezionare **Advanced Setup**(impostazioni avanzate)

In **Setup** (Imposta) > aprire **Experiment Properties** (proprietà esperimento) e selezionare quanto segue

Dare un nome all'esperimento

Instrument (strumento) > 7500 Fast (96 pozzetti)

Type of experiment (tipo di esperimento) > Quantitation (quantificazione) – Standard Curve (curva standard)

Reagents (reagenti) > Other (altro)

Ramp Speed (velocità di rampa) > Standard

In **Setup** (Imposta) > aprire **Plate Setup** (impostazione piastra)

Nella scheda **Define Targets and Samples** (Definisci target e campioni) >

Define Targets (definisci target) come indicato di seguito (definire i colori secondo la necessità)

Tabella 53. Definizione dei target		
Nome del target	Reporter	Quencher
MgPa	FAM	Nessuno
Mutazione di 23S rRNA	JOE	Nessuno
IC	TAMRA	Nessuno

Per consentire il rilevamento automatizzato del campione nel software di analisi, è necessario assegnare nominativi ai pozzetti sulla piastra

In **Setup** (Imposta) > aprire **Plate Setup** (impostazione piastra)

Nella scheda **Define Targets and Samples** (Definisci target e campioni) >

Define Samples (definisci campioni)

Modificare **Sample Name** (nome del campione) in modo che corrisponda al nominativo definito nel modulo dei dosaggi del software di analisi (consultare la **Sezione 24.4**)

I campioni sono etichettati come *Prefisso_Suffisso*(come mostrato nella **Tabella 54** e nella **Figura 17**) per es. Pa_MG

NOTE: nei nominativi dei campioni si fa distinzione tra maiuscole e minuscole. Il nominativo deve coincidere esattamente con quelli assegnati nel file di esecuzione.

Tabella 54. Nominativi dei campioni per il software di analisi

Tipo di campione	Prefisso (nel software di analisi)	_Suffisso (nel software di analisi)	Nome del campione (in 7500 Fast)
Campione regolare	S	_MG	S_MG
Controllo negativo	N	_MG	N_MG
Controllo positivo (MG, 23S rRNA tipo mutante) (Pa)	Pa	_MG	Pa_MG
Controllo positivo (MG, 23S rRNA tipo selvaggio) (Pb)	Pb	_MG	Pb_MG

Figura 17. Editor campioni – Assegnazione di nominativi ai pozzetti



The screenshot shows a window titled "Define Samples" with four buttons at the top: "Add New Sample", "Add Saved Sample", "Save Sample", and "Delete Sample". Below the buttons is a list of sample names in a table-like structure:

Sample Name
Pb_MG
S_MG
Pa_MG
N_MG

Nella scheda **Assign Targets and Samples** (assegnazione target e campioni) >

Selezionare i pozzetti e assegnare target e campioni ai pozzetti selezionati

Selezionare **Passive reference** (riferimento passivo) > None (nessuno)

In **Setup** (imposta) > aprire **Run Method** (metodo di esecuzione)

Impostare **Reaction Volume Per Well** (volume di reazione/pozzetto) su > 20 µL

Creare il seguente programma (mostrato in modo più dettagliato in Graphical View (Vista grafica) (Figura 18 e Figura 19) e Vista Tabulare (Figura 20):

Tabella 55. Programma Thermocycling (termociclaggio)

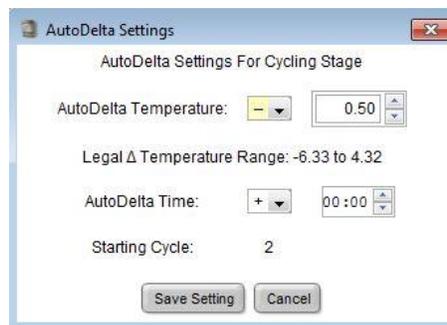
Program Name (nome del programma)	Cycles (cicli)	Target °C	Hold (mantenimento)	Ramp (rampa)*
Polymerase activation (attivazione della polimerasi)	1	95°C	2 min	100%
Touch down cycling (cicli di touchdown):	10	95°C	5 s	100%
Step down (riduzione) -0,5°C/cycle [⊖]		61°C – 56,5°C [⊖]	30 s	100%
Quantification cycling (cicli di quantificazione)*:	40	95°C	5 s	100%
Acquisition/Detection (acquisizione/rilevamento)		52°C ⁺	40 s	100%

* ≠ Default ramp rate (velocità di rampa predefinita)

⊖ Enable AutoDelta (Abilita AutoDelta): -0,5°C/ciclo

+ Collect data on hold (raccolta dati in attesa)

Figura 18. Metodo d'esecuzione – Graphical View (vista grafica)

Figura 19. Metodo d'esecuzione – Graphical View (vista grafica) – Enable AutoDelta (abilita AutoDelta)

Figura 20. Metodo d'esecuzione – Tabular View (vista tabulare)

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



In **Setup** (imposta) > aprire **Run Method** (metodo di esecuzione)

Selezionare **Start Run** (avvia analisi)

21.2 Interpretazione dei risultati

Per l'interpretazione dei dati è necessario il software di analisi **ResistancePlus**[®] MG (7500). Il software di analisi è disponibile su richiesta. Per ulteriori informazioni contattare tech@speedx.com.au.

Consultare la **Sezione 24** per istruzioni sull'utilizzo del software di analisi **ResistancePlus**[®] MG (7500).

22 Appendice 4: Applied Biosystems® 7500 Fast Dx

Le seguenti informazioni sono basate sul software SDS v. 1.4.1 per 7500 Fast Dx.

Il kit **ResistancePlus**® MG₍₅₅₀₎ contiene coloranti per l'Applied Biosystems® (ABI) 7500 Fast Dx. Per tutti i canali vengono utilizzate calibrature dei coloranti predefinite. La calibrazione personalizzata non è necessaria.

22.1 Programmazione dell'Applied Biosystems® 7500 Fast Dx

Selezionare Create New Document (crea nuovo documento)

Nel **New Document Wizard** (procedura guidata di creazione del nuovo documento), effettuare le seguenti selezioni (**Figura 21**):

Assay (dosaggio) > Standard Curve (Absolute Quantification) (curva standard, quantificazione assoluta)

Container (contenitore) > 96-Well Clear (trasparente a 96 pozzetti)

Template (modello) > Blank document (documento vuoto)

Run mode (modalità di esecuzione) > Standard 7500

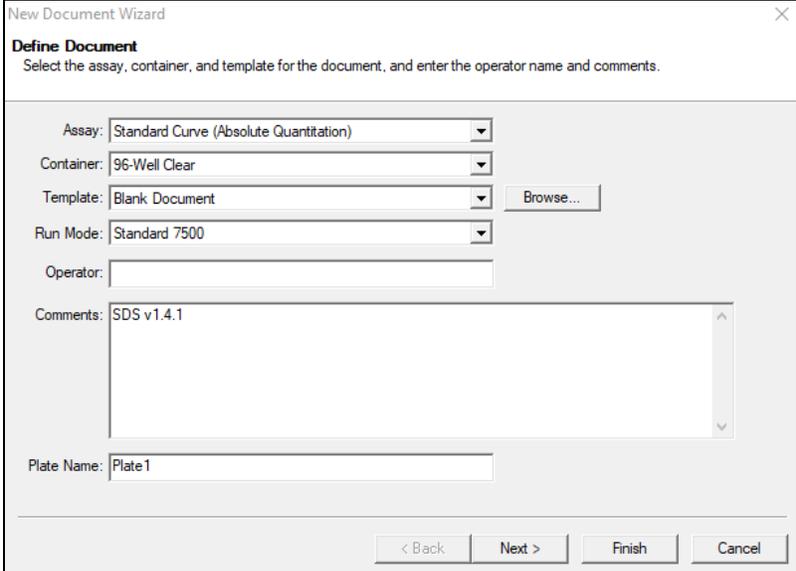
Operator (operatore) > Enter Operator's name (Inserire il nome dell'operatore)

Comments (commenti) > Inserire eventuali commenti o note aggiuntive per il file di esecuzione

Plate Name (nome della piastra) > Assegnare un nome univoco al file di esecuzione

Selezionare **Next** (avanti)

Figura 21. Finestra della procedura guidata di creazione di un nuovo documento



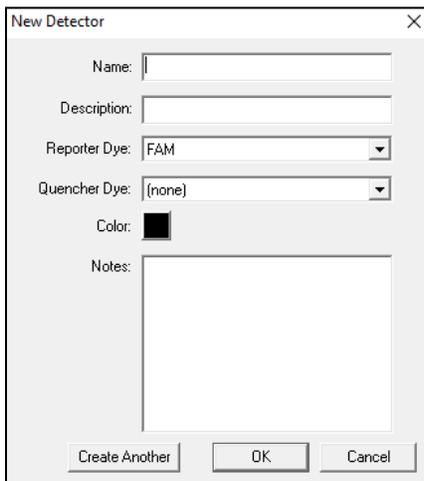
In **Select Detectors** (seleziona rilevatori) > selezionare **New Detector** (nuovo rilevatore)

Definire i rilevatori come indicato di seguito (definire i colori secondo la necessità) (**Tabella 56 e Figura 22**)

Tabella 56. Definizione dei rilevatori			
Rilevatori	Nome rilevatore	Colorante reporter	Quencher
Rilevatore 1	MgPa	FAM	Nessuno
Rilevatore 2	Mutazione di 23S rRNA	JOE	Nessuno
Rilevatore 3	IC	TAMRA	Nessuno

Selezionare **OK**

Figura 22. Finestra nuovo rilevatore

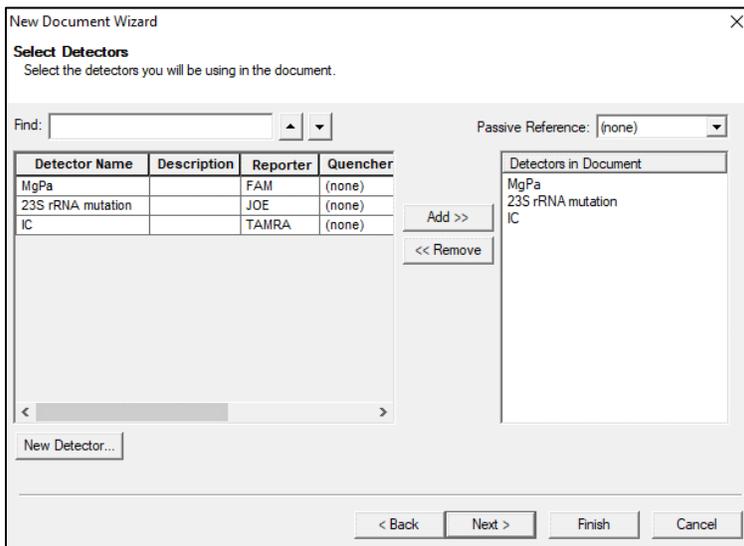


Selezionare Detectors (rilevatori) (Figura 23)

Selezionare i rilevatori e **Add** (aggiungere) al documento

Selezionare **Passive reference** (riferimento passivo) > **None** (nessuno)

Figura 23. Finestra di selezione dei rilevatori



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

Detectors in Document	
MgPa	
23S rRNA mutation	
IC	

In **Set Up** (configura) piastra campione >

Selezionare i pozzetti e assegnare quattro rilevatori ai pozzetti selezionati

- MgPa
- Mutazione di 23S rRNA
- IC

Selezionare **Next** (avanti)

Per consentire il rilevamento automatizzato del campione nel software di analisi, è necessario assegnare nominativi ai pozzetti sulla piastra

In **Setup** (configura) > scheda **Plate** (piastra)

Fare clic con il pulsante destro del mouse sul pozzetto e selezionare **Well Inspector** (ispettore pozzetto) > Inserire **Sample Name** (nome campione)

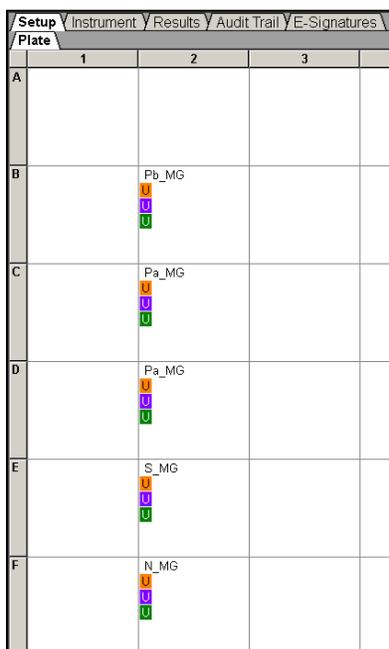
Modificare **Sample Name** (nome del campione) in modo che corrisponda al nominativo definito nel modulo dei dosaggi del software di analisi (vedi **Sezione 24.4**)

I campioni sono etichettati come *Prefisso_Suffisso* (come mostrato nella **Tabella 57** e nella **Figura 24**) per es. Pb_MG

NOTE: nei nominativi dei campioni si fa distinzione tra maiuscole e minuscole. Il nominativo deve coincidere esattamente con quelli assegnati nel file di esecuzione.

Tabella 57. Nominativi dei campioni per il software di analisi			
Tipo di campione	Prefisso_ (nel software di analisi)	_Suffisso (nel software di analisi)	Nome del campione (in 7500 Fast Dx)
Campione regolare	S	_MG	S_MG
Controllo negativo	N	_MG	N_MG
Controllo positivo (MG, 23S rRNA tipo mutante) (Pa)	Pa	_MG	Pa_MG
Controllo positivo (MG, 23S rRNA tipo selvaggio) (Pb)	Pb	_MG	Pb_MG

Figura 24. Vista impostazione piastra – assegnazione di nominativi ai pozzetti



Setup	Instrument	Results	Audit Trail	E-Signatures
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		

Selezionare **Next** (avanti)

Nella scheda **Instrument** (strumento)

Nel riquadro **Settings** (impostazioni)

Per **Sample Volume** (volume del campione) (μL): Inserire 20 μL

Creare il protocollo del termociclatore che segue (Tabella 58 e Figura 25 e Figura 26)

Tabella 58. Protocollo del termociclatore				
Program Name (nome del programma)	Cycles (cicli)	Target °C	Hold (mantenimento)	Ramp (rampa) †
Polymerase activation (attivazione della polimerasi)	1	95°C	2 min	100%
Touch down cycling (cicli di touchdown): Step down (riduzione) -0.5°C/ciclo [‡]	10	95°C	5 s	100%
		61°C – 56.5°C [‡]	30 s	100%
Quantification cycling (cicli di quantificazione)*: Acquisition/Detection (acquisizione/rilevamento)	40	95°C	5 s	100%
		52°C ⁺	40 s	100%

† Default ramp rate (velocità di rampa predefinita)

‡ Enable AutoDelta (Abilita AutoDelta): -0.5°C/ciclo

+ Collect data on hold (raccolta dati in attesa)

Figura 25. Protocollo del termociclatore – Profilo termico

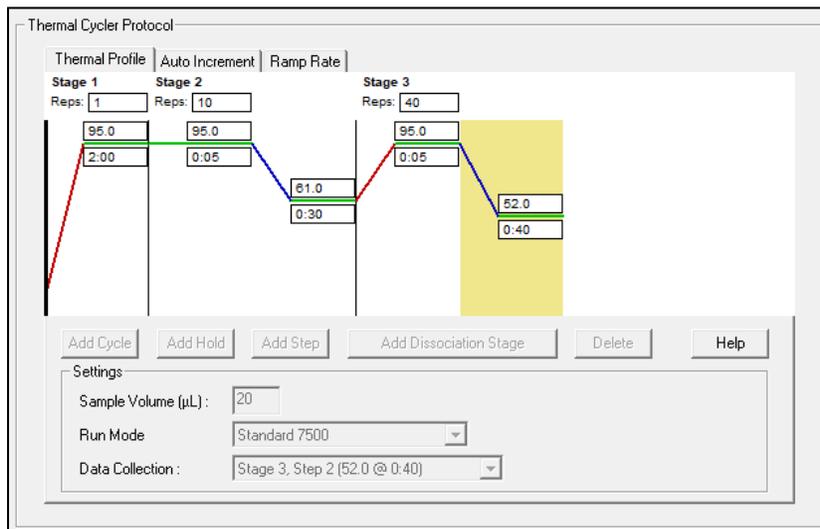
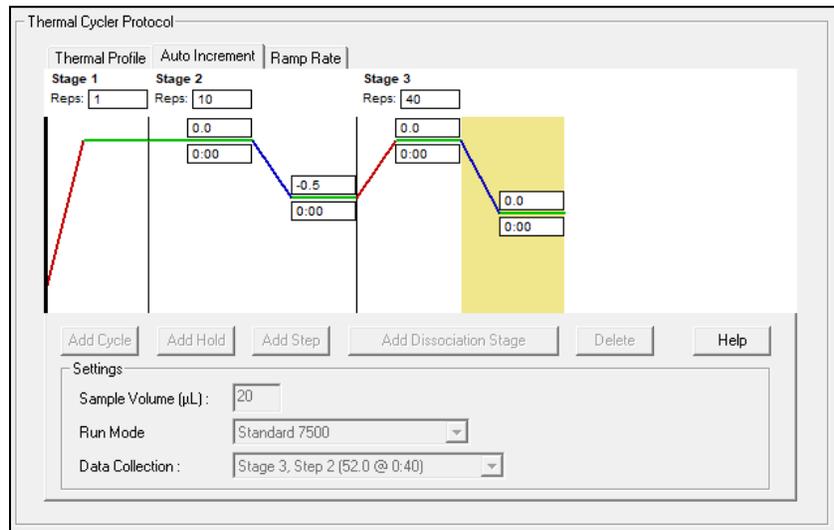


Figura 26. Protocollo del termociclatore – Incremento automatico

22.2 Interpretazione dei risultati

Per l'interpretazione dei dati è necessario il software di analisi **ResistancePlus[®] MG (7500)**. Il software di analisi è disponibile su richiesta. Per ulteriori informazioni contattare tech@speedx.com.au.

Consultare la **Sezione 24** per istruzioni sull'utilizzo del software di analisi **ResistancePlus[®] MG (7500)**.

23 Appendice 5: Sistema di PCR in tempo reale Bio-Rad CFX96™ Dx e CFX96 Touch™

Le seguenti informazioni sono basate su Bio-Rad CFX Manager v. 3.1

Il kit **ResistancePlus**® MG₍₆₇₅₎ contiene coloranti per il CFX96 Real-Time PCR System. Per tutti i canali vengono utilizzate calibrature dei coloranti predefinite. La calibrazione personalizzata non è necessaria.

23.1 Programmazione dei sistemi PCR in tempo reale CFX96™ Dx e CFX96 Touch™

Selezionare **View** (Visualizza) > Aprire **Run Setup** (Impostazione analisi)

In **Run Setup** (impostazione analisi) > Scheda **Protocol**(protocollo) > Selezionare **Create New** (crea nuovo)

Nel **Protocol Editor** (editor protocollo) (vedere **Figura 27**):

Impostare **Sample Volume** (volume campione) > 20 µL

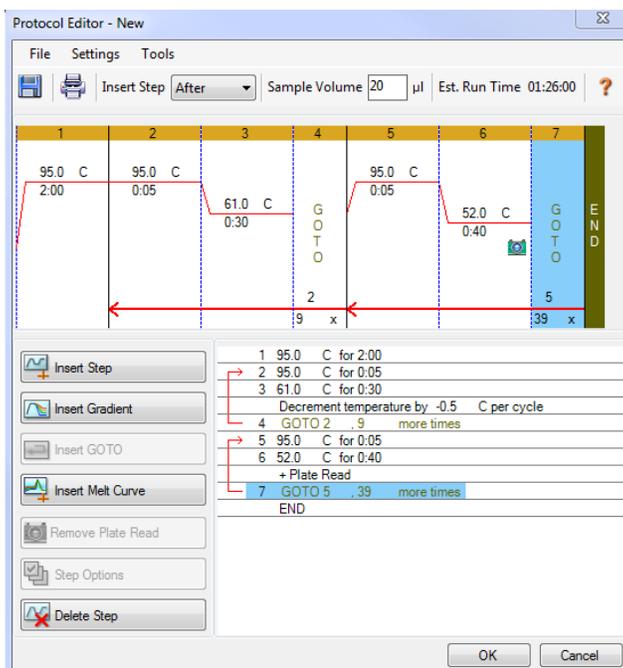
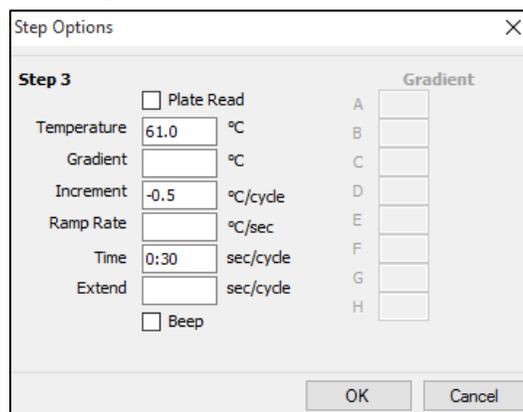
Creare il programma di termociclaggio seguente e salvarlo come '**SpeedX PCR**'. Questo protocollo potrà essere selezionato per analisi future.

Per i cicli di touchdown, selezionare la Fase 3 e **Step options** (Opzioni fase) > Increment (incremento): -0,5°C/ciclo (mostrato più dettagliatamente nella **Figura 28**).

Tabella59. Programma Thermocycling (termociclaggio)			
Program Name (nome del programma)	Cycles (cicli)	Target °C	Hold (mantenimento)
Polymerase activation (attivazione della polimerasi)	1	95°C	2 min
Touch down cycling (cicli di touchdown) ^δ : Step down (riduzione) -0.5°C/ciclo	10	95°C	5 s
		61°C – 56.5°C ^δ	30 s
Quantification cycling (cicli di quantificazione) ⁺ : Acquisition/Detection (acquisizione/rilevamento)	40	95°C	5 s
		52°C ⁺	40 s

^δ **Step options** (opzioni di fase) > Increment (incremento): -0.5°C/ciclo

⁺ **Add Plate Read to Step** (Aggiungi lettura piastra a fase)

Figura 27. Thermocycling Protocol (Protocollo di termociclaggio) - Graphical view (Visualizzazione grafica)

Figura 28. Step options (opzioni fase)


The 'Step Options' dialog box is shown for Step 3. It contains 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

On the right side, there is a 'Gradient' section with a vertical list of checkboxes labeled A through H.

The bottom of the dialog has 'OK' and 'Cancel' buttons.

In **Run Setup** (configura analisi) > Scheda **Plate** (piastra)

Selezionare **Create New** (crea nuova)

Selezionare **Settings**(impostazioni) > **Plate Type** (tipo piastra) > Selezionare **BR Clear** (BR trasparente)

Impostare **Scan mode** (modalità scansione) > All channels (tutti i canali)

Select Fluorophores (Selezionare fluorofori) > FAM, HEX, Quasar 705 (vedere **Tabella 60**)

Selezionare i pozzetti contenenti i campioni, assegnare **Sample Type** (tipo di campione) e spuntare **Load** (carica) per fluorofori (FAM, HEX, Quasar 705)

Salvare la piastra

Tabella 60. Canali per i target <i>ResistancePlus</i> [®] MG ₍₆₇₅₎		
Rilevamento dell' <i>M. genitalium</i> (MgPa)	Mutazione di 23S rRNA	Controllo interno
FAM	HEX	Quasar 705

In **Run Setup** (imposta analisi) > Scheda **Start Run** (avvia analisi)

Selezionare blocco

Start Run (avvia analisi)

Per consentire il rilevamento automatizzato del campione nel software di analisi, è necessario assegnare nominativi ai pozzetti sulla piastra

Aprire il modulo **Plate Setup** (impostazione piastra)

Selezionare il pozzetto

Modificare **Sample Name** (nome del campione) in modo che corrisponda al nominativo definito nel modulo dei dosaggi del software di analisi (consultare la **Sezione 24.4**)

I campioni sono etichettati come *Prefisso_Suffisso* (come mostrato nella **Tabella 61** e nella **Figura 29**) per es. Pb_MG

NOTE: nei nominativi dei campioni si fa distinzione tra maiuscole e minuscole. Il nominativo deve coincidere esattamente con quelli assegnati nel file di esecuzione.

Tabella 61. Nominativi dei campioni per il software di analisi			
Tipo di campione	Prefisso_ (nel software di analisi)	_Suffisso (nel software di analisi)	Nome del campione (in CFX96)
Campione regolare	S	_MG	S_MG
Controllo negativo	N	_MG	N_MG
Controllo positivo (MG, 23S rRNA tipo mutante) (Pa)	Pa	_MG	Pa_MG
Controllo positivo (MG, 23S rRNA tipo selvaggio) (Pb)	Pb	_MG	Pb_MG

Figura 29. Sample Editor (editor campioni) – Assegnazione di nominativi ai pozzetti

	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 Interpretazione dei risultati

Per l'interpretazione dei dati è necessario il software di analisi *ResistancePlus*[®] MG (CFX). Il software di analisi è disponibile su richiesta. Per ulteriori informazioni contattare tech@speedx.com.au.

Consultare la **Sezione 24** per istruzioni sull'utilizzo del software di analisi *ResistancePlus*[®] MG (CFX) .

24 Appendice A: interpretazione dei risultati

L'interpretazione dei dati richiede il software di analisi **ResistancePlus**[®] MG. Benché i primer **PlexPrime**[®] offrano una maggiore specificità rispetto ad altri primer specifici per un allele, alcune amplificazioni non specifiche del dosaggio mutante rRNA 23S possono essere osservate in campioni che contengono alte concentrazioni di *M. genitalium* tipo selvaggio23S rRNA. Il software di analisi **ResistancePlus**[®] MG automatizza l'interpretazione dei dati dei risultati di amplificazione e semplifica il flusso di lavoro.

Vedere la **Tabella 62** per il software di analisi idoneo per ciascuno strumento PCR in tempo reale. Il software di analisi è disponibile su richiesta. Per ulteriori informazioni contattare tech@speedx.com.au.

Tabella 62. Software di analisi ResistancePlus [®] MG		
N. di cat.	Software di analisi*	Strumento PCR in tempo reale
99003	ResistancePlus [®] MG (LC480)	LC480 II
99018	ResistancePlus [®] MG (z480)	z 480
99002	ResistancePlus [®] MG (7500)	7500 Fast e 7500 Fast Dx
99008	ResistancePlus [®] MG (CFX)	CFX96 Dx e CFX96 Touch
99023	REFLEX ResistancePlus [®] MG (LC480)	LC480 II
99024	REFLEX ResistancePlus [®] MG (z480)	z 480
99026	REFLEX ResistancePlus [®] MG (7500)	7500 Fast e 7500 Fast Dx
99025	REFLEX ResistancePlus [®] MG (CFX)	CFX96 Dx e CFX96 Touch

* Per assicurarsi di usare la versione più recente del software di analisi, fare riferimento al sito internet <https://plexpcr.com/products/sexually-transmitted-infections/resistanceplus-mg/#resources>.

NOTA: per impedire la perdita di informazioni sui campioni, attenersi alle ordinarie pratiche di laboratorio per il trasferimento, il reporting e l'archiviazione dei risultati.

24.1 Piattaforma FastFinder – Requisiti IT minimi

Il software di analisi è disponibile sulla piattaforma FastFinder (<https://www.ugentec.com/fastfinder/analysis>). Di seguito sono elencati i requisiti IT minimi per l'installazione della piattaforma FastFinder.

Requisiti hardware

PC (i computer Mac non sono supportati)
 Processore: 2 GHz, 2 GB RAM
 Spazio su disco: 10 Gb
 Cavo di connessione Internet o DSL, proxy non supportato
 Risoluzione schermo minima: 1366x768 pixel

Sistema operativo client supportato

Edizioni supportate del sistema operativo
 Windows 10 32-bit e 64-bit
 Windows 8.1 32-bit, 64-bit e ARM
 Windows 8 32-bit, 64-bit e ARM
 Windows 7 SP1 32-bit e 64-bit
 Windows Vista SP2 32-bit e 64-bit

Browser supportati

Gli utenti dell'account amministratore di FastFinder richiedono uno dei seguenti browser:

- Internet Explorer 11 o superiore
- Microsoft Edge 25 o superiore
- Firefox 45 o superiore
- Google Chrome 47 o superiore.

Potrebbe funzionare su versioni precedenti, ma queste non sono ufficialmente supportate.

Requisiti del software

Per utilizzare il software FastFinder è necessario almeno .NET 4.6.1. Per ulteriori informazioni su .NET Framework visitare le pagine della guida di Microsoft Windows.

Impostazioni antivirus

Il software antivirus potrebbe mettere in quarantena il programma di installazione di FastFinder (UgenTec.FastFinder.Installer.exe). Aggiungere questo file all'elenco consentiti dell'antivirus. Esempio: Symantec (rischio: WS.Reputation.1)

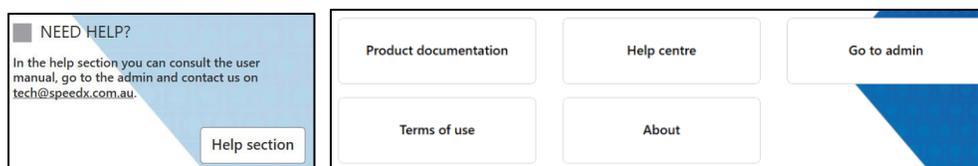
Requisiti del firewall

Le connessioni https devono essere consentite a *.fastfinderplatform.com:443

Per ulteriori informazioni dettagliate sulla piattaforma **FastFinder** consultare il **FastFinder Instructions For Use** (Istruzioni per l'uso di FastFinder) accessibile dal menu **Help** (guida).

Per accedere al menu Help (guida)

- Aprire il menu Start 
- Selezionare  la **sezione Help** (guida) e da lì **Product Documentation** (documentazione di prodotto) seguito da **Instructions For Use** (istruzioni per l'uso)



24.2 Device set up (impostazione del dispositivo) (nuovo utente o dispositivo)

Consultare il documento **FastFinder Instructions For Use** (istruzioni per l'uso di FastFinder) per istruzioni dettagliate sulla configurazione del dispositivo. Il documento è accessibile dal menu **Help** (guida)

Aprire **FastFinder**

- Selezionare **Devices** (dispositivi) nella barra del flusso di lavoro
 - > Selezionare **Add** (aggiungi)
 - > Selezionare un file (file di esecuzione) per il nuovo dispositivo
- Per cambiare la directory corrente
 - > Selezionare **Browse** (sfoglia) e selezionare la cartella contenente i file del caso
 - > Selezionare **Next** (avanti)
- Aggiungere le informazioni sul dispositivo
 - > Selezionare **Save** (salva)

24.2.1 Compensazione del colore

NOTA: Per ulteriori informazioni, consultare la **Sezione 19.2** e **Sezione 20.2** su Colour Compensation (Compensazione del colore)

Per i dispositivi **LC480 II** e **z 480**, è necessario aggiungere al dispositivo un file di compensazione del colore

- Selezionare il dispositivo LC480 II o z 480
 - > Nella sezione **Colour Compensation** (compensazione del colore), selezionare 
 - > Selezionare il file di compensazione del colore nella directory per il dispositivo
- Per cambiare la directory corrente
 - > Selezionare **Browse** (sfoglia) e selezionare la cartella contenente i file del caso
- Selezionare **Next** (avanti)

- Selezionare **ResistancePlus MG (LC480)**, **ResistancePlus MG (z480)**, **REFLEX ResistancePlus MG (LC480)**, o **REFLEX ResistancePlus MG (z480)** dall'elenco per collegare a questo dosaggio
- Selezionare **Save** (salva)

File di compensazione del colore nuovi o addizionali possono essere aggiunti a un dispositivo oppure disattivati, come necessario.

Nella sezione compensazione del colore del dispositivo

- Accanto al nome del file, selezionare 
- Selezionare  per attivare o disattivare un file compensazione del colore per un dosaggio
- Selezionare **Save** (salva)

24.3 Plug-in di dosaggio (nuovo utente)

Per istruzioni dettagliate sull'impostazione dei dosaggi, consultare il documento **FastFinder Instructions For Use** (istruzioni per l'uso di FastFinder), accessibile dal menu **Help** (guida)

Aprire **FastFinder**

- Selezionare **Assays** (dosaggi) nella barra del flusso di lavoro
- Selezionare **Add** (aggiungi)
 - > Per LC480 II > Selezionare **ResistancePlus MG (LC480)** nell'elenco
 - > Per z 480 > Selezionare **ResistancePlus MG (z480)** nell'elenco
 - > Per 7500 Fast e 7500 Fast Dx > Selezionare **ResistancePlus MG (7500)** nell'elenco
 - > For CFX96 Dx e CFX96 Touch > Selezionare **ResistancePlus MG (CFX)** nell'elenco
 - > Per l'analisi dei campioni estratti senza IC su LC480 (flusso di lavoro reflex) > Selezionare **REFLEX ResistancePlus® MG (LC480)** dall'elenco
 - > Per l'analisi dei campioni estratti senza IC su z 480 (flusso di lavoro reflex) > Selezionare **REFLEX ResistancePlus® MG (z480)** dall'elenco
 - > Per l'analisi dei campioni estratti senza IC su 7500 Fast e 7500 Fast Dx (flusso di lavoro reflex) > Selezionare **REFLEX ResistancePlus® MG (7500)** dall'elenco
 - > Per l'analisi dei campioni estratti senza IC su CFX96 Dx e CFX96 Touch (flusso di lavoro reflex) > Selezionare **REFLEX ResistancePlus® MG (CFX)** dall'elenco
- Selezionare **Add** (aggiungi)

Per attivare o disattivare le versioni del plug-in di dosaggio

- In General assay information (informazioni generali sul dosaggio)
 - > Selezionare  Versions (versioni)
 - > Selezionare  per attivare o disattivare la versione del dosaggio
 - > Selezionare **Save**(salva)

24.4 Denominazione dei campioni

È possibile assegnare nominativi dei campioni a un plug-in di dosaggio per automatizzare il rilevamento dei pozzetti e dei tipi di campioni per l'analisi.

Selezionare **Assays** (dosaggi) nella barra del flusso di lavoro

- Sotto Sample type nametags (prefix) (nominativi dei tipi di campioni, prefisso) selezionare 

- > Selezionare  per aggiungere un nominativo e definire i nominativi dei tipi di campioni (controllo negativo, controllo/i positivo/i e campione regolare)
 - > Aggiungere alla casella di testo la parola, l'acronimo o la lettera desiderati
 - > Selezionare **Save**(salva)
- Sotto Mix definition nametags (suffix) (nominativi di definizione delle miscele, suffisso) selezionare 
- > Selezionare  per aggiungere un nominativo per definire il nome della miscela
 - > Aggiungere alla casella di testo la parola, l'acronimo o la lettera desiderati
 - > Selezionare **Save** (salva)
- Nel software dello strumento (prima o dopo il completamento dell'esecuzione), assegnare lo stesso nominativo ai pozzetti appropriati
- > Per **LC480 II** consultare la **Sezione 19** per istruzioni sulla programmazione dei nominativi dei campioni nel file di esecuzione
 - > Per **z 480** consultare la **Sezione 20** per istruzioni sulla programmazione dei nominativi dei campioni nel file di esecuzione
 - > Per **7500 Fast** consultare la **Sezione 21** per istruzioni sulla programmazione dei nominativi dei campioni nel file di esecuzione
 - > Per **7500 Fast Dx** consultare la **Sezione 22** per istruzioni sulla programmazione dei nominativi dei campioni nel file di esecuzione
 - > Per **CFX96 Dx** e **CFX96 Touch** consultare la **Sezione 23** per istruzioni sulla programmazione dei nominativi dei campioni nel file di esecuzione

NOTE: nei nominativi dei campioni si fa distinzione tra maiuscole e minuscole. Il nominativo deve coincidere esattamente con quelli assegnati nel file di esecuzione.

24.5 Aggiunta dei numeri di lotto delle miscele

È possibile assegnare al dosaggio numeri di lotto delle miscele per consentire la tracciabilità dei reagenti

- Selezionare **Assays** (dosaggi) nella barra del flusso di lavoro
- > Sotto **Assay Lot:** (lotto di dosaggio:) selezionare  per aggiungere un nuovo lotto oppure per modificare un lotto esistente 
 - > Una volta aggiunti, i numeri di lotto diventano disponibili nel modulo di analisi

Selezionare  per mostrare tutti i numeri di lotto o solo i numeri di lotto attivi

24.6 Analisi

Selezionare **Analyses** (analisi) nella barra del flusso di lavoro per avviare una nuova analisi

1 Select datafile

Cercare il file da caricare per l'analisi da una directory specificata

- Per cambiare la **directory corrente**
 - > Selezionare **Browse** (sfoglia) e selezionare la cartella contenente i file del caso
- Selezionare il file dati di esecuzione dall'elenco
 - > Selezionare **Next step** (fase successiva)

2 Assign assay(s)

Se la denominazione dei campioni non è stata impostata nel modulo dei dosaggi, assegnare manualmente alla piastra le informazioni sul dosaggio

- Per **LC480 II** > Selezionare **ResistancePlus MG (LC480)**
- Per **z 480** > Selezionare **ResistancePlus MG (z480)**
- Per **7500 Fast** e **7500 Fast Dx** > Selezionare **ResistancePlus MG (7500)**
- Per **CFX96 Dx** e **CFX96 Touch** > Selezionare **ResistancePlus MG (CFX)**
- Per l'analisi dei campioni estratti senza IC su **LC480** > Selezionare **REFLEX ResistancePlus® MG (LC480)**
- Per l'analisi dei campioni estratti senza IC su **z 480** > Selezionare **REFLEX ResistancePlus® MG (z480)**
- Per l'analisi dei campioni estratti senza IC su **7500 Fast** e **7500 Fast Dx** > Selezionare **REFLEX ResistancePlus® MG (7500)**
- Per l'analisi dei campioni estratti senza IC su **CFX96 Dx** e **CFX96 Touch** > Selezionare **REFLEX ResistancePlus® MG (CFX)**
- Selezionare i pozzetti e assegnarli come:
 - > Campione regolare (S)
 - > Controllo negativo (N)
 - > Controllo positivo (MG, 23S rRNA tipo mutante) (Pa)
 - > Controllo positivo (MG, 23S rRNA tipo selvaggio) (Pb)
- Selezionare **Next step** (fase successiva)

Per salvare il layout della piastra come modello per uso futuro

- Selezionare i pozzetti e assegnare i tipi di campioni
 - > Selezionare  per salvare il modello
- Specificare il nome del modello per uso futuro
 - > Selezionare **Save** (salva)

Per caricare un modello di piastra salvato in precedenza

- Selezionare  per caricare il modello piastra
 - > Selezionare il modello nel menu a discesa
 - > Spuntare la casella per caricare i tipi di campione specificati all'interno del modello di piastra
 - > Selezionare **Load** (carica)

3 Configure assay(s)

- Per **LC480 II** > Selezionare **ResistancePlus MG (LC480)**
 - > Selezionare nel menu a discesa il file di compensazione del colore appropriato
 - > Selezionare **Assay Lot** (lotto di dosaggio) nel menu a discesa
 - > Selezionare **Analyse**(analizza)

- Per **z 480** > Selezionare **ResistancePlus MG (z480)**
 - > Selezionare nel menu a discesa il file di compensazione del colore appropriato
 - > Selezionare **Assay Lot** (lotto di dosaggio) nel menu a discesa
 - > Selezionare **Analyse**(analisi)

- Per **7500 Fast** e **7500 Fast Dx** > Selezionare **ResistancePlus MG (7500)**
 - > Selezionare **Assay Lot** (lotto di dosaggio) nel menu a discesa
 - > Selezionare **Analyse**(analisi)

- Per **CFX96 Dx** e **CFX96 Touch** > Selezionare **ResistancePlus MG (CFX)**
 - > Selezionare **Assay Lot** (lotto di dosaggio) nel menu a discesa
 - > Selezionare **Analyse** (analisi)

- Per campioni estratti senza IC (flusso di lavoro reflex) su **LC480 II** > Selezionare **REFLEX ResistancePlus MG (LC480)**
 - > Selezionare nel menu a discesa il file di compensazione del colore appropriato
 - > Selezionare **Assay Lot** (lotto di dosaggio) nel menu a discesa
 - > Selezionare **Analyse** (analisi)

- Per campioni estratti senza IC (flusso di lavoro reflex) su **z 480** > Selezionare **REFLEX ResistancePlus MG (z480)**
 - > Selezionare nel menu a discesa il file di compensazione del colore appropriato
 - > Selezionare **Assay Lot** (lotto di dosaggio) nel menu a discesa
 - > Selezionare **Analyse** (analisi)

- Per il campioni estratti senza IC (flusso di lavoro reflex) su **7500 Fast** e **7500 Fast Dx** > Selezionare **REFLEX ResistancePlus MG (7500)**
 - > Selezionare **Assay Lot** (lotto di dosaggio) nel menu a discesa
 - > Selezionare **Analyse** (analisi)

- Per il campioni estratti senza IC (flusso di lavoro reflex) su **CFX96 Dx** e **CFX96 Touch** > Selezionare **REFLEX ResistancePlus MG (CFX)**
 - > Selezionare **Assay Lot** (lotto di dosaggio) nel menu a discesa
 - > Selezionare **Analyse** (analisi)

24.7 Risultati

Consultare la **Tabella 63** per un riepilogo dei possibili risultati dei campioni riportati.

NOTE: si raccomanda vivamente di confermare le curve di amplificazione di tutti i campioni positivi.

Per risolvere eventuali risultati incerti 

- Selezionare la scheda **Resolve** (risoluzione)
- Selezionare il campione da risolvere
- Ispezionare le curve di amplificazione per risultati incerti
 - > Selezionare per tracciare una curva di riferimento sul grafico
 - > Selezionare per tracciare un controllo positivo sul grafico
 - > Selezionare per tracciare un controllo negativo sul grafico
 - > Selezionare per confermare il risultato suggerito oppure selezionare un'opzione diversa
- Confermare come **Negative** (negativo) o **Inconclusive** (includente) e aggiungere commenti

NOTA: per campioni inconcludenti, estrarre e testare i campioni un'altra volta. Se il risultato del campione rimane inconcludente, raccogliere un nuovo campione da riesaminare.

Per finalizzare l'analisi e prevenire ulteriori modifiche da parte dell'utente

- > Selezionare **Authorise Analysis** (autorizza analisi)
- > Selezionare **Yes** (sì) per confermare
- Per rifiutare o riavviare l'analisi
 - > Selezionare **Restart Analysis** (riavvia analisi) o **Reject Analysis** o (rifiuta analisi)
 - > Selezionare l'opzione per confermare

24.8 Curva di riferimento

È possibile salvare una curva di riferimento e utilizzarla per confrontare campioni sulla stessa piastra o tra piastre differenti

- Selezionare il campione di interesse nel menu **Well Details** (dettagli pozzetto) o **Target Details** (dettagli target)
- Nel menu del grafico di amplificazione > selezionare 
 - > Selezionare la casella di spunta per il canale di interesse e aggiungere un'etichetta
 - > Selezionare **Save** (salva) per aggiungere il segnale come curva di riferimento

Questa curva di riferimento viene quindi visualizzata come collegata al dosaggio nel menu dei dosaggi e può essere disattivata in qualsiasi momento.

24.9 Panoramica dei risultati

Tabella 63. Interpretazione dei risultati del software di analisi ResistancePlus® MG (Scheda di panoramica dei risultati)						
	Pozzetto	Nome	Dosaggio	Risultato	Valori Cq ^A	Risultati complessivi
	A1	Campione 1	ResistancePlus MG	Negativo	CANALE C: 25.31	Campione 1 - Negativo M. genitalium non rilevato, IC valido
	A2	Campione 2	ResistancePlus MG	Positivo	CANALE A: 13.35 CANALE B: 24.22 CANALE C: 24.36	Campione 2 - Positivo M. genitalium rilevato, Mutazione di 23S rRNA non rilevata
	A3	Campione 3	ResistancePlus MG	Positivo	CANALE A: 23.32 CANALE B: 31.64	Campione 3 - Positivo M. genitalium rilevato, Mutazione di 23S rRNA non rilevata
	A4	Campione 4	ResistancePlus MG	Positivo	CANALE A: 21.32 CANALE B: 23.22 CANALE C: 24.30	Campione 4 - Positivo M. genitalium, mutazione 23S rRNA rilevata
	A5	Campione 5	ResistancePlus MG	Positivo	CANALE A: 23.16 CANALE B: 24.31	Campione 5 - Positivo M. genitalium, mutazione 23S rRNA rilevata
	A6	Campione 6	ResistancePlus MG	Non valido	CANALE C: 35.02	Campione 6 - Non valido IC non valido, ripetere il test ¹
⚠	A7	Campione 7 (Contrassegnato per la risoluzione)	ResistancePlus MG	Positivo	CANALE A: 26.27 CANALE B: 28.11 ² CANALE C: 28.92	Campione 7 - Positivo ² M. genitalium, mutazione 23S rRNA rilevata
⚠	A7	Campione 7 (Risolti come inconcludente)	ResistancePlus MG	Non valido	CANALE A: 26.27 CANALE C: 28.92	Campione 7 - Non valido ³ Risultato inconcludente, ripetere il test ¹
	B2	Pa (Controllo positivo di tipo mutante)	ResistancePlus MG	Positivo	CANALE A: 25.01 CANALE B: 24.23	Pa - Positivo Controllo positivo valido
	B3	Pb (Controllo positivo di tipo selvaggio)	ResistancePlus MG	Positivo	CANALE A: 25.90	Pb - Positivo Controllo positivo valido
	B4	N (Controllo negativo)	ResistancePlus MG	Negativo	CANALE C: 26.25	N - Negativo Controllo negativo valido

^A Consultare la **Tabella 12** per i nomi dei canali per i diversi strumenti

¹ Per i campioni non validi e inconcludenti per IC, estrarre e testare di nuovo

² Un campione con Cq incerto sarà contrassegnato per la risoluzione con ⚠

³ Un campione risolto come inconcludente viene contrassegnato con ⚠

24.10 Esportazione dei risultati

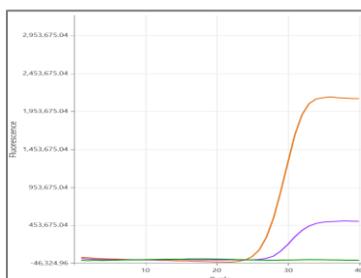
- Per esportare i risultati
 - > Selezionare **Exports** (esportazioni) nella barra del flusso di lavoro
 - > Esportare uno o più dei seguenti tipi di rapporto: **Cq values list** (elenco valori Cq, CSV), **Results (risultati, CSV)**, **Generic Amplification CSV (amplificazione generale, CSV)** o il file di integrazione LIS appropriato.
 - > Selezionare **Exports**(esportazioni)
- Per scaricare le esportazioni
 - > Selezionare **Reports**(rapporti) nella barra del flusso di lavoro
 - > Selezionare i file e salvare

- In alternativa, esportare un rapporto personalizzato
 - > Esportare **Amplification Curve Analysis (PDF)** (analisi curva di amplificazione, PDF)
 - > Selezionare le informazioni incluse desiderate (grafici, audit trail, panoramica dei risultati)
 - > Selezionare le impostazioni del rapporto desiderate per personalizzare l'ordine dei campioni
- Selezionare **Exports**(esportazioni)
 - > Aprire in **Report Viewer** (visualizzatore rapporti) per visualizzare, salvare e stampare

24.11 Grafici di esempio dei controlli

I seguenti esempi mostrano le curve di amplificazione (curve di amplificazione corrette in confronto a la linea di base) e la panoramica dei risultati del software di analisi **ResistancePlus MG (7500)** per tipi di campioni di controllo.

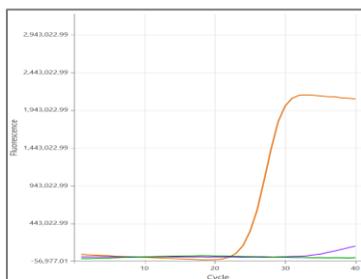
24.11.1 *M. genitalium*, controllo mutante 23S rRNA (Pa)



CANALE A CANALE B CANALE C

Pozzetto	Nome	Dosaggio	Risultato	Valori Cq	Risultati complessivi
B1	Pa	ResistancePlus MG	Positivo	CANALE A: 26.36 CANALE B: 27.38	Pa - Positivo Controllo positivo valido

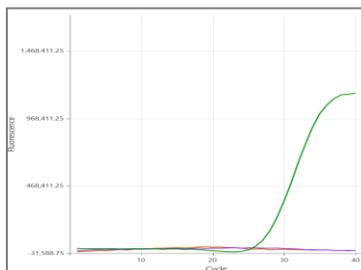
24.11.2 *M. genitalium*, controllo di 23S rRNA tipo selvaggio (Pb)



CANALE A CANALE B CANALE C

Pozzetto	Nome	Dosaggio	Risultato	Valori Cq	Risultati complessivi
D12	Pb	ResistancePlus MG	Positivo	CANALE A: 24.30 CANALE B: 34.29	Pb - Positivo Controllo positivo valido

24.11.3 *M. genitalium* controllo negativo (N) (campione negativo)



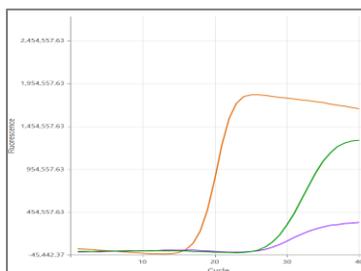
CANALE A CANALE B CANALE C

Pozzetto	Nome	Dosaggio	Risultato	Valori Cq	Risultati complessivi
D12	N	ResistancePlus MG	Negativo	CANALE C: 27.65	N - Negativo Controllo negativo valido

24.12 Esempi

I seguenti esempi mostrano le curve di amplificazione (curve di amplificazione corrette in confronto a la linea di base) e la panoramica dei risultati del software di analisi **ResistancePlus MG (7500)** per campioni diversi.

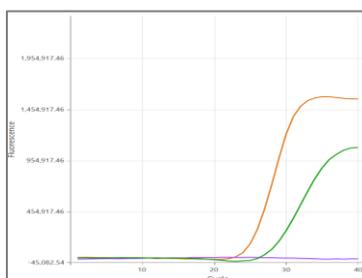
24.12.1 Esempio 1. Campione alta copia di *M. genitalium*, rRNA 23S di tipo selvaggio



CANALE A CANALE B CANALE C

Pozzetto	Nome	Dosaggio	Risultato	Valori Cq	Risultati complessivi
D2	Campione 12	ResistancePlus MG	Positivo	CANALE A: 16.34 CANALE B: 26.59 CANALE C: 26.00	Campione 12 - Positivo M. genitalium rilevato, Mutazione di 23S rRNA non rilevata

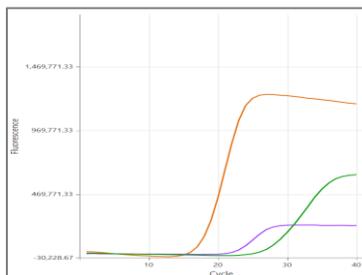
24.12.2 Esempio 2. Campione bassa copia di *M. genitalium*, rRNA 23S di tipo selvaggio



CANALE A CANALE B CANALE C

Pozzetto	Nome	Dosaggio	Risultato	Valori Cq	Risultati complessivi
F1	Campione 6	ResistancePlus MG	Positivo	CANALE A: 29.30 CANALE C: 28.11	Campione 6 - Positivo M. genitalium rilevato, Mutazione di 23S rRNA non rilevata

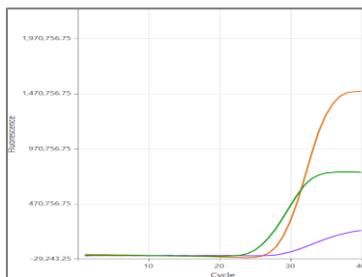
24.12.3 Esempio 3. Campione alta copia di *M. genitalium*, mutante rRNA 23S



CANALE A CANALE B CANALE C

Pozzetto	Nome	Dosaggio	Risultato	Valori Cq	Risultati complessivi
G3	Campione 9	ResistancePlus MG	Positivo	CANALE A: 18.08 CANALE B: 22.31 CANALE C: 28.03	Campione 9 - Positivo M. genitalium, mutazione 23S rRNA rilevata

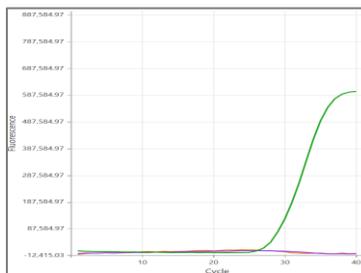
24.12.4 Esempio 4. Campione bassa copia di *M. genitalium*, mutante rRNA 23S



CANALE A CANALE B CANALE C

Pozzetto	Nome	Dosaggio	Risultato	Valori Cq	Risultati complessivi
E3	Campione 21	ResistancePlus MG	Positivo	CANALE A: 29.08 CANALE B: 29.23 CANALE C: 26.13	Campione 21 - Positivo M. genitalium, mutazione 23S rRNA rilevata

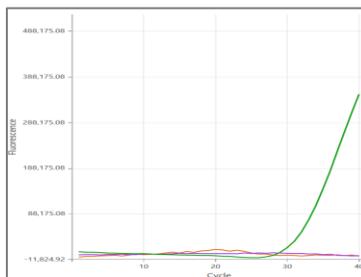
24.12.5 Esempio 5. Campione negativo



CANALE A CANALE B CANALE C

Pozzetto	Nome	Dosaggio	Risultato	Valori Cq	Risultati complessivi
E3	Campione 73	ResistancePlus MG	Negativo	CANALE C: 29.23	Campione 73 - - Negativo M. genitalium non rilevato, IC valido

24.12.6 Esempio 6. Campione non valido



CANALE A CANALE B CANALE C

Pozzetto	Nome	Dosaggio	Risultato	Valori Cq	Risultati complessivi
E3	Campione 35	ResistancePlus MG	Non valido	CANALE C: 31.16	Campione 35 - Non valido IC non valido, ripetere il test

In questo esempio, il segnale IC si trova al di fuori del cut-off del canale. Per i campioni IC non validi, ripetere l'estrazione del campione e poi ripetere il test.

24.12.7 Esempio 7. Campioni da risolvere – Segnale negativo

In questo esempio, il CANALE B (JOE) è stato contrassegnato per la risoluzione. Il software suggerisce che il campione è Negativo (Figura 30).

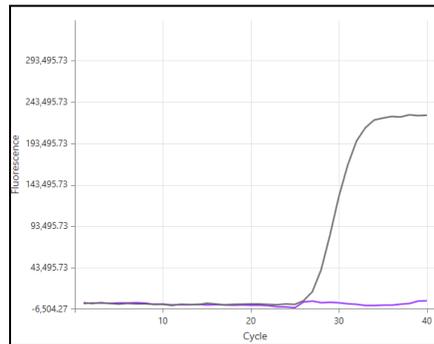
Figura 30. Campioni da risolvere così come compaiono nel menu Resolve (risolvi) del software di analisi

	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 		

Per determinare l'azione adeguata da eseguire per risolvere, è possibile tracciare un altro campione o controllo per il confronto dei segnali

- Selezionare **Ref** per tracciare una curva di riferimento positiva (precedentemente salvata) per il CANALE B (JOE)
- Selezionare **P** per tracciare un controllo positivo dall'analisi
- Selezionare **N** per tracciare un controllo negativo dall'analisi

CANALE B



Dopo l'ispezione delle curve di amplificazione (mostrate sopra), si può vedere che non c'è amplificazione nel canale.



Il risultato è risolto selezionando l'icona

per confermare il suggerimento negativo dal software. Il risultato risolto viene mostrato nella **Figura 31** più in basso.

Figura 31. Risultati risolti così come compaiono nel menu Resolve (risoluzione) del software di analisi

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 Esempio 8. Campioni da risolvere – Segnale inconcludente

In questo esempio, il CANALE B (JOE) è stato contrassegnato per la risoluzione. Il software suggerisce che il campione è positivo (Figura 32).

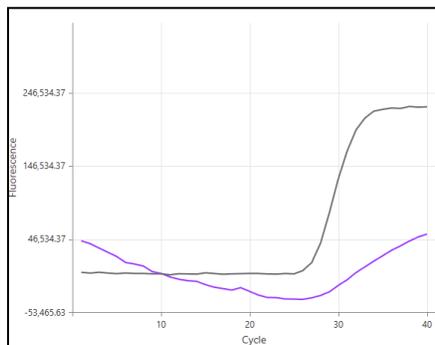
Figura 32. Campioni da risolvere così come compaiono nel menu Resolve (risolvi) del software di analisi

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 		

Per determinare l'azione adeguata da eseguire per risolvere, tracciare un altro campione o controllo per il confronto dei segnali

- Selezionare per tracciare una curva di riferimento positiva (precedentemente salvata) per il CANALE B (JOE)
- Selezionare per tracciare un controllo positivo dall'analisi
- Selezionare per tracciare un controllo negativo dall'analisi

CANALE B



Dopo l'ispezione delle curve di amplificazione (mostrate sopra), c'è una potenziale amplificazione nel canale.

Si consiglia di risolvere come Inconclusive (inconcludente), selezionando l'icona  e selezionando l'opzione corrispondente nel menu a discesa. Si possono aggiungere commenti all'audit trail del campione. Il campione deve essere estratto e testato di nuovo. Il risultato risolto viene mostrato nella **Figura 33** più in basso.

Vedere la **Tabella 63**, Campione 7, per le modalità di visualizzazione dei risultati prima e dopo la risoluzione nella scheda **Results Overview** (panoramica dei risultati).

Figura 33. Risultati risolti così come compaiono nel menu Resolve (risoluzione) del software di analisi

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 Glossario



Conformità europea
Per uso diagnostico *In Vitro*



Numero di catalogo



Codice del lotto



Rappresentante autorizzato
Nella Comunità Europea



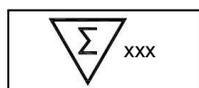
Produttore



Data di produzione



Limitazione di temperatura



Contenuto sufficiente per
xxx determinazioni



Utilizzare entro il



Importatore Europeo



Marchio Valutazione di
Conformità del Regno Unito

I prodotti SpeedX possono essere coperti da uno o più brevetti locali o stranieri. Si prega di guardare su www.plexpcr.com/patents per le informazioni complete sui brevetti

PlexPCR[®], **ResistancePlus**[®], **PlexPrime**[®] e **PlexZyme**[®] sono marchi di fabbrica appartenenti a SpeedX. Altri marchi di fabbrica e copyright sono di proprietà dei rispettivi titolari.

© Copyright 2024 SpeedX Pty. Ltd.