

ResistancePlus[®] MG

Multiplex realtids-PCR för identifiering av Mycoplasma genitalium och detektion av mutationer som förknippas med resistens mot azitromycin

Produkt	Plattform	Storlek	Katalognr.			
		(reaktioner)				
ResistancePlus® MG	LC480 II	100	REF 20001L-01			
	z 480					
ResistancePlus [®] MG	LC480 II	25	REF 2000125			
	z 480					
ResistancePlus [®] MG ₍₅₅₀₎	ABI 7500 Fast	100	REF 2000201			
	ABI 7500 Fast Dx					
ResistancePlus [®] MG ₍₅₅₀₎	ABI 7500 Fast	25	REF 2000225			
	ABI 7500 Fast Dx					
ResistancePlus [®] MG ₍₆₇₅₎	CFX96™ Dx	100	REF 2000301			
	CFX96™ Touch					
ResistancePlus [®] MG ₍₆₇₅₎	CFX96™ Dx	25	REF 2000325			
	CFX96™ Touch					
Tillbehör – analysprogramvara						
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 – Svit 123 2595 AM Haag Nederländerna





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





Innehållsförteckning

1	Produ	ktbeskrivning	. 5			
2	Avsed	Avsedd användning				
3	Patog	eninformation	. 5			
4	Kittets	s innehåll	. 6			
5	Trans	port och förvaring	.7			
6	Varnı	ngar och forsiktighetsatgarder	. 8			
6.	1	Allmant	. 8			
6.	2	Laboratorium	. 8			
6.	3	Provhantering	. 8			
6.	4	Analys	. 8			
6.	5	Säkerhetsåtgärder	. 8			
6.	6	Analystilläggsprogram: varningar/försiktighetsåtgärder/begränsningar	. 8			
7	Erford	lerligt material som ej medföljer	. 9			
8	Tekni	kprincip	11			
9	Proce	dursoversikt	13			
10	Detaij		14			
10).1	Provtagning, transport och forvaring	14			
	10.1.1	Validerade provtagningsprodukter	14			
	10.1.2	Provtagning, transport och förvaring av okonserverad urin	14			
	10.1.3	Provtagning, transport och förvaring med torra provtagningspinnar	14			
	10.1.4	Provtagning, transport och förvaring med Multi-Collect Specimen Collection Kit (Abbott, kat.nr 9K12-01)	14			
	10.1.5	Provtagning, transport och förvaring med Aptima [®] Urine Collection Kit (Hologic, kat.nr 301040)	15			
	10.1.6	Provtagning, transport och förvaring med Aptima [®] Multitest swab specimen collection kit (Hologic, kat.nr PRD-0354 15	16)			
	10.1.7	Provtagning, transport och förvaring med DeltaSwab ViCUM [®] 2 mL + Standard flocked swab (deltalab, kat.nr 30427 16	'8)			
	10.1.8	Provtagning, transport och förvaring med Vacumed [®] Urine without preservative (FL medical, kat.nr 44950)	16			
	10.1.9	Provtagning, transport och förvaring med Regular FLOQSwab [™] in 1 mL of UTM [™] media (Copan, kat.nr 359C)	16			
	10.1.10	Provtagning, transport och förvaring med cobas [®] PCR media (Roche, kat.nr 06466281190)	16			
	10.1.11	Validerade provextrakt	16			
10).2	Provbearbetning	17			
10).3	Intern kontroll (IC)	17			
	10.3.1	Intern kontroll på MagNA Pure 96	17			
	10.3.2	Intern kontroll på MICROLAB STARIet IVD	18			
	10.3.3	Intern kontroll på QIAsymphony [®] SP	18			
	10.3.4	Intern kontroll på easyMAG [®]	18			
10).4	Förberedelse av realtids-PCR	19			
	10.4.1	Beredning av masterblandning	20			
	10.4.2	Hållbarhet för masterblandning	20			
10).5	Förberedelse av PCR med extraherade nukleinsyror (reflexarbetsflöde)	20			
11	Progr	ammering och analys	21			
12	Tolkn	ing av resultat	22			
13	Begrä	insningar	23			
14	Kvalit	etskontroll	23			





15	Anvis	ningar för ResistancePlus [®] MG Positive Control	24
	15.1	Bruksanvisning	24
16	Prest	andaegenskaper	25
	16.1	Klinisk prestanda	25
	16.1.1	Klinisk studie 1	25
	16.1.2	Klinisk studie 2	
	16.1.3	Klinisk studie 3	27
	16.1.4	Klinisk studie 4	29
	16.1.5	Klinisk studie 5	31
	16.1.6	Klinisk studie 6	32
	16.1.7	Klinisk studie 7	33
	16.2	Analytisk prestanda	34
	16.2.1	Reproducerbarhet och repeterbarhet	34
	16.2.2	Analytisk sensitivitet	37
	16.2.3	Analytisk specificitet	37
	16.2.4	Potentiellt interfererande substanser	38
	16.2.5	Korsreaktivitet med andra 23S rRNA-mutationer	40
17	Kund	tjänst och teknisk service	40
18	Refe	enser	41
19	Bilag	a 1: LightCycler [®] 480 Instrument II	42
	19.1	Programmera LightCycler [®] 480 Instrument II (LC480 II)	42
	19.2	Colour Compensation (Färgkompensation) för LightCycler® 480 Instrument II	46
	19.3	Tolkning av resultat	47
20	Bilag	a 2: cobas z 480 analyser	48
	20.1	Programmering av cobas z 480 analyzer	48
	20.2	Färgkompensation för cobas z 480 analyser	52
	20.3	Tolkning av resultat	53
21	Bilag	a 3: Applied Biosystems [®] 7500 Fast	54
	21.1	Programmering av Applied Biosystems® 7500 Fast	54
	21.2	Tolkning av resultat	57
22	Bilag	a 4: Applied Biosystems 7500 Fast Dx	58
	22.1	Programmering av Applied Biosystems [®] 7500 Fast Dx	58
	22.2	Tolkning av resultat	62
23	Bilag	a 5: Bio-Rad CFX96™ Dx och CFX96 Touch™ Real-Time PCR System	63
	23.1	Programming the CFX96™ Dx och CFX96 Touch™ Real-time PCR System	63
	23.2	Tolkning av resultat	65
24	Bilag	a A: Tolkning av resultat	66
	24.1	FastFinder-platform – Minimikrav för IT	66
	24.2	Device set up (Enhetskonfiguration) (ny användare eller enhet)	67
	24.2.1	Colour Compensation (Färgkompensation)	67
	24.3	Analysinsticksmodul (ny användare)	68
	24.4	Namngivning av prover	69
	24.5	Lägga till blandningens satsnummer	69





2	4.6	Analys	. 69
2	.4.7	Resultat	. 72
2	4.8	Referenskurva	. 72
2	4.9	Resultatöversikt	. 73
2	4.10	Exportera resultat	. 74
2	4.11	Exempeldiagram över kontroll	. 74
	24.11.1	<i>M. genitalium</i> , 23S rRNA-mutantkontroll (Pa)	. 74
	24.11.2	M. genitalium, 23S rRNA vildtypkontroll (Pb)	. 74
	24.11.3	M. genitalium negativ kontroll (N) (negativt prov)	. 75
2	4.12	Exempel	. 75
	24.12.1	Exempel 1. Hög kopia <i>M. genitalium</i> , 23S rRNA vildtypsprov	. 75
	24.12.2	Exempel 2. Låg kopia <i>M. genitalium</i> , 23S rRNA vildtypsprov	. 76
	24.12.3	Exempel 3. Hög kopia <i>M. genitalium</i> , 23S rRNA-mutantprov	. 76
	24.12.4	Exempel 4. Låg kopia <i>M. genitalium</i> , 23S rRNA-mutantprov	. 76
	24.12.5	Exempel 5. Negativt prov	. 77
	24.12.6	Exempel 6. Ogiltigt prov	. 77
	24.12.7	Exempel 7. Prov som ska lösas – negativ signal	. 77
	24.12.8	Exempel 8. Prover som ska lösas – obedömbar signal	. 79
25	Ordlis	ta	. 80





1 Produktbeskrivning

Satsen **Resistance**Plus[®] MG detekterar samtidigt *M. genitalium* och fyra mutationer vid positionerna 2058 och 2059 i 23S rRNAgenen (*E. coli*-numrering) som är förknippade med resistens mot azitromycin (makrolidbaserat antibiotikum). Satsen **Resistance**Plus[®] MG är multiplex realtids-PCR med en brunn bestående av tre avläsningar. Avläsning 1 anger förekomsten eller frånvaron av *M. genitalium* genom detektion av MgPa-genen, avläsning 2 anger förekomsten av en A2058G-, A2059G-, A2059G-, A2058T- eller A2058Cmutation i 23S rRNA-genen och avläsning 3 är en intern kontroll för att övervaka extraktionseffektivitet och qPCR-hämning. Satsen **Resistance**Plus[®] MG använder **PlexZyme[®]** och **PlexPrime[®]** för specificitet och överlägsen multiplexkapacitet. Analysen är validerad på prover extraherade med användning av MagNA Pure 96 System (Roche), MICROLAB STARlet IVD (Hamilton), QIAsymphony[®] SP (QIAGEN), NUCLISENS[®] easyMAG[®] (Biomérieux) och realtidsdetektion på Roche LightCycler[®] 480 Instrument II (LC480 II), analysinstrumentet cobas z 480 (z480), samt realtids-PCR-detektionssystemen Applied Biosystems[®] 7500 Fast (7500 Fast), Applied Biosystems[®] 7500 Fast Dx (7500 Fast Dx), Bio-Rad CFX96TM Dx (CFX96 Dx) och CFX96 TouchTM (CFX96 Touch).

2 Avsedd användning

Satsen **Resistance**Plus[®] MG är ett kvalitativt *in vitro*-diagnostiskt multiplex realtids-PCR-test för identifiering av *M. genitalium* och detektion av fyra mutationer i 23S rRNA-genen (A2058G, A2059G, A2059G, A2058T och A2058C), *Escherichia coli*-numrering) som är förknippade med resistens mot azitromycin (makrolidantibiotikum). Den är avsedd för att hjälpa till med diagnosen av *M. genitalium* infektion och detekterar mutationer förknippade med resistens mot azitromycin i *M. genitalium* och ska användas tillsammans med klinisk information och annan laboratorieinformation.

Satsen **Resistance**Plus[®] MG kan användas med följande provtyper: urin från man och kvinna samt vaginala prover från symtomatiska och asymtomatiska patienter.

Negativa resultat utesluter inte *M. genitalium*-infektioner och ger ingen bekräftelse på känslighet för azitromycin eftersom det kan förekomma andra mekanismer för behandlingssvikt.

Satsen **Resistance**Plus[®] MG är avsedd för att användas yrkesmässigt på sjukhus eller andra inrättningar såsom referenslaboratorier eller nationella laboratorier. Den är inte avsedd för självtestning, användning i hemmet eller patientnära användning.

3 Patogeninformation

M. genitalium är en liten bakterie som finns i människans urinvägar. *M. genitalium* har förknippats med ett flertal sexuellt överförbara infektioner (STI). Hos män är bakterien den andra vanligaste orsaken till icke-gonokockuretrit (NGU) och förknippas även med prostatit, epididymit och balanit, inflammation av glans penis och förhud¹. Hos kvinnor förknippas bakterien med cervicit, bäckeninflammationssjukdom (PID), inklusive endometrit (inflammation av endometrium) och salpingit (inflammation av äggledare)^{1.2.3}.

Azitromycin används vanligtvis för behandling av *M. genitalium* och för syndromhantering av STI, såsom NGU och cervicit. Azitromycin tillhör mikrolidklassen av antibiotika och verkar genom att binda till 23S rRNA för att hämma proteinsyntes. Punktmutationer i 23S rRNA-genen av *M. genitalium*, A2058G, A2059G, A2058T, A2058C och A2059C (*E. coli*-numrering) har förknippats med behandlingssvikt och/eller *in vitro*-resistens mot azitromycin^{4.5}. De vanligaste mutationerna är A2058G och A2059G som utgör 89 % av makrolidresistensmutationer i en aktuell studie⁶.





4 Kittets innehåll

Tabell 1. Innehåll för ResistancePlus [®] MG-satser						
Lockfärg	Innehåll	Beskrivning	Kat.nr 20001L-01 (100 reaktioner)	Kat.nr 2000125 (25 reaktioner)		
Blått	Plex Mastermix, 2 x	Masterblandning innehållande komponenter nödvändiga för qPCR inklusive dNTP, MgCl ₂ , DNA-polymeras och buffert	1 x 1 mL	1 x 250 µL		
Brunt	MG+23S Mix, 20 x	Blandning innehållande oligonukleotider^ för amplifiering och detektion av <i>M. genitalium</i> och 23S rRNA-mutationer	1 x 100 µL	1 x 25 μL		
Vitt	Kontrollblandning 1, 20 x	Blandningen innehållande oligonukleotider^ för amplifiering och detektion av intern kontrollanalys för LC480 II och z 480	1 x 100 µL	1 x 25 µL		
Rött	Celler för intern kontroll [#]	Interna kontrollceller innehållande DNA-mall för intern kontroll för att övervaka extraktions- och amplifieringseffektivitet	1 x 500 µL	1 x 100 µL		
Neutral	Nukleasfritt vatten	Vatten av PCR-kvalitet	1 x 1 mL	1 x 1 mL		

Förvara mallrören separat från oligoblandningar, dvs. hanteringsrum för mall eller nukleinsyra

^ Oligonukleotider är PCR-primerpar (inklusive *PlexPrime*®-primrar), *PlexZyme*®-enzymer och fluorescensprob

Tabell 2. Innehåll för ResistancePlus [®] MG ₍₅₅₀₎ -satser						
Lockfärg	Innehåll Beskrivning		Kat.nr 2000201 (100 reaktioner)	Kat.nr 2000225 (25 reaktioner)		
Blått	Plex Mastermix, 2 x	Masterblandning innehållande komponenter nödvändiga för qPCR inklusive dNTP, MgCl ₂ , DNA-polymeras och buffert	1 x 1 mL	1 x 250 μL		
Brunt	MG+23S Mix, 20 x	Blandning innehållande oligonukleotider^ för amplifiering och detektion av <i>M. genitalium</i> och 23S rRNA-mutationer	1 x 100 µL	1 x 25 µL		
Vitt	Kontrollblandning 2, 20 x	Blandningen innehållande oligonukleotider^ för amplifiering och detektion av intern kontrollanalys för 7500 Fast och 7500 Fast Dx	1 x 100 µL	1 x 25 µL		
Rött	Celler för intern kontroll [#]	Interna kontrollceller innehållande DNA-mall för intern kontroll för att övervaka extraktions- och amplifieringseffektivitet	1 x 500 μL	1 x 100 µL		
Neutral	Nukleasfritt vatten	Vatten av PCR-kvalitet	1 x 1 mL	1 x 1 mL		

Förvara mallrören separat från oligoblandningar, d.v.s. hanteringsrum för mall eller nukleinsyra

^ Oligonukleotider är PCR-primerpar (inklusive *PlexPrime®-*primrar), *PlexZyme®-*enzymer och fluorescensprob





Tabell 3. Innehåll för <i>ResistancePlus[®]</i> MG ₍₆₇₅₎ -satser						
Lockfärg	Innehåll	Beskrivning	Kat.nr 2000301 (100 reaktioner)	Kat.nr 2000325 (25 reaktioner)		
Blått	Plex Mastermix, 2 x	Masterblandning innehållande komponenter nödvändiga för qPCR inklusive dNTP, MgCl ₂ , DNA-polymeras och buffert	1 x 1 mL	1 x 250 µL		
Brunt	MG+23S Mix, 20 x	Blandning innehållande oligonukleotider^ för amplifiering och detektion av <i>M. genitalium</i> och 23S rRNA-mutationer	1 x 100 µL	1 x 25 μL		
Vitt	Kontrollblandning 3, 20 x	Blandningen innehållande oligonukleotider^ för amplifiering och detektion av intern kontrollanalys förCFX96 Dx och CFX96 Touch	1 x 100 µL	1 x 25 µL		
Rött	Celler för intern kontroll [#]	Interna kontrollceller innehållande DNA-mall för intern kontroll för att övervaka extraktions- och amplifieringseffektivitet	1 x 500 µL	1 x 100 µL		
Neutral	Nukleasfritt vatten	Vatten av PCR-kvalitet	1 x 1 mL	1 x 1 mL		

Förvara mallrören separat från oligoblandningar, d.v.s. hanteringsrum för mall eller nukleinsyra

^ Oligonukleotider är PCR-primerpar (inklusive *PlexPrime®-primrar*), *PlexZyme®-enzymer* och fluorescensprob

5 Transport och förvaring

- Komponenterna i satserna *ResistancePlus®* MG levereras på torris eller isgelpack. Alla komponenter ska förvaras vid -25 °C till -15 °C vid mottagande. Det rekommenderas att frysnings-/tiningscykler begränsas till 15.
- Satsens aktivitet bibehålls tills utgångsdatumet som anges på etiketten vid förvaring under rekommenderade förhållanden och korrekt hantering. Använd inte efter utgångsdatum.
- En allvarlig incident ska rapporteras till SpeeDx genom att kontakta tech@speedx.com.au.





6 Varningar och försiktighetsåtgärder

6.1 Allmänt

- För in vitro-diagnostisk användning.
- Läs denna bruksanvisning noga före användning. Följ förfarandena noga som de beskrivs för att säkerställa testresultats tillförlitlighet. Eventuell avvikelse från dessa förfaranden kan påverka testprestanda.
- Användare ska få tillräcklig utbildning om användningen av analysen ResistancePlus® MG.
- En allvarlig incident ska rapporteras till tillverkaren och kompetent myndighet i medlemsstaten där användaren och/eller patienten är etablerad.

6.2 Laboratorium

- Det rekommenderas att utföra beredning/extraktion av prov, beredning av masterblandning, tillsättning av prov och termocykling på rumsligt separerade ställen. PCR-instrumentet ska åtminstone idealiskt stå i ett separat rum från områden där reaktioner bereds.
- Det rekommenderas att följa rutinmässiga försiktighetsåtgärder i laboratoriet. Använd lämplig personlig skyddsutrustning, t.ex. skyddshandskar, skyddsglasögon och laboratorierock vid hantering av reagenser.
- Patogena organismer kan förekomma i kliniska prover. Behandla alla biologiska prover som potentiellt smittsamma och följ din institutions säkerhetsförfaranden för hantering av kemikalier och biologiska prover.
- Följ din institutions förfaranden för hantering av riskavfall för korrekt kassering av prover, reagenser och andra potentiellt kontaminerade material.

6.3 Provhantering

- Prover ska samlas in, transporteras och förvaras med användning av standardmässiga laboratorietekniker eller enligt anvisningar för provtagningssatsen.

6.4 Analys

- Grundläggande försiktighetsåtgärder för att förhindra kontaminering av PCR-reaktioner inkluderar användning av sterila filterpipettspetsar, användning av en ny pipettspets för varje pipettering och separation av arbetsflöde.
- PCR-tester har en benägenhet att kontamineras av tidigare PCR-produkter. Öppna aldrig reaktionskärl efter slutförande av PCR.
- Analysreagenser innehåller IDTE-buffert som kan orsaka allvarlig ögonirritation. Det rekommenderas att reagenser används i ett välventilerat område och använd lämplig personlig skyddsutrustning, t.ex. skyddshandskar, skyddsglasögon och laboratorierock vid hantering av reagenser.

6.5 Säkerhetsåtgärder

- Säkerhetsdatablad (SDS) finns tillgängliga på begäran. Kontakta tech@speedx.com.au för mer information.

6.6 Analystilläggsprogram: varningar/försiktighetsåtgärder/begränsningar

- SpeeDx-programvara kan endast kontrollera analysen av rådata genererade från testsatsen vid användning med respektive PCRinstrument. Den kontrollerar inte beredning av prover, reaktioner, programmering av utrustning eller leverans av behandling.
- Användare ska ha tillräcklig utbildning om användning av analysprogramvaran **Resistance**Plus[®] MG och åtkomst ska begränsas till varje tilldelad enskild användare.
- Det rekommenderas att implementera åtkomst med användarautentisering och cybersäkerhetskontroller såsom antivirusprogramvara eller användning av en brandvägg inom IT-systemet och infrastruktur som använder programvaran.
- Vid upptäckt av en cybersäkerhetsincident såsom obehörig åtkomst och ransomware-attacker, kontakta <u>tech@speedx.com.au</u> för vidare support.





7 Erforderligt material som ej medföljer

Positivt kontrollmaterial

- ResistancePlus® MG Positive Control -kit (SpeeDx, kat.nr 95001)

Allmänna laboratorieartiklar

- Skyddshandskar och rena laboratorierockar
- Vortexblandare
- Bänkcentrifug för 0,5 mL- och 1,5 mL-rör
- Mikropipetter
- Sterila aerosol-resistenta pipettspetsar
- 0,5 mL- och 1,5 mL-rör (PCR-kvalitet)
- 2,0 mL-rör (för förspädning av interna kontrollceller)

För MagNA Pure 96 Instrument

- 1x Phosphate Buffered Saline (PBS) (Fosfatbuffrad koksaltlösning (PBS))
- MagNA Pure 96 Internal Control Tube (Roche, kat.nr 06374905001)
- MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit (Roche, kat.nr 06543588001)
- MagNA Pure 96 DNA och Viral NA Large Volume Kit (Roche, kat.nr 06374891001)
- MagNA Pure 96 System Fluid (externt) (Roche, kat.nr 06640729001)
- MagNA Pure 96 Processing Cartridge (Roche, kat.nr 06241603001)
- MagNA Pure 96 Pure tip 1000uL (Roche, kat.nr 6241620001)
- MagNA Pure 96 Output Plate (Roche, kat.nr 06241611001)
- MagNA Pure Sealing Foil (Roche, kat.nr 06241638001)

För MICROLAB STARlet Instrument

- 1x Phosphate Buffered Saline (PBS) (Fosfatbuffrad koksaltlösning (PBS))
- STARMag 96 X 4 Universal Cartridge kit (384T) kit (Seegene, kat.nr 744300.4.UC384)
- 2,0 mL-behållare

För QIAsymphony[®] SP-instrument

- 1x Phosphate Buffered Saline (PBS) (Fosfatbuffrad koksaltlösning (PBS))
- Sample Prep Cartridges, 8-well (Qiagen, kat.nr 997002)
- 8-Rod Covers (Qiagen, kat.nr 997004)
- Filter tips, 200 µL and 1500 µL (Qiagen, kat.nr 990332 and 997024)
- 2 mL tubes (Sarstedt, kat.nr 72.639 eller 72.694)
- 14 mL polystyrene tubes (Corning, kat.nr 352051)
- DSP Virus/Pathogen Mini Kit (QIAGEN, kat.nr. 937036)

Bruksanvisning





För NucliSENS[®] easyMAG[®]-instrument

- 1x Phosphate Buffered Saline (PBS) (Fosfatbuffrad koksaltlösning (PBS))
- NucliSENS® easyMAG® Lysis Buffer 4X1L (Biomerieux, kat.nr 280134)
- NucliSENS® easyMAG® Lysis Buffer 2ML 48T (Biomerieux, kat.nr 200292)
- NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica (Biomerieux, kat.nr 280133)
- NucliSENS® easyMAG® Extraction buffer 1 (Biomerieux, kat.nr 280130)
- NucliSENS® easyMAG® Extraction buffer 2 (Biomerieux, kat.nr 280131)
- NucliSENS® easyMAG® Extraction buffer 3 (Biomerieux, kat.nr 280132)
- NucliSENS[®] easyMAG[®] Disposables (Biomerieux, kat.nr 280135)

För LightCycler® 480 Instrument II och cobas z 480 analyser

- PlexPCR[®] Colour Compensation-kit (CC) (SpeeDx, kat.nr 90001)
- LightCycler[®] 480 Multiwell Plate 96 (Roche, kat.nr 04729692001)
- LightCycler[®] 480 Sealing Foil (Roche, kat.nr 04729757001)

För Applied Biosystems® 7500 Fast och 7500 Fast Dx

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

För Bio-Rad CFX96™ Dx och CFX96 Touch™ Real-time PCR Detection System

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

Provinsamlingsenheter

- Multi-Collect provtagningskit (Abbott, kat.nr 9K12-01)
- Aptima[®] urinprovtagningskit (Hologic, kat.nr 301040)
- Aptima[®] unisex provtagningskit (Hologic, kat.nr 301041)
- DeltaSwab ViCUM[®] 2 mL + Standard flockad provtagningspinne (deltalab, kat.nr 304278)
- Vacumed[®] Urin utan konserveringsmedel (FL medical, kat.nr 44950)
- Standard FLOQSwab™ i 1 mL UTM™-medium (Copan, kat.nr 359C)
- cobas® PCR-medium (Roche, kat.nr 06466281190)





8 Teknikprincip

Realtids-PCR (qPCR) kan användas för att amplifiera och detektera specifika målnukleinsyror från patogener. *PlexPCR*[®] är en qPCRteknik som använder *PlexZyme*[®]-enzymer som detekterar och rapporterar den amplifierade produkten genom generering av en fluorescenssignal (**Figur 1**). *PlexPrime*[®]-primrar för specifik amplifiering av mutantsekvenser som är kopplat till mutantspecifik *PlexZyme*[®]-detektion (**Figur 2**).

PlexZyme[®]-enzymer är katalytiska DNA-komplex som består av två DNA-oligonukleotider som benämns som "partiella enzymer". Varje partiellt enzym har en målspecifik region, en katalytisk kärna och en universell probbindande region. När målprodukten föreligger binder de två partiella enzymerna intill varandra för att bilda aktivt **PlexZyme**[®] som har katalytisk aktivitet för att klyva en märkt prob. Klyvning separerar fluorofor- och quencher-färgämnen vilket ger upphov till en fluorescenssignal som kan övervakas i realtid. **PlexZyme**[®]-enzymer har ytterligare specificitet jämfört med tekniker med alternerande detektion eftersom två partiella enzymer krävs för att binda för detektion. **PlexZyme**[®]-enzymer är även multipla omsättningsenzymer och multipla prober kan klyvas under varje PCR-cykel vilket resulterar i en stark och känslig signal. **PlexZyme**[®]-analyser är mycket känsliga och specifika och är idealiskt lämpliga för multiplexdetektion av patogener.

PlexPrime®-primer har tre funktionella regioner. Den långa 5'-regionen förankrar primern till ett särskilt ställe och den korta 3'-regionen målsöker förlängning från mutantbasen selektivt. En införingssekvens ligger mellan 5'- och 3'-regionen och fungerar som en bryggstruktur som för in en måloberoende sekvens i den resulterande amplikonen och ökar det selektiva trycket för 3'-regionen. I multiplex är varje *PlexPrime®*-primer utformad för att målsöka en specifik mutantbas och kommer att inkorporera en unik införingssekvens vilket producerar distinkta mutantamplikonsekvenser. Till skillnad från andra probbaserade detektionstekniker kan *PlexZyme®*-enzymet överlappas med *PlexPrime®*-primer för att målsöka den specifika mutantamplikonen innehållande mutantbasen och den inkorporerade införingssekvensen. Den unika kombinationen av *PlexPrime®*-primrar bundna till *PlexZyme®*-enzymer möjliggör den specifik amplifieringen av mutantsekvenser samt känslig och specifik detektion i multiplex.



Figur 1. Schematisk representation av *PlexZyme*[®]-detektion och universell signalering





Figur 2. Schematisk representation av *PlexPrime*[®]-primer kopplad till *PlexZyme*[®]-detektion. *PlexPrime*[®]-primern amplifierar mutantsekvensen specifikt och *PlexZyme*[®]-enzymer detekterar amplikonen specifikt.



PlexPrime amplicon

Bruksanvisning





9 Procedursöversikt







10 Detaljerat förfarande

Obs! Tillhandahållna reagenser anges i kursiv stil och färgen på rörlocket anges därefter inom parentes.

10.1 Provtagning, transport och förvaring

Prover med urin från män, urin från kvinnor och vaginala prover från symtomatiska eller asymtomatiska patienter ska samlas in, transporteras och förvaras med användning av standardmässiga laboratorietekniker eller enligt anvisningar för provtagningssatsen.

10.1.1 Validerade provtagningsprodukter

Otillräcklig eller olämplig provtagning, förvaring och transport kan sannolikt ge falska testresultat. Lämplig utbildning om provtagning rekommenderas i hög grad för att säkerställa provkvalitet och provhållbarhet.

Provtagningsprodukter som har validerats med satsen **Resistance**Plus[®] MG anges nedan med kort vägledning avseende produkttillverkarens anvisningar för insamling, hantering och transport. Dessa anvisningar är inte avsedda att ersätta eller gälla i stället för eventuella anvisningar från tillverkaren. Referera alltid till anvisningar från provtagningsproduktens tillverkare för lämpliga provtagningsmetoder.

Utbildad personal ska säkerställa lämplig förståelse av produkten och metoden före användning av en provtagningsmetod. Testbeskrivningen ska åtminstone granskas i följande avseenden: indikation av provtyp, tillräcklig volym, förfaranden, nödvändiga provtagningsmaterial, patientförberedelse, lämplig hantering och förvaringsanvisningar.

10.1.2 Provtagning, transport och förvaring av okonserverad urin

- 1. Användning av en genomskinlig och steril urinprovskopp utan konserveringsmedel eller transportmedia rekommenderas för patientens egenprovtagning.
- 2. Patienten ska samla in 20-50 mL morgonurin och sätta eller skruva på locket ordentligt.
- 3. Det rekommenderas att använda dubbelpåsar för urinprov med absorberande dynor för transport. Förvaringstemperaturer för urinprover beror på den avsedda bearbetningstiden.

10.1.3 <u>Provtagning, transport och förvaring med torra provtagningspinnar</u>

Torra provtagningspinnar kan användas för vaginala prover tagna av kliniker eller patient Se tillverkarens bipacksedel för lämpliga provtagningsmetoder på grund av variabiliteten.

10.1.4 Provtagning, transport och förvaring med Multi-Collect Specimen Collection Kit (Abbott, kat.nr 9K12-01)

Anvisningar sammanfattas nedan för insamling och transport av urin och vaginala prover med multi-Collect Specimen Collection Kit (Abbott, kat.nr 9K12-01)

10.1.4.1 Provtagning, transport och förvaring av urin

- 1. Patienten ska inte ha urinerat inom minst en timme före provtagning.
- 2. Kassera provtagningspinnen eftersom den inte krävs för insamling av urinprover.
- 3. Patienten ska samla in de första 20 till 30 ml av morgonurinen (den första delen av flödet) med hjälp av en provtagningskopp.
- 4. Skruva av transportrörets lock och se till att inte spilla ut transportbufferten i röret.
- 5. Hantera locket och röret noga för att undvika kontaminering.
- 6. Använd överföringspipetten av plast för att överföra urin från provtagningskoppen till transportröret tills vätskenivån i röret hamnar inom det genomskinliga fyllningsfönstret på transportrörets etikett, annars måste ett nytt prov samlas in. Överfyll inte. Lite mer än ett helt tryck på överföringspipettens boll kan krävas för att överföra den nödvändiga volymen av urinprovet.
- Sätt tillbaka locket på transportröret ordentligt. Se till att locket försluts helt.
 Märk transportröret med providentifieringsinformation, inklusive provtagningsdatum, med en vidhäftande etikett. Se till att inte dölja fyllningsfönstret på transportröret.
- 9. Efter provtagning ska transportröret transporteras och förvaras vid 2 °C till 30 °C i upp till 14 dagar. Om längre förvaring krävs ska det förvaras vid -10 °C eller kallare i upp till 90 dagar.





10.1.4.2 <u>Provtagning, transport och förvaring av vaginalprover</u>

- 1. Kassera överföringspipetten för engångsbruk eftersom den inte krävs för insamling av vaginalprover.
- 2. Ta ut den sterila provtagningspinnen från omslaget och se till att inte vidröra pinnens spets eller lägga den på någon yta.
- 3. För in provtagningspinnens vita spets cirka 5 cm in i vaginans öppning.
- 4. Vrid pinnen försiktigt i 15 till 30 sekunder mot vaginans sidor.
- 5. Dra ut pinnen försiktigt.
- 6. Hantera locket och röret noga för att undvika kontaminering.
- 7. Skruva av transportrörets lock och placera provtagningspinnen omedelbart i transportröret så att den vita spetsen är placerad nedåt.
- 8. Bryt av pinnen försiktigt vid den markerade linjen på skaftet och var försiktig för att undvika stänk av innehållet.
- 9. Sätt tillbaka locket på transportröret. Se till att locket försluts helt.
- 10. Märk transportröret med providentifieringsinformation, inklusive provtagningsdatum, med en vidhäftande etikett.
- 11. Efter provtagning ska transportröret transporteras och förvaras vid 2 °C till 30 °C i upp till 14 dagar. Om längre förvaring krävs ska det förvaras vid -10 °C eller kallare i upp till 90 dagar.

10.1.5 Provtagning, transport och förvaring med Aptima® Urine Collection Kit (Hologic, kat.nr 301040)

Anvisningar sammanfattas nedan för insamling och transport av urinprover från män och kvinnor med Aptima[®] Urine Collection Kit (Hologic, kat.nr 301040). Observera att klinisk prestanda för denna provtagningsprodukt endast har påvisats med prover extraherade med MagNA Pure 96-instrument samt MagNA Pure 96 DNA och Viral NA Large Volume Kit. Se **avsnitt 10.2 och avsnitt 16.1.5** för ytterligare information.

- 1. Användning av en genomskinlig och steril urinprovskopp utan konserveringsmedel eller transportmedia rekommenderas för patientens egenprovtagning.
- 2. Patienten anvisas att ta 20–30 ml av första morgonurinen i den tillhandahållna urinprovtagningskoppen. Kvinnliga patienter ska inte rengöra det labiala området innan de samlar in provet.
- Med pipetten och transportröret i Aptima
 Urine Collection Kit ska du överföra 2 ml urin med pipetten till provtransportröret utan lock. Lämplig urinvolymlinje måste ligga inom urintransportrörets svarta fyllningslinjer. Urin måste överföras från den genomskinliga och sterila urinkoppen till Aptima-urinprovröret inom 24 timmar efter insamling.
- 4. Sätt tillbaka locket på transportröret ordentligt.
- 5. Efter insamling ska bearbetade urinprover i Aptima-urintransportröret transporteras och förvaras vid 2 °C till 30 °C och förvaras vid 2 °C till 30 °C fram till testet. Se tillverkarens anvisningar för detaljerad förvaringsoptimering.

10.1.6 Provtagning, transport och förvaring med Aptima® Multitest swab specimen collection kit (Hologic, kat.nr PRD-03546)

Anvisningar sammanfattas nedan för insamling och transport av vaginalprover med Aptima[®] Multitest swab specimen collection kit (Hologic, kat.nr PRD-03546). Observera att klinisk prestanda för denna provtagningsprodukt endast har påvisats med prover extraherade med MagNA Pure 96-instrument samt MagNA Pure 96 DNA och Viral NA Large Volume Kit. Se **avsnitt 10.2 och avsnitt 16.1.5** för ytterligare information.

10.1.6.1 <u>Provtagning, transport och förvaring av vaginalprover</u>

- 1. Riv delvis upp provtagningspinnens förpackning. Ta ut provtagningspinnen. Vidrör inte den mjuka spetsen eller lägg inte ned provtagningspinnen. Använd ett nytt Aptima Multitest Swab Specimen Collection Kit om den mjuka spetsen vidrörs, om provtagningspinnen läggs ned eller provtagningspinnen tappas.
- 2. Håll provtagningspinnen, placera tummen och pekfingret i mitten av provtagningspinnens skaft och täck över den skårade linjen. Håll inte provtagningspinnens skaft under den skårade linjen.
- 3. För försiktigt in provtagningspinnen i vagina ca 5 cm förbi introitus och rotera försiktigt provtagningspinnen medurs i 10 till 30 sekunder. Se till att provtagningspinnen vidrör vaginas väggar så att fukt absorberas av provtagningspinnen och dra sedan ut provtagningspinnen utan att vidröra huden.
- 4. Skruva av locket från röret medan du håller provtagningspinnen i samma hand. Spill inte ut innehållet i röret. Om innehållet i röret spills ut ska ett nytt Aptima Multitest Swab Specimen Collection Kit användas.
- 5. Placera provtagningspinnen omedelbart i transportröret så att den skårade linjen är placerad överst i röret.
- 6. Bryt försiktigt av provtagningspinnens skaft mot rörets sida vid den skårade linjen.
- 7. Kassera omedelbart den övre delen av provtagningspinnens skaft.
- Skruva ordentligt på locket på röret. Efter insamling ska provtagningspinnen i provtransportröret transporteras och förvaras vid 2 °C till 30 °C fram till testet.





10.1.7 Provtagning, transport och förvaring med DeltaSwab ViCUM[®] 2 mL + Standard flocked swab (deltalab, kat.nr 304278)

Anvisningar sammanfattas nedan för insamling och transport av vaginalprover med DeltaSwab ViCUM[®] 2 mL + Standard flocked swab (deltalab, kat.nr 304278).

- 1. Öppna den avrivningsbara förpackningen med båda händer genom att dra från motstående sidor.
- 2. Rör om innehållet i röret.
- 3. Öppna flow pack-förpackningen och samla in provet med provtagningspinnen.
- 4. Öppna röret med den andra handen och placera provtagningspinnen i röret så att den täcks av mediet.
- 5. Rikta in provtagningspinnens brytpunkt med rörets ovansida genom att lätt trycka ned provtagningspinnen. Bryt av provtagningspinnen vid brytpunkten genom att stödja den mot rörets inre kant.
- 6. Kassera den överblivna delen av pinnen, skruva på locket ordentligt och skaka provet för att eluera det i mediet.
- 7. Efter insamling ska provtagningspinnen i provtransportröret transporteras och förvaras vid 4 °C till 25 °C fram till testet.

10.1.8 Provtagning, transport och förvaring med Vacumed[®] Urine without preservative (FL medical, kat.nr 44950)

Anvisningar sammanfattas nedan för insamling och transport av urinprover från män och kvinnor med Vacumed[®] Urine without preservative collection tube (FL medical, kat.nr 44950).

- 1. Öppna urinprovtagningsbehållarens lock och lägg det upp och ned på en ren yta.
- 2. Vidrör inte behållarens och lockets inre ytor.
- 3. Samla in urinprovet. Fyll behållaren upp till ¾ av kapaciteten.
- 4. Sätt tillbaka locket och vrid ordentligt i medurs riktning för noga förslutning.
- 5. Skaka provet försiktigt.
- 6. Lyft delvis på den skyddande etiketten (ta inte bort den helt).
- 7. För in provröret och applicera ett försiktigt tryck. Håll röret anslutet tills det är fullt (slut på flöde).
- 8. Ta bort provröret och fäst den skyddande etiketten helt.
- 9. Förvara provröret vid 4 °C till 25 °C fram till testet.

10.1.9 Provtagning, transport och förvaring med Regular FLOQSwab[™] in 1 mL of UTM[™] media (Copan, kat.nr 359C)

Anvisningar sammanfattas nedan för insamling och transport av vaginalprover med Regular FLOQSwab[™] i 1 mL UTM[™] media (Copan, kat.nr 359C).

- 1. Öppna UTM-satsens förpackning och ta ut mediumprovröret och den inre påsen som innehåller den sterila provtagningspinnen.
- 2. Ta ut den sterila provtagningspinnen från påsen, samla in det kliniska provet och se till att provtagningspinnens spets endast kommer i kontakt med insamlingsstället för att förhindra risk för kontaminering.
- 3. Skruva av och ta bort locket från provröret efter provtagning och se till att inte spilla ut mediet.
- 4. För in provtagningspinnen i provröret tills brytpunkten är i nivå med provrörets öppning.
- 5. Böj och bryt av provtagningspinnen vid brytpunkten och håll provröret borta från ansiktet och kassera den överblivna delen.
- 6. Skruva tillbaka locket på provröret och förslut det hermetiskt.
- 7. Bearbeta provet i UTM inom 48 timmar efter provtagning med förvaring av provröret vid 2–25 °C.
- 8. Vortexblanda i 20 sekunder efter bearbetning för att säkerställa att provet frisätts från provtagningspinnen och för att homogenisera mediet.

10.1.10 Provtagning, transport och förvaring med cobas[®] PCR media (Roche, kat.nr 06466281190)

Anvisningar sammanfattas nedan för insamling och transport av urinprover från män och kvinnor med cobas[®] PCR media (Roche, kat.nr 06466281190).

- 1. Blanda och överför urin i rör med cobas[®] PCR Media med hjälp av en engångspipett (medföljer inte). Obs! Urin kan förvaras vid 2 °C till 30 °C i upp till 24 timmar före överföring till rör med cobas[®] PCR Media.
- 2. Den korrekta volymen av urin har tillsatts när vätskenivån är mellan de två svarta linjerna på röretiketten.
- 3. Sätt tillbaka locket noga på röret med cobas® PCR Media.
- 4. Vänd röret upp och ned 5 gånger för att blanda. Provet är nu redo för transport och testning.
- 5. Transportera och förvara röret med cobas® PCR Media innehållande stabiliserat urinprov vid 2 °C till 30 °C.

10.1.11 Validerade provextrakt

Provextrakt validerade för användning omfattar:

- cobas[®] x480 (från CT/NG-protokoll)

Se avsnitt 10.5 för anvisningar för att förbereda PCR med extraherade nukleinsyror (reflexarbetsflöde).





10.2 Provbearbetning

Satsen *ResistancePlus®* MG har validerats på följande extraktionsinstrument i Tabell 4.

Se avsnitt 10.3 för anvisningar om användning av den interna kontrollen.

Tabell 4. Validerade extraktionsprotokoll						
Instrument	Extraktionssats	Provvolym	Protokoll	Elueringsvolym		
MagNA Pure 96 ^a	MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit	200 µL	Pathogen Universal 200	50 μL eller 100 μL		
MagNA Pure 96 ^a	MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Large Volume Kit	1 000 µL^	Viral NA Universal LV 1000 3.1	100 µL		
MICROLAB STARlet IVD ^b	STARMag 96 x 4 Universal Cartridge kit (Seegene)	10 μl spädda celler för intern kontroll tillsatta per prov 200 μL Välj "Pause before PCR setup" (Pausa före PCR-konfiguration) för att endast utföra provextraktion		100 µl		
QIAsymphony SP ^c	DSP Virus/Pathogen Mini Kit	200 µL	Complex200_V6_DSP	110 µL		
NucliSENS [®] easyMAG ^{®d}	NucliSENS [®] easyMAG [®] reagents	200 µL- provtagningspinne	Generic 2.01; "On-board"-arbetsflöde	100 µL		
		1 000 µL urin	Generic 2.01; "On-board"-arbetsflöde	100 µL		

^a Se 10.3.1 för användning av den interna kontrollen med MagNA Pure 96

^b Se 10.3.2 för användning av den interna kontrollen med STARlet IVD

^c Se 10.3.3 för användning av den interna kontrollen med QIAsymphony SP

^d Se 10.3.4 för användning av den interna kontrollen med NucliSENS® easyMAG®

^ Klinisk prestanda för prover insamlade med Aptima[®] Urine Collection Kit (Hologic, kat.nr 301040), Aptima[®] unisex swab specimen collection kit (Hologic, kat.nr 301041) och Aptima[®] Multitest swab specimen collection kit (Hologic, kat.nr PRD-03546) har endast påvisats med detta extraktionsprotokoll. Se avsnitt 16.1.5 för ytterligare information.

10.3 Intern kontroll (IC)

Satsen omfattar en intern kontroll för att övervaka extraktionseffektivitet och qPCR-inhibition. Den interna kontrollanalysen tillhandahålls som en kontrollblandning (VITT) och celler för intern kontroll (RÖTT). Kontrollblandningen tillsätts till PCR-masterblandningen (). Cellerna för intern kontroll innehåller DNA-mallen för den interna kontrollen. Cellerna för intern kontroll är spädda och bearbetade enligt nedan för specifika extraktionsinstrument. DNA-mallen för den interna kontrollen är därför samextraherad med provet och samamplifierad i reaktionen.

10.3.1 Intern kontroll på MagNA Pure 96

Späd *cellerna för intern kontroll* (**RÖTT**) 1 till 200 i 1 x PBS (**Tabell 5**). Justera volymen efter behov med hjälp av samma spädningsfaktor (se handbok för extraktionssats för minsta volym för nödvändigt antal prover). De spädda cellerna för intern kontroll laddas i röret för intern kontroll på MagNA Pure 96:

- För MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit (Pathogen Universal 200-protokoll) tillsätts 20 µl automatiskt till varje prov (standard).
- För MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Large Volume Kit (Viral NA Universal LV 1000 3.1-protokoll) delas provvolymen upp och bearbetas i två separata brunnar på MagNA Pure 96 Processing Cartridge. Totalt 40 µl av spädda celler för intern kontroll tillsätts automatiskt till varje prov (20 µl per brunn på bearbetningskassetten).

Obs! Förvara INTE spädda celler för intern kontroll.





Tabell 5. Spädning av celler för intern kontroll för MagNA Pure 96 (1 till 200-spädning)					
Celler för intern kontroll (RÖTT) (μL) 1 x PBS (μL) Total volym (μL) Volym tillsatt till prov (μL)					
18	3 582	3 600	20		

10.3.2 Intern kontroll på MICROLAB STARlet IVD

Späd *cellerna för intern kontroll* (**RÖTT**) 1 till 20 i 1 x PBS (**Tabell 6**). Justera volymen efter behov med hjälp av samma spädningsfaktor (se handbok för extraktionssats för minsta volym för nödvändigt antal prover). De spädda cellerna för intern kontroll laddas i ett 2 mlrör och placeras i reagensstället med 10 µl automatiskt tillsatt till varje prov.

Obs! Förvara INTE spädda celler för intern kontroll.

Tabell 6. Spädning av celler för intern kontroll för MICROLAB STARlet IVD (1 till 20-spädning)					
Celler för intern kontroll (RÖTT) (μL) 1 x PBS (μL) Total volym (μL) Volym tillsatt till prov (μ					
50	950	1 000	10		

10.3.3 Intern kontroll på QIAsymphony® SP

Späd *cellerna för intern kontroll* (**RÖTT**) 1 till 50 i 1 x PBS (**Tabell 7**). Justera volymen efter behov med hjälp av samma spädningsfaktor enligt antalet prover som krävs.

Obs! Förvara INTE spädda celler för intern kontroll.

Tabell 7. Spädning av celler för intern kontroll för QIAsymphony [®] SP (1 till 50-spädning)					
Celler för intern kontroll (RÖTT) (µL) 1 x PBS (µL) Total volym (µL)					
40	1 950	2 000			

De spädda *cellerna för intern kontroll* används sedan för att bereda en blandning av intern kontroll-bärar-RNA-buffert AVE enligt **Tabell 8** nedan. Justera volymen efter behov med hjälp av samma spädningsfaktor för antalet prover som krävs (se handbok för extraktionssats för minsta volym för nödvändigt antal prover). Blandningen av intern kontroll-bärar-RNA-buffert AVE ska beredas omedelbart före start av körning.

Blandningen av intern kontroll-bärar-RNA-buffert AVE tillsätts till ett rör som placeras i en rörhållare och laddas i provlådans fack A i QIAsymphony[®] SP. 120 µL (standard) av blandningen tillsätts till varje prov.

Tabell 8. Beredning av blandningen av intern kontroll-bärar-RNA-buffert AVE för QIAsymphony SP						
Rörtyp	Antal prover	Volym av spädda celler för intern kontroll (μL)	Stambärar-RNA (µL)	Buffert AVE (µL)	Total volym (µL)	
-	1	10	3	107	120	
2 mL	1 + kastad volym^	40	12	428	480	
14 mL	1 + kastad volym [^]	60	18	642	720	

^ 2 mL-rör kräver tre ytterligare prover (360 μL) för att svara för kastad volym

#14 mL-rör kräver fem ytterligare prover (600 μL) för att svara för kastad volym

10.3.4 Intern kontroll på easyMAG®

Späd *cellerna för intern kontroll* (**RÖTT**) 1 till 200 i 1 x PBS (**Tabell 9**). Justera volymen efter behov med hjälp av samma spädningsfaktor. Bered en "förblandning" av spädda celler för intern kontroll och NucliSENS[®] easyMAG[®] Magnetic Silica för det antal prover som krävs (**Tabell 10**). 100 µl förblandad kiseldioxid krävs per prov.





Obs! Förvara INTE spädda celler för intern kontroll.

Tabell 9. Spädning av celler för intern kontroll för NucliSENS® easyMAG® (1 till 200-spädning)							
Celler för intern kontroll (RÖTT) (μL) 1 x PBS (μL) Total volym (μL) Spädningsfaktor							
10	1 990	2 000	200				

Tabell 10. Förblandning av NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica och spädda celler för intern kontroll							
Antal prover	Volym av spädda celler för intern kontroll (μL) Volym av magnetisk kiseldioxid (μL) Volym tillsatt till prov (μL)						
1	50	50	100				

"On-board"- eller "off-board"-arbetsflöde kommer att användas beroende på provtypen. "Off-board"-arbetsflöde används för optimalt nukleinsyrautbyte av urinprover. Se användarhandboken för NucliSENS[®] easyMAG[®] för mer information.

"On-board"-arbetsflöde (prover tagna med provtagningspinne)

Överför prover till provkärlet.

Ladda provkärlet på easyMAG.

Programmera följande extraktionsbegäran:

Protokoll: Generic 2.0.1 (för programvaruversion 2.0)

Matris: Annan

Volym (mL): 0,200

Eluat (µL): 100 µL

Typ: Primär

Efter "on-board"-lysering tillsätts 100 µl av förblandad kiseldioxid till varje prov.

Fortsätt extraktionsprocessen.

"Off-board"-arbetsflöde (urin)

Blanda röret med NucliSENS Lysis Buffer en kort stund och tillsätt 1 000 µL urin. Vortexblanda röret.

Låt blandningen stå i rumstemperatur i 10 minuter.

Efter lysering ska lysaten överföras till provkärlet och laddas på easyMAG.

Tillsätt 100 µL av förblandad kiseldioxid till varje prov.

Programmera följande extraktionsbegäran:

Protokoll: Generic 2.0.1 (för programvaruversion 2.0)

Matris: Annan

Volym (mL): 1,000

Eluat (µL): 100 µL

Typ: Lyserad

Fortsätt extraktionsprocessen.

10.4 Förberedelse av realtids-PCR

Obs! Tina reagenserna helt före användning och blanda noga genom kort vortexblandning

Se Tabell 1 - Tabell 3 för beskrivning av satsinnehåll.





10.4.1 Beredning av masterblandning

Bered masterblandningen enligt beskrivning i Tabell 11.

För en 20 µL-reaktionsvolym krävs 15 µL masterblandning och 5 µl prov. Pipettera masterblandningen på PCR-plattan och tillsätt sedan extraherat prov till reaktionen.

En kontroll utan mall (NTC) ska ingå i varje körning. För NTC-reaktionen tillsätts *nukleasfritt vatten* (**NEUTRALT**) i stället för prov. Förslut plattan, centrifugera och överför till termocykler.

Tabell 11. Masterblandning							
Reagens	Koncentration	Volym per 20 µL reaktion (µL)					
Nukleasfritt vatten (NEUTRALT)	Ej tillämpligt	3,0					
Plex Mastermix (BLÅTT)	2 x	10,0					
MG+23S Mix (BRUNT)	20 x	1,0					
Kontrollblandning [#] (VITT)	20 x	1,0					
Total volym (µl)	15,0						
Tillsätt 5 μL prov för en slutlig volym på 20 μL							

*Kontrollblandningen som ingår i varje sats är specifik för PCR-instrumentet som används; se Tabell 1 – Tabell 3 för korrekt kontrollblandning att använda.

10.4.2 <u>Hållbarhet för masterblandning</u>

Masterblandningen kan beredas i bulkformat och förvaras vid -20 °C i upp till 4 veckor eller förvaras vid 4 °C i upp till 1 vecka.

10.5 Förberedelse av PCR med extraherade nukleinsyror (reflexarbetsflöde)

Nukleinsyraextrakt som erhållits utan tillsättningen av celler för intern kontroll (**RÖTT**) till prover kan testas med användning av satsen *ResistancePlus*[®] MG.

Detta förfarande ska endast följas för extrakt som

har testats tidigare på en annan analysplattform enligt tillverkarens bruksanvisning och då det tidigare genomförda testet genererade ett giltigt resultat.

Masterblandning ska beredas enligt **avsnitt 10.4.1.** När det gäller reflextestning finns inte den interna kontrollen i provextraktet. Kontrollblandningen måste dock inkluderas enligt beskrivningen i avsnitt **10.4.1**.

Se Tabell 1 – Tabell 3 för beskrivning av satsinnehåll.

Bered reaktionsblandningen enligt beskrivning i **Tabell 11**. För en 20 µl-reaktionsvolym krävs 15 µL masterblandning och 5 µL prov. Pipettera masterblandningen på PCR-plattan och tillsätt sedan extraherat prov till reaktionen.

En kontroll utan mall (NTC) ska ingå i varje körning. För NTC-reaktionen tillsätts *nukleasfritt vatten* (**NEUTRALT**) i stället för prov. Förslut plattan, centrifugera och överför till termocykler.





11 Programmering och analys

Detaljer för programmering och analys beskrivs i avsnitt 19 – avsnitt 23.

Satsen ResistancePlus® MG har tre kanaler för detektion av M. genitalium, 23S rRNA-mutation och intern kontroll (Tabell 12).

Programvaran *ResistancePlus®* MG är begränsad till analys av resultat som motsvarar nukleinsyraextrakt, som erhållits utan tillsats av celler för intern kontroll (RÖTT) till prover.

För nukleinsyraextrakt som erhållits utan tillsats av celler för intern kontroll (**RÖTT**) till prover ska programvaran REFLEX **Resistance**Plus[®] MG har två kanaler för detektion av *M. genitalium* och 23S rRNA-mutation (**Tabell 13**).

Detta förfarande ska endast följas för extrakt som

har testats tidigare på en annan analysplattform enligt tillverkarens bruksanvisning och då det tidigare genomförda testet genererade ett giltigt resultat.

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

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





12 Tolkning av resultat

Datatolkning kräver analysprogramvaran **Resistance**Plus[®] MG. Medan **Plex**Prime[®]-primrar erbjuder större specificitet än andra allelspecifika primrar kan viss icke-specifik amplifiering från 23S rRNA-mutantanalysen påvisas i prover som innehåller höga koncentrationer av *M. genitalium* vildtyp 23S rRNA. Analysprogramvaran **Resistance**Plus[®] MG automatiserar datatolkningen av amplifieringsresultaten och strömlinjeformar arbetsflödet. Anvisningar om användning av analysprogramvaran beskrivs i **avsnitt 24**.

Se **Tabell 14** för lämplig analysprogramvara för varje realtids-PCR-instrument. Analysprogramvaran kan tillhandahållas på begäran. Kontakta <u>tech@speedx.com.au</u> för mer information.

Tabell 14. Analysprogramvaran ResistancePlus [®] MG					
Kat.nr	Analysprogramvara*	Realtids-PCR-instrument			
99003	Resistance Plus [®] MG (LC480)	LC480 II			
99018	<i>ResistancePlus</i> [®] MG (z 480)	z 480			
99002	Resistance Plus [®] MG (7500)	7500 Fast och 7500 Fast Dx			
99008	<i>ResistancePlus</i> [®] MG (CFX)	CFX96 Dx och CFX96 Touch			
99023	REFLEX ResistancePlus® MG (LC480)	LC480 II			
99024	REFLEX ResistancePlus® MG (z480)	z 480			
99026	REFLEX ResistancePlus® MG (7500)	7500 Fast och 7500 Fast Dx			
99025	REFLEX ResistancePlus® MG (CFX)	CFX96 Dx och CFX96 Touch			

* Se webbplatsen <u>https://plexpcr.com/products/sexually-transmitted-infections/resistanceplus-mg/#resources</u> för att säkerställa att du använder den mest aktuella versionen av analysprogramvara.





13 Begränsningar

- Analysen *ResistancePlus®* MG målsöker *MgPa*-genen för *M. genitalium* och mutationer vid positionerna 2058 och 2059 i 23S rRNA-genen (A2058G, A2059G, A2058T och A2058C, *E. coli*-numrering) som är förknippade med resistens mot azitromycin (makrolidbaserat antibiotikum).
- Analysen **Resistance**Plus[®] MG har påvisats korsreagera med *M. genitalium*, 23S rRNA A2059C-mutantsekvenser.
- Studier av klinisk prestanda för *ResistancePlus*[®] MG, som sammanfattas i avsnitt 16.1, inkluderar testning med urinprover från män och kvinnor samt vaginalprover. Ytterligare provtyper, t.ex. rektala, cervikala, endocervikala, uretrala, penila, penil meatala och faryngeala prover, har också testats. Dock finns begränsade data för närvarande som stödjer användningen av dessa provtyper.
- Analysen **Resistance**Plus[®] MG ska endast utföras av personal som är utbildad i förfarandet och ska utföras enligt dessa bruksanvisningar.
- Tillförlitliga resultat beror på lämplig provtagning, transport, förvaring och bearbetning. Det kan leda till inkorrekta resultat om lämpliga förfaranden inte följs i något av dessa steg.
- Analysen ResistancePlus® MG är en kvalitativ analys och ger inga kvantitativa värden eller information om organismbelastning.
- Resultat från testet måste korreleras med den kliniska historiken, epidemiologiska data, laboratoriedata och andra data som finns tillgängliga för klinikern.
- Förekomsten av M. genitalium och makrolidresistens kommer att påverka positiva och negativa förväntade värden för analysen.
- Detektion av antibiotikaresistensmarkörer korrelerar kanske inte med fenotypiskt genuttryck.
- Terapeutisk svikt eller framgång kan inte bestämmas baserat på analysresultaten eftersom nukleinsyra kan kvarstå efter lämplig antimikrobiell behandling.
- Negativa resultat utesluter inte risken för infektion på grund av olämplig provtagning, tekniskt fel, förekomst av hämmare, sammanblandning av prover eller lågt antal organismer i det kliniska provet.
- Negativa resultat för resistensmarkörer anger inte känslighet för detekterade mikroorganismer eftersom resistensmarkörer som inte mäts av analysen eller andra potentiella mekanismer av antibiotikaresistens kan förekomma.
- Falskt positiva resultat kan inträffa på grund av korskontaminering av målorganismer, deras nukleinsyror eller den amplifierade produkten.

14 Kvalitetskontroll

Satsen ResistancePlus® MG omfattar en intern kontroll för att övervaka extraktionseffektivitet och qPCR-hämning (avsnitt 10.3).

När reflextestning utförs har inte celler för intern kontroll i satsen **Resistance**Plus[®] MG lagts till i extraktionsprocessen. Reflextestning kan endast utföras på prover som tidigare befunnits giltiga med ett annat system, vilket säkerställer att extraktionseffekt och qPCR-inhibition har övervakats.

Satsen **Resistance**Plus[®] MG Positive Control (kat.nr 95001) rekommenderas som positivt kontrollmaterial för nukleinsyraamplifiering. Se **avsnitt 15** för bruksanvisning för **Resistance**Plus[®] MG Positive Ckontrols. Ett känt negativt prov rekommenderas att användas som en negativ kontroll.





15 Anvisningar för *ResistancePlus*[®] MG Positive Control

Satsen **Resistance**Plus[®] MG Positive Control innehåller positivt kontrollmaterial för *M. genitalium* 23S rRNA-mutanter och en *M. genitalium* vildtyp 23S rRNA (**Tabell 15**).

Tabell 15. Innehåll i satsen <i>ResistancePlus[®]</i> MG Positive Control (kat.nr 95001)							
Lockfärg	Innehåll	Mängd (10 reaktioner)					
Neutral	MG, 23S rRNA-vildtyp	Mall för positiv kontroll för detektion av <i>M. genitalium</i> , 23S rRNA-vildtyp	1 x 50 µL				
Grönt	MG, 23S rRNA A2058G	Mall för positiv kontroll för detektion av <i>M. genitalium</i> , 23S rRNA A2058G-mutation	1 x 50 µL				
Rött	MG, 23S rRNA A2059G	Mall för positiv kontroll för detektion av <i>M. genitalium</i> , 23S rRNA A2059G-mutation	1 x 50 µL				
Blått	MG, 23S rRNA A2058T	Mall för positiv kontroll för detektion av <i>M. genitalium</i> , 23S rRNA A2058T-mutation	1 x 50 µL				
Gult	MG, 23S rRNA A2058C	Mall för positiv kontroll för detektion av <i>M. genitalium</i> , 23S rRNA A2058C-mutation	1 x 50 µL				

15.1 Bruksanvisning

Bered qPCR-reaktioner enligt beskrivning i avsnitt 10.4 med användning av positiv kontroll som prov.

Datatolkning kräver analysprogramvaran ResistancePlus® MG. Se avsnitt 24.11 for exempel på resultat.





16 Prestandaegenskaper

16.1 Klinisk prestanda

16.1.1 Klinisk studie 1

En prospektiv-retrospektiv studie utfördes vid Royal Women's Hospital (RWH), Melbourne, Australien. Prover samlades in från och med maj 2016 till och med juni 2016, samt baserat på kliniska laboratorieresultat. 144 prover valdes för inklusion i studien. De 144 proverna bestod av 84 urinprover från män, 33 urinprover från kvinnor, 14 vaginalprover och 13 höga vaginalprover. För att bestämma prestanda för satsen *ResistancePlus®* MG jämfördes detektion av *M. genitalium* med kliniska laboratorieresultat från en väletablerad 16S rRNA qPCR som används för rutinmässig diagnostik vid RWH^Z och detektion av 23S rRNA-mutant jämfördes med Sangersekvensering⁸. Satsen *ResistancePlus®* MG utfördes på LC480 II efter provextraktion på MagNA Pure 96-instrumentet med användning av MagNA Pure 96 DNA och Viral NA Small Volume Kit med användning av Universal Pathogen 200-protokoll. För detektion av *M. genitalium* användes en sammansatt referens för avvikande prover med användning av en tredje qPCR-reaktion inriktad på MgPa-genen⁹. För detektion av 23S rRNA-mutant togs Sanger-sekvensering som det sanna resultatet. Lösta resultat samt sensitivitet och specificitet för satsen *ResistancePlus®* MG för detektion av *M. genitalium* och detektion av 23S rRNA-mutant visas i **Tabell 16**. Två prover uteslöts eftersom resultatet för den interna kontrollen var ogiltigt (ett urinprov från kvinna och ett urinprov från man). Analys av detektion av 23S rRNA-mutation omfattar endast prover där mutantstatusen kunde bestämmas. Analys av resultat i enlighet med provtyp visas i **Tabell 17**. Analys av 23S rRNA-mutation visas i **Tabell 18**.

Tabell 16. Klinisk utvärdering av satsen <i>ResistancePlus®</i> MG (klinisk studie 1)							
		Detektion av <i>M. genitalium</i> 16S rRNA qPCR				Detektion a mu Sekver	v 23S rRNA- tant nsering
Positivt Negativt					Mutant	Vildtyp	
	Positivt	83	0		Mutant detekterad	52	2
MG	Negativt	1	58^	Mutant inte detekterad	2	21	
	•	1					
	Sensitivitet	itivitet 98,8 % (95 % KI 93,5– 100,0 %)			Sensitivitet	96,3 % (95 % ł	KI 87,3–99,6 %)
	Specificitet	100,0 % (95 % KI 93,8– 100,0 %)			Specificitet	91,3 % (95 % ł	KI 72,0–98,9 %)

95 % KI – 95 % konfidensintervall, mutant – 23S rRNA-mutation vid positionerna A2058G, A2059G, A2058T och A2058C (*E. coli-* numrering), vildtyp – frånvaro av mutation vid dessa positioner.

^ Satsen *ResistancePlus®* MG detekterade ett sant *M. genitalium*-negativt resultat med användning av sammansatt referens, tabellen representerar lösta resultat.





Tabell 17. Analys av kliniskt resultat i enlighet med prov^ (klinisk studie 1)							
Prov	Förväntade <i>M. genitalium-</i> negativa	Förväntade <i>M. genitalium</i> 23S rRNA-mutant					
Urinprov från man	28/28	8/10 ¹	41/42 ¹				
Urinprov från kvinna	12/13	11/11	4/6 ²				
Vaginal provtagningspinne	8/8	1/1	2/2 ³				
Hög vaginal provtagningspinne	9/9	1/1	4/4 ⁴				

Mutant – 23S rRNA-mutation vid positionerna A2058G, A2059G, A2058T och A2058C (*E. coli*-numrering), vildtyp – frånvaro av mutation vid dessa positioner

[^] 2 urinprover från kvinna, 3 urinprover från man, 1 vaginal provtagningspinne exkluderades, eftersom sekvensering misslyckades och mutantstatus inte kunde fastställas

¹ Urinprov från man: 2 *M. genitalium av vildtyp* felaktigt identifierade som *M. genitalium*-mutant detekterad, 18 A2058G, 20 A2059G, 3 A2058T korrekt detekterade; 1 A2058G felaktigt identifierad som *M. genitalium* ej detekterad

² Urinprov från kvinna: 1 A2058G, 3 A2059G korrekt detekterade; 2 A2059G felaktigt identifierade som *M. genitalium* detekterad, mutant ej detekterad

³ Vaginal provtagningspinne: 2 A2059G korrekt detekterad

⁴ Hög vaginal provtagningspinne: 3 A2058G, 1 A2059G korrekt detekterade

Tabell 18. <i>M. genitalium</i> 23S rRNA-mutationsanalys (Klinisk studie 1)				
Referensresultat^	ResistancePlus [®] MG-resultat			
Vildtyp	21/33 ¹			
A2058G	22/23 ²			
A2059G	26/28 ³			
A2058T	3/3			

^ Endast för M. genitalium-positiva prover

¹ Vildtyp: 2 urinprover från man, felaktigt identifierade som *M. genitalium*-mutant, detekterade

² A2058G: 1 urinprov från man, felaktigt identifierat som *M. genitalium*-mutant, ej detekterad

³ A2059G: 2 urinprover från kvinna felaktigt identifierade som *M. genitalium-*mutant, ej detekterade

16.1.2 Klinisk studie 2

En underuppsättning av de extraherade proverna från Studie 1 kördes på ABI 7500 Fast. Resultaten jämfördes med de kliniska resultaten från 16S rRNA qPCR (Twin 2011) och Sanger-sekvensering (Twin 2012). Avvikande prover för *M. genitalium*-detektion, testades om med 16S rRNA qPCR (Twin 2011) på grund av misstänkt provdegradering. Lösta resultat samt sensitivitet och specificitet för satsen *ResistancePlus®* MG₍₅₅₀₎, för detektion av *M. genitalium* och detektion av 23S rRNA-mutant, visas i **Tabell 19**. Analys av detektion av 23S rRNA-mutation omfattar endast prover där mutantstatusen kunde bestämmas.





Tabell 19. Klinisk utvärdering av satsen <i>ResistancePlus[®]</i> MG ₍₅₅₀₎ (klinisk studie 2)							
Detektion av <i>M. genitalium</i> 16S rRNA qPCR				Detektion a mu Sekver	v 23S rRNA- tant nsering		
Positivt Nega		Negativt			Mutant	Vildtyp	
	Positivt	79	0^		Mutant detekterad	47	1
ResistancePlus® MG	Negativt	2	43#		Mutant inte detekterad	4	19
Sensitivitet 97,5 % (95 % KI 91,4–99,7 %)			Sensitivitet	92,2 % (95 % ł	(81,1–97,8 %)		
	Specificitet	100,0 % (95 % KI 91,8– 100,0 %)			Specificitet	95,0 % (95 % KI 75,1–99,9 %)	

95 % KI – 95 % konfidensintervall, mutant – 23S rRNA-mutation vid positionerna A2058G, A2059G, A2058T och A2058C (*E. coli-* numrering), vildtyp – frånvaro av mutation vid dessa positioner.

^ Satsen *ResistancePlus®* MG₍₅₅₀₎ detekterade ett sant *M. genitalium*-positivt resultat med användning av referenstest, tabellen anger lösta resultat.

[#] Satsen **Resistance**Plus[®] MG₍₅₅₀₎ detekterade 10 sanna *M. genitalium*-negativa resultat med användning av referenstest, tabellen anger lösta resultat.

16.1.3 Klinisk studie 3

En retrospektiv studie utfördes vid Canterbury Health Laboratories (CHL), Christchurch, Nya Zeeland på karakteriserade och arkiverade prover från 2010–2016 insamlade med multi-Collect Specimen Collection Kit (Abbott). De 137 proverna bestod av 110 urinprover från män, 11 urinprover från kvinnor, 15 vaginalprover, 1 uretral-/vaginalprov och 1 vaginal-/cervikalprov. För att bestämma prestanda för satsen **Resistance**Plus[®] MG jämfördes detektion av *M. genitalium* med kliniska laboratorieresultat från en väletablerad MgPa qPCR som används för rutinmässig diagnostik vid CHL (Jensen 2004) och detektion av 23S rRNA-mutant jämfördes med Sanger-sekvensering (Jensen 2008). Satsen **Resistance**Plus[®] MG utfördes på LC480 II efter provextraktion på MagNA Pure 96-instrumentet med användning av MagNA Pure 96 DNA och Viral NA Small Volume Kit med användning av Universal Pathogen 200-protokoll. För detektion av 23S rRNA-mutant resultatet. Sensitivitet och specificitet för satsen **Resistance**Plus[®] MG för detektion av 23S rRNA-mutant visas i **Tabell 20**. Ett prov uteslöts eftersom resultatet för intern kontroll var ogiltigt. Analys av detektion av 23S rRNA-mutation omfattar endast prover där mutantstatusen kunde bestämmas. Analys av resultat i enlighet med provtyp visas i **Tabell 21**. Analys av 23S rRNA-mutation visas i **Tabell 22**





Tabell 20. Klinisk utvärdering av satsen <i>ResistancePlus®</i> MG (klinisk studie 3)							
		Detektion av <i>M. genitalium</i> 16S rRNA qPCR				Detektion a mu Sekver	v 23S rRNA- tant nsering
Positi		Positivt	Negativt			Mutant	Vildtyp
	Positivt	76	0		Mutant detekterad	52	1
MG	Negativt	3	57^		Mutant inte detekterad	5	19
	•		•			1	•
	Sensitivitet	96,2 % (95 % KI 89,3–99,2 %)			Sensitivitet	91,2 % (95 % ł	KI 80,7–97,1 %)
	Specificitet	100,0 % (95 % KI 93,7– 100,0 %)			Specificitet	95,0 % (95 % KI 75,1–99,9 %)	

95 % KI – 95 % konfidensintervall, mutant – 23S rRNA-mutation vid positionerna A2058G, A2059G, A2058T och A2058C (*E. coli-* numrering), vildtyp – frånvaro av mutation vid dessa positioner.

^ Tabell representerar lösta resultat.

Tabell 21. Analys av kliniskt resultat i enlighet med prov (klinisk studie 3)								
Prov	Förväntade <i>M. genitalium-</i> negativa	Förväntade <i>M. genitalium</i> - negativa Förväntade <i>M. genitalium</i> <i>av</i> vildtyp						
Urinprov från man	45/45	17/18 ¹	38/45 ¹					
Urinprov från kvinna	4/4	1/1	6/6 ²					
Vaginal provtagningspinne	6/6	1/1	8/8 ³					
Uretral/vaginal provtagningspinne	1/1	0/0	0/0					
Vaginal/cervikal provtagningspinne	1/1	0/0	0/0					

Mutant – 23S rRNA-mutation vid positionerna A2058G, A2059G, A2058T och A2058C (*E. coli*-numrering), vildtyp – frånvaro av mutation vid dessa positioner.

¹ Urinprov från man: 1 *M. genitalium-vildtyp felaktigt identifierad som M. genitalium-*mutant detekterad, 4 A2058G, 32 A2059G, 1 A2058T, 1 A2058C korrekt detekterad; 1 A2058G och 1 A2059G felaktigt identifierade som *M. genitalium* ej detekterad, 3 A2058G och 2 A2059G felaktigt identifierade som *M. genitalium-*mutant ej detekterad

² Urinprov från kvinna: 2 A2058G, 4 A2059G korrekt detekterade

³ Vaginal provtagningspinne: 1 A2058G, 7 A2059G korrekt detekterade





Tabell 22. <i>M. genitalium</i> 23S rRNA-mutationsanalys (Klinisk studie 3)						
Referensresultat^	ResistancePlus [®] MG-resultat					
Vildtyp	19/20 ¹					
A2058G	7/10 ²					
A2059G	43/45 ³					
A2058T	1/1					
A2058C	1/1					

^ Endast för *M. genitalium-*positiva prover

¹ Vildtyp: 1 urinprov från man felaktigt identifierat som *M. genitalium*-mutant detekterad

² A2058G: 3 urinprover från man felaktigt identifierade som *M. genitalium-*mutant ej detekterad

 3 A2059G: 2 urinprover från man felaktigt identifierade som $\it{M.~genitalium}$ -mutant ej detekterad

16.1.4 Klinisk studie 4

En retrospektiv klinisk studie utfördes vid Vall d'Hebron University Hospital (HUVH), Barcelona, Spanien, för att utvärdera prestanda för satsen **Resistance**Plus[®] MG₍₆₇₅₎ för detektion av *M. genitalium*- och azitromycin-resistensassocierade mutationer i retrospektiva prover, insamlade mellan december 2017 och april 2018. Prover samlades in med användning av DeltaSwab ViCUM[®] (Deltalab, Spanien) för provtagningspinnar eller Vacumed[®] Urine (FL medical, Italien) för urin. 86 prover bestod av 46 urinprover och 40 vaginala provtagningspinnar. Prover extraherades med STARIet IVD (Hamilton) och kördes på CFX96 Dx (Bio-Rad)-instrumentet. För att utvärdera prestanda jämfördes *M. genitalium*-detektion med Allplex[™] STI Essential (Seegene) samt med satsen **Resistance**Plus[®] MG₍₆₇₅₎ för *M. genitalium*-detektion, jämfört med Allplex[™] STI Essential (Seegene), visas i **Tabell 23**. Sensitivitet och specificitet för **Resistance**Plus[®] MG₍₆₇₅₎ jämfört med **Resistance**Plus[®] MG är såsom visas i **Tabell 24**. Analys av resultat i enlighet med provtyp visas i **Tabell 25**.

Tabell 23. Jämförelse av satsen <i>ResistancePlus[®]</i> MG ₍₆₇₅₎ med Allplex™ STI Essential (klinisk studie 4)						
		Detektion av <i>M. genitalium</i> Allplex™ STI Essential				
		Positivt	Negativt			
_	Positivt	40	0			
ResistancePlus [®] MG ₍₆₇₅₎	Negativt	0	46			
	Sensitivitet	100,0 % (95 % KI 91,2–100,0 %)				
	Specificitet	100,0 % (95 % KI 92,3–100,0 %)				





Tabell 24. Klinisk utvärdering av satsen <i>ResistancePlus[®]</i> MG ₍₆₇₅₎ (klinisk studie 4)							
		Detektion av <i>M. genitalium</i> <i>ResistancePlus®</i> MG (LC480 II)				Detektion a mut <i>Resistanc</i> (LC4	v 23S rRNA- ant [#] e <i>Plus®</i> MG 80 II)
		Positivt	Negativt			Mutant detekterad	Mutant inte detekterad
ResistancePlus [®] MG ₍₆₇₅₎	Positivt	40	0		Mutant detekterad	20	0
	Negativt	0	46		Mutant inte detekterad	1	20
	•						
	Sensitivitet	100,0 % (95 % Kl 91,2– 100,0 %)			Sensitivitet	100,0 % (95 100,	5 % KI 83,2– 0 %)
	Specificitet	100,0 % (95 % KI 92,3– 100,0 %)			Specificitet	100,0 % (95 100,	5 % KI 83,2– 0 %)

95 % KI – 95 % konfidensintervall, mutant – 23S rRNA-mutation vid positionerna A2058G, A2059G, A2058T och A2058C (*E. coli-* numrering), vildtyp – frånvaro av mutation vid dessa positioner.

1 prov exkluderades från analys eftersom det sekvenserades som blandad vildtyp och mutant

Tabell 25. Analys av kliniskt resultat i enlighet med prov (klinisk studie 4)							
Prov	Förväntade <i>M. genitalium-</i> negativa	Förväntade M. genitalium-negativa Förväntade M. genitalium 23S rRNA vildtyp Förväntade rl					
Urinprov från man	26/26	5/5	15/15				
Vaginal provtagningspinne för kvinnor	20/20	15/15	5/5				





16.1.5 Klinisk studie 5

En retrospektiv klinisk studie utfördes vid Royal Women's Hospital (RWH), Melbourne, Australien med användning av insamlade urinprover och vaginalprover med Aptima[®] från juni 2017–november 2017. Matchade patientprover samlades in som okonserverad urin (rutinmässigt prov) eller med Aptima[®] Urine Specimen Collection kit (Hologic) eller som torrt prov taget med provtagningspinne (rutinmässigt prov) eller med Aptima[®] Unisex Swab Specimen Collection kit (Hologic). 147 prover bestod av 122 urinprover och 25 vaginalprover. För att bestämma prestanda för insamlade prover med Aptima[®] med satsen *ResistancePlus[®]* MG jämfördes detektion av *M. genitalium* och detektion av 23S rRNA-mutant med de kliniska diagnostiska resultaten erhållna från satsen *ResistancePlus[®]* MG (SpeeDx) med användning av det rutinmässiga provet. Testning av insamlade prover med Aptima[®] utfördes på LC480 II efter provextraktion på MagNA Pure 96-instrumentet med användning av MagNA Pure 96 DNA och Viral NA Small Volume Kit med användning av Viral NA Universal LV 1000-protokoll. Kliniska diagnostiska resultat från RWH, erhållna från ett matchat diagnostiskt prov testat med satsen *ResistancePlus[®]* MG (SpeeDx), togs som det sanna resultatet för *M. genitalium*. För detektion av 23S rRNA-mutant jämfördes resultatet med det diagnostiska resultatet och Sanger-sekvensering.

Sensitivitet och specificitet för satsen **Resistance**Plus[®] MG för detektion av *M. genitalium* och detektion av 23S rRNA-mutant visas i **Tabell 26**. Analys av detektion av 23S rRNA-mutation omfattar endast prover där mutantstatusen kunde bestämmas. Analys av resultat i enlighet med provtyp visas i **Tabell 27**.

Tabell 26. Klinisk utvärdering av satsen <i>ResistancePlus[®]</i> MG (klinisk studie 5)								
		Detektion av <i>M. genitalium</i> <i>ResistancePlus®</i> MG (rutinmässigt prov)				Detektion a mu <i>Resistanc</i> (rutinmäs	v 23S rRNA- tant e <i>Plus[®]</i> MG sigt prov)	
		Positivt	Negativt			Mutant	Vildtyp	
ResistancePlus®	Positivt	77	3		Mutant detekterad	51	0	
MG (med 1 ml Aptima-prov)	Negativt	3	64		Mutant inte detekterad	2	24	
	Sensitivitet	96,3 % (95 % KI 89,4–99,2 %)			Sensitivitet	96,2 % (95 % KI 87,0–99,5 %)		
	Specificitet	95,5 % (95 % KI 87,5–99,1 %)			Specificitet	100,0 % (95 % KI 86,0– 100,0 %)		

Tabell 27. Analys av kliniskt resultat i enlighet med provtyp (klinisk studie 5)							
Prov	Förväntade <i>M. genitalium-</i> negativa	Förväntade <i>M. genitalium</i> 23S rRNA-mutant					
Urin	50/52 ¹	21/22 ¹	45/48 ¹				
Vaginal provtagningspinne	14/15 ²	3/4 ²	6/6				

Mutant – 23S rRNA-mutation vid positionerna A2058G, A2059G, A2058T och A2058C (*E. coli*-numrering), vildtyp – frånvaro av mutation vid dessa positioner.

¹ Urin: 2 *M. genitalium*-negativa felaktigt identifierade som *M. genitalium av v*ildtyp respektive -mutant; 1 *M. genitalium av v*ildtyp felaktigt identifierad som *M. genitalium*-negativ; 2 *M. genitalium*-mutanter felaktigt identifierade som *M. genitalium av v*ildtyp, 1 *M. genitalium*-mutant felaktigt identifierad som *M. genitalium*-negativ

² Vaginal provtagningspinne 1 *M. genitalium*-negativt felaktigt identifierat som *M. genitalium av vildtyp*; 1 *M. genitalium av vildtyp felaktigt identifierad som M. genitalium-negativ*





16.1.6 Klinisk studie 6

En retrospektiv studie utfördes vid University of Queensland Centre for Clinical Research (UQCCR), Australien, med användning av cobas[®] x480-extrakt from urin- och pinnprover, som samlades in från februari 2017 till februari 2019. Prover samlades in som okonserverade urinprover med cobas[®] PCR media insamlingssats (Roche) och extraherades på cobas[®] x480 (cobas[®] 4800, Roche)instrument med användning av "Full Workflow"- och "CT/NG"-protokollet, utan tillägg av SpeeDx celler för intern kontroll. De 109 extrakten bestod av 10 vaginalprover, 5 höga vaginalprover, samt 84 urinprover från män och 10 urinprover från kvinnor.

För att bestämma prestanda för cobas[®]-extrakt med satsen **Resistance**Plus[®] MG₍₅₅₀₎ jämfördes detektion av *M. genitalium* med det rutinmässiga diagnostiska resultatet (MgPa PCR-analys (Trembizki *et al.*, 2017)) och detektion av 23S rRNA-mutant jämfördes med Sanger-sekvensering. Satsen **Resistance**Plus[®] MG₍₅₅₀₎ utfördes på ABI 7500 Fast Dx. Sensitivitet och specificitet för satsen **Resistance**Plus[®] MG₍₅₅₀₎ för detektion av *M. genitalium* och detektion av 23S rRNA-mutant, visas i **Tabell 28**. Analys av detektion av 23S rRNA-mutation omfattar endast prover där mutantstatusen kunde bestämmas. Analys av resultat i enlighet med provtyp visas i **Tabell 29**. Analys av 23S rRNA-mutation visas i **Tabell 30**.

Tabell 28. Klinisk utvärdering av satsen <i>ResistancePlus[®]</i> MG ₍₅₅₀₎ (klinisk studie 6)								
		Detektion av <i>M. genitalium</i> MgPa qPCR					Detektion a mu Sanger-se	v 23S rRNA- tant kvensering
		Positivt	Negativt				Mutant	Vildtyp
	Positivt	54	0			Mutant detekterad	37^	0
ResistancePlus® MG ₍₅₅₀₎	Negativt	1	51			Mutant inte detekterad	0	17
			•					•
	Sensitivitet	98,2 % (95 % KI 90,3– 100,0 %)				Sensitivitet	100,0 % (95 100,	5 % KI 90,5– 0 %)
	Specificitet	100,0 % (95 % KI 93,0– 100,0 %)				Specificitet	100,0 % (95 % KI 80,5– 100,0 %)	

^ 1 vaginalprov gav ett blandat resultat för vildtyp/A2059G-sekvensering, som korrekt identifierades som mutant med analysen *ResistancePlus®* MG₍₅₅₀₎

Tabell 29. Analys av kliniskt resultat i enlighet med prov (klinisk studie 6) *								
Prov	Förväntade <i>M. genitalium-</i> negativa	Förväntade M. genitalium- negativaFörväntade M. genitalium 23S rRNA av vildtyp						
Urinprov från man	42/42	13/13	26/27 ¹					
Urinprov från kvinna	6/6	1/1	3/3 ²					
Vaginal provtagningspinne	1/1	1/1	7/73^					
Hög vaginal provtagningspinne	2/2	2/2	1/14					

[#] 3 prover exkluderades, eftersom sekvensering misslyckades och sann 23S-status inte kunde bestämmas, inklusive: 2 urinprover och 1 vaginalprov

¹ Urinprov från man 8 A2058G, 3 A2058T och 15 A2059G korrekt identifierade; 1 A2058T identifierades felaktigt som *M. genitalium* ej detekterat

² Urinprov från kvinna: 2 A2058G och 1 A2059G korrekt identifierade

³ Vaginal provtagningspinne: 3 A2058G, 2 A2058T och 1 A2059G korrekt identifierade; ^ 1 vaginalprov identifierades som en blandning av vildtyp/A2059G

⁴ Hög vaginal provtagningspinne: 1 A2059G korrekt identifierat





Tabell 30. <i>M. genitalium</i> 23S rRNA-mutationsanalys (klinisk studie 6)						
Referensresultat^	ResistancePlus [®] MG-resultat					
Vildtyp	17/17					
A2058G	13/13					
A2059G	19/19 ¹					
A2058T	5/5					
A2058C	-					

^ Endast för *M. genitalium-*positiva prover

¹ A2059G: 1 vaginalprov med blandad vildtyp/A2059G identifierades korrekt som *M. genitalium*, 23S-mutation detekterad

16.1.7 Klinisk studie 7

En retrospektiv klinisk studie utfördes vid Microbiological Diagnostic Unit Public Health Unit (MDU), Victoria, Australien med användning av torra prover tagna med provtagningspinne och okonserverade urinprover insamlade från oktober 2018–januari 2019. Proverna bestod av 19 vaginalprover, 2 höga vaginalprover och 44 urinprover.

Satsen **Resistance**Plus[®] MG utfördes på LC480 II efter provextraktion på QIAsymphony SP (QIAGEN)-instrumentet med användning av satsen DSP Virus/Pathogen Mini och Complex200_V6_DSP-protokollet. Resultat jämfördes med rutinmässiga diagnostiska resultat erhållna från satsen **Resistance**Plus[®] MG (SpeeDx) med användning av prover extraherade på MagNA Pure 96-instrumentet (MP96). För avvikande resultat utfördes ett 16S rRNA qPCR (Twin 2011)-test för detektion av *M. genitalium* och Sanger-sekvensering (Twin 2012) utfördes för detektion av 23S rRNA-mutant. Sensitivitet och specificitet för satsen **Resistance**Plus[®] MG för detektion av *M. genitalium* och detektion av 23S rRNA-mutant visas i **Tabell 31**. Analys av detektion av 23S rRNA-mutation omfattar endast prover där mutantstatusen kunde bestämmas. Analys av resultat i enlighet med provtyp visas i **Tabell 32**.

Tabell 31. Klinisk utvärdering av satsen <i>ResistancePlus[®]</i> MG (klinisk studie 7)							
		Detektion av <i>M. genitalium</i> <i>ResistancePlus®</i> MG (MP96)				Detektion a mu ResistancePlu	v 23S rRNA- tant <i>ıs[®]</i> MG (MP96)
		Positivt	Negativt			Mutant	Vildtyp
ResistancePlus [®]	Positivt	36	0		Mutant detekterad	16	1
MG (QIAsymphony SP)	Negativt	1	27		Mutant inte detekterad	1	18
	•						
Sensitivitet		97,3 % (95 % KI 85,8–99,9 %)			Sensitivitet	94,1 % (95 % ł	KI 71,3–99,9 %)
Specificitet		100,0 % (95 % KI 87,2– 100,0 %)			Specificitet	94,7 % (95 % ł	(1 74,0–99,9 %)





Tabell 32. Analys av kliniskt resultat i enlighet med prov (klinisk studie 7) *								
Prov	Förväntade <i>M. genitalium-</i> negativa	Förväntade M. genitalium- negativaFörväntade M. genitalium 23S rRNA av vildtyp						
Urinprov från man	17/17	9/9	12/14 ¹					
Urinprov från kvinna	1/1	1/2 ²	1/1					
Vaginal provtagningspinne	8/8 [#]	7/7	3/3					
Hög vaginal provtagningspinne	1/1	1/1	-					

[#] 1 vaginal provtagningspinne exkluderades, eftersom den producerade ett ogiltigt resultat med satsen **Resistance**Plus[®] MG

¹ Urinprov från man: 1 *M. genitalium* 23S rRNA-mutant identifierades felaktigt som *M. genitalium* ej detekterat; 1 *M. genitalium* 23S rRNA-mutant identifierades felaktigt som *M. genitalium* detekterat, 23S-mutation ej detekterad

² Urinprov från kvinna: 1 felaktigt identifierat som *M. genitalium* detekterat, 23S rRNA-mutation detekterad

16.2 Analytisk prestanda

16.2.1 Reproducerbarhet och repeterbarhet

Reproducerbarhet och repeterbarhet för satsen **Resistance**Plus[®] MG på LC480 II bedömdes med användning av kvantifierad syntetisk mall för *M. genitalium* MgPa- och 23S rRNA-mål (A2058G, A2059G, A2059G, A2058T och A2058C), vid 10 000 och 3x LOD-kopior per reaktion med användning av 6 replikat (om inte annat specificeras). Experiment utfördes på LC480 II.

För att bestämma variabilitet mellan partier testades två partier och kördes på en maskin av en operatör (**Tabell 33**). De två partierna uppvisade bra reproducerbarhet med en variationskoefficient (% CV) mellan 0,35 och 2,37 % för alla mål.

Tabell 33. Variabilitet mellan partier				
	Genomsnittligt Cq	STDEV	%CV	Antal prover
MgPa 10 000 kopior	16,9	0,15	0,89	12/12
MgPa 30 kopior	25,5	0,52	2,05	12/12
A2058G 10 000 kopior	20,4	0,48	2,37	12/12
A2058G 36 kopior	27,8	0,43	1,54	12/12
A2059G 10 000 kopior	18,0	0,06	0,35	12/12
A2059G 30 kopior	25,6	0,50	1,94	12/12
A2058T 10 000 kopior	18,7	0,09	0,46	12/12
A2058T 30 kopior	26,2	0,30	1,14	12/12
A2058C 10 000 kopior	17,7	0,13	0,75	12/12
A2058C 30 kopior	25,4	0,29	1,15	12/12

För att bestämma variabilitet mellan dagar utfördes testning under tre dagar av en operatör på samma maskin (**Tabell 34**). De tre körningarna uppvisade bra reproducerbarhet mellan olika dagar med en variationskoefficient mellan 0,88 och 2,31 % för alla mål.





Tabell 34. Variabilitet mellan dagar				
	Genomsnittligt Cq	STDEV	%CV	Antal prover
MgPa 10 000 kopior	17,0	0,18	1,09	18/18
MgPa 30 kopior	25,6	0,59	2,31	18/18
A2058G 10 000 kopior	20,2	0,37	1,83	18/18
A2058G 36 kopior	27,9	0,51	1,84	18/18
A2059G 10 000 kopior	18,1	0,24	1,34	18/18
A2059G 30 kopior	25,7	0,32	1,23	18/18
A2058T 10 000 kopior	18,7	0,23	1,22	18/18
A2058T 30 kopior	26,3	0,31	1,17	18/18
A2058C 10 000 kopior	17,8	0,16	0,88	18/18
A2058C 30 kopior	25,5	0,31	1,22	18/18

För att bestämma variabilitet mellan körningar jämfördes tre qPCR-körningar under samma dag av samma operatör (**Tabell 35**). De tre körningarna uppvisade bra reproducerbarhet med en variationskoefficient mellan 0,40 och 3,20 % för alla mål.

Tabell 35. Variabilitet mellan körningar				
	Genomsnittligt Cq	STDEV	%CV	Antal prover
MgPa 10 000 kopior	17,0	0,07	0,40	18/18
MgPa 30 kopior	25,7	0,47	1,83	18/18
A2058G 10 000 kopior	19,8	0,63	3,20	18/18
A2058G 36 kopior	27,5	0,51	1,85	18/18
A2059G 10 000 kopior	18,4	0,11	0,61	18/18
A2059G 30 kopior	25,7	0,39	1,52	18/18
A2058T 10 000 kopior	18,7	0,22	1,18	18/18
A2058T 30 kopior	26,4	0,42	1,59	18/18
A2058C 10 000 kopior	17,8	0,08	0,46	18/18
A2058C 30 kopior	25,5	0,31	1,22	18/18

För att bestämma variabilitet mellan operatörer jämfördes två körningar av två operatörer (**Tabell 36**). De två körningarna av olika operatörer uppvisade bra reproducerbarhet med en variationskoefficient mellan 0,54 och 1,62 % för alla mål.





Tabell 36. Variabilitet mellan operatörer				
	Genomsnittligt Cq	STDEV	%CV	Antal prover
MgPa 10 000 kopior	16,8	0,12	0,73	12/12
MgPa 30 kopior	25,3	0,41	1,61	12/12
A2058G 10 000 kopior	20,2	0,24	1,21	12/12
A2058G 36 kopior	27,9	0,45	1,62	12/12
A2059G 10 000 kopior	17,9	0,10	0,58	12/12
A2059G 30 kopior	25,5	0,39	1,53	12/12
A2058T 10 000 kopior	18,6	0,10	0,54	12/12
A2058T 30 kopior	26,1	0,31	1,20	12/12
A2058C 10 000 kopior	17,7	0,13	0,71	12/12
A2058C 30 kopior	25,2	0,27	1,06	12/12

För att bestämma variabilitet mellan instrument jämfördes två körningar på två maskiner utförda av samma operatör (**Tabell 37**). Körningarna på olika instrument uppvisade bra reproducerbarhet med en variationskoefficient mellan 0,30 och 2,62 % för alla mål.

Tabell 37. Variabilitet mellan instrument				
	Genomsnittligt Cq	STDEV	%CV	Antal prover
MgPa 10 000 kopior	16,7	0,10	0,60	12/12
MgPa 30 kopior	25,4	0,67	2,62	12/12
A2058G 10 000 kopior	20,0	0,07	0,33	12/12
A2058G 36 kopior	27,8	0,51	1,82	12/12
A2059G 10 000 kopior	17,8	0,05	0,30	12/12
A2059G 30 kopior	25,3	0,36	1,41	12/12
A2058T 10 000 kopior	18,5	0,09	0,50	12/12
A2058T 30 kopior	25,9	0,30	1,16	12/12
A2058C 10 000 kopior	17,6	0,13	0,75	12/12
A2058C 30 kopior	25,3	0,36	1,44	12/12

För att bestämma variabilitet inom körningar jämfördes tre experiment med separat utförande av samma operatör med körning av varje mål på samma platta (**Tabell 38**). De tre experimenten uppvisade bra reproducerbarhet med en variationskoefficient mellan 0,57 och 3,12 % för alla mål.




Tabell 38. Variabilitet inom körningar						
	Genomsnittligt Cq STDEV		%CV	Antal prover		
MgPa 10 000 kopior	17,3	0,36	2,09	18/18		
MgPa 30 kopior	25,9	0,81	3,12	18/18		
A2058G 10 000 kopior	20,2	0,11	0,57	18/18		
A2058G 36 kopior	28,0	0,65	2,31	18/18		
A2059G 10 000 kopior	17,9	0,15	0,83	18/18		
A2059G 30 kopior	25,8	0,38	1,46	18/18		
A2058T 10 000 kopior	18,8	0,12	0,66	18/18		
A2058T 30 kopior	26,8	0,38	1,41	18/18		
A2058C 10 000 kopior	17,8	0,15	0,83	18/18		
A2058C 30 kopior	25,5	0,36	1,41	18/18		

16.2.2 Analytisk sensitivitet

Den analytiska sensitiviteten för satsen **Resistance**Plus[®] MG på LC480 II bestämdes genom att köra begränsade spädningsserier med användning av kvantifierad syntetisk mall för *M. genitalium* MgPa- och 23S rRNA-mål (A2058G, A2059G, A2058T och A2058C). Sensitiviteten för varje mål bestämdes som antalet kopior per reaktion med ≥ 95 % detektion som visas i **Tabell 39**.

Tabell 39. Analytisk sensitivitet					
Analytisk sensitivitet (kopior/reaktion)					
MgPa	10				
A2058G	12				
A2059G	10				
A2058T	10				
A2058C	10				

16.2.3 Analytisk specificitet

Denna studie utfördes för att utvärdera satsen **Resistance**Plus[®] MG när icke-målorganismer förekommer vid höga koncentrationer. En panel utvärderades med 65 mikroorganismer (4 virus, 2 protozoer, 4 svampar och 55 bakterier), som representerar patogener eller flora som vanligtvis förekommer i urinvägarna eller som är nära relaterade till *M. genitalium*. Varje bakteriestam testades vid 1 x 10⁶ genom/ml, om inte annat anges. Virusstammar testades vid 1 x 10⁵ genom/ml, om inte annat anges. Alla andra organismer testades vid de angivna koncentrationerna. Alla organismer kvantifierades med qPCR, förutom de som kvantifierades som kolonibildande enheter (CFU) eller plackbildande enheter (PFU) (). Alla mikroorganismer testades i triplikat. Alla mikroorganismer späddes i en negativ klinisk matris (antingen urinprov eller vaginalprov).

Resultat anger att ingen av dessa organismer uppvisade falskt positiva resultat i M. genitalium-negativa matriser (Tabell 40).

En *in silico*-analys utfördes även för att utvärdera om oligonukleotiderna i analysen **Resistance**Plus[®] MG kunde amplifiera och detektera nukleinsyrasekvenser från icke-målorganismer tillgängliga i BLAST. Inga signifikanta interaktioner detekterades.





Tabell 40. Mikroorganismer testade för analytisk specificitet							
Organism	Koncentration (genom/ml)	Organism	Koncentration (genom/ml)	Organism	Koncentration (genom/ml)		
Actinomyces israelii	1 x 10 ⁶	HIV-1^	1 x 10 ³	Mycoplasma pirum (2)*	1 x 10 ⁶		
Atopobium vaginae	1 x 10 ⁶	HPV-typ 18 (HeLa-celler)^	1 x 10 ⁵	Mycoplasma pneumoniae (6)*	1 x 10 ⁶		
Bacterioides fragilis	1 x 10 ⁶	Klebsiella oxytoca	1 x 10 ⁶	Mycoplasma primatum	1 x 10 ⁶		
Bifidobacterium adolescentis	1 x 10 ⁶	Lactobacillus acidophilus	1 x 10 ⁶	Mycoplasma salivarium	1 x 10 ⁶		
Campylobacter jejuni	1 x 10 ⁶	Lactobacillus crispatus	1 x 10 ⁶	Neisseria gonorrhoeae	1 x 10 ⁶		
Candida albicans	1 x 10 ⁵	Lactobacillus jensenii	1 x 10 ⁶	Pentatrichomonas hominis [#]	1 x 10 ⁵		
Candida glabrata	1 x 10 ⁶	Lactobacillus vaginalis	1 x 10 ⁶	Peptostreptococcus anaerobius	1 x 10 ⁶		
Candida parapsilosis	1 x 10 ⁶	Listeria monocytogenes	1 x 10 ⁶	Prevotella bivia	1 x 10 ⁶		
Candida tropicalis	1 x 10 ⁵	Mobiluncus curtisii	1 x 10 ⁶	Propionibacterium acnes	1 x 10 ⁵		
Chlamydia trachomatis	1 x 10 ⁶	Mycobacterium smegmatis	1 x 10 ⁵	Proteus mirabilis	1 x 10 ⁶		
Clostridium perfringens	1 x 10 ⁶	Mycoplasma alvi	1 x 10 ⁶	Proteus vulgaris	1 x 10 ⁶		
Corynebacterium genitalium	1 x 10 ⁶	Mycoplasma amphoriforme (2)*	1 x 10 ⁶	Pseudomonas aeruginosa	1 x 10 ⁶		
Enterobacter aerogenes	1 x 10 ⁶	Mycoplasma arginini	1 x 10 ⁶	Staphylococcus aureus	1 x 10 ⁶		
Enterobacter cloaceae	1 x 10 ⁶	Mycoplasma buccale	1 x 10 ⁶	Staphylococcus saprophyticus	1 x 10 ⁶		
Enterococcus fecalis	1 x 10 ⁶	Mycoplasma fermentans	1 x 10 ⁶	Streptococcus agalactiae	1 x 10 ⁶		
Fusobacterium nucleatum	1 x 10 ⁶	Mycoplasma gallisepticum	1 x 10 ⁴	Streptococcus pyogenes	1 x 10 ⁶		
Gardnerella vaginalis	1 x 10 ⁶	Mycoplasma hominis	1 x 10 ⁶	Trichomonas vaginalis [#]	1 x 10 ⁵		
Haemophilus ducreyi	1 x 10 ⁶	Mycoplasma lipohilum	1 x 10 ⁴	Ureaplasma urealyticum	1 x 10 ⁵		
Herpes simplex-virus I	1 x 10 ⁶	Mycoplasma orale	1 x 10 ⁶				
Herpes simplex-virus II	1 x 10 ⁶	Mycoplasma penetrans	1 x 10 ⁶				

* Siffra inom parentes betecknar antalet testade stammar.

^ Kvantifierad som PFU/ml.

Kvantifierad som CFU/ml.

16.2.4 Potentiellt interfererande substanser

En studie om interfererande substanser utfördes för att undersöka om substanser eller tillstånd som kan förekomma i urinprover eller vaginalprover kan påverka prestandan för analysen **Resistance**Plus[®] MG. Panelen bestod av endogena substanser, t.ex. blod, mucin och leukocyter, och läkemedel (receptbelagda och receptfria) som skulle kunna användas för att behandla tillstånd i urinvägarna. Alla substanser utvärderades genom prestanda för den interna kontrollen som övervakar extraktion och qPCR-hämning. Alla testprover testades i triplikat. Substanser späddes i en negativ klinisk matris (antingen urinprov eller vaginalprov) enligt vad som är lämpligt.

Resultat angav att ingen av substanserna och tillstånden interfererade med detektion av den interna kontrollen eller gav falskt positiva resultat.

Resultat sammanfattas i Tabell 41 och Tabell 42.





Tabell 41. Potentiellt interfererande substanser i urinprover						
Klass/substans	Produktnamn	Testkoncentration				
Helblod		1 volymprocent				
Sädesvätska		5,0 volymprocent				
Slem	Mucin	0,8 viktprocent				
Antihistika	Azitromycin	1,8 mg/ml				
Antibiotika	Doxycyklin	3,6 mg/ml				
A	Aspirin	40 mg/ml				
Anaigetika	Paracetamol	3,2 mg/ml				
Intravaginella hormoner		7 mg/ml progesteron + 0,07 mg/ml beta-östradiol				
Leukocyter		10 ⁵ celler/ml				
Albumin	Bovint serumalbumin	10 mg/ml				
Glukos		10 mg/ml				
Sur urin (pH 4,0)	Urin + N-acetyl-L-cystein	pH 4,0				
Alkalisk urin (pH 9,0)	Urin + ammoniumcitrat	pH 9,0				
Bilirubin		1 mg/ml				

Tabell 42. Potentiellt interfererande substanser i vaginalprover						
Klass/substans	Produktnamn	Testkoncentration				
Blod		60 volymprocent				
Sädesvätska		5,0 volymprocent				
Slem	Mucin	0,8 viktprocent				
	Vagisil Anti-Itch Crème (1.0 oz)	0,25 viktprocent				
	K-Y Jelly (4.0 oz)	0,25 viktprocent				
	Options Gynol II Vaginal Contraceptive Gel	0,25 viktprocent				
Receptfria vaginalprodukter och preventivmedel	Walgreens Clotrimazole Vaginal Cream (1.5 oz)	0,25 viktprocent				
	Vagisil Sensitive Skin Formula Maximum Strength Anti-Itch Creme with Oatmeal (1.0 oz)	0,25 viktprocent				
	Vagisil ProHydrate Natural Feel Internal Moisturizing Gel (0.2 oz x 8 pack)	0,25 viktprocent				
	Vagisil Daily Intimate Deodorant Powder (8.0 oz)	0,25 viktprocent				
	Summer's Eve Medicated Douche	0,25 volymprocent				
Deodoranter och pulver	Summer's Eve Deodorant spray (2.0 oz)	0,25 volymprocent				
Hemorrojdkräm	Preparation H Hemorrhoidal Cream (0.9 oz)	0,25 viktprocent				
Receptbelagda läkemedel	Metronidazole Vaginal Gel, 0.75%	0,25 viktprocent				





Tabell 42. Potentiellt interfererande substanser i vaginalprover						
Klass/substans Produktnamn Testkoncentrat						
	Estrace [®] (vaginalkräm med östradiol, USP 0,01 %)	0,25 viktprocent				
Leukocyter		10 ⁵ celler/ml				
Intravaginella hormoner	-	7 mg/ml progesteron + 0,07 mg/ml beta-östradiol				

16.2.5 Korsreaktivitet med andra 23S rRNA-mutationer

Korsreaktivitet för satsen *ResistancePlus®* MG bedömdes med användning av kvantifierad syntetisk mall för *M. genitalium* MgPaoch 23S rRNA-mål (A2059C) vid 10 000 och 45 kopior per reaktion. Resultaten påvisade att testet *ResistancePlus®* MG korsreagerar med *M. genitalium* A2059C 23S rRNA-mål med en träffrekvens på 100 %.

17 Kundtjänst och teknisk service

Kontakta teknisk service för frågor om reaktionsinställning, cykliska förhållanden och annat.

Tel: +61 2 9209 4169, E-post: tech@speedx.com.au





18 Referenser

- 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
- Jensen JS, Bradshaw CS, Tabrizi SN, Fairley CK, Hamasuna R. Azithromycin treatment failure in Mycoplasma genitaliumpositive patients with nongonococcal urethritis is associated with induced macrolide resistance. Clin Infect Dis. 2008 Dec 15;47(12):1546-53.
- Jensen JS. Kapitel 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.
- 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 Bilaga 1: LightCycler[®] 480 Instrument II

Följande information är baserad på LightCycler[®] 480 Software (version 1.5).

ResistancePlus[®] MG-kittet innehåller färger för LightCycler[®] 480 Instrument II. PlexPCR[®] Colour Compensation-kittet (kat.nr. 90001) måste köras och tillämpas för LC480 II-analys (se avsnitt 19.2). Detta kit kan erhållas på begäran.

19.1 Programmera LightCycler[®] 480 Instrument II (LC480 II)

Detection Format (Detektionsformat)

Skapa ett anpassat Detection Format (Detektionsformat)

Öppna Tools (Verktyg) > Detection Formats (Detektionsformat)

Skapa ett nytt detektionsformat och ge det namnet "SpeeDx PlexPCR" (kan skapas när filen för SpeeDx färgkompensation skapas) (se Figur 3).

För Filter Combination Selection (Val av filterkombination), välj följande (Excitation – Emission):

	Tabell 43. Filterkombinationer								
LC480 II	440-488	465–510	533–580	533-610	533–640	618–660			

^ Dessa filterkombinationer är standardnamn för kanalerna

Ställ in Selected Filter Combination List (Vald filterkombinationslista) för alla kanaler som:

Melt Factor (Smältfaktor): 1

Quant Factor (Kvantfaktor): 10

Max Integration Time (sec) (Max. integrationstid (s)): 1

-Filte	er Comb	ination	Sel	ection-					
		Em	i s s	ion					
E x	48 440 🔽	8 510	580	610	640	660			
c i	465	্য আন	_		_	, L			
t a	498		Г	Г	Г	Г			
t i	533		ঘ	ন	ন	г			
o n	618 🗆					ঘ			
								C	ear
- Sele	ected Fi	Iter Co	mbir	nation I	ist-				
Exc	itation	Emissi	on	Name	M	elt	Quant	Max Integ	ration
	ilter	Filte	r		Fac	ctor	Factor	Time (S	Sec)
	ilter 440	Filte 488	r 4	140-488	Fac 1	tor	Factor 10	Time (S	Sec)
	ilter 440 465	Filte 488 510	r 4	140-488 165-510	Fac 1 1	tor	Factor 10 10	Time (9 1 1	Sec)
	ilter 440 465 533	Filte 488 510 580	r 4	440-488 465-510 533-580	Fac 1 1 1	tor	Factor 10 10 10	Time (1 1 1	Sec)
	ilter 440 465 533 533	Filte 488 510 580 610	r 4	440-488 465-510 533-580 533-610	Fac 1 1 1 1	tor	Factor 10 10 10 10 10	Time (5 1 1 1 1	Sec)
	ilter 440 465 533 533 533	Filte 488 510 580 610 640	r 4	440-488 465-510 533-580 533-610 533-640	Fac 1 1 1 1 1	tor	Factor 10 10 10 10 10 10	Time (5 1 1 1 1 1 1	Sec)

Figur 3. Anpassat SpeeDx detektionsformat

Instrument Settings (Instrumentinställningar)

Skapa ett anpassat Detection Format (Detektionsformat)

Öppna Tools (Verktyg) > Instruments (Instrument)

För Instrument Settings (Instrumentinställningar) > välj Barcode Enabled (Streckkodsaktiverad)





Experiment setup (Konfigurera experiment)

Välj New Experiment (Nytt experiment)

På fliken Run Protocol (Kör protokoll)

För Detection Format (Detektionsformat) välj det anpassade formatet "SpeeDx PlexPCR" (Figur 4)

Välj Customize (Anpassa) >

Välj Integration Time Mode (Integrationstidläge) > Dynamic (Dynamiskt)

Välj följande aktiva Filter Combinations (Filterkombinationer) som visas i Tabell 44

Tabell 44. Kanaler för <i>ResistancePlus[®]</i> MG-mål						
Detektion av <i>M. genitalium</i> (MgPa)	23S rRNA-mutation	Internal Control (Intern kontroli)				
465–510	533–580	533–640				

Detection Detection	on For ction egrati	^{mats} Format SpeeDx PlexPC on Time Mode	R
•)ynan	nic	C Manual
Ac	tive	Filter Combination	
		(440-488)	
	•	(465-510)	
	•	(533-580)	
		(533-610)	
	•	(533-640)	
		(618-660)	
			0

Figur 4. Anpassa detektionsformat

Tilldela etiketter till brunnarna på plattan för att aktivera automatisk provdetektion i analysprogrammet.

Öppna modulen Sample Editor (Provredigerare)

Välj brunn

Redigera Sample Name (Provnamn) så att det överensstämmer med etiketten som definierats i analysprogramvarans analysmodul (se avsnitt 24.4)

Prover som är märkta Prefix_Suffix (såsom visas i Tabell 45 och Figur 5) t.ex. Pa_MG

OBS! Provetiketterna är skiftlägeskänsliga. Etiketten måste överensstämma exakt med de tilldelade i körfilen.

Tabell 45. Provetiketter för analysprogramvaran							
Provtyp	Prefix (i analysprogramvaran)	_Suffix (i analysprogramvaran)	Provnamn (i LC480)				
Vanligt prov	S	_MG	S_MG				
Negativ kontroll	Ν	_MG	N_MG				
Positiv kontroll (MG, 23S rRNA mutant typ) (Pa)	Ра	_MG	Pa_MG				
Positiv kontroll (MG, 23S rRNA vildtyp) (Pb)	Pb	_MG	Pb_MG				





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

Figur 5. Provredigerare – Tilldela etiketter till brunnar

Ställ in Reaction Volume (Reaktionsvolym) > 20 µL

Skapa följande program (visas mer detaljerat I Figur 6 – Figur 9):

Tabell 46. Termocyklingsprogram									
Program name (Programnamn)	Cycles (cykler)	Target °C (Mål-C)	Hold (Pausad)	Ramp rate (Ramphastighet) (°C/s) [≠]					
Polymerase activation (Polymerasaktivering)	1	95 °C	2 min	4,4					
Touch down cycling (Nedåtgående cykling) ^ö :	10	95 °C	5 s	4,4					
Step down (Gå ned) -0,5 °C/cykel	10	61 °C–56,5 °C ^ŏ	30 s	2,2					
Quantification cycling (Kvantifieringscykling)*:	40	95 °C	5 s	4,4					
Acquisition/Detection (Insamling/detektering)	40	52 °C+	40 s	2,2					
Cooling (Kylning)	1	40 °C	30 s	2,2					

[#] Standardramphastighet (96-brunnsplatta)

^o Stegstorlek: -0,5 °C/cykel, S-mål: 56 °C

* Analysläge: kvantifiering, Insamlingsläge: enkelt

Figur 6. Termocyklingsprogram – Polymerasaktivering

	Database: Research Database (Rese	arch)
	User: Speedx	noche
col Data	Run Notes	5
xPCR Custon	ize Block Size 96 Plate ID Reactio	n Volume 20 🛨
Lot No	Test ID	
Prog	ams	
	Cycles	Analysis Mode
	1 🗘 None	· ·
	10 🗘 None	
	40 🚖 Quar	ntification 📩 🐼
	1 🛟 None	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
Polymerase activation	Temperature Targets	
Acquisition Mode Hold (hh:mm:ss) Ramp Rate	C/s) Acquisitions (per °C) Sec Target (°C) Step Size (°C)	Step Delay (cycles)
		$ \rightarrow $
ne 🔽 00:02:00 📩 4.4	÷ ÷0 ÷0 ÷	
	col Data xPCR Custom Lot No Progr. Polymerase activation Acquisition Mode Hold (hh:mm:s) Ramp Rate (ne 100.02.00 144	Database: Research Database (Research Database (Research Database) (Research







Figur 7. Termocyklingsprogram – Nedåtgående cykling

🍠 LightCy	cler@	0 480 S	oftware releas	e 1.5.1.62	SP2								((
Instrume	nt:	30231	1 / Not Conn	ected					Database:	Research	Database (R	esearch)		Reality
Window:		New	Experimen	t				•	User:	Speedx				NUCIE
Experi-				Run Pr	otocol		Data			Run Ne	otes			<u>راع</u>
ment	E	Setup		-										ĽU
	ſ	Detecti	ion Format	SpeeDx	PlexPCR		Customize	Block Size	96 Pla	te ID	Rea	tion Volume 20	±.	
Editor	0	Color (Comp ID			Lot No			Test ID					6
	Ē						Programs							
Sample	Ľ		Program N	lame							Cycles	Analysis Mode	•	
Lanor	6	F)	Polymerase	activatio	n							one	-	E-E
Analysis	8	¥Ľ	Quantificatio	on cycling	1					4	10 ± G	uantification	-	
Analysis	6	2	Cooling	,						1	I I	one	•	
	5													
Report							.							
\equiv	6					Touch	down cycling Tempe	rature Targets						
Sum.	6	3	Target	(°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions	(per °C) Sec	Target (°C)	Step Size (C) Step Delay (c	ycles)	
	6	Ð	95	÷	None	▼ 00:00:05	4.4		÷ 0	÷	0	÷ 0	÷	\leftarrow
	Ĩ		61	÷	None	00:00:30	2.2 🛟		56	÷	0.5	÷0	÷	H
	G	2												∞
		~												

Figur 8. Termocyklingsprogram – Kvantifieringscykling

J LightCycle	r® 48	SU Software release	se 1.5.1.62 S	P2								
Instrument:	30	231 / Not Conn	ected					Databas	e: Research	Database (Res	earch)	Boche
Window:	N	ew Experimen	t				-	User:	Speedx			Lincing
Experi-			Run Pro	tocol		Data			Run N	otes		12
ment	- Set	up ection Format	SpeeDx	PlexPCR		Customize	Block Size	96 P	late ID	Reacti	on Volume 20	
Subset Editor	Cold	or Comp ID	1-1		Lot No		1	Test ID			1	- 0-
	~	1				Programs						
Editor	\equiv	Program N	lame							Cycles	Analysis Mode	· 목
\equiv	\oplus	Touchdown	cycling							10 10 Nor	e	
Analysis		Quantification	on cycling							40 🗘 Qua	ntification	
	\cong	Cooling								1 🛟 Nor	e	- 3
Report	<u> </u>	J										
					Quan	tification cycling Temn	erature Targets	2				
Sum.		Target	(°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions	(per °C) Se	c Target (°C)	Step Size (°C	Step Delay (cy	cles)
\square	\oplus	▶ 95	÷	None	▼ 00:00:05	÷ 4.4 ÷		÷ 0	÷	0 -	0	\rightarrow
í		52		Single	00:00:40	÷2.2 ÷		0	-	0 -	0	
l		2										\otimes
Í	V											







Figur 9. Termocyklingsprogram – Kylning

· ·
cles)
cles)
cies
-
1 19
5
2
n
(n)

> Start Run (Starta körning)

Exportera en .ixo-fil när cyklingsprogrammet har avslutats för analys i ResistancePlus® MG (LC480)-analysprogramvaran.

Välj Export (Exportera)

Spara på en lätt identifierbar plats

19.2 Colour Compensation (Färgkompensation) för LightCycler[®] 480 Instrument II

OBS! *PlexPCR*[®] Colour Compensation-kittet (kat.nr 90001) måste köras och tillämpas för LC480 II-analys. Detta kit kan erhållas på begäran.

För analys med hjälp av programmet måste Sample Name (Provnamn) på färgkompensationsreaktionerna märkas som visas i **Tabell** 47.

Exportera en .ixo-fil när cyklingsprogrammet har avslutats för analys i *ResistancePlus®* MG (LC480)-analysprogramvaran.

Välj Export (Exportera)

Spara på en lätt identifierbar plats med namnet "SpeeDx PlexPCR"





Tabell 47. Provnamn för färgkompensationsreaktioner för analysprogramvaran												
Reaktioner												
BLANK (TOM) 488-blandning 510 mix (510- blandning) 580 mix (580- blandning) 610 mix (610- blandning) 640 mix (640- blandning) blandning) blandning)												
Dominant Channel (Dominant kanal)	Water (Vatten)	440-488	465–510	533–580	533-610	533–640	618–660					
Sample Name (Provnamn)	Sample Name (Provnamn) BLANK (TOM) 440-488 465–510 533–580 533-610 533–640 618–660											

19.3 Tolkning av resultat

ResistancePlus[®] MG (LC480)-analysprogramvaran krävs för tolkning av data. Analysprogramvaran kan erhållas på begäran. Kontakta <u>tech@speedx.com.au</u> för mer information.

Se avsnitt 24 för instruktioner om hur man använder ResistancePlus® MG (LC480)-analysprogramvaran.





20 Bilaga 2: cobas z 480 analyser

Följande information baseras på cobas z 480 analyser Software (LightCycler 480 SW UDF 2.1.0). Kontakta din Roche-representant för hjälp att komma åt UDF-programvaran på cobas z 480 analyser.

ResistancePlus[®] MG -kittet innehåller färger för cobas z 480 analyser. *PlexPCR*[®] Colour Compensation-kittet (kat.nr. 90001) måste köras och tillämpas för z 480-analys (se **avsnitt 20.2**). Detta kit kan erhållas på begäran.

20.1 Programmering av cobas z 480 analyzer

Detection Format (Detektionsformat)

Skapa ett anpassat Detection Format (Detektionsformat)

Öppna Tools (Verktyg) > Detection Formats (Detektionsformat)

Skapa ett nytt detektionsformat och ge det namnet "SpeeDx PlexPCR" (kan skapas när filen för SpeeDx färgkompensation skapas) (se Figur 10).

För Filter Combination Selection (Val av filterkombination), välj följande (Excitation – Emission):

	Tabell 48. Filterkombinationer									
z 480	465–510	540–580	540–610	540–645	610–670					

^ Dessa filterkombinationer är standardnamn för kanalerna

Ställ in Selected Filter Combination List (Vald filterkombinationslista) för alla kanaler som:

Melt Factor (Smältfaktor): 1

Quant Factor (Kvantfaktor): 10

Max Integration Time (sec) (Max. integrationstid (s)): 1



Figur 10. Anpassat SpeeDx detektionsformat





Instrument Settings (Instrumentinställningar)

Skapa ett anpassat Detection Format (Detektionsformat)

Öppna Tools (Verktyg) > Instruments (Instrument)

För Instrument Settings (Instrumentinställningar) > välj Barcode Enabled (Streckkodsaktiverad)

Experiment setup (Konfigurera experiment)

Välj New Experiment (Nytt experiment)

På fliken Run Protocol (Kör protokoll)

För Detection Format (Detektionsformat) välj det anpassade formatet "SpeeDx PlexPCR" (Figur 11)

Välj Customize (Anpassa) >

Välj Integration Time Mode (Integrationstidläge) > Dynamic (Dynamiskt)

Välj följande aktiva Filter Combinations (Filterkombinationer) som visas i Tabell 49

Tabell 49. Kanaler för <i>ResistancePlus[®]</i> MG-mål								
Detektion av M. genitalium (MgPa) 23S rRNA-mutation Internal Control (Intern kontroll)								
465–510	540–580	540–645						

Figur 11. Anpassa detektionsformat

Detecti	on Format	5
Detec	ction For gration 1 lynamic	mat SpeeDx PlexPCR Time Mode C Manual
Ac	tive	Filter Combination
	~	465-510 (465-510)
	✓	540-580 (540-580)
		540-610 (540-610)
	✓	540-645 (540-645)
•		610-670 (610-670)

Tilldela etiketter till brunnarna på plattan för att aktivera automatisk provdetektion i analysprogrammet.

Öppna modulen Sample Editor (Provredigerare)

Välj brunn

Redigera Sample Name (Provnamn) så att det överensstämmer med etiketten som definierats i analysprogramvarans analysmodul (se avsnitt 24.4)

Proven är märkta Prefix_Suffix (såsom visas i Tabell 50 och Figur 12) t.ex. Pa_MG

OBS! Provetiketterna är skiftlägeskänsliga. Etiketten måste överensstämma exakt med de tilldelade i körfilen.





Tabell 50. Provetiketter för analysprogramvaran									
Provtyp	Prefix (i analysprogramvaran)	_Suffix (i analysprogramvaran)	Provnamn (i z 480)						
Vanligt prov	S	_MG	S_MG						
Negativ kontroll	Ν	_MG	N_MG						
Positiv kontroll (MG, 23S rRNA mutant typ) (Pa)	Ра	_MG	Pa_MG						
Positiv kontroll (MG, 23S rRNA vildtyp) (Pb)	Pb	_MG	Pb_MG						

Pos	Filter combinatio	ı	Color	Repl Of	Sample Name	Quantification Sample Type
A12	465-510 (4	65			S_MG	Unknown
A12	540-580 (5	40			S_MG	Unknown
A12	540-645 (5	40			S_MG	Unknown
B12	465-510 (4	65			Pa_MG	Unknown
B12	540-580 (5	40			Pa_MG	Unknown
B12	540-645 (5	40			Pa_MG	Unknown
C12	465-510 (4	65			Pb_MG	Unknown
C12	540-580 (5	40			Pb_MG	Unknown
C12	540-645 (5	40			Pb_MG	Unknown
D12	465-510 (4	65			N_MG	Unknown
D12	540-580 (5	40			N_MG	Unknown
D12	540-645 (5	10			N_MG	Unknown

Figur 12. Provredigerare – Tilldela etiketter till brunnar

Ställ in Reaction Volume (Reaktionsvolym) > 20 µL

Skapa följande program (visas mer detaljerat i Figur 13 – Figur 16):

Tabell 51. Termocyklingsprogram									
Program name (Programnamn)	Cycles (cykler)	Target °C (Mål-C)	Hold (Pausad)	Ramp rate (Ramphastighet) (°C/s) [≠]					
Polymerase activation (Polymerasaktivering)	1	95 °C	2 min	4,4					
Touch down cycling (Nedåtgående cykling) ^ö :	10	95 °C	5 s	4,4					
Step down (Gå ned) -0,5 °C/cykel	10	61 °C–56,5 °C⁵	30 s	2,2					
Quantification cycling (Kvantifieringscykling)*:	10	95 °C	5 s	4,4					
Acquisition/Detection (Insamling/detektering)	40	52 °C+	40 s	2,2					
Cooling (Kylning)	1	40 °C	30 s	2,2					

[#] Standardramphastighet (96-brunnsplatta)

^o Stegstorlek: -0,5 °C/cykel, S-mål: 56 °C

* Analysläge: kvantifiering, Insamlingsläge: enkelt





Figur 13. Termocyklingsprogram – Polymerasaktivering

LightCycle	er® 480 9	SW - User Defined Wo	rkflow for cobas z 480						-		×
Instrument:	5473	5 / Not Connected				Da	tabase: June2020 (Research)			Reality
Window:	New	v Experiment				✓ Us	er: Speedx				nucile
Experi-	_	Run	Protocol		Data		Run N	lotes			<u>5</u>]]
ment	- Setup Detect	tion Format Spee	Dx PlexPCR		Customize	Block Size 96	Plate ID	Reac	tion Volume 20	Ð	
Subset Editor	Color	Comp ID		Lot No		Te	st ID				67
\equiv					Programs						
Sample		Program Name						Cycles	Analysis Mode		~문
	۹Ŀ	Polymerase ac	tivation					1 • No	one	•	동공
	S-	Touchdown cyc	ling n cycling						antification	÷	$\overline{\frown}$
Analysis	Θ	Cooling	rejering						one	-	(↔)
							I			-1	
Report	▼										
				Pol	lymerase activation Temp	perature Targets					
[] [Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:s	s) Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °	C) Sec Target (°C)	Step Size (°	C) Step Delay (cycl	es)	
	A	0.5	* None	- 00.02.00			<u>.</u>	0	.	-	Ê
	S.	95	• None	•100:02:00				10	•10	-	$\mathbf{\nabla}$
	Θ										
											\otimes
	-									I '	-

Figur 14. Termocyklingsprogram – Nedåtgående cykling



Figur 15. Termocyklingsprogram – Kvantifieringscykling

LightCycl	ler® 480	SW - User Defined Wo	rkflow for cobas z 480						-		\times
Instrument:	5473	5 / Not Connected					Database: June2020	(Research)		100	
Window:	Nev	v Experiment				•	User: Speedx			Lung	Jelle
Experi-		Run	Protocol		Data		Run	Notes		Ŀ	ΣΠ
ment	- Setup Detec	tion Format Spee	Dx PlexPCR		Customize	Block Size 96	Plate ID	Reacti	on Volume 20 📫	15	-
Subset Editor	Color	Comp ID		Lot No			Test ID	_			7
\square		[Programs						
Sample	\frown	Program Name						Cycles	Analysis Mode		
Editor	(+)	Polymerase ac	tivation					1 • Nor	ie _	비본	육
	×.	Touchdown cyc	ling n cycling					10 Nor	e .	17	-
Analysis	Θ	Cooling	a oferrad					1 Nor	ie T	- 6	(
								1		10	_
Report	\mathbf{r}										
				Quantifi	ication cycling Temp	erature Targets				լլե	
Sum		Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (pe	er °C) Sec Target (°C	C) Step Size (°C) Step Delay (cycles	15	\equiv
Sum.	A		* W		· · · · ·		^	* -	* . · ·	- É	\sim
		52	None Single	00:00:05	· · · · · ·		- 0	• 0	• 0 • 0		\sim
	Θ									16	<u>a</u>
											<u>S</u>
	$\mathbf{\nabla}$										





Figur 16. Termocyklingsprogram – Kylning



> Start Run (Starta körning)

Exportera en .ixo-fil när cyklingsprogrammet har avslutats för analys i ResistancePlus® MG (z480)-analysprogramvara.

Välj Export (Exportera)

Spara på en lätt identifierbar plats

20.2 Färgkompensation för cobas z 480 analyser

OBS! *PlexPCR*[®] Colour Compensation-kittet (kat.nr 90001) måste köras och tillämpas för z480 II-analys. Detta kit kan erhållas på begäran.

För analys med hjälp av programmet måste Sample Name (Provnamn) på färgkompensationsreaktionerna märkas som visas i **Tabell 52.**

Exportera en .ixo-fil när cyklingsprogrammet har avslutats för analys i ResistancePlus® MG (z480)-analysprogramvara.

Välj Export (Exportera)

Spara på en lätt identifierbar plats med namnet "SpeeDx PlexPCR"





Tabell 52. Provnamn för färgkompensationsreaktioner för analysprogramvaran							
Reaktioner							
	BLANK (TOM)	510 mix (510-blandning)	580 mix (580-blandning)	610 mix (610-blandning)	640 mix (640-blandning)	660 mix (660-blandning)	
Dominant Channel (Dominant kanal)	Water (Vatten)	465–510	540–580	540–610	540–645	610–670	
Sample Name (Provnamn)	BLANK (TOM)	465–510	540–580	540–610	540–645	610–670	

20.3 Tolkning av resultat

ResistancePlus[®] MG (z480)-analysprogramvaran krävs för tolkning av data. Analysprogramvaran kan erhållas på begäran. Kontakta tech@speedx.com.au för mer information.

Se avsnitt 24 för instruktioner om hur man använder ResistancePlus® MG (z480)-analysprogramvaran.





21 Bilaga 3: Applied Biosystems[®] 7500 Fast

Följande information baseras på 7500 programvara v2.3.

ResistancePlus[®] MG₍₅₅₀₎-kittet innehåller färger för Applied Biosystems[®] (ABI) 7500 Fast. Standardfärgkalibreringar används för alla kanaler. Anpassad kalibrering krävs inte.

21.1 Programmering av Applied Biosystems[®] 7500 Fast

Välj Advanced Setup (Avancerad konfiguration)

I Setup (Konfiguration) > öppna Experiment Properties (Experimentegenskaper) och välj följande

Name the experiment (Namnge experimentet)

Instrument > 7500 Fast (96 Wells) (7500 Fast (96 brunnar))

Type of experiment (Typ av experiment) > Quantitation – Standard Curve (Kvantifiering – standardkurva)

Reagents (Reagenser) > Other (Övriga)

Ramp Speed (Ramphastighet) > Standard

| Setup (Konfiguration) > öppna Plate Setup (Plattkonfiguration)

Under fliken Define Targets and Samples (Definiera mål och prov) >

Define Targets (Definiera mål) enligt nedan (definiera färger vid behov)

Tabell 53. Define Targets (Definiera mål)				
Target name (Målnamn)	Reporter (rapporterare)	Quencher		
MgPa	FAM	None (ingen)		
23S rRNA-mutation	JOE	None (ingen)		
IC	TAMRA	None (ingen)		

Tilldela etiketter till brunnarna på plattan för att aktivera automatisk provdetektion i analysprogrammet

| Setup (Konfiguration) > öppna Plate Setup (Plattkonfiguration)

Under fliken Define Targets and Samples (Definiera mål och prov) >

Define Samples (Definiera prov)

Redigera Sample Name (Provnamn) så att det överensstämmer med etiketterna som definierats i analysprogramvarans analysmodul (se avsnitt 24.4)

Prover som är märkta Prefix_Suffix (såsom visas i Tabell 54 och Figur 17) t.ex. Pa_MG

OBS! Provetiketterna är skiftlägeskänsliga. Etiketten måste överensstämma exakt med de tilldelade i körfilen.

Tabell 54. Provetiketter för analysprogramvaran						
Provtyp	Prefix (i analysprogramvaran)	_Suffix (i analysprogramvaran)	Provnamn (i 7500 Fast)			
Vanligt prov	S	_MG	S_MG			
Negativ kontroll	Ν	_MG	N_MG			
Positiv kontroll (MG, 23S rRNA mutant typ) (Pa)	Ра	_MG	Pa_MG			
Positiv kontroll (MG, 23S rRNA vildtyp) (Pb)	Pb	_MG	Pb_MG			





Figur 17. Provredigerare – Tilldela etiketter till brunnar

Define Samples			
Add New Sample	Add Saved Sample	Save Sample	Delete Sample
Sample Name			
Pb_MG]
Pa_MG			
N_MG			

I fliken Assign Targets and Samples (Tilldela mål och prover) >

Välj brunnar och tilldela mål och prov till de valda brunnarna

Välj Passive reference (Passiv referens) > None (Ingen)

| Setup (Konfiguration) > öppna Run Method (Kör metod)

Ställ in Reaction Volume Per Well (Reaktionsvolym per brunn) > 20 μ L

Skapa följande program (visas mer detaljerat i Graphical View (Grafisk vy) (Figur 18 och Figur 19) och Tabular View (Tabellvy) (Figur 20)

Tabell 55. Termocyklingsprogram						
Program name (Programnamn)	Cycles (cykler)	Target °C (Mål-C)	Hold (Pausad)	Ramp [≠]		
Polymerase activation (Polymerasaktivering)	1	95 °C	2 min	100 %		
Touch down cycling (Nedåtgående cykling):	10	95 °C	5 s	100 %		
Step down (Gå ned) -0,5 °C/cykel ^ö	10	61 °C–56,5 °C ^ŏ	30 s	100 %		
Quantification cycling (Kvantifieringscykling)*:	40	95 °C	5 s	100 %		
Acquisition/Detection (Insamling/detektering)	40	52 °C+	40 s	100 %		

Standard ramphastighet

⁶ Enable AutoDelta (Aktivera AutoDelta): -0,5 °C/cykel

+ Samla in data pausad







Figur 18. Kör metod – Graphical View (Grafisk vy)



AutoDelta Settings
AutoDelta Settings For Cycling Stage
AutoDelta Temperature: - 💌 0.50 👗
Legal ∆ Temperature Range: -6.33 to 4.32
AutoDelta Time: + 💌 00:00 🔍
Starting Cycle: 2
Save Setting Cancel





Figur 20. Kör metod – Tabular View (Tabellvy)

	Holding Stage	Cycling	g Stage	Cycling Stage		
		Number of Cycles: 10 Finable AutoDelta Starting Cycle: 2		Number of Cycles: 40 💮 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				
AutoDelta Time:		+ • 00:00	+ • 00:00			
Collect Data on Ramp:				1		
Collect Data on Hold:	m.	mj	۳. Č	۳.		
	Step 1	Step 1	Step 2	Step 1	Step 2	

I Setup (Konfiguration) > öppna Run Method (Kör metod)

Välj Start Run (Starta körning)

21.2 Tolkning av resultat

ResistancePlus[®] MG (7500)-analysprogramvaran krävs för tolkning av data. Analysprogramvaran kan erhållas på begäran. Kontakta <u>tech@speedx.com.au</u> för mer information.

Se avsnitt 24 för instruktioner om hur man använder ResistancePlus® MG (7500)-analysprogramvaran.





22 Bilaga 4: Applied Biosystems 7500 Fast Dx

Följande information baseras på SDS-programvara v1.4.1 för 7500 Fast Dx.

ResistancePlus[®] MG₍₅₅₀₎-kittet innehåller färger för Applied Biosystems[®] (ABI) 7500 Fast Dx. Standardfärgkalibreringar används för alla kanaler. Anpassad kalibrering krävs inte.

22.1 Programmering av Applied Biosystems[®] 7500 Fast Dx

Välj Create New Document (Skapa nytt dokument)

I New Document Wizard (Guide för nytt dokument), välj följande (Figur 21):

Assay (Analys) > Standard Curve (Absolute Quantification) (Standardkurva (absolut kvantifiering))

Container (Behållare) > 96-Well Clear (96-brunn klar)

Template (Mall) > Blank document (Tomt dokument)

Run mode (Körläge) > Standard 7500

Operator (Användare) > Ange användarens namn

Comments (Kommentarer) > Ange eventuella kommentarer eller anteckningar för körfilen

Plate Name (Plattnamn) > Ge körfilen ett unikt namn

Välj Next (Nästa)

Figur 21. Fönstret New Document Wizard (Guide för nytt dokument)

A00701	Standard Course (Abaab to Overstitati		_	
Assay.	Standard Curve (Absolute Quantitatio	on)	<u> </u>	
Container:	96-Well Clear			
Template:	Blank Document		Browse	
Run Mode:	Standard 7500		•	
Operator:				
Comments:	SDS v1.4.1			^
				\sim

| Select Detectors (Välj detektorer) > välj New Detector (Ny detektor)

Definiera detektorer enligt nedan (definiera färger vid behov) (så som visas i Tabell 56 och

Figur 22)

Tabell 56. Definiera detektorer						
Detektorer	Detektornamn	Rapporterarfärg	Quencher			
Detektor 1	MgPa	FAM	None (ingen)			
Detektor 2	23S rRNA-mutation	JOE	None (ingen)			
Detektor 3	IC	TAMRA	None (ingen)			





Välj **OK**

Figur 22. Fönstret Ny detektor

New Detector		×
Name:	 	
Description:		
Reporter Dye:	FAM	
Quencher Dye:	(none)	
Color:		
Notes:		
Create Ar	other OK Cancel	

Välj detektorer (Figur 23)

Välj detektorer och klicka på Add (Lägg till) för att lägga till dem i dokumentet Välj Passive reference (Passiv referens) > None (Ingen)

New Document Wiza	rd					×
Select Detectors Select the detectors y	ou will be using	in the docume	ent.			
Find:		• ·	•	Pas	sive Reference: (none)	•
Detector Name	Description	Reporter	Quencher		Detectors in Document	
MgPa		FAM	(none)		MgPa	
23S rRNA mutation		JOE	(none)	I	23S rRNA mutation	
IC		TAMRA	(none)	Add >>		
<			>	<< Remove		
New Detector						
			< E	Back Next	> Finish	Cancel

Figur 23. Fönstret Select Detectors (Välj detektorer)

I Set Up (Konfigurera) provplatta >

Välj brunnar och tilldela 4 detektorer till de valda brunnarna

- MgPa
- 23S rRNA-mutation
- IC

Välj Next (Nästa)

Tilldela etiketter till brunnarna på plattan för att aktivera automatisk provdetektion i analysprogrammet.





Under fliken Setup (Konfigurera) > Plate (Platta)

Högerklicka på brunnen och välj Well Inspector (Brunnsinspektör) > ange Sample Name (Provnamn)

Redigera Sample Name (Provnamn) så att det överensstämmer med etiketten som definierats i analysprogramvarans analysmodul (se avsnitt 24.4)

Prover som är märkta Prefix_Suffix (såsom visas i Tabell 57 and Figur 24) t.ex. Pb_MG

OBS! Provetiketterna är skiftlägeskänsliga. Etiketten måste överensstämma exakt med de tilldelade i körfilen.

Tabell 57. Provetiketter för analysprogramvaran					
Provtyp	Prefix_ (i analysprogramvaran)	_Suffix (i analysprogramvaran)	Provnamn (i 7500 Fast Dx)		
Vanligt prov	S	_MG	S_MG		
Negativ kontroll	Ν	_MG	N_MG		
Positiv kontroll (MG, 23S rRNA mutant typ) (Pa)	Ра	_MG	Pa_MG		
Positiv kontroll (MG, 23S rRNA vildtyp) (Pb)	Pb	_MG	Pb_MG		

Figur 24. Setup plate view (Konfigurera plattvy) - Assigning nametags to wells (Tilldela brunnar etiketter)



Välj Next (Nästa)

På fliken Instrument

I rutan Settings (Inställningar)

För Sample Volume (Provvolym) (µL): ange 20 µL

Skapa följande termocyklingsprotokoll(Tabell 58, Figur 25 och Figur 26)





Tabell 58. Termocyklingsprotokoll					
Program name (Programnamn)	Cycles (cykler)	Target °C (Mål-C)	Hold (Pausad)	Ramp [≠]	
Polymerase activation (Polymerasaktivering)	1	95 °C	2 min	100 %	
Touch down cycling (Nedåtgående cykling):	10	95 °C	5 s	100 %	
Step down (Gå ned) -0,5 °C/cykel⁵	10	61 °C–56,5 °C⁵	30 s	100 %	
Quantification cycling (Kvantifieringscykling)*:	40	95 °C	5 s	100 %	
Acquisition/Detection (Insamling/detektering)	40	52 °C+	40 s	100 %	

Standard ramphastighet

⁶ (Aktivera AutoDelta):-0,5 °C/cykel

+ Samla in data pausad



Figur 25. Termocyklingsprotokoll – Termoprofil





Figur 26. Termocyklingsprotokoll – Automatisk ökning



22.2 Tolkning av resultat

ResistancePlus[®]MG (7500)-analysprogramvaran krävs för tolkning av data. Analysprogramvaran kan erhållas på begäran. Kontakta <u>tech@speedx.com.au</u> för mer information.

Se avsnitt 24 för instruktioner om hur man använder ResistancePlus® MG (7500)-analysprogramvaran.





23 Bilaga 5: Bio-Rad CFX96[™] Dx och CFX96 Touch[™] Real-Time PCR System

Den följande informationen baseras på Bio-Rad CFX Manager v3.1

The **Resistance**Plus[®] MG₍₆₇₅₎-kittet innehåller färger för CFX96 Real-Time PCR System. Standardfärgkalibreringar används för alla kanaler. Anpassad kalibrering krävs inte.

23.1 Programming the CFX96[™] Dx och CFX96 Touch[™] Real-time PCR System

Välj View (Vy) > öppna Run Setup (Körkonfiguration)

I fliken Run Setup (Körkonfiguration) > Protocol (Protokoll) > Välj Create New (Skapa nytt)

| Protocol Editor (Protokollredigerare) (se: Figur 27):

Ställ in Sample Volume (Provvolym) > 20 µL

Skapa följande termocyklingsprogram och spara som "SpeeDx PCR". Detta protokoll kan väljas för framtida körningar.

For Touch down cycling (Nedåtgående cykling) väljer du steg 3 och därefter **Step options (Stegalternativ)** > Increment (Ökning): -0.5 °C/cykel (visas mer detaljerat i **Figur 28**).

Tabell 59. Termocyklingsprogram				
Program name (Programnamn)	Cycles (cykler)	Target °C (Mål-C)	Hold (Pausad)	
Polymerase activation (Polymerasaktivering)	1	95 °C	2 min	
Touch down cycling (Nedåtgående cykling) ^ō :	10	95 °C	5 s	
Step down (Gå ned) -0,5 °C/cykel	10	61 °C–56,5 °C ^δ	30 s	
Quantification cycling (Kyantifieringscykling)*:	10	95 °C	5 s	
Acquisition/Detection (Insamling/detektering)	40	52 °C ⁺	40 s	

⁶ Step options (Stegalternativ) > Ökning: -0,5 °C/cykel

+ Lägg till plattavläsning till steg

Figur 27. Thermocycling Protocol (Termocykelprotokoll) – Graphical view (Grafisk vy)







Figur 28. Step Options (Stegalternativ)

Step Options				×
Step 3				Gradient
	Plate R	lead	A	
Temperature	61.0	°C	В	
Gradient		°C	С	
Increment	-0.5	°C/cycle	D	
Ramp Rate		°C/sec	E	
Time	0:30	sec/cycle	F	
Extend		sec/cycle	G	
	Веер	1	Н	
			ОК	Cancel

I fliken Run Setup (Körkonfiguration) > Plate (Platta)

Välj Create New (Skapa ny)

Välj Settings (Inställningar) > Plate Type (Plattyp) > välj BR Clear (BR klar)

Ställ in Scan mode (Skanningsläge) > All channels (Alla kanaler)

Välj Fluorophores (Fluoroforer) > FAM, HEX, Quasar 705 (se Tabell 60)

Välj brunnar som innehåller prover och tilldela Sample Type (Provtyp) och kontrollera Load (Ladda) avseende fluoroforer (FAM, HEX, Quasar 705)

Save plate (Spara platta)

Tabell 60. Kanaler för <i>ResistancePlus</i> ® MG ₍₆₇₅₎ -mål				
Detektion av <i>M. genitalium</i> (MgPa) 23S rRNA-mutation Internal Control (Intern kontroll				
FAM	HEX	Quasar 705		

På fliken Run Setup (Körkonfiguration) > Start Run (Starta körning)

Välj block

Start Run (Starta körning)

Tilldela etiketter till brunnarna på plattan för att aktivera automatisk provdetektion i analysprogrammet.

Öppna modulen Plate Setup (Plattkonfiguration)

Välj brunn

Redigera Sample Name (Provnamn) så att det överensstämmer med etiketten som definierats i analysprogramvarans analysmodul (se avsnitt 24.4)

Prover som är märkta Prefix_Suffix (såsom visas i Tabell 61 och Figur 29) t.ex. Pb_MG

OBS! Provetiketterna är skiftlägeskänsliga. Etiketten måste överensstämma exakt med de tilldelade i körfilen.





Tabell 61. Provetiketter för analysprogramvaran					
Provtyp	Prefix_ (i analysprogramvaran)	Suffix (i analysprogramvaran)	Provnamn (i CFX96)		
Vanligt prov	S	_MG	S_MG		
Negativ kontroll	Ν	_MG	N_MG		
Positiv kontroll (MG, 23S rRNA mutant typ) (Pa)	Ра	_MG	Pa_MG		
Positiv kontroll (MG, 23S rRNA vildtyp) (Pb)	Pb	_MG	Pb_MG		

Figur 29. Provredigerare – Tilldela etiketter till brunnar

	1	2	3
А	Unk FAM HEX Ouasar 705 S MG		
В	Unk FAM HEX Ouasar 705 Pa MG		
с	Unk FAM HEX Ouasar 705 Pb MG		
D	Unk FAM HEX Ouasar 705 N MG		

23.2 Tolkning av resultat

ResistancePlus® MG (CFX)-analysprogramvaran krävs för tolkning av data. Analysprogramvaran kan erhållas på begäran. Kontakta <u>tech@speedx.com.au</u> för mer information.

Se avsnitt 24 för instruktioner om hur du använder ResistancePlus® MG (CFX)-analysprogramvaran.





24 Bilaga A: Tolkning av resultat

Resistance*Plus*[®] MG-analysprogramvaran krävs för tolkning av data. Även om *PlexPrime***[®]**-primrar erbjuder högre specificitet än andra allelspecifika primrar, kan viss icke-specifik amplifikation från 23S rRNA-mutantanalysen ses i prover som innehåller höga koncentrationer av *M. genitalium* vildtyp 23S rRNA. *ResistancePlus*[®] MG-analysprogramvaran tolkar data från amplifieringsresultat automatiskt och effektiviserar arbetsflödet.

Se **Tabell 62** för lämplig analysprogramvara för varje realtids-PCR-instrument. Analysprogramvaran kan erhållas på begäran. Kontakta <u>tech@speedx.com.au</u> för mer information.

Tabell 62. <i>ResistancePlus</i> [®] MG-analysprogramvara			
Kat.nr	Analysprogramvara*	Realtids-PCR-instrument	
99003	Resistance Plus [®] MG (LC480)	LC480 II	
99018	Resistance Plus [®] MG (z480)	z 480	
99002	Resistance Plus [®] MG (7500)	7500 Fast och 7500 Fast Dx	
99008	ResistancePlus [®] MG (CFX)	CFX96 Dx och CFX96 Touch	
99023	REFLEX ResistancePlus® MG (LC480)	LC480 II	
99024	REFLEX ResistancePlus® MG (z480)	z 480	
99026	REFLEX ResistancePlus® MG (7500)	7500 Fast och 7500 Fast Dx	
99025	REFLEX ResistancePlus® MG (CFX)	CFX96 Dx och CFX96 Touch	

* Se webbplatsen <u>https://plexpcr.com/products/sexually-transmitted-infections/resistanceplus-mg/#resources</u> för att kontrollera att du använder den senaste versionen av analysprogramvaran

OBS! Följ standardiserad laboratoriepraxis för överföring, rapportering och förvaring av resultat för att förhindra förlust av provresultat.

24.1 FastFinder-platform – Minimikrav för IT

Analysprogramvaran är tillgänglig i FastFinder-plattformen (https://www.ugentec.com/fastfinder/analysis). Minimikraven för IT för installation av FastFinder-plattformen listas nedan.

Hårdvarukrav

PC (Mac-dator stöds ej)

Processor: 2 GHz, 2 GB RAM

Lagringsutrymme: 10 GB

Internetanslutning Kabel eller DSL, proxy stöds inte

Minsta skärmupplösning: 1366x768 pixlar

Klientoperativsystem som stöds

Operativsystem Versioner som stöds

Windows 10 32-bitars och 64-bitars

Windows 8.1 32-bitars, 64-bitars och ARM

Windows 8 32-bitars, 64-bitars och ARM

Windows 7 SP1 32-bitars och 64-bitars

Windows Vista SP2 32-bitars och 64-bitars

Webbläsare som stöds

För användare med FastFinder-administratörskonto krävs ett av följande:

Internet Explorer 11 eller senare

Microsoft Edge 25 eller senare





- Firefox 45 eller senare
- Google Chrome 47 eller senare.

Den kan eventuellt köras på äldre versioner, men dessa stöds inte officiellt.

Programvarukrav

För att använda FastFinder-programvara krävs minst .NET 4.6.1. För mer information om ramverket .NET, se Microsoft Windows hjälpsidor.

Antivirusinställningar

Din antivirusprogramvara kan placera FastFinder-installationsprogrammet (UgenTec.FastFinder.Installer.exe) i karantän. Lägg till den här filen i antivirusprogrammets lista över godkända program. Exempel: Symantec (Risk: WS.Reputation.1)

Brandväggskrav

https-anslutningar ska tillåtas för *.fastfinderplatform.com:443

Mer detaljerade instruktioner gällande plattformen FastFinder finns i bruksanvisningen för FastFinder som nås via menyn Help (Hjälp).

Öppna menyn Help (Hjälp)

- Öppna startmenyn

 Välj eller avsnittet Help (Hjälp) och välj sedan Product Information (Produktdokumentation) följt av Instructions For Use (Bruksanvisning)

NEED HELP? In the help section you can consult the user manual, go to the admin and contact us on	Product documentation	Help centre	Go to admin
Help section	Terms of use	About	

24.2 Device set up (Enhetskonfiguration) (ny användare eller enhet)

Se bruksanvisningen för FastFinder, som nås från menyn Help (Hjälp), för detaljerade instruktioner om installation av enheten Öppna FastFinder

- Välj Devices (Enheter) från arbetsflödesfältet
 - > Välj Add (Lägg till)
 - > Välj en fil (körfil) för den nya enheten
- Ändra Current directory (Aktuell katalog)
 - > Välj Browse (Bläddra) och välj den mapp som innehåller relevanta filer
 - > Välj Next (Nästa)
- Lägg till information om enheten
 - > Välj Save (Spara)

24.2.1 <u>Colour Compensation (Färgkompensation)</u>

OBS! Se avsnitt 19.2-och avsnitt 20.2 för mer information om färgkompensation

För LC480 II- och z 480-enheter måste en färgkompensationsfil läggas till på enheten





- Välj LC480 II- eller z 480-enheten
 - > I avsnittet Colour Compensation (Färgkompensation), välj +
 - > Välj färgkompensationsfilen för enheten från katalogen
- Ändra Current directory (Aktuell katalog)
 - > Välj Browse (Bläddra) och välj den mapp som innehåller relevanta filer
- Välj Next (Nästa)
- Välj ResistancePlus MG (LC480), ResistancePlus MG (z480), REFLEX ResistancePlus MG (LC480), eller REFLEX ResistancePlus MG (z480) i listan för att länka till den här analysen
- Välj Save (Spara)

Nya eller ytterligare färgkompensationsfiler kan läggas till i en enhet eller inaktiveras efter behov.

I avsnittet om enhetens färgkompensation

- Välj bredvid filnamnet
- Väli 🔨 Active

för att aktivera eller inaktivera en färgkompensationsfil för en analys

- Välj Save (Spara)

24.3 Analysinsticksmodul (ny användare)

Se bruksanvisningen för FastFinder, som nås via menyn Help (Hjälp), för detaljerade instruktioner om konfiguration av analyser

Öppna FastFinder

- Välj Assays (Analyser) från arbetsflödesfältet
- Välj Add (Lägg till)
 - > För LC480 II > välj ResistancePlus MG (LC480) från listan
 - > För z 480 > välj ResistancePlus MG (z480) från listan
 - > För 7500 Fast och 7500 Fast Dx > välj ResistancePlus MG (7500) från listan
 - > För CFX96 Dx och CFX96 Touch > välj ResistancePlus MG (CFX) från listan

> För analys av prover som extraherats utan IC på LC480 (reflexarbetsflöde) > välj REFLEX ResistancePlus®MG (LC480) från listan

> För analys av prover som extraherats utan IC på z 480 (reflexarbetsflöde) > välj REFLEX ResistancePlus®MG (z480) från listan

> För analys av prover som extraherats utan IC på 7500 Fast och 7500 Fast Dx (reflexarbetsflöde) > välj REFLEX ResistancePlus®MG (7500) från listan

> För analys av prover som extraherats utan IC på CFX96 Dx och CFX96 Touch (reflexarbetsflöde) > välj REFLEX ResistancePlus®MG (CFX) från listan

- Välj Add (Lägg till)

För att aktivera eller inaktivera versioner av analysinsticksmodulen

- I General assay information (Allmän analysinformation)
 - Välj Versions (Versioner)
 - > Välj

för att aktivera eller inaktivera analysversionen

> Välj Save (Spara)

>





24.4 Namngivning av prover

Provetiketter kan tilldelas till en insticksanalysmodul för att automatisera detektion av brunnar och provtyper för analys.

Välj Assays (Analyser) från arbetsflödesfältet

- I Sample type nametags (prefix) (Etiketter för provtyp (prefix)) väljer du
 - > Välj 🖽 för att lägga till en etikett för att definiera provtypsetiketter (negativ kontroll, positiv kontroll och vanligt prov)
 - > Lägg till valfritt ord, valfri akronym eller bokstav i textrutan
 - > Välj Save (Spara)
- I Mix definition nametags (suffix) (Etiketter blandningsdefinition (suffix)) väljer du
 - Välj 于 för att lägga till en etikett för att definiera blandningsnamnet
 - > Lägg till valfritt ord, valfri akronym eller bokstav i textrutan
 - > Välj Save (Spara)
- Tilldela samma etikett till motsvarade brunnar i instrumentprogrammet (före eller efter körningen slutförts)
 - > För LC480 II se avsnitt 19 för anvisningar om hur man programmerar provetiketter i körfilen
 - > För z 480 se avsnitt 20 för anvisningar om hur man programmerar provetiketter i körfilen
 - > För 7500 Fast se avsnitt 21 för anvisningar om hur man programmerar provetiketter i körfilen
 - > För 7500 Fast Dx se avsnitt 22 för anvisningar om hur man programmerar provetiketter i körfilen
 - > För CFX96 Dx och CFX96 Touch se avsnitt 23 för anvisningar om hur man programmerar provetiketter i körfilen

OBS! Provetiketterna är skiftlägeskänsliga. Etiketten måste överensstämma exakt med de tilldelade i körfilen.

24.5 Lägga till blandningens satsnummer

Blandningens satsnummer kan tilldelas till analysen för att möjliggöra spårbarhet av reagenser

- Välj Assays (Analyser) från arbetsflödesfältet
 - > I Assay Lot (Analyssats): Välj
- för att lägga till en ny sats eller välj

för att redigera en befintlig sats

När satsen har lagts till blir satsnumren tillgängliga i analysmodulen



>

Show all lots Show only active lots

för att visa alla satsnummer eller endast aktiva satsnummer

24.6 Analys

Välj Analyses (Analyser) från arbetsflödesfältet för att starta en ny analys

Select datafile

Sök efter filen som ska laddas för analys från en specificerad katalog

- Ändra Current directory (Nuvarande katalog)

- > Välj Browse (Bläddra) och välj den katalog som innehåller relevanta filer
- Välj kör (data)-filen från listan
 - > Välj Next step (Nästa steg)



2 Assign assay(s)

Tilldela analysinformation till plattan manuellt om benämning av prov inte har installerats i analysmodulen

- För LC480 II > välj ResistancePlus MG (LC480)
- För z 480 > välj ResistancePlus MG (z480)
- För 7500 Fast and 7500 Fast Dx > välj ResistancePlus MG (7500)
- För CFX96 Dx och CFX96 Touch > välj ResistancePlus MG (CFX)
- För analys av prover som extraherats utan IC på LC480 > välj REFLEX ResistancePlus®MG (LC480)
- För analys av prover som extraherats utan IC på z 480 > välj REFLEX ResistancePlus®MG (z480)
- För analys av prover som extraherats utan IC på 7500 Fast och 7500 Fast Dx > välj REFLEX ResistancePlus® MG (7500)
- För analys av prover som extraherats utan IC på CFX96 Dx och CFX96 Touch > välj REFLEX ResistancePlus[®]MG (CFX)
- Välj brunnar och tilldela som:
 - Vanligt prov (S)
 - > Negativ kontroll (N)
 - > Positiv kontroll (MG, 23S rRNA mutant typ) (Pa)
 - > Positiv kontroll (MG, 23S rRNA vildtyp) (Pb)
- Välj Next step (Nästa steg)

För att spara plattlayouten som en mall för framtida bruk

- Välj brunnar och tilldela provtyper
 - > Väli
- för att spara mall
- Specificera mallnamn för framtida bruk
 - > Välj Save (Spara)

För att ladda en tidigare sparad plattmall

- Välj för att ladda plattmall
 - > Välj mall från rullgardinsmeny
 - > Markera kryssrutan för att ladda provtyper specificerade inom plattmallen
 - > Välj Load (Ladda)

3 Configure assay(s)

- För LC480 II > välj ResistancePlus MG (LC480)
 - > Välj lämplig Färgkompensationsfil från rullgardinsmenyn
 - > Välj Assay Lot (Analyssats) från rullgardinsmenyn
 - > Välj Analyse (Analysera)





- För z 480 > välj ResistancePlus MG (z480)
 - > Välj lämplig Färgkompensationsfil från rullgardinsmenyn
 - > Välj Assay Lot (Analyssats) från rullgardinsmenyn
 - > Välj Analyse (Analysera)
- För 7500 Fast och 7500 Fast Dx > välj ResistancePlus MG (7500)
 - > Välj Assay Lot (Analyssats) från rullgardinsmenyn
 - > Välj Analyse (Analysera)
- För CFX96 Dx och CFX96 Touch > välj ResistancePlus MG (CFX)
 - > Välj Assay Lot (Analyssats) från rullgardinsmenyn
 - > Välj Analyse (Analysera)
- För prover extraherade utan IC (reflexarbetsflöde) på LC480 II > Välj REFLEX ResistancePlus MG (LC480)
 - > Välj lämplig Färgkompensationsfil från rullgardinsmenyn
 - > Välj Assay Lot (Analyssats) från rullgardinsmenyn
 - > Välj Analyse (Analysera)
- För prover extraherade utan IC (reflexarbetsflöde) på z 480 > Välj REFLEX ResistancePlus MG (z480)
 - > Välj lämplig Färgkompensationsfil från rullgardinsmenyn
 - > Välj Assay Lot (Analyssats) från rullgardinsmenyn
 - > Välj Analyse (Analysera)
- För prover extraherade utan IC (reflexarbetsflöde) på 7500 Fast och 7500 Fast Dx > Välj REFLEX ResistancePlus MG (7500)
 - > Välj Assay Lot (Analyssats) från rullgardinsmenyn
 - > Välj Analyse (Analysera)
- För prover extraherade utan IC (reflexarbetsflöde) på CFX96 Dx och CFX96 Touch > Välj REFLEX ResistancePlus MG (CFX)
 - > Välj Assay Lot (Analyssats) från rullgardinsmenyn
 - > Välj Analyse (Analysera)





24.7 Resultat

>

Se Tabell 63 för en sammanfattning av möjliga rapporterade provresultat.

OBS! Det rekommenderas starkt att amplifieringskurvor bekräftas för alla positiva prover.

Lösa alla resultat som är osäkra

- Välj fliken Resolve (Lös)
- Välj provet som ska lösas
- Inspektera amplifieringskurvor för osäkra resultat
 - > Välj (Ref för att rita en referenskurva på diagrammet
 - > Välj (P) för att rita en positiv kontroll på diagrammet
 - > Välj [N] för att rita en negativ kontroll på diagrammet
 - Välj 🖌 för att bekräfta föreslagna resultat eller välj 📝 för ett annat alternativ
- Bekräfta som Negative (Negativ) eller Inconclusive (Obedömbar) och lägg till kommentarer

OBS! För obedömbara prover ska du extrahera och testa proverna en gång till. Om provet förblir obedömbart ska du ta ett nytt prov och testa på nytt.

Slutföra analys och förhindra ytterligare användarredigeringar

- > Välj Authorise Analysis (Auktorisera analys)
- > Välj Yes (Ja) för att bekräfta
- Förkasta analys eller starta om analysen
 - > Välj Restart Analysis (Starta om analys) eller Reject Analysis (Avvisa analys)
 - > Välj ett alternativ för att bekräfta

24.8 Referenskurva

En referenskurva kan sparas och användas för att jämföra med prover på samma platta eller över olika plattor

- Välj intresseprovet i menyn Well Details (Brunninformation) eller Target Details (Målinformation)
- Från amplifieringsdiagrammenyn > välj
 - > Markera kryssrutan för intressekanalen och lägg till en etikett
 - > Välj Save (Spara) för att lägga till signal som referenskurva

Denna referenskurva kommer nu att länkas till analysen i analysmenyn och kan inaktiveras när som helst.




24.9 Resultatöversikt

Tab (Res	Tabell 63. Tolkning av resultat med <i>ResistancePlus[®]</i> MG-analysprogramvara (Fliken Results Overview (Resultatöversikt))									
	Brunn	Namn	Analys	Resultat	Cq-värden^	Totalresultat				
	A1	Prov 1	ResistancePlus MG	Negativ	CHANNEL C (KANAL C): 25,31	Prov 1 Negativ M. genitalium ej detekterad, IC giltig				
	A2	Prov 2	ResistancePlus MG	Positiv	CHANNEL A (KANAL A): 13,35 CHANNEL B (KANAL B): 24,22 CHANNEL C (KANAL C): 24,36	Prov 2 – Positiv M. genitalium detekterad, 23S rRNA-mutation ej detekterad				
	A3	Prov 3	ResistancePlus MG	Positiv	CHANNEL A (KANAL A): 23,32 CHANNEL B (KANAL B): 31,64	Prov 3 – positivt M. genitalium detekterad, 23S rRNA-mutation ej detekterad				
	A4	Prov 4	ResistancePlus MG	Positiv	CHANNEL A (KANAL A): 21,32 CHANNEL B (KANAL B): 23,22 CHANNEL C (KANAL C): 24,30	Prov 4 – positivt M. genitalium, 23S rRNA- mutation detekterad				
	A5	Prov 5	ResistancePlus MG	Positiv	CHANNEL A (KANAL A): 23,16 CHANNEL B (KANAL B): 24,31	Prov 5 – positivt M. genitalium, 23S rRNA- mutation detekterad				
	A6	Prov 6	ResistancePlus MG	Ogiltig	CHANNEL C (KANAL C): 35,02	Prov 6 – Ogiltig IC ogiltig, upprepa test ¹				
!	A7	Prov 7 (Flaggad för att lösas)	ResistancePlus MG	Positiv	CHANNEL A (KANAL A): 26,27 CHANNEL B (KANAL B): 28,11 ² CHANNEL C (KANAL C): 28,92	Prov 7 – positivt ² M. genitalium, 23S rRNA- mutation detekterad				
L	A7	Prov 7 (Lös till obedömbart)	ResistancePlus MG	Ogiltig	CHANNEL A (KANAL A): 26,27 CHANNEL C (KANAL C): 28,92	Prov 7 – ogiltigt ³ Obedömbart resultat, upprepa test ¹				
	B2	Pa (Mutanttyp positiv kontroll)	ResistancePlus MG	Positiv	CHANNEL A (KANAL A): 25,01 CHANNEL B (KANAL B): 24,23	Pa - Positiv Positiv kontroll giltig				
	B3	Pb (Vildtyp positiv kontroll)	ResistancePlus MG	Positiv	CHANNEL (KANAL A): 25,90	Pb – positiv Positiv kontroll giltig				
	B4	N (Negativ kontroll)	ResistancePlus MG	Negativ	CHANNEL C (KANAL C): 26,25	N - Negativ Negativ kontroll giltig				

^ Se Tabell 12 för de olika instrumentens kanalnamn

¹ För IC ogiltiga och obedömbara prov, extrahera och testa igen

² Ett prov med osäker Cq flaggas för lösning med (!)

³ Ett prov med lösning som är obedömbart flaggas med 📀





24.10 Exportera resultat

- Exportera resultat
 - > Välj Exports (Exporter) i arbetsflödesfältet

> Exportera en eller flera av följande rapporttyper: lista över Cq-värden (CSV), Resultat (CSV), Allmän amplifiering CSV eller lämplig LIS-integrationsfil.

- > Välj Exports (Exporter)
- Hämta exporter
 - > Välj Reports (Rapporter) i arbetsflödesfältet
 - > Välj filer och spara
- Eller exportera en anpassad rapport
 - > Exportera Amplification Curve Analysis (PDF) (Amplifieringskurvanalys (PDF))
 - > Välj valfri information som ska inkluderas (diagram, verifieringskedja, resultatöversikt)
 - > Välj önskade rapportinställningar för att anpassa provordern
- Välj Exports (Exporter)
 - > Öppna i Report Viewer (Rapportvisare) för att visa, spara och skriva ut

24.11 Exempeldiagram över kontroll

Följande exempel visar amplifieringskurvor (baslinjekorrigerande amplifieringskurvor) och resultatsöversikt från analysprogramvaran **ResistancePlus MG (7500)** för kontrollprovtyper.

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



KANAL A KANAL B KANAL C

Brunn	Namn	Analys	Resultat	Cq-värden	Totalresultat
B1	Pa	ResistancePlus MG	Positiv	CHANNEL A (KANAL A): 26,36 CHANNEL B (KANAL B): 27,38	Pa - Positiv Positiv kontroll giltig

24.11.2 M. genitalium, 23S rRNA vildtypkontroll (Pb)



KANAL A KANAL B KANAL C





Br	unn	Namn	Analys	Resultat	Cq-värden	Totalresultat
D1	2	Pb	ResistancePlus MG	Positiv	CHANNEL A (KANAL A): 24,30 CHANNEL B (KANAL B): 34,29	Pb - Positiv Positiv kontroll giltig

24.11.3 <u>M. genitalium negativ kontroll (N) (negativt prov)</u>



καναία κ	KANAL C	

Brunn	Namn	Analys	Resultat	Cq-värden	Totalresultat
D12	N	ResistancePlus MG	Negativ	CHANNEL C (KANAL C): 27,65	N - Negativ Negativ kontroll giltig

24.12 Exempel

Följande exempel visar amplifieringskurvor (baslinjekorrigerande amplifieringskurvor) och resultatsöversikt från **ResistancePlus MG** (7500)-analysprogramvaran för olika prover.

24.12.1 Exempel 1. Hög kopia M. genitalium, 23S rRNA vildtypsprov



KANAL A KANAL B KANAL C

Brunn	Namn	Analys	Resultat	Cq-värden	Totalresultat
D2	Prov 12	ResistancePlus MG	Positiv	CHANNEL A (KANAL A): 16,34 CHANNEL B (KANAL B): 26,59 CHANNEL C (KANAL C): 26,00	Prov 12 – positivt M. genitalium detekterad, 23S rRNA-mutation ej detekterad





24.12.2 Exempel 2. Låg kopia M. genitalium, 23S rRNA vildtypsprov



KANAL A KANAL B KANAL C

Brunn	Namn	Analys	Resultat	Cq-värden	Totalresultat
F1	Prov 6	ResistancePlus MG	Positiv	CHANNEL A (KANAL A): 29,30 CHANNEL C (KANAL C): 28,11	Prov 6 – Positiv M. genitalium detekterad, 23S rRNA-mutation ej detekterad

24.12.3 Exempel 3. Hög kopia M. genitalium, 23S rRNA-mutantprov



KANAL A KANAL B KANAL C

Brunn	Namn	Analys	Resultat	Cq-värden	Totalresultat
G3	Prov 9	ResistancePlus MG	Positiv	CHANNEL A (KANAL A): 18,08 CHANNEL B (KANAL B): 22,31 CHANNEL C (KANAL C): 28,03	Prov 9 – Positive (positivt) M. genitalium, 23S rRNA-mutation detekterad

24.12.4 Exempel 4. Låg kopia M. genitalium, 23S rRNA-mutantprov



KANAL A KANAL B KANAL C

Brunn	Namn	Analys	Resultat	Cq-värden	Totalresultat
E3	Prov 21	ResistancePlus MG	Positiv	CHANNEL A (KANAL A): 29,08 CHANNEL B (KANAL B): 29,23 CHANNEL C (KANAL C): 26,13	Prov 21 – Positive (positivt) M. genitalium, 23S rRNA-mutation detekterad





24.12.5 Exempel 5. Negativt prov



KANAL A KANAL B KANAL C

Brunn	Namn	Analys	Resultat	Cq-värden	Totalresultat
E3	Prov 73	ResistancePlus MG	Negativ	CHANNEL C (KANAL C): 29,23	Prov 73 – negativt M. genitalium ej detekterad, IC giltig

24.12.6 Exempel 6. Ogiltigt prov



KANAL A KANAL B KANAL C

Brunn	Namn	Analys	Resultat	Cq-värden	Totalresultat
E3	Prov 35	ResistancePlus MG	Ogiltig	CHANNEL C (KANAL C): 31,16	Prov 35 – Ogiltigt IC ogiltig, gör om test

I det här exemplet är IC-signalen utanför kanalens cut-off. För IC ogiltiga prov, extrahera provet och gör sedan om testet.

24.12.7 Exempel 7. Prov som ska lösas – negativ signal

I detta exempel, flaggades att CHANNEL B (KANAL B) (JOE) ska lösas med programvaran och det föreslås att provet är Negative (Negativt) (Figur 30).

Figur 30. Prov som ska lös	sas så som visas i	analysprogramvarans mer	າy Resolve (Lös)
----------------------------	--------------------	-------------------------	------------------

	Target	Channel	Cq	Curve result	Info	3
	MgPa	FAM	21.32	Positive	M. genitalium detected	
.	23S rRNA mutation	JOE	_	Negative 🗸 💉	Mutant not detected	
	IC	TAMRA	27.31	Positive		

För att avgöra lämplig åtgärd för att lösa, kan ett annat prov eller kontroll ritas för signaljämförelse





- Ref för att rita en positiv referenskurva (tidigare sparad) för CHANNEL B (KANAL B) (JOE) Välj -
- P för att rita en positiv kontroll från körningen Välj -
- för att rita en negativ kontroll från körningen Välj N -





Efter inspektion av amplifieringskurvorna (ovan) kan man se att det inte finns någon amplifiering i kanalen.

Figur 31 nedan.

Resultatet blir löst genom att välja ikonen 🧹 , för att bekräfta det negativa förslaget från programmet. Det lösta resultatet visas i

Figur 31. Löst resultat	så som det visas	i analysprogramvarans men	y Resolve ((Lös))
J				/	

Target	Channel	Cq	Result	Info	3
MgPa	FAM	21.32	Positive	M. genitalium detected	
23S rRNA mutation	JOE	_	Negative	Mutant not detected	Ş
IC	TAMRA	27.31	Positive		





24.12.8 Exempel 8. Prover som ska lösas – obedömbar signal

I detta exempel flaggades att CHANNEL B (KANAL B) (JOE) ska lösas med programvaran och det föreslås att provet är Positive (Positivt) (Figur 32).

Figur 32. Prov som ska lösas så som visas i analysprogramvarans meny Resolve (Lös)

	Target	Channel	Cq	Curve result	Info	9
	MgPa	FAM	26.27	Positive	M. genitalium detected	
6	23S rRNA mutation	JOE	28.11	Positive 🗸 💉	Mutant detected	
	IC	TAMRA	28.92	Positive		

För att avgöra lämplig åtgärd för att lösa, rita ett annat prov eller kontroll för signaljämförelse

- Välj (Ref) för att rita en positiv referenskurva (tidigare sparad) för CHANNEL B (KANAL B) (JOE)

- Välj (P

P_____ för att rita en positiv kontroll från körningen

- Välj N för att rita en negativ kontroll från körningen



Efter inspektion av amplifieringskurvorna (ovan) finns en möjlig amplifiering i kanalen.

Det rekommenderas att man löser till obedömbar genom att välja ikonen och välja alternativet Inconclusive (Obedömbar) från rullgardinsmenyn. Kommentarer kan läggas till i provets verifieringskedja. Provet ska extraheras och testas på nytt. Det lösta resultatet visas i **Figur 33** nedan.

Se Tabell 63, prov 7, för information om hur resultat visas före och efter lösning på fliken Results Overview (Resultatsöversikt).

Target	Channel	Cq	Result	Info	3
MgPa	FAM	26.27	Positive	M. genitalium detected	
23S rRNA mutation	JOE	28.11	Inconclusive	Mutant detected	Ę
IC	TAMRA	28.92	Positive		





25 Ordlista



Europeisk överensstämmelse För *in vitro*-diagnostisk användning



Auktoriserad representant

I Europeiska gemenskapen



Katalognummer



Satskod



Tillverkare



Tillverkningsdatum

Utgångsdatum



Temperaturbegränsning



Innehåller tillräckligt för xxx bestämningar



Europeisk importör



CA

Bedömningsmärke för överensstämmelse i Storbritannien

SpeeDx-produkter kan täckas av en eller flera lokala eller främmande patent. Se <u>www.plexpcr.com/patents</u> för utförlig information om patent.

PlexPCR[®], *ResistancePlus*[®], *PlexPrime*[®] och *PlexZyme*[®] är varumärken som tillhör SpeeDx. Andra copyright och varumärken är respektive ägares egendom.

© Copyright 2024 SpeeDx Pty. Ltd.