



ResistancePlus[®] MG

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



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

Produits accessoires – Logiciel d'analyse

ResistancePlus [®] MG (LC480)	REF 99003
ResistancePlus [®] MG (7500)	REF 99002
ResistancePlus [®] MG (CFX)	REF 99008



MedEnvoy
Prinses Margrietplantsoen 33 – Suite 123
2595 AM La Haye
Les Pays-Bas



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

RÉSERVÉ À UN USAGE PROFESSIONNEL

Non destiné à la vente aux États-Unis

Contenus

1	Description du produit	5
2	Utilisation prévue	5
3	Informations sur les pathogènes	5
4	Contenu du kit.....	6
5	Expédition et stockage	7
6	Avertissements et précautions	8
6.1	Généralités.....	8
6.2	À l'intention des laboratoires.....	8
6.3	Manipulation des échantillons.....	8
6.4	Test.....	8
6.5	Précautions de sécurité	8
6.6	Plug-ins du test : avertissements/précautions/limites	8
7	Produits et consommables associés	9
8	Principe technologique.....	11
9	Aperçu de la procédure.....	13
10	Procédure détaillée	14
10.1	Prélèvement, transport et conservation des échantillons	14
10.1.1	Dispositifs validés pour le prélèvement des échantillons.....	14
10.1.2	Prélèvement, transport et conservation des échantillons d'urine pure	14
10.1.3	Prélèvement, transport et conservation des frottis secs	14
10.1.4	Prélèvement, transport et conservation d'échantillons prélevés à l'aide d'un kit multi-Collect Specimen Collection Kit (Abbott, n° réf. 9K12-01).....	14
10.1.5	Prélèvement, transport et conservation des kits pour prélèvement d'urine Aptima® (Hologic, n° réf. 301040)	15
10.1.6	Prélèvement, transport et conservation des kits pour écouvillonnage Aptima® Multitest (Hologic, n° réf. PRD-03546) 15	
10.1.7	Prélèvement, transport et conservation des kits DeltaSwab ViCUM® 2 mL + écouvillon floqué standard (deltalab, n° réf. 304278) 16	
10.1.8	Prélèvement, transport et conservation des flacons Vacumed® Urine sans conservateur (FL medical, n° réf. 44950) 16	
10.1.9	Prélèvement, transport et conservation des kits Regular FLOQSwab™ dans 1 mL de milieu UTM™ (Copan, n° réf. 359C) 16	
10.1.10	Prélèvement, transport et conservation des milieux PCR cobas® (Roche, n° réf. 06466281190).....	16
10.1.11	Extraits d'échantillon validés.....	17
10.2	Traitement des échantillons.....	17
10.3	Cellules de contrôle interne (CI)	17
10.3.1	Contrôle interne sur MagNA Pure 96	18
10.3.2	Contrôle interne sur MICROLAB STARlet IVD.....	18
10.3.3	Contrôle interne sur QIASymphony® SP.....	18
10.3.4	Contrôle interne sur easyMAG®	19
10.4	Préparation de la PCR en temps réel	20
10.4.1	Préparation du mastermix.....	20
10.4.2	Stabilité du mastermix	20
11	Paramétrage et analyse	21
12	Interprétation des résultats.....	21
13	Limitations.....	22

14	Contrôle qualité.....	22
15	Instructions d'utilisation de <i>ResistancePlus</i> [®] MG Positive Control	23
15.1	Instructions d'utilisation	23
16	Caractéristiques de performance	24
16.1	Performances cliniques	24
16.1.1	Étude clinique 1	24
16.1.2	Étude clinique 2.....	25
16.1.3	Étude clinique 3.....	26
16.1.4	Étude clinique 4.....	28
16.1.5	Étude clinique 5.....	29
16.1.6	Étude clinique 6.....	30
16.1.7	Étude clinique 7.....	32
16.2	Performances analytiques	33
16.2.1	Reproductibilité et répétabilité.....	33
16.2.2	Sensibilité analytique.....	36
16.2.3	Spécificité analytique.....	36
16.2.4	Substances potentiellement perturbatrices	37
16.2.5	Réactivité croisée avec les autres mutations affectant l'ARNr 23S.....	39
17	Service clients et assistance technique	39
18	Références	40
19	Annexe 1 : LightCycler [®] 480 instrument II	41
19.1	Configuration du LightCycler [®] 480 Instrument II (LC480 II).....	41
19.2	Compensation des couleurs pour l'instrument LightCycler [®] 480 II	46
19.3	Interprétation des résultats	48
20	Annexe 2 : Applied Biosystems [®] 7500 Fast.....	49
20.1	Programmation du système Applied Biosystems [®] 7500 Fast.....	49
20.2	Interprétation des résultats	52
21	Annexe 3 : Applied Biosystems [®] 7500 Fast Dx	53
21.1	Programmation du système Applied Biosystems [®] 7500 Fast Dx.....	53
21.2	Interprétation des résultats	56
22	Annexe 4 : Système de PCR en temps réel Bio-Rad CFX96 [™] Dx et CFX96 Touch [™]	57
22.1	Programmation des systèmes de PCR en temps réel CFX96 [™] Dx et CFX96 Touch [™]	57
22.2	Interprétation des résultats	60
23	Annexe A : interprétation des résultats.....	61
23.1	Plate-forme FastFinder : configuration informatique minimale requise.....	61
23.2	Plugin de FastFinder (nouvel utilisateur).....	62
23.3	Dénomination des échantillons.....	63
23.4	Analyse	63
23.5	Résultats	65
23.5.1	Onglet Résumé	65
23.5.2	Onglet Détails.....	67
23.6	Courbe de référence	68
23.7	Exporter des résultats.....	68

23.8	Récupération des analyses autorisées	68
23.9	Graphiques d'exemple de témoins	68
23.9.1	Témoin négatif de <i>M. genitalium</i> (Na) (échantillon négatif).....	69
23.9.2	Contrôle sans matrice (No template control).....	69
23.9.3	<i>M. genitalium</i> , témoin mutant de l'ARNr 23S (Pa).....	70
23.9.4	<i>M. genitalium</i> , témoin de type sauvage de l'ARNr 23S (Pb).....	71
23.10	Exemples	72
23.10.1	Exemple 1. Échantillon <i>M. genitalium</i> , échantillon ARNr 23S de type sauvage avec un nombre faible de copies.....	72
23.10.2	Exemple 2. Échantillon <i>M. genitalium</i> , échantillon ARNr 23S de type sauvage avec un nombre faible de copies.....	73
23.10.3	Exemple 3. Échantillon <i>M. genitalium</i> , échantillon ARNr 23S de type mutant avec un nombre élevé de copies	74
23.10.4	Exemple 4. Échantillon <i>M. genitalium</i> , échantillon ARNr 23S de type mutant avec un nombre faible de copies	75
23.10.5	Exemple 5. Échantillon négatif.....	76
23.10.6	Exemple 6. Échantillon non valide	77
24	Glossaire	78

1 Description du produit

Le kit **ResistancePlus**[®] MG détecte simultanément *M. genitalium* et 4 mutations aux positions 2058 and 2059 du gène codant l'ARNr 23S (numération d'*E. coli*), associées à la résistance à l'azithromycine (antibiotique de la famille des macrolides). Le kit **ResistancePlus**[®] MG est un test PCR multiplexe à 1 puits, en temps réel, comprenant 3 lectures. La lecture 1 indique la présence ou l'absence de *M. genitalium* en détectant le gène MgPa. La lecture 2 indique la présence de la mutation A2059G, A2058G, A2058T ou A2058C du gène codant l'ARNr 23S. La lecture 3 est un contrôle interne permettant de vérifier l'efficacité de l'extraction et l'inhibition par qPCR. Le kit **ResistancePlus**[®] MG utilise **PlexZyme**[®] et **PlexPrime**[®] afin de garantir sa spécificité et ses capacités de multiplexage supérieures. Le test est validé sur des échantillons extraits au moyen des dispositifs MagNA Pure 96 System (Roche), MICROLAB STARlet IVD (Hamilton), QIASymphony[®] SP (QIAGEN), NUCLISENS[®] easyMAC[®] (Biomérieux), avec détection en temps réel sur dispositif Roche LightCycler[®] 480 Instrument II (LC480 II), ainsi que sur les systèmes de détection par PCR en temps réel Applied Biosystems[®] 7500 Fast (7500 Fast), Applied Biosystems[®] 7500 Fast Dx (7500 Fast Dx), Bio-Rad CFX96[™] Dx (CFX96 Dx) et CFX96 Touch[™] (CFX96 Touch).

2 Utilisation prévue

Le kit **ResistancePlus**[®] MG est un dispositif de diagnostic *in vitro*. Il s'agit d'un test PCR qualitatif multiplexé en temps réel permettant d'identifier *M. genitalium* et de détecter 4 mutations du gène codant l'ARNr 23S (A2058G, A2059G, A2058T et A2058C, numération d'*Escherichia coli*), associées à une résistance à l'azithromycine (antibiotique de la famille des macrolides). Il est destiné à contribuer au diagnostic de *M. genitalium* et détecte les mutations associées à la résistance à l'azithromycine chez *M. genitalium*. Il convient de l'utiliser en association avec les informations cliniques et les autres résultats biologiques du patient.

Le kit **ResistancePlus**[®] MG peut être utilisé avec les échantillons suivants prélevés chez des patients aussi bien symptomatiques qu'asymptomatiques: urine masculine et féminine et frottis vaginaux.

Un résultat négatif n'exclut pas une infection par *M. genitalium* et ne confirme pas l'existence d'une sensibilité à l'azithromycine, les échecs thérapeutiques pouvant être dus à d'autres mécanismes.

Le kit **ResistancePlus**[®] MG est destiné à être utilisé dans un cadre professionnel, par exemple hôpitaux et laboratoires de référence ou d'État. Il n'est pas destiné à être utilisé en tant qu'auto-test, à domicile ou dans les cabinets médicaux.

3 Informations sur les pathogènes

M. genitalium est une petite bactérie qui se trouve dans le tractus urogénital humain. *M. genitalium* s'associe à une vaste panoplie d'infections sexuellement transmissibles (IST). Chez l'homme, elle constitue la deuxième cause la plus fréquente d'urétrite non gonococcique (UNG) et s'associe également à la prostatite, l'épididymite et la balanoposthite, une inflammation du gland et du prépuce¹. Chez la femme, elle s'associe à la cervicite et aux maladies inflammatoires pelviennes (MIP), notamment à l'endométrite (inflammation de l'endomètre) et à la salpingite (inflammation des trompes de Fallope)^{1,2,3}.

L'azithromycine est fréquemment utilisée pour le traitement des infections à *M. genitalium* et pour la prise en charge syndromique des IST telles que l'UNG et la cervicite. L'azithromycine fait partie de la famille des macrolides, une classe d'antibiotiques. Elle agit en se liant à l'ARNr 23S pour inhiber la synthèse protéique. Certaines mutations ponctuelles du gène codant pour l'ARNr 23S, à savoir A2058G, A2059G, A2058T, A2058C et A2059C (numération d'*E. coli*), s'associent à un échec thérapeutique et/ou une résistance *in vitro* à l'azithromycine^{4,5}. Les mutations les plus fréquentes sont A2058G et A2059G : d'après une étude récente, elles contribuent à 89 % des mutations responsables de la résistance aux macrolides⁶.

4 Contenu du kit

Tableau 1. Contenu des kits <i>ResistancePlus</i> [®] MG				
Couleur du capuchon	Contenu	Description	N° réf.: 20001L-01 (100 réactions)	N° réf.: 2000125 (25 réactions)
Bleu	<i>Plex</i> Mastermix, 2 x	Mastermix contenant tous les composants nécessaires à la qPCR : dNTP, MgCl ₂ , ADN polymérase et tampon	1 x 1 mL	1 x 250 µL
Marron	Mélange MG+23S, 20x	Mélange contenant les oligonucléotides [^] nécessaires à l'amplification et la détection de <i>M. genitalium</i> et des mutations affectant l'ARNr 23S	1 x 100 µL	1 x 25 µL
Blanc	Mélange de contrôle 1, 20 x	Mélange contenant les oligonucléotides [^] nécessaires à l'amplification et la détection aux fins des tests de contrôle interne sur LC480	1 x 100 µL	1 x 25 µL
Rouge	Cellules de contrôle interne [#]	Cellules de contrôle interne, contenant une matrice ADN pour contrôle interne permettant de vérifier l'efficacité de l'extraction et de l'amplification	1 x 500 µL	1 x 100 µL
Incolore	Eau sans nucléase	Eau pour PCR	1 x 1 mL	1 x 1 mL

Conserver les tubes de modèles séparément des matrices d'oligonucléotides, à savoir dans la pièce dédiée à la manipulation des matrices ou des acides nucléiques

[^] Les oligonucléotides se présentent sous la forme de couples d'amorces pour PCR (y compris amorces *PlexPrime*[®]), d'enzymes *PlexZyme*[®] et de sondes fluorescentes

Tableau 2. Contenu des kits <i>ResistancePlus</i> [®] MG ₍₅₅₀₎				
Couleur du capuchon	Contenu	Description	N° réf.: 2000201 (100 réactions)	N° réf.: 2000225 (25 réactions)
Bleu	<i>Plex</i> Mastermix, 2 x	Mastermix contenant tous les composants nécessaires à la qPCR: dNTP, MgCl ₂ , ADN polymérase et tampon	1 x 1 mL	1 x 250 µL
Marron	Mélange MG+23S, 20x	Mélange contenant les oligonucléotides [^] nécessaires à l'amplification et la détection de <i>M. genitalium</i> et des mutations affectant l'ARNr 23S	1 x 100 µL	1 x 25 µL
Blanc	Mélange de contrôle 2, 20 x	Mélange contenant les oligonucléotides [^] nécessaires à l'amplification et la détection aux fins des tests de contrôle interne sur 7500 Fast et 7500 Fast Dx	1 x 100 µL	1 x 25 µL
Rouge	Cellules de contrôle interne [#]	Cellules de contrôle interne, contenant une matrice ADN pour contrôle interne permettant de vérifier l'efficacité de l'extraction et de l'amplification	1 x 500 µL	1 x 100 µL
Incolore	Eau sans nucléase	Eau pour PCR	1 x 1 mL	1 x 1 mL

Conserver les tubes de modèles séparément des matrice d'oligonucléotides, à savoir dans la pièce dédiée à la manipulation des matrice ou des acides nucléiques

[^] Les oligonucléotides se présentent sous la forme de couples d'amorces pour PCR (y compris amorces *PlexPrime*[®]), d'enzymes *PlexZyme*[®] et de sondes fluorescentes

Tableau 3. Contenu des kits <i>ResistancePlus</i> [®] MG ₍₆₇₅₎				
Couleur du capuchon	Contenu	Description	N° réf.: 2000301 (100 réactions)	N° réf.: 2000325 (25 réactions)
Bleu	<i>Plex</i> Mastermix, 2 x	Mastermix contenant tous les composants nécessaires à la qPCR : dNTP, MgCl ₂ , ADN polymérase et tampon	1 x 1 mL	1 x 250 µL
Marron	Mélange MG+23S, 20x	Mélange contenant les oligonucléotides [^] nécessaires à l'amplification et la détection de <i>M. genitalium</i> et des mutations affectant l'ARNr 23S	1 x 100 µL	1 x 25 µL
Blanc	Mélange de contrôle 3, 20 x	Mélange contenant les oligonucléotides [^] nécessaires à l'amplification et la détection aux fins des tests de contrôle interne sur CFX96 Dx et CFX96 Touch	1 x 100 µL	1 x 25 µL
Rouge	Cellules de contrôle interne [#]	Cellules de contrôle interne, contenant une matrice ADN pour contrôle interne permettant de vérifier l'efficacité de l'extraction et de l'amplification	1 x 500 µL	1 x 100 µL
Incolore	Eau sans nucléase	Eau pour PCR	1 x 1 mL	1 x 1 mL

Conserver les tubes de modèles séparément des matrice d'oligonucléotides, à savoir dans la pièce dédiée à la manipulation des matrice ou des acides nucléiques

[^] Les oligonucléotides se présentent sous la forme de couples d'amorces pour PCR (y compris amorces *PlexPrime*[®]), d'enzymes *PlexZyme*[®] et de sondes fluorescentes

5 Expédition et stockage

- Les composants des kits *ResistancePlus*[®] MG sont expédiés sur glace carbonique ou packs de gel réfrigérant. Après réception, tous les composants doivent être conservés à une température de -25 °C à -15 °C. Il est recommandé de ne pas effectuer plus de 15 cycles de congélation/décongélation.
- Dans les bonnes conditions de conservation et de manipulation, l'activité du kit est préservée jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Ne pas utiliser après la date de péremption.
- Les incidents graves doivent être signalés à SpeedX à l'adresse tech@speedx.com.au

6 Avertissements et précautions

6.1 Généralités

- Usage réservé au diagnostic *in vitro*.
- Lire attentivement le manuel avant utilisation. Afin de garantir la fiabilité des résultats, suivre scrupuleusement les procédures telles qu'elles sont décrites. Tout écart par rapport à ces procédures peut affecter les performances du test.
- Les utilisateurs doivent avoir été dûment formés à l'utilisation du test **ResistancePlus**[®] MG.
- Les incidents graves doivent être signalés au fabricant et à l'autorité compétente de l'État membre où réside l'utilisateur et/ou le patient.

6.2 À l'intention des laboratoires

- Il est recommandé de réaliser la préparation/l'extraction des échantillons, la préparation du mastermix, l'ajout des échantillons et le thermocyclage dans des espaces physiquement séparés. Au minimum, l'instrument PCR devrait dans l'idéal être placé dans une pièce distincte des espaces de préparation des réactifs.
- Il convient de suivre les précautions habituellement appliquées au sein du laboratoire. Lors de la manipulation des réactifs, porter un équipement de protection personnel adapté, par exemple gants, lunettes de protection et blouse de laboratoire.
- Les échantillons cliniques peuvent contenir des organismes pathogènes. Traiter tous les échantillons biologiques comme potentiellement infectieux et suivre les procédures de sécurité en vigueur dans votre établissement lors de la manipulation de produits chimiques et d'échantillons biologiques.
- Suivre les procédures de votre établissement en matière d'élimination des déchets dangereux pour éliminer correctement les échantillons, les réactifs et les autres matériaux potentiellement contaminés.

6.3 Manipulation des échantillons

- Les échantillons doivent être prélevés, transportés et conservés conformément aux techniques de laboratoire standard ou aux instructions qui accompagnent les kits de prélèvement.

6.4 Test

- Les précautions de base pour prévenir la contamination des réactions PCR sont, notamment : l'utilisation de filtres pour pointes de pipettes stériles, l'utilisation d'une nouvelle pointe de pipette pour chaque pipetage et la séparation des étapes du flux de travail.
- Les tests PCR sont sensibles à la contamination par les produits de PCR précédents. Ne jamais ouvrir les récipients de réaction une fois la PCR achevée.
- Les réactifs du test contiennent un tampon IDTE qui peut provoquer des irritations oculaires graves. Il est recommandé de manipuler les réactifs dans une zone bien ventilée et de porter un équipement de protection personnel adapté, par exemple gants, lunettes de protection et blouse de laboratoire.

6.5 Précautions de sécurité

- Les fiches de données de sécurité (FDS) sont disponibles sur demande. Contactez tech@speedx.com.au pour plus d'informations.

6.6 Plug-ins du test : avertissements/précautions/limites

- Lorsqu'il est utilisé avec l'instrument PCR correspondant, le logiciel SpeedX contrôle uniquement l'analyse des données brutes générées par le kit de test. Il ne contrôle pas la préparation des échantillons, le paramétrage de l'équipement ni la mise à disposition du traitement.
- Les utilisateurs doivent être dûment formés à l'utilisation du logiciel d'analyse **ResistancePlus**[®] MG. L'accès au logiciel doit être restreint à chaque utilisateur individuel assigné.
- Il est recommandé d'implémenter un système d'authentification des utilisateurs pour accéder au logiciel, ainsi que des mesures de cybersécurité, telles qu'un logiciel antivirus ou un pare-feu, au sein de l'infrastructure informatique utilisée pour son utilisation.
- En cas de détection d'un incident de cybersécurité, tel qu'un accès non autorisé ou une attaque par ransomware, contacter tech@speedx.com.au pour obtenir de l'aide.

7 Produits et consommables associés

Matériel de contrôle positif

- Kit de contrôle positif **ResistancePlus**[®] MG (SpeedX, Cat. n° 95001)

Consommables de laboratoire divers

- Gants et blouses de laboratoire propres
- Agitateur vortex
- Centrifugeuse de paillasse pour tubes 0,5 mL et 1,5 mL
- Micropipettes
- Pointes de pipettes stériles résistantes aux aérosols
- Tubes de 0,5 mL et 1,5 mL (compatibles PCR)
- Tubes de 2,0 mL (pour prédilution des cellules de contrôle interne)

Pour le MagNA Pure 96 Instrument

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

Pour l'instrument MICROLAB STARlet

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

Pour l'instrument QIASymphony[®] SP

- Phosphate Buffered Saline (PBS) (Tampon phosphate salin) 1x
- Cartouches de préparation d'échantillon, 8 puits (Qiagen, réf. 997002)
- Manchons 8 barreaux (Qiagen, réf. 997004)
- Pointes de filtre, 200 µL et 1500 µL (Qiagen, réf. 990332 et 997024)
- Tubes 2 mL (Sarstedt, réf. 72.639 ou 72.694)
- Tubes en polystyrène 14 mL (Corning, réf. 352051)
- Kit DSP Virus/Pathogen Mini (QIAGEN, Cat no 937036)

Pour le NucliSENS® easyMAG® instrument

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

Pour le LightCycler® 480 Instrument II et l'analyseur

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

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

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

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

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

Dispositifs de prélèvement d'échantillons

- Kit de prélèvement d'échantillons Multi-Collect (Abbott, Cat. n° 9K12-01)
- Kit de prélèvement d'urine Aptima® (Hologic, Cat. n° 301040)
- Kit de prélèvement d'échantillon par frottis unisexe Aptima® (Hologic, Cat. n° 301041)
- DeltaSwab ViCUM® 2 mL + écouvillon floqué standard (deltalab, Cat. n° 304278)
- Urine Vacumed® sans conservateur (FL medical, Cat. n° 44950)
- FLOQSwab™ standard dans 1 mL de milieu UTM™ (Copan Cat. n° 359C)
- Milieu cobas® PCR (Roche, Cat. n° 06466281190)

8 Principe technologique

La PCR en temps réel (qPCR) sert à amplifier et détecter les acides nucléiques de pathogènes spécifiquement ciblés. **PlexPCR[®]** est une technologie de qPCR utilisant les enzymes **PlexZyme[®]** qui détectent et signalent la présence du produit amplifié en générant un signal fluorescent (**Figure 1**). Les amorces **PlexPrime[®]** servent à l'amplification spécifique de séquences mutées, associée à la détection de mutations spécifiques avec **PlexZyme[®]** (**Figure 2**).

Les enzymes **PlexZyme[®]** sont des complexes ADN catalytiques composés de deux oligonucléotides d'ADN, appelés « enzymes partielles ». Chaque enzyme partielle possède une région spécifique à la cible, un noyau catalytique et un région universelle de liaison à la sonde. En présence du produit cible, les deux enzymes partielles se lient de manière adjacente afin de former la **PlexZyme[®]** active, qui possède l'activité nécessaire pour cliver une sonde marquée. Ce clivage sépare le fluophore et les quenchers, produisant un signal fluorescent qui peut être surveillé en temps réel. Les enzymes **PlexZyme[®]** offrent davantage de spécificité que les autres technologies de détection, étant donné que la liaison de deux enzymes partielles est nécessaire pour permettre la détection. Les enzymes **PlexZyme[®]** sont également des enzymes à renouvellement multiple, il est donc possible de cliver plusieurs sondes lors de chaque cycle de PCR, ce qui aboutit à un signal fort et sensible. Les tests **PlexZyme[®]** sont hautement sensibles et spécifiques. Ils sont idéalement adaptés à la détection multiplexée d'agents pathogènes.

Les amorces **PlexPrime[®]** possèdent trois régions fonctionnelles. La région 5' longue ancre l'amorce à une région spécifique, tandis que la région 3' courte cible de manière sélective l'extension à partir de la base mutante. Une séquence d'insertion se situe entre les régions 5' et 3' et agit comme une structure de liaison qui insère une séquence indépendante de la cible dans l'amplicon résultant, augmentant ainsi la pression sélective de la région 3'. Dans le multiplexe, chaque amorce **PlexPrime[®]** est conçue pour cibler une base mutante spécifique et intègre une séquence d'insertion unique, produisant ainsi des séquences d'amplicon mutantes distinctes. Contrairement aux autres technologies de détection par sonde, l'enzyme **PlexPrime[®]** peut être superposée à l'amorce **PlexZyme[®]** pour cibler l'amplicon mutant spécifique contenant la base mutante et la séquence d'insertion incorporée. Cette association unique de sondes **PlexPrime[®]** et d'enzymes **PlexZyme[®]** permet l'amplification spécifique de séquences mutantes ainsi que la détection sensible et spécifique dans le multiplexe.

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

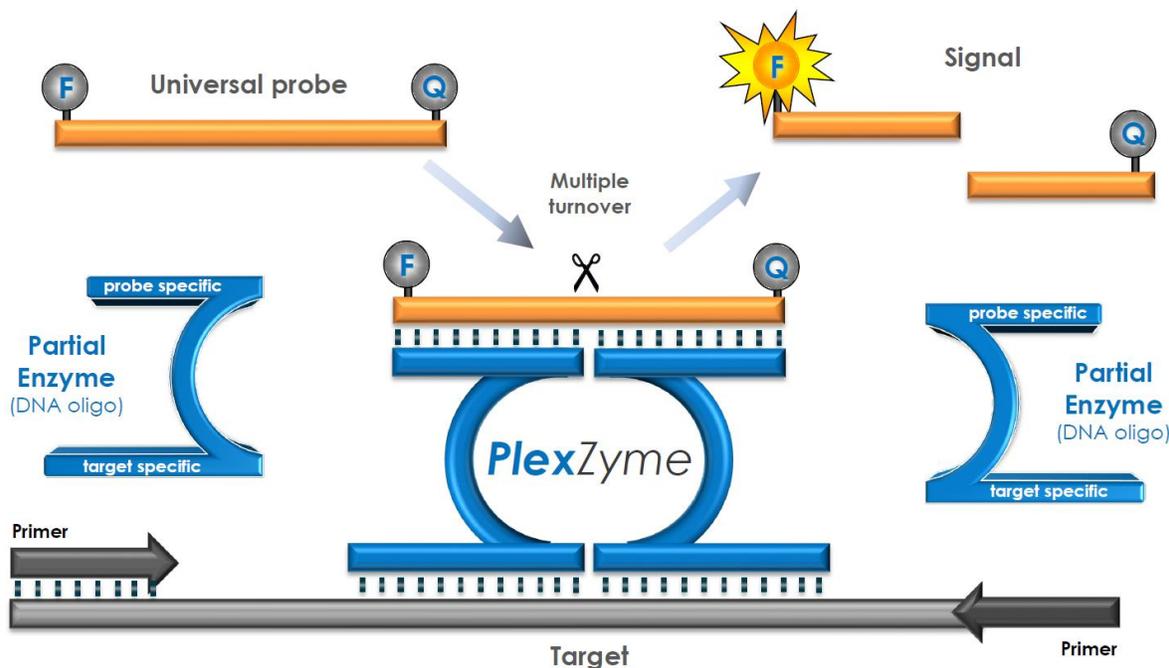
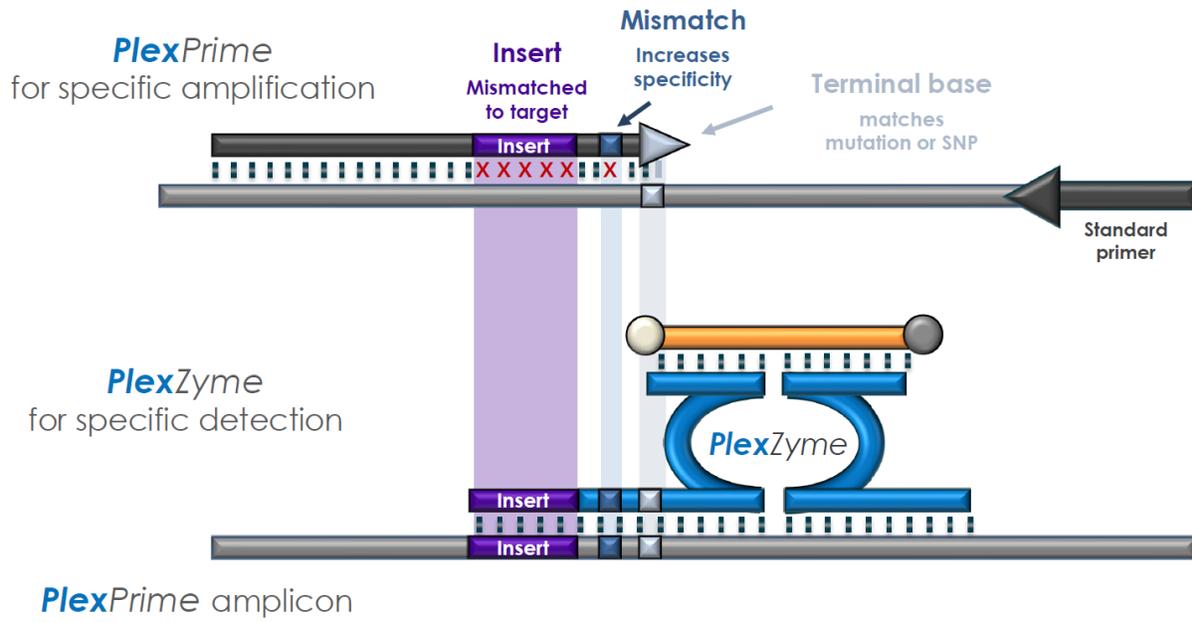
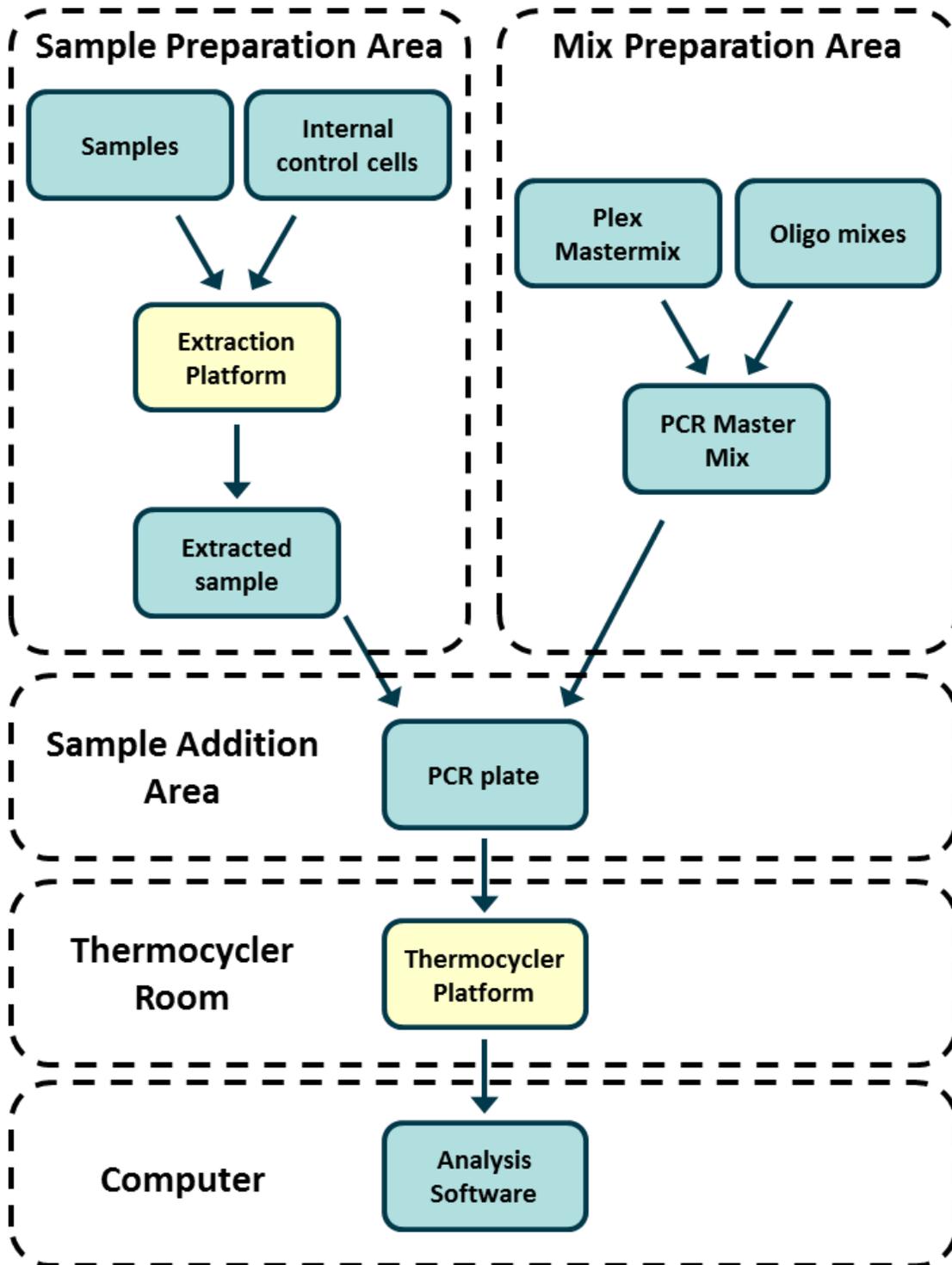


Figure 2. Représentation schématique de l'amorce *PlexPrime*[®] associée à la détection par *PlexZyme*[®]. L'amorce *PlexPrime*[®] amplifie spécifiquement la séquence mutante et les enzymes *PlexZyme*[®] détectent spécifiquement l'amplicon.



9 Aperçu de la procédure



10 Procédure détaillée

Remarque : les réactifs fournis sont indiqués en italiques, suivis de la couleur du capuchon entre parenthèses.

10.1 Prélèvement, transport et conservation des échantillons

Les échantillons d'urine masculine et féminine et de frottis vaginaux, prélevés auprès de patients symptomatiques ou non, doivent être prélevés, transportés et conservés conformément aux techniques de laboratoire standard ou aux instructions qui accompagnent les kits de prélèvement.

10.1.1 Dispositifs validés pour le prélèvement des échantillons

En cas de prélèvement, de conservation ou de transport inadéquat ou inapproprié des échantillons, les résultats du test risquent d'être faussés. Il est fortement recommandé d'être dûment formé au prélèvement d'échantillons afin de garantir leur qualité et leur stabilité.

Les dispositifs de prélèvement d'échantillons validés pour le kit **ResistancePlus**[®] MG sont énumérés ci-dessous, avec quelques conseils relatifs aux instructions du fabricant du dispositif en matière de prélèvement, de manipulation et de transport. Ces conseils n'ont pas vocation à remplacer ou dépasser les instructions du fabricant. Se référer systématiquement aux instructions de prélèvement fournies par le fabricant du dispositif afin d'appliquer les méthodes appropriées.

Avant tout prélèvement, les membres dûment formés du personnel doivent s'assurer de bien comprendre le dispositif et la méthodologie. Il convient de vérifier au minimum les éléments suivants : types d'échantillons, volume suffisant, procédure(s), matériel nécessaire pour le prélèvement, préparation du patient et instructions de manipulation et de conservation.

10.1.2 Prélèvement, transport et conservation des échantillons d'urine pure

1. Pour le prélèvement autonome d'urine par le patient, il est conseillé d'utiliser un flacon stérile spécialement prévu à cet usage, ne contenant aucun conservateur ni milieu de transport.
2. Le patient doit recueillir 20 à 50 ml de ses premières urines émises, puis fermement reboucher ou revisser le capuchon.
3. Il est recommandé d'emballer doublement le flacon d'urine lors de son transport, en utilisant des lingettes absorbantes. La température de conservation de l'urine dépend des temps de traitement prévus.

10.1.3 Prélèvement, transport et conservation des frottis secs

Les échantillons vaginaux peuvent être prélevés par frottis sec, réalisé par le médecin ou la patiente. Les méthodes de prélèvement étant variables, consulter la notice fournie par le fabricant.

10.1.4 Prélèvement, transport et conservation d'échantillons prélevés à l'aide d'un kit multi-Collect Specimen Collection Kit (Abbott, n° réf. 9K12-01)

Les instructions pour le prélèvement et le transport d'échantillons d'urine et de frottis vaginaux prélevés à l'aide d'un kit multi-Collect Specimen Collection Kit (Abbott, n° réf. 9K12-01) sont résumées ci-dessous.

10.1.4.1 Prélèvement, transport et conservation des échantillons d'urine

1. Le patient doit s'abstenir d'uriner pendant au moins une heure avant le prélèvement de l'échantillon.
2. Éliminer l'écouvillon : il n'est pas requis pour le prélèvement d'urine.
3. Le patient doit prélever les 20 à 30 premiers millilitres des urines émises (première partie du jet) dans un flacon prévu à cet usage.
4. Dévisser le capuchon du tube de transport en faisant attention à ne pas renverser le tampon de transport qu'il contient.
5. Manipuler soigneusement le capuchon et le tube afin d'éviter toute contamination.
6. Transférer l'urine du flacon de prélèvement dans le tube de transport à l'aide de la pipette de transfert en plastique, jusqu'à atteindre le niveau indiqué par la fenêtre transparente de l'étiquette sur le flacon de transport. Si cela n'est pas possible, prélever un nouvel échantillon. Ne pas sur-remplir. Il pourrait être nécessaire d'exercer un peu plus d'une pression complète sur le bulbe de la pipette de transfert pour obtenir le volume d'urine requis.
7. Reboucher soigneusement le tube de transport. Vérifier que le tube est fermement bouché.
8. Apposer une étiquette adhésive d'identification de l'échantillon, mentionnant la date de prélèvement, sur le tube de transport. Faire attention à ne pas cacher la fenêtre de remplissage sur le tube de transport.
9. Après le recueil, transporter et conserver le tube de transport à une température comprise entre 2 et 30 °C pendant une durée maximale de 14 jours. Si une conservation plus longue est nécessaire, conserver à une température de 10 °C ou moins pendant 90 jours maximum.

10.1.4.2 Prélèvement, transport et conservation des échantillons de frottis vaginaux

1. Éliminer la pipette de transfert jetable : elle n'est pas requise pour le prélèvement d'un frottis vaginal.
2. Retirer l'écouvillon stérile de son emballage, en faisant attention à ne pas toucher l'embout de l'écouvillon et à ne le poser sur aucune surface.
3. Insérer l'embout blanc de l'écouvillon dans l'ouverture du vagin à une profondeur de 5 cm environ.
4. Pivoter délicatement l'écouvillon pendant 15 à 30 secondes contre les parois du vagin.
5. Retirer doucement l'écouvillon.
6. Manipuler soigneusement le capuchon et le tube afin d'éviter toute contamination.
7. Dévisser le capuchon du tube de transport et placer immédiatement l'écouvillon dans le tube, l'embout blanc vers le bas.
8. Casser soigneusement l'écouvillon au niveau de la ligne marquée sur la tige, en faisant attention à ne pas déverser le contenu.
9. Reboucher le tube de transport. Vérifier que le tube est fermement bouché.
10. Apposer une étiquette adhésive d'identification de l'échantillon, mentionnant la date de prélèvement, sur le tube de transport.
11. Après le recueil, transporter et conserver le tube de transport à une température comprise entre 2 et 30 °C pendant une durée maximale de 14 jours. Si une conservation plus longue est nécessaire, conserver à une température de 10 °C ou moins pendant 90 jours maximum.

10.1.5 Prélèvement, transport et conservation des kits pour prélèvement d'urine Aptima® (Hologic, n° réf. 301040)

Les instructions de prélèvement et de transport des échantillons d'urine masculine et féminine avec les kits de prélèvement d'urine Aptima® sont résumées ci-dessous (Hologic, n° réf. 301040). Veuillez noter que les performances cliniques de ce dispositif de prélèvement ont été démontrées uniquement sur des échantillons extraits sur l'instrument MagNA Pure 96, en utilisant le kit MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Large Volume. Voir les rubriques 10.2 et 16.1.5 pour plus d'informations.

1. Pour le prélèvement autonome d'urine par le patient, il est conseillé d'utiliser un flacon stérile spécialement prévu à cet usage, ne contenant aucun conservateur ni milieu de transport.
2. Indiquer au patient de prélever 20 à 30 mL des premières urines émises dans le flacon de prélèvement. Les patientes de sexe féminin ne doivent pas faire de toilette intime (région labiale) avant de prélever l'échantillon.
3. Utiliser le matériel inclus dans le kit de prélèvement d'urine Aptima® pour transférer 2 ml d'urine à l'aide de la pipette dans le tube de transport débouché. Le niveau d'urine doit être compris entre les lignes de remplissage noires indiquées sur le tube de transport. L'urine doit être transférée du flacon à urine stérile transparent au tube à essai Aptima dans les 24 heures qui suivent le prélèvement.
4. Reboucher fermement le tube de transport.
5. Après le prélèvement, les échantillons d'urine traités contenus dans les tubes de transport Aptima doivent être transportés et conservés à une température comprise entre 2 et 30 °C jusqu'à analyse. Pour plus d'informations sur les conditions optimales de conservation, voir les instructions du fabricant.

10.1.6 Prélèvement, transport et conservation des kits pour écouvillonnage Aptima® Multitest (Hologic, n° réf. PRD-03546)

Les instructions pour le prélèvement et le transport de frottis vaginaux prélevés à l'aide d'un kit pour écouvillonnage Aptima® Multitest (Hologic, n° réf. PRD-03546) sont résumées ci-dessous. Veuillez noter que les performances cliniques de ce dispositif de prélèvement ont été démontrées uniquement sur des échantillons extraits sur l'instrument MagNA Pure 96, en utilisant le kit MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Large Volume. Voir les rubriques 10.2 et 16.1.5 pour plus d'informations.

10.1.6.1 Prélèvement, transport et conservation des échantillons de frottis vaginaux

1. Ouvrir partiellement l'emballage de l'écouvillon. Retirer l'écouvillon. Ne pas toucher l'embout doux ni poser l'écouvillon. Si l'embout tombe ou s'il est posé ou touché, utiliser un nouveau kit Aptima Multitest.
2. Maintenir l'écouvillon en plaçant l'index et le pouce au milieu de la tige, de manière à couvrir la ligne indiquée. Ne pas tenir la tige de l'écouvillon en-dessous de cette ligne.
3. Insérer doucement l'écouvillon dans le vagin, jusqu'à une profondeur d'environ 5 cm après l'introitus, et pivoter délicatement dans les sens horaire pendant 10 à 30 secondes. S'assurer que l'écouvillon touche les parois du vagin, de manière à ce qu'il absorbe l'humidité présente, puis retirer l'écouvillon sans toucher la peau.
4. Dévisser le capuchon du tube tout en maintenant l'écouvillon sans le changer de main. Ne pas renverser le contenu du tube. Si le contenu du tube se renverse, utiliser un nouveau kit pour écouvillonnage Aptima Multitest.
5. Placer immédiatement l'écouvillon dans le tube de transport, de manière à ce que la ligne se trouve en haut du tube.
6. Casser soigneusement la tige de l'écouvillon au niveau de la ligne en appuyant contre la paroi du tube.
7. Jeter immédiatement la partie supérieure de la tige.
8. Reboucher fermement le tube. Après le recueil, transporter et conserver l'écouvillon dans son tube de transport à une température comprise entre 2 et 30 °C, jusqu'à analyse.

10.1.7 Prélèvement, transport et conservation des kits DeltaSwab ViCUM® 2 mL + écouvillon floqué standard (deltalab, n° réf. 304278)

Les instructions pour le prélèvement et le transport de frottis vaginaux prélevés à l'aide d'un kit DeltaSwab ViCUM® 2 mL + écouvillon floqué standard (deltalab, n° réf. 304278) sont résumées ci-dessous.

1. Ouvrir le sachet en tirant vers des côtés opposés à l'aide deux mains.
2. Agiter doucement le tube.
3. Ouvrir le sachet à soufflet et prélever l'échantillon à l'aide de l'écouvillon.
4. Ouvrir le tube avec l'autre main et placer l'écouvillon à l'intérieur, de sorte qu'il soit immergé dans le milieu.
5. Aligner la partie cassable de l'écouvillon avec la partie supérieure du tube en exerçant une légère pression vers le bas sur l'écouvillon. Casser l'écouvillon au niveau de la cassure en l'appuyant sur le rebord interne du tube.
6. Jeter le morceau de tige restant, revisser fermement le capuchon et remuer l'échantillon afin de le diluer dans le milieu.
7. Après le recueil, transporter et conserver l'écouvillon dans son tube de transport à une température comprise entre 4 et 25 °C, jusqu'à analyse.

10.1.8 Prélèvement, transport et conservation des flacons Vacumed® Urine sans conservateur (FL medical, n° réf. 44950)

Les instructions de prélèvement et de transport des échantillons d'urine masculine et féminine avec les flacons de prélèvement Vacumed® Urine sans conservateur (FL medical, n° réf. 44950).

1. Ouvrir le capuchon du flacon à urine et le poser à l'envers sur une surface propre.
2. Ne pas toucher les surfaces internes du flacon et du capuchon.
3. Recueillir l'échantillon d'urine. Remplir le flacon aux ¾ de sa capacité.
4. Remettre le capuchon en place et le serrer fermement en tournant dans le sens horaire.
5. Remuer doucement l'échantillon.
6. Soulever partiellement l'étiquette de protection (ne pas l'enlever entièrement).
7. Insérer le tube à essai en exerçant une légère pression. Le tube doit rester connecté jusqu'à ce qu'il soit plein (fin du débit).
8. Retirer le tube à essai et recoller intégralement l'étiquette de protection.
9. Conserver le tube à essai à une température de 4 à 25 °C, jusqu'à analyse.

10.1.9 Prélèvement, transport et conservation des kits Regular FLOQSwab™ dans 1 mL de milieu UTM™ (Copan, n° réf. 359C)

Les instructions pour le prélèvement et le transport de frottis vaginaux prélevés à l'aide d'un kit Regular FLOQSwab™ dans 1 ml de milieu UTM™ (Copan, n° réf. 359C) sont résumées ci-dessous.

1. Ouvrir l'emballage du kit UTM et retirer le tube à essai contenant le milieu ainsi que la pochette interne contenant l'écouvillon stérile.
2. Retirer l'écouvillon stérile de la pochette et prélever l'échantillon clinique. S'assurer que l'embout de l'écouvillon entre en contact uniquement avec le site de prélèvement afin d'éviter tout risque de contamination.
3. Une fois l'échantillon recueilli, dévisser et retirer le capuchon du tube à essai en prêtant attention à ne pas renverser le milieu.
4. Insérer l'écouvillon dans le tube à essai, jusqu'à ce que la cassure soit au même niveau que l'ouverture du tube.
5. Plier et casser l'écouvillon au niveau de la cassure, en gardant le tube à essai à l'écart du visage, et jeter la partie en excès.
6. Revisser le capuchon sur le tube à essai et le sceller hermétiquement.
7. Traiter l'échantillon contenu dans l'UTM dans les 48 heures suivant le prélèvement, en conservant le tube à essai à une température comprise entre 2 et 25 °C.
8. Passer à l'agitateur vortex pendant 20 secondes avant traitement afin de favoriser la libération de l'échantillon par l'écouvillon et d'homogénéiser le milieu.

10.1.10 Prélèvement, transport et conservation des milieux PCR cobas® (Roche, n° réf. 06466281190)

Les instructions de prélèvement et de transport des échantillons d'urine masculine et féminine dans le milieu PCR cobas® (Roche, n° réf. 06466281190) sont résumées ci-dessous.

1. Mélanger et transférer l'urine dans le tube de milieu PCR cobas® à l'aide d'une pipette jetable (non fournie). Remarque : l'urine peut être conservée à une température comprise entre 2 °C et 30 °C pendant 24 heures maximum avant transfert dans le tube de milieu PCR cobas®.
2. Le volume d'urine nécessaire est atteint lorsque son niveau est compris entre les deux lignes noires marquées sur l'étiquette du tube.
3. Reboucher fermement le tube de milieu PCR cobas®.
4. Retourner le tube à 5 reprises pour mélanger. L'échantillon est prêt pour le transport et l'analyse.
5. Transporter et conserver le tube de milieu PCR cobas® contenant l'urine stabilisée à une température comprise entre 2 °C et 30 °C.

10.1.11 Extraits d'échantillon validés

Les extraits d'échantillon dont l'utilisation a été validée sont les suivants:

- cobas® x480 (protocole CT/NG)

10.2 Traitement des échantillons

Le kit **ResistancePlus**® MG a été validé sur les instruments d'extraction énumérés dans le **Tableau 4**.

Voir la **rubrique 10.3** pour les instructions d'utilisation du contrôle interne.

Tableau 4. Protocoles d'extraction validés				
Instrument	Kit d'extraction	Volume d'échantillon	Protocole	Volume de dilution
MagNA Pure 96 ^a	Kit MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume	200 µL	Pathogen Universal 200	50 µL ou 100 µL
MagNA Pure 96 ^a	Kit MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Large Volume	1 000 µL [^]	Viral NA Universal LV 1000 3.1	100 µL
MICROLAB STARlet IVD ^b	Kit STARMag 96 x 4 Universal Cartridge (Seegene)	200 µL	Ajout de 10 µl de cellules de contrôle interne par échantillon Sélectionner « Pause before PCR setup » (Mise en pause avant paramétrage de la PCR) pour réaliser uniquement l'extraction d'échantillon	100 µL
QIASymphony SP ^c	Kit DSP Virus/Pathogen Mini	200 µL	Complex200_V6_DSP	110 µL
NucliSENS® easyMAG ^{®d}	Réactifs NucliSENS® easyMAG®	Écouvillon de 200 µL	Generic 2.01; Flux de travail « On-board »	100 µL
		1 000 µL d'urine	Generic 2.01; Flux de travail « Off-board »	100 µL

^a Voir la rubrique 10.3.1 pour les instructions d'utilisation du contrôle interne avec MagNA Pure 96

^b Voir la rubrique 10.3.2 pour les instructions d'utilisation du contrôle interne avec STARlet IVD

^c Voir la rubrique 10.3.3 pour les instructions d'utilisation du contrôle interne avec QIASymphony SP

^d Voir la rubrique 10.3.4 pour les instructions d'utilisation du contrôle interne avec NucliSENS® easyMAG®

[^] Les performances cliniques des échantillons prélevés avec les kits Aptima® ont été prouvées uniquement avec ce protocole de prélèvement. Veuillez consulter la rubrique 16.1.5 pour obtenir plus d'informations.

10.3 Cellules de contrôle interne (CI)

Ce kit comprend un contrôle interne pour surveiller l'efficacité de l'extraction et l'inhibition par qPCR. Le test de contrôle interne se présente sous la forme du **mélange de contrôle (BLANC)** et des **cellules de contrôle interne (ROUGE)**. Le **mélange de contrôle** est ajouté au mastermix PCR (**Tableau 11**). Les **cellules de contrôle interne** contiennent le modèle ADN de contrôle interne. Les **cellules de contrôle interne** sont diluées et traitées comme détaillé ci-dessous, en fonction des différents instruments d'extraction. Le modèle ADN de contrôle interne est donc extrait en même temps que l'échantillon et co-amplifié pendant la réaction.

10.3.1 Contrôle interne sur MagNA Pure 96

Diluer les *cellules de contrôle interne (ROUGE)* à 1 pour 200 dans 1x PBS (**Tableau 5**). (Ajuster le volume comme requis en appliquant le même facteur de dilution (voir le manuel du kit d'extraction afin de déterminer le volume minimal pour le nombre désiré d'échantillons). Les cellules de contrôle interne diluées sont chargées dans le tube de contrôle interne de MagNA Pure 96:

- Pour le kit MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume (protocole Pathogen Universal 200), un volume de 20 µL est automatiquement ajouté à chaque échantillon (par défaut).
- Pour le kit MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Large Volume (protocole Viral NA Universal LV 1000 3.1), l'échantillon est divisé et traité dans deux puits séparés de la cartouche MagNA Pure 96 Processing Cartridge. Au total, 40 µL de cellules de contrôle interne diluées sont automatiquement ajoutés à chaque échantillon (20 µL par puits de la cartouche de traitement).

Remarque: NE PAS conserver les cellules de contrôle interne diluées.

Tableau 5. Dilution des cellules de contrôle interne sur MagNA Pure 96 (dilution à 1:200)			
Cellules de contrôle interne (ROUGE) (µL)	1x PBS (µL)	Volume total (µL)	Volume ajouté à l'échantillon (µL)
18	3582	3600	20

10.3.2 Contrôle interne sur MICROLAB STARlet IVD

Diluer les *cellules de contrôle interne (ROUGE)* à 1 pour 20 dans 1x PBS (**Tableau 6**). Ajuster le volume comme requis en appliquant le même facteur de dilution (voir le manuel du kit d'extraction afin de déterminer le volume minimal pour le nombre désiré d'échantillons). Les cellules de contrôle interne diluées sont chargées dans un tube de 2 mL et placées sur le plateau de réactifs, 10 µL étant automatiquement ajoutés à chaque échantillon.

Remarque: NE PAS conserver les cellules de contrôle interne diluées.

Tableau 6. Dilution des cellules de contrôle interne sur MICROLAB STARlet IVD (dilution à 1:20)			
Cellules de contrôle interne (ROUGE) (µL)	1x PBS (µL)	Volume total (µL)	Volume ajouté à l'échantillon (µL)
50	950	1000	10

10.3.3 Contrôle interne sur QIAAsymphony® SP

Diluer les *cellules de contrôle interne (ROUGE)* à 1 pour 50 dans 1x PBS (**Tableau 7**). Ajuster le volume comme requis en appliquant le même facteur de dilution, en fonction du nombre désiré d'échantillons.

Remarque: NE PAS conserver les cellules de contrôle interne diluées.

Tableau 7. Dilution des cellules de contrôle interne sur QIAAsymphony® SP (dilution à 1:50)		
Cellules de contrôle interne (ROUGE) (µL)	1x PBS (µL)	Volume total (µL)
40	1950	2000

Les *cellules de contrôle interne* diluées sont ensuite utilisées pour préparer un mélange contrôle interne + ARN entraîneur + tampon AVE, comme montré dans le **Tableau 8** ci-dessous. Ajuster le volume comme requis en appliquant le même facteur de dilution en fonction du nombre désiré d'échantillons (voir le manuel du kit d'extraction afin de déterminer le volume minimal pour le nombre désiré d'échantillons). Le mélange contrôle interne + ARN entraîneur + tampon AVE doit être préparé immédiatement avant de commencer l'analyse.

Le mélange contrôle interne + ARN entraîneur + tampon AVE est ajouté à un tube qui est placé sur un support de tube et chargé dans l'emplacement A du tiroir à tubes de QIAAsymphony® SP. Par défaut, 120 µL de mélange sont ajoutés à chaque échantillon.

Tableau 8. Préparation du mélange contrôle interne + ARN entraîneur + tampon AVE pour QIAAsymphony SP

Type de tube	Nombre d'échantillons	Volume de cellules de CI diluées (µL)	ARN entraîneur (µL)	Tampon AVE (µL)	Volume total (µL)
-	1	10	3	107	120
2 ml	1 + volume vide [^]	40	12	428	480
14 ml	1 + volume vide [#]	60	18	642	720

[^] Pour un tube de 2 mL, 3 échantillons supplémentaires (360 µL) sont nécessaires pour tenir compte du volume vide.

[#] Pour un tube de 14 mL, 5 échantillons supplémentaires (600 µL) sont nécessaires pour tenir compte du volume vide.

10.3.4 Contrôle interne sur easyMAG[®]

Diluer les *cellules de contrôle interne (ROUGE)* à 1 pour 200 dans 1x PBS (**Tableau 9**) Ajuster le volume comme requis en appliquant le même facteur de dilution. Préparer un « pré-mélange » de cellules de contrôle interne diluées et de silice magnétique NucliSENS[®] easyMAG[®] pour le nombre désiré d'échantillons (**Tableau 10**). Chaque échantillon nécessite 100 µL de pré-mélange de silice.

Remarque: NE PAS conserver les cellules de contrôle interne diluées.

Tableau 9. Dilution des cellules de contrôle interne sur NucliSENS[®] easyMAG[®] (dilution à 1:200)

Cellules de contrôle interne (ROUGE) (µL)	1x PBS (µL)	Volume total (µL)	Facteur de dilution
10	1990	2000	200

Tableau 10. Pré-mélange de silice magnétique NucliSENS[®] easyMAG[®] et de cellules de contrôle interne diluées

Nombre d'échantillons	Volume de cellules de CI diluées (µL)	Volume de silice magnétique (µL)	Volume ajouté à l'échantillon (µL)
1	50	50	100

En fonction du type d'échantillon, le flux de travail « on-board » ou « off-board » sera utilisé. Le flux de travail « off-board » est utilisé pour une récupération optimale d'acide nucléique dans les échantillons d'urine. Voir le manuel d'utilisateur NucliSENS[®] easyMAG[®] pour plus d'informations.

Flux de travail « on-board » (écouvillons)

Transférer les échantillons dans les récipients à échantillons.

Transférer les récipients sur easyMAG.

Programmer les requêtes d'extraction suivantes :

Protocol: Generic 2.0.1 (pour la version 2.0 du logiciel)

Matrix: Other

Volume (mL): 0,200

Eluate (µL): 100 µL

Type: Primary

Après la lyse on-board, ajouter 100 µL de pré-mélange de silice à chaque échantillon.

Poursuivre le processus d'extraction.

Flux de travail « off-board » (urine)

Centrifuger brièvement le tube de tampon de lyse NucliSENS et ajouter 1 000 µL d'urine. Vortexer le tube.

Laisser le mélange reposer à température ambiante pendant 10 minutes.

Après la lyse, transférer les lysats dans les récipients à échantillon et les charger sur easyMAG.

Ajouter 100 µL de pré-mélange de silice à chaque échantillon.

Programmer les requêtes d'extraction suivantes :

Protocol: Generic 2.0.1 (pour la version 2.0 du logiciel)

Matrix: Other

Volume (mL): 1000

Eluate (µL): 100 µL

Type: Lysed

Poursuivre le processus d'extraction.

10.4 Préparation de la PCR en temps réel

Remarque : décongeler entièrement les réactifs et les mélanger soigneusement en les passant brièvement à l'agitateur vortex avant utilisation.

Voir **Tableau 1 – Tableau 3** pour la description du contenu des kits.

10.4.1 Préparation du mastermix

Préparer le mastermix comme détaillé dans le **Tableau 11**.

Pour une réaction d'un volume de 20 µL, 15 µL de mastermix et 5 µL d'échantillon sont nécessaires. Pipeter le mastermix sur le plateau PCR, puis ajouter l'échantillon extrait à la réaction.

Un contrôle sans modèle (NTC, no template control) doit être inclus à chaque cycle d'analyses. Pour la réaction NTC, ajouter de l'eau sans nucléase (**INCOLORE**) à la place de l'échantillon.

Sceller le plateau, centrifuger et transférer dans le thermocycleur.

Tableau 11. Master Mix		
Réactif	Concentration	Volume pour une réaction de 20 µL (µL)
Eau sans nucléase (INCOLORE)	S.O.	3,0
Plex Mastermix (BLEU)	2 x	10,0
Mélange MG+23S (MARRON)	20 x	1,0
Mélange de contrôle* (BLANC)	20 x	1,0
Volume total (µL)		15,0
Ajouter 5 µL d'échantillon pour un volume final de 20 µL.		

* Le mélange de contrôle inclus à chaque kit est spécifique à l'instrument utilisé ; voir **Tableau 1 – Tableau 3** pour déterminer le mélange de contrôle à utiliser

10.4.2 Stabilité du mastermix

Le mastermix peut être préparé par lots et conservé à une température de -20 °C pendant 4 semaines au maximum, ou 4 °C pendant 1 semaine maximum.

11 Paramétrage et analyse

Pour plus d'informations sur le paramétrage et l'analyse, voir les **rubriques 19 - 22**.

Le kit **ResistancePlus®** MG possède trois canaux de détection pour *M. genitalium*, les mutations affectant l'ARNr 23SA et le contrôle interne (**Tableau 12**).

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

12 Interprétation des résultats

Le logiciel d'analyse **ResistancePlus®** MG est nécessaire pour l'analyse des données. Bien que les amorces **PlexPrime®** offrent une spécificité supérieure à celle des autres amorces allèles-spécifiques, une certaine amplification non spécifique peut être observée dans les tests de détection des mutations affectant l'ARNr 23S lorsque l'échantillon présente une concentration élevée en ARNr 23S de *M. genitalium* de type sauvage. Le logiciel d'analyse **ResistancePlus®** MG automatise l'interprétation des résultats de l'amplification et simplifie le flux de travail. Pour les instructions d'utilisation du logiciel d'analyse, voir la **rubrique 23**.

Voir le **Tableau 13** pour déterminer le logiciel d'analyse adapté à chaque instrument de PCR en temps réel. Le logiciel d'analyse peut être fourni sur demande. Contactez tech@speedx.com.au pour plus d'informations.

Tableau 13. Logiciel d'analyse <i>ResistancePlus®</i> MG		
N° réf.	Logiciel d'analyse*	Instrument de PCR en temps réel
99003	ResistancePlus® MG (LC480)	LC480 II
99002	ResistancePlus® MG (7500)	7500 Fast et 7500 Fast Dx
99008	ResistancePlus® MG (CFX)	CFX96 Dx et CFX96 Touch

* Consultez le site Internet <https://plexpcr.com/products/sexually-transmitted-infections/resistanceplus-mg/#resources> pour vous assurer d'utiliser la version la plus récente du logiciel d'analyse.

13 Limitations

- Le test **ResistancePlus**[®] MG détecte le gène *MgPa* de *M. genitalium* et les mutations aux positions 2058 et 2059 du gène codant l'ARNr 23S (A2058G, A2059G, A2058T et A2058C, numération d'*E. coli*), associées à la résistance à l'azithromycine (antibiotique de la famille des macrolides).
- La réaction croisée du test **ResistancePlus**[®] MG avec *M. genitalium* et les séquences mutantes A2059C affectant l'ARNr 23S a été démontrée.
- Les études de performances cliniques réalisées avec **ResistancePlus**[®] MG, résumées dans la rubrique 16.1, comprennent des tests réalisés sur de l'urine masculine et féminine ainsi que sur des frottis vaginaux. D'autres types d'échantillons ont également été testés, notamment des écouvillons rectaux, cervicaux, endocervicaux, urétraux, péniens, du méat pévien et pharyngés. Toutefois, les données en faveur de l'utilisation de ces types d'échantillons sont limitées à ce jour.
- Le test **ResistancePlus**[®] MG doit être réalisé exclusivement par des professionnels dûment formés à la procédure et conformément aux présentes instructions d'utilisation.
- La fiabilité des résultats dépend du transport, de la conservation et du traitement adéquats des échantillons. Le non-respect des procédures à l'une de ces étapes peut entraîner des résultats erronés.
- Le test **ResistancePlus**[®] MG est un test qualitatif qui ne fournit pas de valeurs quantitatives ni d'informations sur la charge organique.
- Les résultats des tests doivent être corrélés aux antécédents médicaux, aux données épidémiologiques, aux résultats biologiques et aux autres informations à disposition du médecin.
- La prévalence de *M. genitalium* et la résistance aux macrolides se répercute sur les valeurs prédictives positives et négatives du test.
- La détection de marqueurs de résistance aux antibiotiques n'est pas forcément liée à l'expression phénotypique d'un gène.
- Compte tenu du fait que les acides nucléiques peuvent rester présents après un traitement antimicrobien approprié, les résultats du test ne permettent pas de prédire l'échec ou la réussite thérapeutique.
- Un résultat négatif n'exclut pas la possibilité d'une infection et peut découler d'une procédure erronée de prélèvement d'échantillon, d'une erreur technique, de la présence d'inhibiteurs, d'une confusion entre échantillons ou d'un faible nombre d'organismes dans l'échantillon clinique.
- Un dépistage de marqueurs de résistance négatif ne garantit pas la sensibilité des micro-organismes détectés ; en effet, des marqueurs de résistance non mesurés par le test ou d'autres mécanismes potentiels d'antibiorésistance peuvent être présents.
- Des résultats faux positifs sont possibles en cas de contamination croisée avec les organismes cibles, leurs acides nucléiques ou le produit amplifié.

14 Contrôle qualité

Le kit **ResistancePlus**[®] MG comprend un contrôle interne pour surveiller l'efficacité de l'extraction et l'inhibition par qPCR (rubrique 10.3).

Il est recommandé d'utiliser le kit **ResistancePlus**[®] MG Positive Control (n° réf. 95001) comme matériel de contrôle positif pour l'amplification de l'acide nucléique. Voir la rubrique 15 pour les instructions d'utilisation des **ResistancePlus**[®] MG Positive Controls. Il est recommandé d'utiliser un échantillon négatif confirmé en tant que contrôle négatif.

15 Instructions d'utilisation de *ResistancePlus*[®] MG Positive Control

Le kit *ResistancePlus*[®] MG Positive Control contient du matériel de contrôle positif pour les mutations affectant l'ARNr 23S de *M. genitalium* et un ARNr 23S de *M. genitalium* de type sauvage (**Tableau 14**).

Tableau 14. Contenu du kit <i>ResistancePlus</i> [®] MG Positive Control (n° réf. 95001)			
Couleur du capuchon	Contenu	Description	Quantité (10 réactions)
Incolore	MG, ARNr 23S de type sauvage	Modèle de contrôle positif pour la détection de <i>M. genitalium</i> , ARNr 23S de type sauvage	1 x 50 µL
Vert	MG, ARNr 23S A2058G	Modèle de contrôle positif pour la détection de <i>M. genitalium</i> , ARNr 23S avec mutation A2058G	1 x 50 µL
Rouge	MG, ARNr 23S A2059G	Modèle de contrôle positif pour la détection de <i>M. genitalium</i> , ARNr 23S avec mutation A2059G	1 x 50 µL
Bleu	MG, ARNr 23S A2058T	Modèle de contrôle positif pour la détection de <i>M. genitalium</i> , ARNr 23S avec mutation A2058T	1 x 50 µL
Jaune	MG, ARNr 23S A2058C	Modèle de contrôle positif pour la détection de <i>M. genitalium</i> , ARNr 23S avec mutation A2058C	1 x 50 µL

15.1 Instructions d'utilisation

Préparer les réactions qPCR comme décrit dans la **rubrique 10.4** en utilisant un contrôle positif comme échantillon.

Le logiciel d'analyse *ResistancePlus*[®] MG est nécessaire pour l'analyse des données. Voir **rubrique 23.9** pour des exemples de résultats.

16 Caractéristiques de performance

16.1 Performances cliniques

16.1.1 Étude clinique 1

Une étude prospective-rétrospective a été menée au Royal Women's Hospital (RWH), Melbourne, Australie. Les échantillons ont été prélevés entre mai et juin 2016. 144 échantillons ont été sélectionnés sur la base des résultats biologiques pour être inclus dans l'étude. Ces 144 échantillons comprenaient 84 échantillons d'urine masculine, 33 échantillons d'urine féminine, 14 frottis vaginaux et 13 frottis cervico-vaginaux. Afin de déterminer les performances du kit **ResistancePlus**[®] MG, les résultats de la détection de *M. genitalium* ont été comparés aux résultats d'analyses biologiques obtenus à l'aide d'un dépistage d'ARNr 16S par qPCR selon une méthode bien établie, utilisée par le RWH pour les diagnostics de routine²; la détection de la mutation ARNr 23S a également été comparée à un séquençage de Sanger³. Le kit **ResistancePlus**[®] MG a été analysé sur LC480 II après extraction d'échantillon sur instrument MagNA Pure 96 à l'aide d'un kit MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume selon le protocole Universal Pathogen 200. Pour la détection de *M. genitalium*, une référence composite a été utilisée pour les échantillons aberrants en utilisant une troisième réaction qPCR ciblant le gène MgPa⁴. Pour la détection de l'ARNr 23S mutant, le résultat obtenu par séquençage de Sanger a été considéré comme véridique. Les résultats résolus ainsi que la sensibilité et la spécificité du kit **ResistancePlus**[®] MG pour la détection de *M. genitalium* et de l'ARNr 23S mutant sont indiqués dans le **Tableau 15**. Deux échantillons ont été exclus en raison de résultats non valides au contrôle interne (1 échantillon d'urine féminine et 1 d'urine masculine). L'analyse de la détection de la mutation affectant l'ARNr 23S a porté uniquement sur les échantillons pour lesquels le statut de la mutation a pu être déterminé. L'analyse des résultats en fonction du type d'échantillon est présentée dans le **Tableau 16**. L'analyse des mutations affectant l'ARNr 23S est présentée dans le **Tableau 17**.

Tableau 15. Évaluation clinique du kit *ResistancePlus*[®] MG (étude clinique 1)

		Détection de <i>M. genitalium</i> par qPCR, ARNr 16S		Détection de l'ARNr 23S mutant Séquençage		
		Résultat positif	Résultat négatif	Mutant	Type sauvage	
ResistancePlus [®] MG	Résultat positif	83	0	Mutant détecté	52	2
	Résultat négatif	1	58 [^]	Mutant non détecté	2	21
Sensibilité		98,8 % (IC à 95 % : 93,5-100,0 %)		Sensibilité		96,3 % (IC à 95 % : 87,3-99,6 %)
Spécificité		100,0 % (IC à 95 % : 93,8-100,0 %)		Spécificité		91,3 % (IC à 95 % : 72,0-98,9 %)

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

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

Tableau 16. Analyse des résultats cliniques en fonction des échantillons^{*} (étude clinique 1)

Échantillon	Résultat attendu pour le dépistage de <i>M. genitalium</i> : négatif	Résultat attendu pour le dépistage de <i>M. genitalium</i> : ARNr 23S type sauvage	Résultat attendu pour le dépistage de <i>M. genitalium</i> : ARNr 23S mutant
Urine masculine	28/28	8/10 ¹	41/42 ¹
Urine féminine	12/13	11/11	4/6 ²
Frottis vaginal	8/8	1/1	2/2 ³
Frottis cervico-vaginal	9/9	1/1	4/4 ⁴

Mutant : mutation affectant l'ARNr 23S aux positions A2058G, A2059G, A2058T et A2058C (numération d'*E. coli*) ; Type sauvage : absence de mutation sur ces positions

^{*} 2 échantillons d'urine féminine, 3 échantillons d'urine masculine et 1 frottis vaginal ont été exclus en raison d'un échec du séquençage et de l'impossibilité de déterminer le statut de la mutation

¹ Urine masculine : 2 erreurs de qualification de *M. genitalium* en type sauvage suite à la détection de *M. genitalium* mutant, 18 A2058G, 20 A2059G et 3 A2058T correctement détectés ; 1 erreur de qualification en A2058G suite à la non-détection de *M. genitalium*

² Urine féminine : 1 A2058G, 3 A2059G correctement détectés ; 2 erreurs de qualification en A2059G suite à la détection de *M. genitalium* sans mutation

³ Frottis vaginal : 2 A2059G correctement détectés

⁴ Frottis cervico-vaginal : 3 A2058G, 1 A2059G correctement détectés

Tableau 17. Analyse des mutations affectant l'ARNr 23S de *M. genitalium* (étude clinique 1)

Résultat de référence [^]	Résultat <i>ResistancePlus</i> [®] MG
Type sauvage	21/33 ¹
A2058G	22/23 ²
A2059G	26/28 ³
A2058T	3/3

[^] Uniquement pour les échantillons positifs à *M. genitalium*

¹ Type sauvage 2 erreurs de qualification pour des échantillons d'urine masculine suite à la détection de *M. genitalium* mutant

² A2058G : 1 erreur de qualification pour des échantillons d'urine masculine suite à l'absence de détection de *M. genitalium*

³ A2059G : 2 erreurs de qualification pour des échantillons d'urine féminine suite à l'absence de détection de *M. genitalium* mutant

16.1.2 Étude clinique 2

Un sous-ensemble d'échantillons extraits issus de l'étude 1 ont été testés sur l'instrument ABI 7500 Fast. Les résultats ont été comparés aux résultats cliniques d'un dépistage d'ARNr 16S par qPCR (Twin 2011) et par séquençage de Sanger (Twin 2012). Les échantillons ayant donné des résultats aberrants pour la détection de *M. genitalium* ont été re-testés au moyen d'un dépistage d'ARNr 16S par qPCR (Twin 2011) en raison d'une suspicion de dégradation de l'échantillon. Les résultats résolus ainsi que la sensibilité et la spécificité du kit *ResistancePlus*[®] MG₍₅₅₀₎ pour la détection de *M. genitalium* et de l'ARNr 23S mutant sont indiqués dans le **Tableau 18**. L'analyse de la détection de la mutation affectant l'ARNr 23S a porté uniquement sur les échantillons pour lesquels le statut de la mutation a pu être déterminé.

Tableau 18. Évaluation clinique du kit *ResistancePlus*[®] MG₍₅₅₀₎ (étude clinique 2)

		Détection de <i>M. genitalium</i> par qPCR, ARNr 16S		Détection de l'ARNr 23S mutant Séquençage		
		Résultat positif	Résultat négatif	Mutant	Type sauvage	
<i>ResistancePlus</i>[®] MG	Résultat positif	79	0 [^]	Mutant détecté	47	1
	Résultat négatif	2	43 [#]	Mutant non détecté	4	19
Sensibilité		97,5 % (IC à 95 % : 91,4- 99,7 %)		Sensibilité		92,2 % (IC à 95 % : 81,1- 97,8 %)
Spécificité		100,0 % (IC à 95 % : 91,8- 100,0 %)		Spécificité		95,0 % (IC à 95 % : 75,1- 99,9 %)

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

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

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

16.1.3 Étude clinique 3

Une étude clinique rétrospective a été menée à Canterbury Health Laboratories (CHL), Christchurch, Nouvelle-Zélande, sur des échantillons caractérisés et archivés, datant de 2010-2016, prélevés au moyen du kit multi-Collect Specimen Collection (Abbott). Les 137 échantillons comprenaient 110 échantillons d'urine masculine, 11 échantillons d'urine féminine et 15 frottis vaginaux, 1 frottis vaginal/urétral et 1 frottis vaginal/cervical. Afin de déterminer les performances du kit *ResistancePlus*[®] MG, les résultats de la détection de *M. genitalium* ont été comparés aux résultats d'analyses biologiques obtenus à l'aide d'un dépistage de MgPa par qPCR selon une méthode bien établie, utilisée par le CHL pour les diagnostics de routine (Jensen 2004) ; la détection de la mutation ARNr 23S a été comparée à un séquençage de Sanger (Jensen 2008). Le kit *ResistancePlus*[®] MG a été analysé sur LC480 II après extraction d'échantillon sur instrument MagNA Pure 96 à l'aide d'un kit MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume selon le protocole Universal Pathogen 200. Pour la détection de *M. genitalium*, le dépistage de MgPa de routine a été renouvelé pour les échantillons aberrants. Pour la détection de l'ARNr 23S mutant, le résultat obtenu par séquençage de Sanger a été considéré comme véridique. La sensibilité et la spécificité du kit *ResistancePlus*[®] MG pour la détection de *M. genitalium* et de l'ARNr 23S mutant sont indiquées dans le **Tableau 19**. Un échantillon a été exclu en raison d'un résultat non valide au contrôle interne. L'analyse de la détection de la mutation affectant l'ARNr 23S a porté uniquement sur les échantillons pour lesquels le statut de la mutation a pu être déterminé. L'analyse des résultats en fonction du type d'échantillon est présentée dans le **Tableau 20**. L'analyse des mutations affectant l'ARNr 23S est présentée dans le **Tableau 21**.

Tableau 19. Évaluation clinique du kit <i>ResistancePlus</i> [®] MG (étude clinique 3)						
		Détection de <i>M. genitalium</i> par qPCR, ARNr 16S		Détection de l'ARNr 23S mutant Séquençage		
		Résultat positif	Résultat négatif	Mutant	Type sauvage	
<i>ResistancePlus</i> [®] MG	Résultat positif	76	0	Mutant détecté	52	1
	Résultat négatif	3	57 [^]	Mutant non détecté	5	19
Sensibilité		96,2 % (IC à 95 % : 89,3-99,2 %)		Sensibilité		91,2 % (IC à 95 % : 80,7-97,1 %)
Spécificité		100,0 % (IC à 95 % : 93,7-100,0 %)		Spécificité		95,0 % (IC à 95 % : 75,1-99,9 %)

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

[^] Le tableau répertorie les résultats résolus

Tableau 20. Analyse des résultats cliniques en fonction des échantillons (étude clinique 3)			
Échantillon	Résultat attendu pour le dépistage de <i>M. genitalium</i> : négatif	Résultat attendu pour le dépistage de <i>M. genitalium</i> : type sauvage	Résultat attendu pour le dépistage de <i>M. genitalium</i> : ARNr 23S mutant
Urine masculine	45/45	17/18 ¹	38/45 ¹
Urine féminine	4/4	1/1	6/6 ²
Frottis vaginal	6/6	1/1	8/8 ³
Frottis urétral/vaginal :	1/1	0/0	0/0
Frottis vaginal/cervical :	1/1	0/0	0/0

Mutant : mutation affectant l'ARNr 23S aux positions A2058G, A2059G, A2058T et A2058C (numérotation d'*E. coli*) ; Type sauvage : absence de mutation sur ces positions

¹ Urine masculine : 1 erreur de qualification de *M. genitalium* en type sauvage suite à la détection de *M. genitalium* mutant, 4 A2058G, 32 A2059G, 1 A2058T et 1 A2058C correctement détectés ; 1 erreur de qualification en A2058G et 1 en A2059G suite à la non-détection de *M. genitalium*, 3 erreurs de détection en A2058G et 2 en A2059G suite à l'absence de détection de *M. genitalium* mutant

² Urine féminine : 2 A2058G, 4 A2059G correctement détectés

³ Frottis vaginal : 1 A2058G, 7 A2059G correctement détectés

Tableau 21. Analyse des mutations affectant l'ARNr 23S de <i>M. genitalium</i> (étude clinique 3)	
Résultat de référence [^]	Résultat <i>ResistancePlus</i> [®] MG
Type sauvage	19/20 ¹
A2058G	7/10 ²
A2059G	43/45 ³
A2058T	1/1
A2058C	1/1

[^] Uniquement pour les échantillons positifs à *M. genitalium*

¹ Type sauvage 1 erreur de qualification pour un échantillon d'urine masculine suite à la détection de *M. genitalium* mutant

² A2058G : 3 erreurs de qualification pour des échantillons d'urine masculine suite à l'absence de détection de *M. genitalium* mutant

³ A2059G : 2 erreurs de qualification pour des échantillons d'urine masculine suite à l'absence de détection de *M. genitalium* mutant

16.1.4 Étude clinique 4

Une étude clinique rétrospective a été réalisée à l'hôpital universitaire Vall d'Hebron (HUVH), Barcelone, Espagne, afin d'évaluer les performances du kit *ResistancePlus*[®] MG₍₆₇₅₎ pour la détection de *M. genitalium* et des mutations associées à la résistance à l'azithromycine dans des échantillons recueillis rétrospectivement entre décembre 2017 et avril 2018. Les frottis ont été prélevés au moyen de DeltaSwab ViCUM[®] (Deltalab, Espagne), tandis que les échantillons d'urine ont été recueillis au moyen de Vacumed[®] Urine (FL medical, Italie). Les 86 échantillons comprenaient 46 échantillons urinaires et 40 frottis vaginaux. Les échantillons ont été extraits sur STARlet IVD (Hamilton) et testés sur CFX96 Dx (Bio-Rad). Pour évaluer les performances du kit, la détection de *M. genitalium* a été comparée aux résultats obtenus avec Allplex[™] STI Essential (Seegene) et avec les kits *ResistancePlus*[®] MG (SpeedX) sur LC480 II, aussi bien pour la détection de *M. genitalium* que pour le statut des mutations affectant l'ARNr 23S. La sensibilité et la spécificité du kit *ResistancePlus*[®] MG₍₆₇₅₎ pour la détection de *M. genitalium* mutant par comparaison avec Allplex[™] STI Essential (Seegene) sont indiquées dans le **Tableau 22**. La sensibilité et la spécificité de *ResistancePlus*[®] MG₍₆₇₅₎ par comparaison avec *ResistancePlus*[®] MG sont présentées dans le tableau **Tableau 23**. L'analyse des résultats en fonction du type d'échantillon est présentée dans le **Tableau 24**.

Tableau 22. Comparaison du kit <i>ResistancePlus</i> [®] MG ₍₆₇₅₎ kit et d'Allplex [™] STI essentiel (étude clinique 4)			
		Détection de <i>M. genitalium</i>	
		Allplex [™] STI Essential	
		Résultat positif	Résultat négatif
<i>ResistancePlus</i> [®] MG ₍₆₇₅₎	Résultat positif	40	0
	Résultat négatif	0	46
Sensibilité		100,0 % (IC à 95 % : 91,2-100,0 %)	
Spécificité		100,0 % (IC à 95 % : 92,3-100,0 %)	

Tableau 23. Évaluation clinique du kit <i>ResistancePlus</i> [®] MG ₍₆₇₅₎ (étude clinique 4)							
		Détection de <i>M. genitalium</i>		Détection de l'ARNr 23S mutant [#]			
		<i>ResistancePlus</i> [®] MG (LC480 II)		<i>ResistancePlus</i> [®] MG (LC480 II)			
		Résultat positif	Résultat négatif	Mutant détecté	Mutant non détecté		
<i>ResistancePlus</i> [®] MG ₍₆₇₅₎	Résultat positif	40	0	Mutant détecté	20		
	Résultat négatif	0	46	Mutant non détecté	1		
Sensibilité		100,0 % (IC à 95 % : 91,2-100,0 %)		Sensibilité		100,0 % (IC à 95 % : 83,2-100,0 %)	
Spécificité		100,0 % (IC à 95 % : 92,3-100,0 %)		Spécificité		100,0 % (IC à 95 % : 83,2-100,0 %)	

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

[#] 1 échantillon, ayant obtenu un résultat de séquençage mixte (type sauvage/mutant), a été exclu de l'analyse

Tableau 24. Analyse des résultats cliniques en fonction des échantillons (étude clinique 4)			
Échantillon	Résultat attendu pour le dépistage de <i>M. genitalium</i> : négatif	Résultat attendu pour le dépistage de <i>M. genitalium</i> : ARNr 23S type sauvage	Résultat attendu pour le dépistage de <i>M. genitalium</i> : ARNr 23S mutant
Urine masculine	26/26	5/5	15/15
Frottis vaginal	20/20	15/15	5/5

16.1.5 Étude clinique 5

Une étude clinique rétrospective a été réalisée au Royal Women's Hospital (RWH), Melbourne, Australie, sur des échantillons d'urine et des écouvillons prélevés à l'aide d'Aptima[®] entre juin et novembre 2017. Des échantillons patient assortis ont été recueillis sous forme d'urine pure (échantillon de routine) ou à l'aide du kit de prélèvement d'urine Aptima[®] (Hologic), ou bien sous forme d'écouvillon sec (échantillon de routine) ou à l'aide du kit d'écouvillonnage Aptima[®] Unisex Swab Specimen Collection (Hologic). Les 147 échantillons comprenaient 122 échantillons urinaires et 25 frottis vaginaux. Afin de déterminer les performances des échantillons prélevés avec Aptima[®] et analysés avec un kit *ResistancePlus*[®] MG, la détection de *M. genitalium* et d'ARNr 23S mutant a été comparée aux résultats diagnostiques obtenus avec un kit *ResistancePlus*[®] MG (SpeeDx) sur un échantillon de routine. Les échantillons prélevés avec Aptima[®] ont été analysés sur LC480 II après extraction d'échantillon sur instrument MagNA Pure 96 à l'aide d'un kit MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume selon le protocole Universal Pathogen 1000. Les résultats diagnostiques obtenus par le RWH sur échantillon assorti testé à l'aide d'un kit *ResistancePlus*[®] MG (SpeeDx) ont été considérés comme véridiques pour *M. genitalium*. Pour la détection de l'ARNr 23S mutant, le résultat a été comparé au résultat diagnostique et au séquençage de Sanger.

La sensibilité et la spécificité du kit *ResistancePlus*[®]MG pour la détection de *M. genitalium* et de l'ARNr 23S mutant sont indiquées dans le **Tableau 25**. L'analyse de la détection de la mutation affectant l'ARNr 23S a porté uniquement sur les échantillons pour lesquels le statut de la mutation a pu être déterminé. L'analyse des résultats en fonction du type d'échantillon est présentée dans le **Tableau 26**.

Tableau 25. Évaluation clinique du kit *ResistancePlus*[®] MG (étude clinique 5)

		Détection de <i>M. genitalium</i> <i>ResistancePlus</i> [®] MG (échantillon de routine)		Détection de l'ARNr 23S mutant <i>ResistancePlus</i> [®] MG (échantillon de routine)		
		Résultat positif	Résultat négatif	Mutant	Type sauvage	
<i>ResistancePlus</i> [®] MG (avec échantillon Aptima de 1 ml)	Résultat positif	77	3	Mutant détecté	51	0
	Résultat négatif	3	64	Mutant non détecté	2	24
Sensibilité		96,3 % (IC à 95 % : 89,4-99,2 %)		Sensibilité		96,2 % (IC à 95 % : 87,0-99,5 %)
Spécificité		95,5 % (IC à 95 % : 87,5-99,1 %)		Spécificité		100,0 % (IC à 95 % : 86,0-100,0 %)

Tableau 26. Analyse des résultats cliniques en fonction des échantillons (étude clinique 5)

Échantillon	Résultat attendu pour le dépistage de <i>M. genitalium</i> : négatif	Résultat attendu pour le dépistage de <i>M. genitalium</i> : type sauvage	Résultat attendu pour le dépistage de <i>M. genitalium</i> : ARNr 23S mutant
Urine	50/52 ¹	21/22 ¹	45/48 ¹
Frottis vaginal	14/15 ²	3/4 ²	6/6

Mutant : mutation affectant l'ARNr 23S aux positions A2058G, A2059G, A2058T et A2058C (numérotation d'*E. coli*) ; Type sauvage : absence de mutation sur ces positions

¹ Urine : 2 erreurs de qualification d'échantillons négatifs à *M. genitalium* en *M. genitalium* de type sauvage et mutant, respectivement ; 1 erreur de qualification de *M. genitalium* de type sauvage en échantillon négatif à *M. genitalium* ; 2 erreurs de *M. genitalium* mutants en *M. genitalium* de type sauvage ; 1 erreur de qualification de *M. genitalium* mutant en échantillon négatif à *M. genitalium*

² Frottis vaginal : 1 erreur de qualification d'échantillon négatif à *M. genitalium* en *M. genitalium* de type sauvage ; 1 erreur de qualification de *M. genitalium* de type sauvage en échantillon négatif à *M. genitalium*

16.1.6 Étude clinique 6

Une étude rétrospective a été menée à l'University of Queensland Centre for Clinical Research (UQCCR), Australie, sur cobas[®] x480, avec des extraits d'échantillons d'urine et de frottis recueillis entre février 2017 et février 2019. Les échantillons étaient recueillis sous forme d'urine pure ou au moyen de kits de milieu PCR cobas[®](Roche), puis extraits sur instrument cobas[®] x480 (cobas[®] 4800, Roche) en appliquant le protocole « Full Workflow » et « CT/NG », sans ajout de cellules de contrôle interne SpeedX. Les 109 échantillons comprenaient 10 frottis vaginaux, 5 frottis cervico-vaginaux, ainsi que 84 échantillons d'urine masculine et 10 échantillons d'urine féminine.

Afin de déterminer les performances du kit *ResistancePlus*[®] MG₍₅₅₀₎ sur extraits cobas[®], la détection de *M. genitalium* a été comparée aux résultats diagnostiques de routine (dépistage de MgPa par PCR (Trembizki *et al.*, 2017)) et la détection d'ARNr 23S mutant a été comparée au séquençage de Sanger. Les kits *ResistancePlus*[®] MG₍₅₅₀₎ étaient analysés sur ABI 7500 Fast Dx. La sensibilité et la spécificité du kit *ResistancePlus*[®] MG₍₅₅₀₎ pour la détection de *M. genitalium* et de l'ARNr 23S mutant sont indiquées dans le **Tableau 27**. L'analyse de la détection de la mutation affectant l'ARNr 23S a porté uniquement sur les échantillons pour lesquels le statut de la mutation a pu être déterminé. L'analyse des résultats en fonction du type d'échantillon est présentée dans le **Tableau 28**. L'analyse des mutations affectant l'ARNr 23S est présentée dans le **Tableau 29**.

Tableau 27. Évaluation clinique du kit *ResistancePlus*[®] MG₍₅₅₀₎ (étude clinique 6)

		Détection de <i>M. genitalium</i> MgPa qPCR		Détection de l'ARNr 23S mutant Séquençage de Sanger	
		Résultat positif	Résultat négatif	Mutant	Type sauvage
<i>ResistancePlus</i> [®] MG ₍₅₅₀₎	Résultat positif	54	0	Mutant détecté	37 [^]
	Résultat négatif	1	51	Mutant non détecté	0
Sensibilité		98,2 % (IC à 95 % : 90,3-100,0 %)		Sensibilité	
Spécificité		100,0 % (IC à 95 % : 93,0-100,0 %)		Spécificité	
				100,0 % (IC à 95 % : 80,5-100,0 %)	

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

Tableau 28. Analyse des résultats cliniques en fonction des échantillons (étude clinique 6) [#]

Échantillon	Résultat attendu pour le dépistage de <i>M. genitalium</i> : négatif	Résultat attendu pour le dépistage de <i>M. genitalium</i> : ARNr 23S type sauvage	Résultat attendu pour le dépistage de <i>M. genitalium</i> : ARNr 23S mutant
Urine masculine	42/42	13/13	26/27 ¹
Urine féminine	6/6	1/1	3/3 ²
Frottis vaginal	1/1	1/1	7/7 ^{3^}
Frottis cervico-vaginal	2/2	2/2	1/1 ⁴

[#] 3 échantillons ont été exclus pour cause d'échec de séquençage et impossibilité de déterminer le statut 23S véridique, notamment 2 échantillons d'urine et 1 échantillon vaginal

¹ Urine masculine : 8 A2058G, 3 A2058T et 15 A2059G correctement identifiés ; 1 A2058T a été identifié par erreur comme absence de *M. genitalium*

² Urine féminine : 2 A2058G et 1 A2059G correctement identifiés

³ Frottis vaginal : 3 A2058G, 2 A2058T et 1 A2059G correctement identifiés ; [^] 1 frottis vaginal a été identifié comme mixte type sauvage/A2059G

⁴ Frottis cervico-vaginal : 1 A2059G correctement identifié

Tableau 29. Analyse des mutations affectant l'ARNr 23S de *M. genitalium* (étude clinique 6)

Résultat de référence [^]	Résultat <i>ResistancePlus</i> [®] MG
Type sauvage	17/17
A2058G	13/13
A2059G	19/19 ¹
A2058T	5/5
A2058C	-

[^] Uniquement pour les échantillons positifs à *M. genitalium*
¹ A2059G : 1 frottis vaginal mixte type sauvage/A2059G correctement identifié comme *M. genitalium*, mutation 23S détectée

16.1.7 Étude clinique 7

Une étude clinique rétrospective a été réalisée par le Microbiological Diagnostic Unit Public Health Unit (MDU), Victoria, Australie, sur des écouvillons secs et des urines pures prélevées entre octobre 2018 et janvier 2019. Les échantillons comprenaient 19 frottis vaginaux, 2 frottis cervico-vaginaux et 44 échantillons d'urine.

Le kit *ResistancePlus*[®]MG a été analysé sur LC480 II après extraction d'échantillon sur instrument QIASymphony SP (QIAGEN) à l'aide du kit DSP Virus/Pathogen Mini et du protocole Complex200_V6_DSP. Les résultats ont été comparés aux résultats diagnostiques de routine obtenus avec les kits *ResistancePlus*[®]MG (SpeedX) sur des échantillons extraits sur instrument MagNA Pure 96 (MP96). Pour les résultats aberrants, un dépistage de l'ARNr 16S par qPCR (Twin 2011) a été réalisé pour la détection de *M. genitalium* et un séquençage de Sanger (Twin 2012) a été effectué pour la détection de l'ARNr 23S mutant. La sensibilité et la spécificité du kit *ResistancePlus*[®]MG pour la détection de *M. genitalium* et de l'ARNr 23S mutant sont indiquées dans le **Tableau 30**. L'analyse de la détection de la mutation affectant l'ARNr 23S a porté uniquement sur les échantillons pour lesquels le statut de la mutation a pu être déterminé. L'analyse des résultats en fonction du type d'échantillon est présentée dans le **Tableau 31**.

Tableau 30. Évaluation clinique du kit *ResistancePlus*[®] MG (étude clinique 7)

		Détection de <i>M. genitalium</i> <i>ResistancePlus</i> [®] MG (MP96)		Détection de l'ARNr 23S mutant <i>ResistancePlus</i> [®] MG (MP96)		
		Résultat positif	Résultat négatif	Mutant	Type sauvage	
<i>ResistancePlus</i> [®] MG (QIASymphony SP)	Résultat positif	36	0	Mutant détecté	16	1
	Résultat négatif	1	27	Mutant non détecté	1	18
Sensibilité		97,3 % (IC à 95 % : 85,8-99,9 %)		Sensibilité		94,1 % (IC à 95 % : 71,3-99,9 %)
Spécificité		100,0 % (IC à 95 % : 87,2-100,0 %)		Spécificité		94,7 % (IC à 95 % : 74,0-99,9 %)

Tableau 31. Analyse des résultats cliniques en fonction des échantillons (étude clinique 7) *			
Échantillon	Résultat attendu pour le dépistage de <i>M. genitalium</i> : négatif	Résultat attendu pour le dépistage de <i>M. genitalium</i> : ARNr 23S type sauvage	Résultat attendu pour le dépistage de <i>M. genitalium</i> : ARNr 23S mutant
Urine masculine	17/17	9/9	12/14 ¹
Urine féminine	1/1	1/2 ²	1/1
Frottis vaginal	8/8*	7/7	3/3
Frottis cervico-vaginal	1/1	1/1	-

* 1 frottis vaginal a été exclu car il produisait des résultats non valides avec le kit **ResistancePlus**[®] MG

¹ Urine masculine : 1 *M. genitalium* à ARNr 23S mutant a été identifié par erreur comme *M. genitalium* non détecté ; 1 *M. genitalium* à ARNr 23S mutant a été identifié par erreur comme *M. genitalium* détecté, mutation 23S non détectée

² Urine féminine : 1 échantillon identifié par erreur comme *M. genitalium* détecté, mutation ARNr 23S non détectée

16.2 Performances analytiques

16.2.1 Reproductibilité et répétabilité

La reproductibilité et la répétabilité du kit **ResistancePlus**[®] MG sur LC480 II a été évaluée au moyen d'un modèle synthétique quantifié du gène MgPa de *M. genitalium* et des cibles ARNr 23S (A2058G, A2059G, A2058T et A2058C) à 10 000 et 3 x LOD copies par réaction avec 6 réplicats (sauf précision contraire). Les analyses ont été réalisées sur LC480 II.

Pour déterminer la variabilité entre les lots, deux lots étaient testés, les analyses étant réalisées sur la même machine et par le même opérateur (**Tableau 32**). Les deux lots ont affiché une bonne reproductibilité, avec un coefficient de variation (CV, %) compris entre 0,35 et 2,37 % pour toutes les cibles.

Tableau 32. Variabilité entre les lots				
	Valeur Cq moyenne	ÉCART-TYPE	%CV	Nb d'échantillons
MgPa, 10 000 copies	16,9	0,15	0,89	12/12
MgPa, 30 copies	25,5	0,52	2,05	12/12
A2058G, 10 000 copies	20,4	0,48	2,37	12/12
A2058G, 36 copies	27,8	0,43	1,54	12/12
A2059G, 10 000 copies	18,0	0,06	0,35	12/12
A2059G, 30 copies	25,6	0,50	1,94	12/12
A2058T, 10 000 copies	18,7	0,09	0,46	12/12
A2058T, 30 copies	26,2	0,30	1,14	12/12
A2058C, 10 000 copies	17,7	0,13	0,75	12/12
A2058C, 30 copies	25,4	0,29	1,15	12/12

Pour déterminer la variabilité d'un jour sur l'autre, les tests ont été réalisés pendant trois jours par un même opérateur sur une même machine (**Tableau 33**). Les trois cycles ont affiché une bonne reproductibilité entre les jours, avec un coefficient de variation compris entre 0,88 et 2,31 % pour toutes les cibles.

Tableau 33. Variabilité d'un jour sur l'autre				
	Valeur Cq moyenne	ÉCART-TYPE	%CV	Nb d'échantillons
MgPa, 10 000 copies	17,0	0,18	1,09	18/18
MgPa, 30 copies	25,6	0,59	2,31	18/18
A2058G, 10 000 copies	20,2	0,37	1,83	18/18
A2058G, 36 copies	27,9	0,51	1,84	18/18
A2059G, 10 000 copies	18,1	0,24	1,34	18/18
A2059G, 30 copies	25,7	0,32	1,23	18/18
A2058T, 10 000 copies	18,7	0,23	1,22	18/18
A2058T, 30 copies	26,3	0,31	1,17	18/18
A2058C, 10 000 copies	17,8	0,16	0,88	18/18
A2058C, 30 copies	25,5	0,31	1,22	18/18

Pour déterminer la variabilité entre les cycles, trois cycles de qPCR ont été comparés, réalisés le même jour par le même opérateur (**Tableau 34**). Les trois cycles ont affiché une bonne reproductibilité, avec un coefficient de variation compris entre 0,40 et 3,20 % pour toutes les cibles.

Tableau 34. Variabilité entre les cycles				
	Valeur Cq moyenne	ÉCART-TYPE	%CV	Nb d'échantillons
MgPa, 10 000 copies	17,0	0,07	0,40	18/18
MgPa, 30 copies	25,7	0,47	1,83	18/18
A2058G, 10 000 copies	19,8	0,63	3,20	18/18
A2058G, 36 copies	27,5	0,51	1,85	18/18
A2059G, 10 000 copies	18,4	0,11	0,61	18/18
A2059G, 30 copies	25,7	0,39	1,52	18/18
A2058T, 10 000 copies	18,7	0,22	1,18	18/18
A2058T, 30 copies	26,4	0,42	1,59	18/18
A2058C, 10 000 copies	17,8	0,08	0,46	18/18
A2058C, 30 copies	25,5	0,31	1,22	18/18

Pour déterminer la variabilité entre les opérateurs, deux cycles réalisés par deux opérateurs ont été comparés (**Tableau 35**). Les deux cycles réalisés par les deux opérateurs ont affiché une bonne reproductibilité, avec un coefficient de variation compris entre 0,54 et 1,62 % pour toutes les cibles.

Tableau 35. Variabilité entre les opérateurs				
	Valeur Cq moyenne	ÉCART-TYPE	%CV	Nb d'échantillons
MgPa, 10 000 copies	16,8	0,12	0,73	12/12
MgPa, 30 copies	25,3	0,41	1,61	12/12
A2058G, 10 000 copies	20,2	0,24	1,21	12/12
A2058G, 36 copies	27,9	0,45	1,62	12/12
A2059G, 10 000 copies	17,9	0,10	0,58	12/12
A2059G, 30 copies	25,5	0,39	1,53	12/12
A2058T, 10 000 copies	18,6	0,10	0,54	12/12
A2058T, 30 copies	26,1	0,31	1,20	12/12
A2058C, 10 000 copies	17,7	0,13	0,71	12/12
A2058C, 30 copies	25,2	0,27	1,06	12/12

Pour déterminer la variabilité entre les instruments, deux cycles réalisés sur deux machines par le même opérateur ont été comparés (**Tableau 36**). Les cycles réalisés sur les deux machines ont affiché une bonne reproductibilité, avec un coefficient de variation compris entre 0,30 et 2,62 % pour toutes les cibles.

Tableau 36. Variabilité entre les instruments				
	Valeur Cq moyenne	ÉCART-TYPE	%CV	Nb d'échantillons
MgPa, 10 000 copies	16,7	0,10	0,60	12/12
MgPa, 30 copies	25,4	0,67	2,62	12/12
A2058G, 10 000 copies	20,0	0,07	0,33	12/12
A2058G, 36 copies	27,8	0,51	1,82	12/12
A2059G, 10 000 copies	17,8	0,05	0,30	12/12
A2059G, 30 copies	25,3	0,36	1,41	12/12
A2058T, 10 000 copies	18,5	0,09	0,50	12/12
A2058T, 30 copies	25,9	0,30	1,16	12/12
A2058C, 10 000 copies	17,6	0,13	0,75	12/12
A2058C, 30 copies	25,3	0,36	1,44	12/12

Pour déterminer la variabilité intra-cycle, trois expériences ont été comparées, préparées séparément par le même opérateur, chaque cible étant analysée sur le même plateau (**Tableau 37**). Les trois expériences ont affiché une bonne reproductibilité, avec un coefficient de variation compris entre 0,57 et 3,12 % pour toutes les cibles.

Tableau 37. Variabilité intra-cycle				
	Valeur Cq moyenne	ÉCART-TYPE	%CV	Nb d'échantillons
MgPa, 10 000 copies	17,3	0,36	2,09	18/18
MgPa, 30 copies	25,9	0,81	3,12	18/18
A2058G, 10 000 copies	20,2	0,11	0,57	18/18
A2058G, 36 copies	28,0	0,65	2,31	18/18
A2059G, 10 000 copies	17,9	0,15	0,83	18/18
A2059G, 30 copies	25,8	0,38	1,46	18/18
A2058T, 10 000 copies	18,8	0,12	0,66	18/18
A2058T, 30 copies	26,8	0,38	1,41	18/18
A2058C, 10 000 copies	17,8	0,15	0,83	18/18
A2058C, 30 copies	25,5	0,36	1,41	18/18

16.2.2 Sensibilité analytique

La sensibilité analytique du kit **ResistancePlus**[®] MG sur instrument LC480 II a été déterminée par la réalisation de dilutions en série limitées, en utilisant un modèle synthétique quantifié du gène MgPa de *M. genitalium* et des cibles ARNr 23S (A2058G, A2059G, A2058T et A2058C). La sensibilité de chaque cible a été déterminée comme le nombre de copies par réaction avec un taux de détection $\geq 95\%$, comme indiqué dans le **Tableau 38**.

Tableau 38. Sensibilité analytique	
	Sensibilité analytique (copies/réaction)
MgPa	10
A2058G	12
A2059G	10
A2058T	10
A2058C	10

16.2.3 Spécificité analytique

Cette étude a été réalisée en vue d'évaluer les performances du kit **ResistancePlus**[®] MG en présence de concentrations élevées d'organismes non ciblés. Un panel de 65 micro-organismes (4 virus, 2 protozoaires, 4 champignons et 55 bactéries), représentatif des pathogènes ou de la flore généralement présente dans le système uro-génital ou très proche *M. genitalium*, a été évalué. Chaque souche bactérienne a été testée à une concentration de 1×10^6 génomes/ml, sauf précision contraire. Les souches virales ont été testées à une concentration de 1×10^5 génomes/ml, sauf précision contraire. Tous les autres organismes ont été testés aux concentrations indiquées. Tous les organismes ont été quantifiés par qPCR, excepté ceux quantifiés en tant qu'unités formant colonie (UFC) ou unités formant plaque (UFP) (**Tableau 39**). Tous les micro-organismes ont été testés à trois reprises. Tous les micro-organismes testés ont été dilués dans un milieu clinique négatif (urine ou frottis vaginal).

Les résultats ont permis de conclure qu'aucun de ces organismes n'entraîne de faux positifs dans les milieux cliniques négatifs à *M. genitalium* (**Tableau 39**).

Une analyse *in silico* a également été réalisée afin de vérifier si les oligonucléotides présents dans le test **ResistancePlus**[®] MG sont susceptibles d'amplifier et de détecter les séquences d'acides nucléiques d'organismes non ciblés disponibles dans l'outil BLAST. Aucune interaction significative n'a été détectée.

Tableau 39. Micro-organismes soumis aux tests de spécificité analytique

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

* le nombre entre parenthèses correspond au nombre de souches testées

[^] quantifié en tant qu'UFP/ml

[#] quantifié en tant qu'UFC/ml

16.2.4 Substances potentiellement perturbatrices

Une étude des substances perturbatrices a été réalisée afin de vérifier si certaines substances ou conditions, pouvant se manifester dans les échantillons urinaires ou les frottis vaginaux, sont susceptibles d'affecter les performances du test **ResistancePlus**[®] MG. Le panel était composé de substances endogènes telles que sang, mucine, leucocytes et médicaments (avec ou sans ordonnance) pouvant être utilisés dans le traitement de maladies uro-génitales. Toutes les substances ont été évaluées au moyen d'un contrôle interne qui permet de surveiller l'extraction et l'inhibition par qPCR. Tous les échantillons ont été testés à trois reprises. Les substances ont été diluées dans un milieu clinique négatif (urine ou frottis vaginal), en fonction des cas.

Les résultats ont indiqué qu'aucune des substances et conditions testées n'a interféré avec la détection du contrôle interne ni produit de faux positifs.

Les résultats sont résumés dans le **Tableau 40** et le **Tableau 41**.

Tableau 40. Substances potentiellement perturbatrices dans les échantillons d'urine		
Classe/substance	Nom du produit	Concentration testée
Sang total	--	1 % v/v
Sperme	--	5,0 % v/v
Mucus	Mucine	0,8 % p/v
Antibiotiques	Azithromycine	1,8 mg/mL
	Doxycycline	3,6 mg/mL
Antalgiques	Aspirine	40 mg/mL
	Paracétamol	3,2 mg/mL
Hormones intravaginales	--	Progestérone à 7 mg/mL + bêta-estradiol à 0,07 mg/mL
Leucocytes	--	10 ⁵ cellules/mL
Albumine	Albumine sérum bovin	10 mg/mL
Glucose	--	10 mg/mL
Urine acide (pH 4,0)	Urine + N-Acétyl-L-Cystéine	pH 4.0
Urine alcaline (pH 9,0)	Urine + citrate d'ammonium	pH 9.0
Bilirubine	--	1 mg/mL

Tableau 41. Substances potentiellement perturbatrices dans les échantillons de frottis vaginaux		
Classe/substance	Nom du produit	Concentration testée
Sang	--	60 % v/v
Liquide séminal	--	5,0 % v/v
Mucus	Mucine	0,8 % p/v
Produits vaginaux et contraceptifs sans ordonnance	Vagisil Anti-Itch Crème (1.0 oz)	0,25 % p/v
	K-Y Jelly (4.0 oz)	0,25 % p/v
	Options Gynol II Vaginal Contraceptive Gel	0,25 % p/v
	Walgreens Clotrimazole Vaginal Cream (1.5 oz)	0,25 % p/v
	Vagisil Sensitive Skin Formula Maximum Strength Anti-Itch Creme with Oatmeal (1.0 oz)	0,25 % p/v
	Vagisil ProHydrate Natural Feel Internal Moisturizing Gel (0.2 oz x 8 pack)	0,25 % p/v
	Vagisil Daily Intimate Deodorant Powder (8.0 oz)	0,25 % p/v
	Summer's Eve Medicated Douche	0,25 % v/v
Désodorisants et poudres	Summer's Eve Deodorant spray (2.0 oz)	0,25 % v/v
Crème anti-hémorroïdes	Preparation H Hemorrhoidal Cream (0.9 oz)	0,25 % p/v
Médicaments sur ordonnance	Metronidazole Vaginal Gel, 0.75%	0,25 % p/v
	Estrace® (estradiol vaginal cream, USP 0.01%)	0,25 % p/v
Leucocytes	--	10 ⁵ cellules/mL
Hormones intravaginales	--	Progesterone à 7 mg/mL + bêta-estradiol à 0,07 mg/mL

16.2.5 Réactivité croisée avec les autres mutations affectant l'ARNr 23S

La réactivité croisée du kit **ResistancePlus**® MG a été évaluée en utilisant un modèle synthétique quantifié du gène MgPa de *M. genitalium* et des cibles ARNr 23S (A2059C) à raison de 10 000 et 45 copies par réaction. Les résultats ont indiqué une réactivité croisée du test **ResistancePlus**® MG avec la cible ARNr 23S A2059C avec un taux de détection de 100 %.

17 Service clients et assistance technique

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

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

18 Références

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

19 Annexe 1 : LightCycler® 480 instrument II

Les informations suivantes correspondent à la version 1.5 du logiciel LightCycler® 480.

Le kit **ResistancePlus®** MG contient des colorants pour l'instrument LightCycler® 480 II. Le kit de compensation des couleurs **PlexPCR®** (réf. 90001) doit être utilisé et appliqué pour l'analyse LC480 II (voir la **rubrique 19.2**). Ce kit peut être fourni sur demande.

19.1 Configuration du LightCycler® 480 Instrument II (LC480 II)

Format de détection

Créer un format de détection personnalisé

Open Tools (Ouvrez Outils) > **Detection Formats** (Formats de détection)

Créez un nouveau format de détection et le renommez-le « **SpeedX PlexPCR** » (peut être créé lors de la génération du fichier de compensation des couleurs SpeedX) (voir **Figure 3**).

Pour **Filter Combination Selection** (Sélection de la combinaison de filtres), sélectionnez les éléments suivants (excitation-émission) indiqués dans le **Tableau 42**.

Tableau 42. Combinaison de filtres [^]						
LC480 II	440-488	465-510	533-580	533-610	533-640	618-660

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

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

Facteur de fusion : 1

Facteur quantitatif : 10

Temps d'intégration max. (s) : 1

Figure 3. Format de détection personnalisé SpeedX

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

Configuration de l'instrument

Créer un **Detection Format** (**Format de détection**) personnalisé

Open Tools (Ouvrez Outils) > **Instruments**

Pour **Instrument Settings** (Configuration des instruments) > sélectionnez **Barcode Enabled** (Code-barres activé)

Configuration de l'expérience

Sélectionnez **New Experiment** (Nouvelle expérience)

Dans l'onglet **Run Protocol** (Protocole d'exécution)

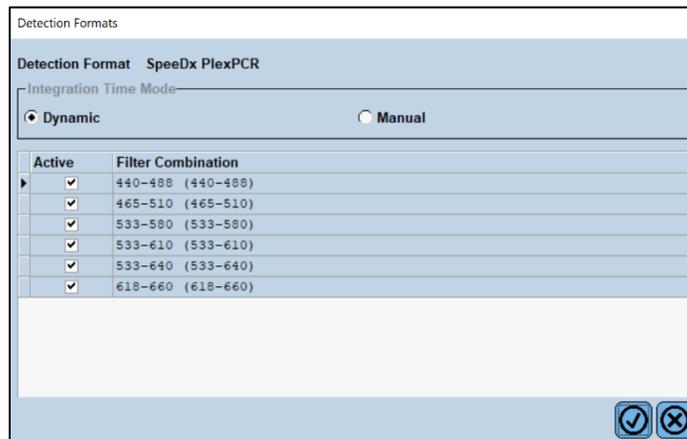
Pour **Detection Format** (Format de détection) sélectionnez le format personnalisé « **SpeedX PlexPCR** » (Figure 4)

Sélectionnez **Customize** (Personnaliser) >

Sélectionnez **Integration Time Mode** (Mode temps d'intégration) > **Dynamic** (Dynamique)

Sélectionnez toutes les combinaisons de filtres actifs affichées à la **Figure 4**

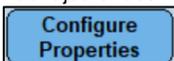
Figure 4.. Format de détection personnalisé



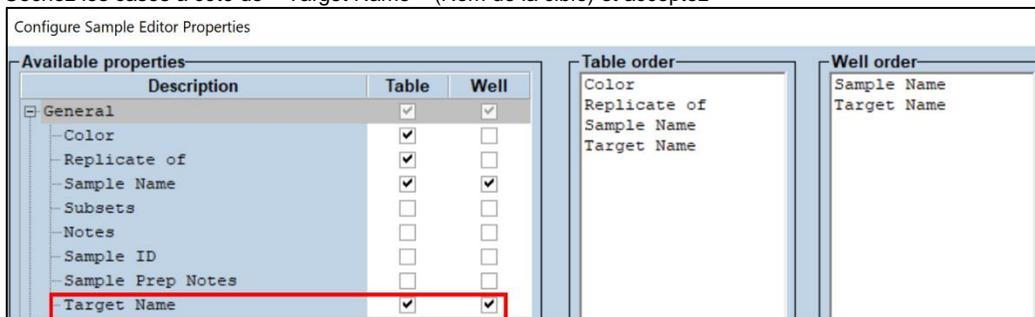
Pour permettre la détection automatique des échantillons dans le logiciel d'analyse, assignez des identifiants aux puits de la plaque

Ouvrez le module **Sample Editor** (Éditeur d'échantillons)

Pour ajouter des noms de cibles, sélectionnez **Configure Properties** (Configurer les propriétés)



Cochez les cases à côté de « **Target Name** » (Nom de la cible) et acceptez



Modifiez le **Target Name** (Nom de la cible) pour chaque canal corresponde à la référence de l'instrument cible défini dans le menu Lab Configuration (Configuration du laboratoire) > Assays (Tests) du logiciel d'analyse et indiqué dans le **Tableau 43**.

Tableau 43. Canaux pour cibles de <i>ResistancePlus</i> ® MG			
Cible	MgPa	23S rRNA mutation	IC
LC480 II	465-510	533-580	533-640

Pour assigner des identifiants, sélectionnez le puits

Modifiez **Sample Name** pour qu'il corresponde à l'identifiant défini dans le menu Lab Configuration (Configuration du laboratoire) > **Assays** (Tests) du logiciel d'analyse (voir la **rubrique 23.3**)

Les échantillons doivent être marqués avec l'identifiant comme préfixe. Les identifiants par défaut sont fournis pour les réactions de témoin (comme indiqué dans le **Tableau 44** et à la **Figure 5**). Les identifiants supplémentaires peuvent se définir aussi bien pour les échantillons réguliers que pour les témoins par le biais du logiciel d'analyse.

Remarque : les identifiants des échantillons sont insérés en respectant la casse. L'identifiant doit correspondre exactement à ceux assignés dans le fichier d'exécution.

Tableau 44. Exemples d'identifiants d'échantillons pour les logiciels d'analyse	
Type d'échantillon	Préfixe par défaut (dans le logiciel d'analyse)
Échantillon classique	Aucun par défaut – défini par l'utilisateur
Témoin négatif	NC
Absence de modèle de témoin	NTC
Témoin positif (MG, type mutant de l'ARNr 23S) (Pa)	Pa
Témoin positif (MG, type naturel de l'ARNr 23S) (Pb)	Pb

Figure 5. Éditeur d'échantillons : assignation des identifiants aux puits

Pos	Filter combination	Color	Repl Of	Sample Name	Target Name
A1	465-510 (465-510)	■		NC	MgPa
A1	533-580 (533-580)	■		NC	23S rRNA mutation
A1	533-640 (533-640)	■		NC	IC
A2	465-510 (465-510)	■		NTC	MgPa
A2	533-580 (533-580)	■		NTC	23S rRNA mutation
A2	533-640 (533-640)	■		NTC	IC
A3	465-510 (465-510)	■		Pa	MgPa
A3	533-580 (533-580)	■		Pa	23S rRNA mutation
A3	533-640 (533-640)	■		Pa	IC
A4	465-510 (465-510)	■		Pb	MgPa
A4	533-580 (533-580)	■		Pb	23S rRNA mutation
A4	533-640 (533-640)	■		Pb	IC

Configurez **Reaction Volume** (Volume de réaction) > 20 µL

Créez le programme suivant dans le **Tableau 45** (voir les détails à la **Figure 6 – Figure 9**):

Tableau 45. Thermocycling Program (Programme de thermocyclage)				
Program name (Nom du programme)	Cycles	Target °C (Cible °C)	Hold (Temps d'arrêt)	Ramp Rate (Vitesse de rampe) (°C/s) [†]
Polymerase activation (Activation de la polymérase)	1	95 °C	2 min	4,4
Touch down cycling (Cyclage Touchdown) [‡] : Step down -0,5° C/cycle	10	95 °C	5 s	4,4
		61°C – 56,5°C [§]	30 s	2,2
Quantification cycling (Cyclage par quantification) [†] : Acquisition/Detection (Acquisition/Détection)	40	95°C	5 s	4,4
		52°C [†]	40 s	2,2
Cooling (Refroidissement)	1	40°C	30 s	2,2

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

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

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

Figure 6. Programme de thermocyclage – Activation de la polymérase

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

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

Figure 7. Programme de thermocyclage – Cyclage par touchdown

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

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

Figure 8. Programme de thermocyclage – quantification

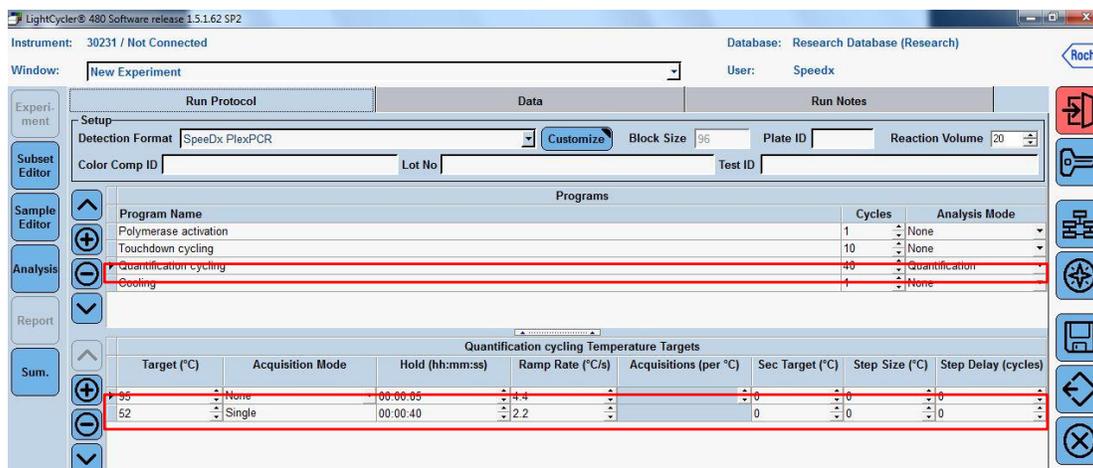
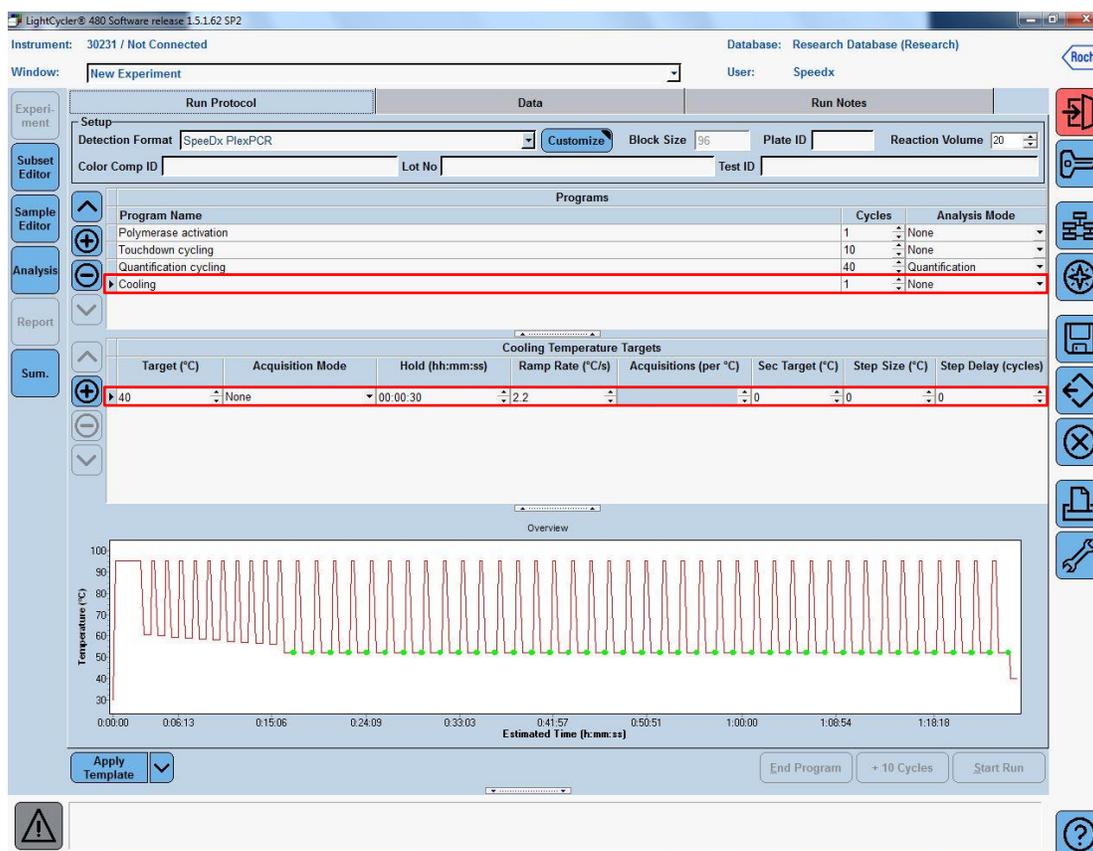


Figure 9. Programme de thermocyclage – Refroidissement



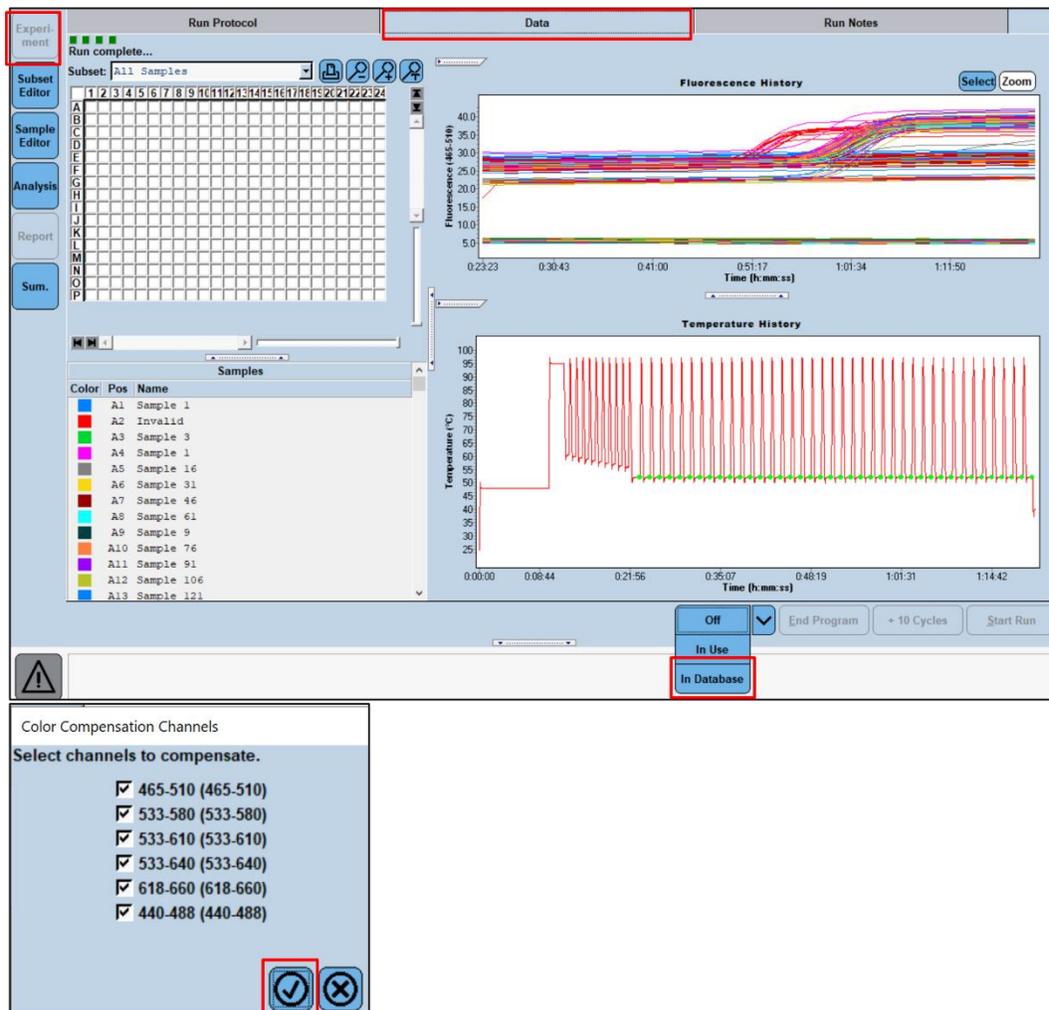
> **Start Run** (Lancer la série)

Lorsque le programme de cyclage est terminé, attachez l'objet CC au fichier d'exécution comme indiqué à la **Figure 10** et exportez-le au format IXO pour l'analyser dans le logiciel d'analyse **ResistancePlus**® MG. Veuillez consulter la **rubrique 19.2** pour savoir comment créer l'objet CC et le sauvegarder dans la base de données du logiciel LightCycler 480.

Sélectionnez **Experiment** (Expérience) > **Data** (Données)

Cliquez sur la flèche déroulante à côté de **Colour Comp (Off)** (Comp. couleur [Désactivé]) et sélectionnez **In Database** (Dans la base de données)

Figure 10. Joindre l'objet CC au fichier d'exécution



Sélectionnez l'objet CC approprié, assurez-vous que tous les canaux sont sélectionnés et **cochez** l'icône

Sélectionnez l'icône **Save** (Sauvegarder)

Sélectionnez l'icône **Export** (Exporter)

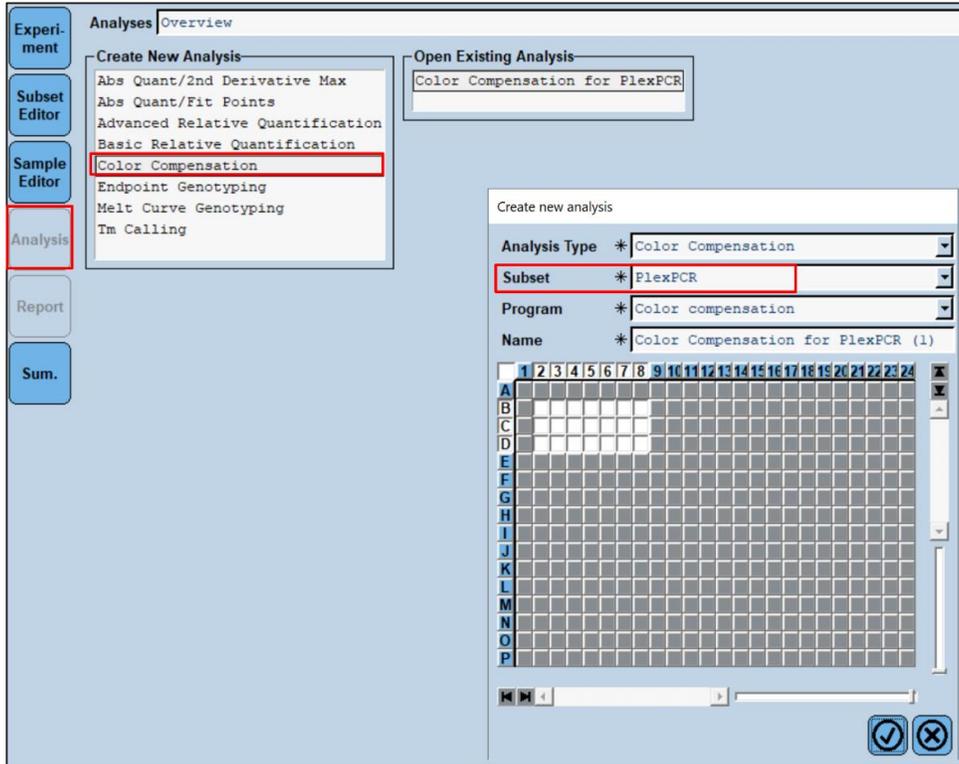
Sauvegardez-le dans un emplacement facilement identifiable

19.2 Compensation des couleurs pour l'instrument LightCycler® 480 II

REMARQUE : le kit de compensation des couleurs **PlexPCR®** (réf. 90001) doit être utilisé et appliqué pour l'analyse LC480 II. Ce kit peut être fourni sur demande.

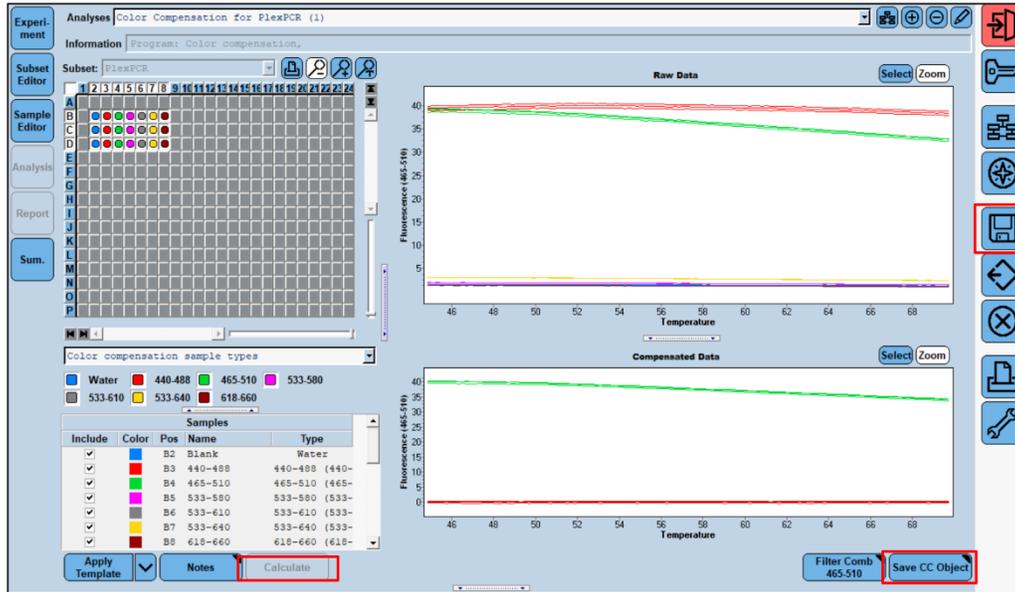
Analysez le fichier de compensation des couleurs via **Analysis** (Analyser) > **Colour Compensation** (Compensation des couleurs) et sélectionnez le groupe correct, comme indiqué à la **Figure 11**.

Figure 11. Analyse : compensation des couleurs



Sélectionnez **Calculate** (Calculer) (Figure 12).

Figure 12. Calculer et sauvegarder l'objet CC



Consultez le mode d'emploi de la compensation couleur PlexPCR (IF-IV0001) pour obtenir plus d'informations et vous assurer que le fichier de compensation couleur a été créé correctement.

Sélectionnez **Save** (Sauvegarder)



19.3 Interprétation des résultats

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

Consulter la **Section 23** pour obtenir les instructions d'utilisation du logiciel d'analyse **ResistancePlus**® MG (LC480).

20 Annexe 2 : Applied Biosystems® 7500 Fast

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

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

20.1 Programmation du système Applied Biosystems® 7500 Fast

Sélectionner **Advanced Setup** (Configuration avancée)

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

Nommer l'expérience

Instrument > 7500 Fast (96 puits)

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

Reagents (Réactifs) > Other (Autre)

Ramp Speed (Vitesse de rampe) > Standard

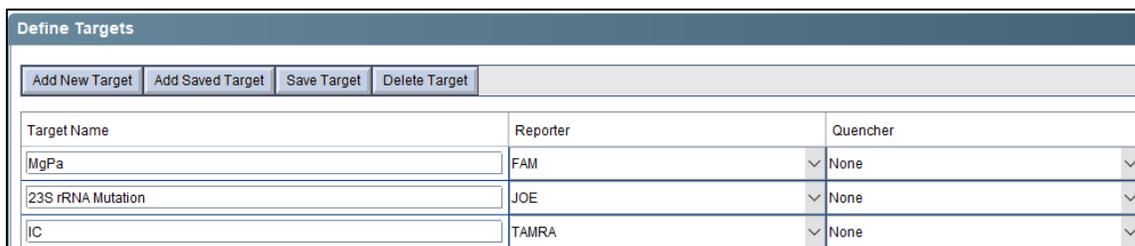
Dans l'onglet **Setup** (Configuration) > ouvrez **Plate Setup** (Configuration de la plaque)

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

Define Targets (Définir les cibles) comme indiqué ci-dessous dans le **Tableau 46** et à la **Figure 13** (Définir les couleurs nécessaires)

Tableau 46. Définir les cibles		
Nom de la cible	Rapporteur	Désactivateur
MgPa	FAM	Aucune
23S rRNA mutation	JOE	Aucune
IC	TAMRA	Aucune

Figure 13. Définir les cibles et les échantillons



Define Targets		
Target Name	Reporter	Quencher
MgPa	FAM	None
23S rRNA Mutation	JOE	None
IC	TAMRA	None

Définir les échantillons (Définir les couleurs nécessaires)

Pour permettre la détection automatique des échantillons dans le logiciel d'analyse, assurez-vous que le nom de la cible (indiqué dans le **Tableau 46**) corresponde à la référence de l'instrument cible défini dans le menu **Lab Configuration** (Configuration du laboratoire) > **Assays** (Tests) du logiciel d'analyse.

D'autre part, il faudra également assigner des identifiants d'échantillons aux puits de la plaque

Dans l'onglet **Setup** (Configuration) > ouvrez **Plate Setup** (Configuration de la plaque)

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

Define Samples (Définir les échantillons)

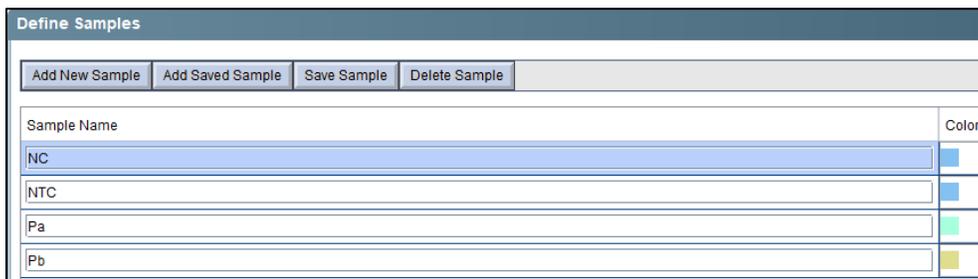
Éditez **Sample Name** pour qu'il corresponde à l'identifiant défini dans le menu **Lab Configuration** (Configuration du laboratoire) > **Assays** (Tests) du logiciel d'analyse (voir la **rubrique 23.3**)

Les échantillons doivent être marqués avec l'identifiant comme préfixe. Les identifiants par défaut sont fournis pour les réactions de témoin (comme indiqué dans le **Tableau 47** et à la **Figure 14**). Les identifiants supplémentaires peuvent se définir aussi bien pour les échantillons réguliers que pour les témoins par le biais du logiciel d'analyse.

Remarque : les identifiants des échantillons sont insérés en respectant la casse. L'identifiant doit correspondre exactement à ceux assignés dans le fichier d'exécution.

Tableau 47. Exemples d'identifiants d'échantillons pour les logiciels d'analyse	
Type d'échantillon	Préfixe par défaut (dans le logiciel d'analyse)
Échantillon classique	Aucun par défaut – défini par l'utilisateur
Témoin négatif	NC
Absence de modèle de témoin	NTC
Témoin positif (MG, type mutant de l'ARNr 23S) (Pa)	Pa
Témoin positif (MG, type naturel de l'ARNr 23S) (Pb)	Pb

Figure 14. Éditeur d'échantillons : assignation des identifiants aux puits



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

Sélectionnez les puits et assignez des cibles et des échantillons aux puits choisis

Sélectionnez **Passive reference** (Référence passive) > Aucune

In **Setup** > open **Run Method**

Configurez **Reaction Volume Per Well** (Volume de réaction par puits) > 20 µL

Créez le programme suivant dans le **Tableau 48** (indiqué plus en détail dans les graphiques (**Figure 15** et **Figure 16**) et le tableau (**Figure 17**) :

Tableau 48. Thermocycling Program (Programme de thermocyclage)				
Program name (Nom du programme)	Cycles	Target °C (Cible °C)	Hold (Temps d'arrêt)	Ramp* (Rampe)
Polymerase activation (Activation de la polymérase)	1	95 °C	2 min	100 %
Touch down cycling (Cyclage Touchdown) : Step down -0,5° C/cycle ^δ	10	95 °C	5 s	100 %
		61°C – 56,5°C ^δ	30 s	100 %
Quantification cycling (Cyclage par quantification) ^{+ :} Acquisition/Détection	40	95°C	5 s	100 %
		52°C ⁺	40 s	100 %

* Vitesse de rampe par défaut

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

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

Figure 15. Méthode de traitement – Graphical View (Vue graphique)

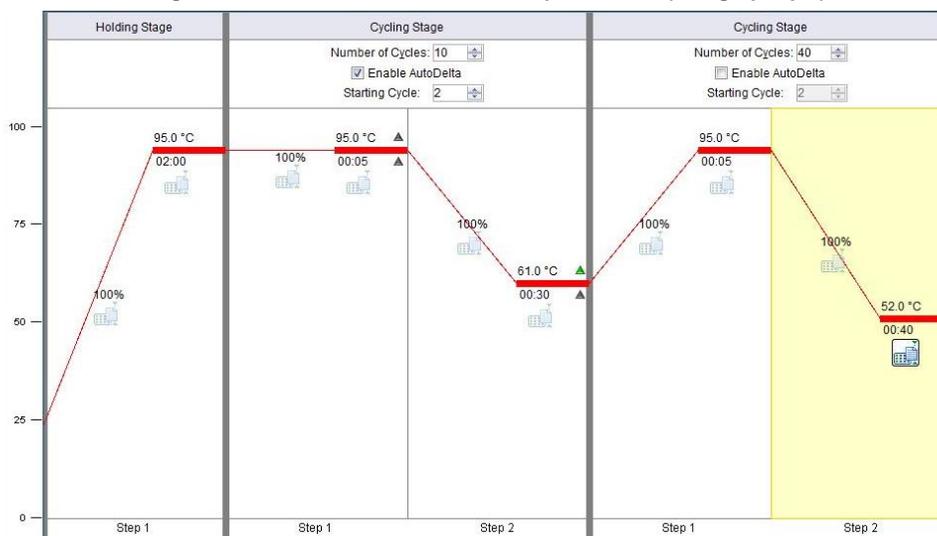


Figure 16. Méthode de traitement – Graphical View (Vue graphique) – Enable AutoDelta (Activer AutoDelta)

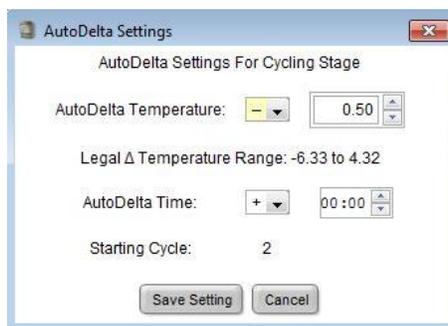


Figure 17. Méthode de traitement – Tabular View (Vue tabulaire)

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

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

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

20.2 Interprétation des résultats

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

Consulter la **Section 23** pour obtenir les instructions d'utilisation du logiciel d'analyse **ResistancePlus**® MG (7500).

21 Annexe 3 : Applied Biosystems® 7500 Fast Dx

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

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

21.1 Programmation du système Applied Biosystems® 7500 Fast Dx

Sélectionner Create New Document (Créer nouveau document)

Dans **New Document Wizard** (Assistant nouveau document) sélectionner les options suivantes pour renseigner les champs (**Figure 18**):

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

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

Template (Modèle) > Blank document (document vide)

Run mode (Mode série) > Standard 7500

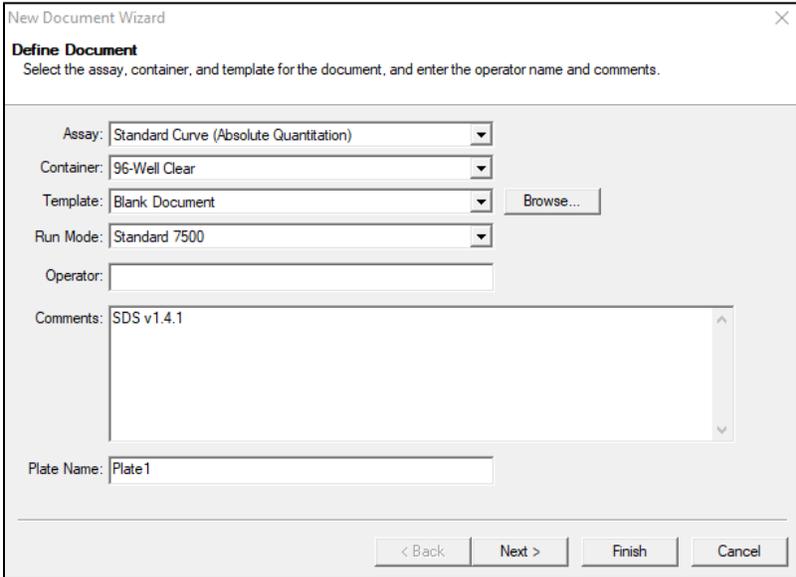
Operator (Opérateur) > Saisir le nom de l'opérateur

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

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

Sélectionner **Next** (Suivant)

Figure 18. Fenêtre New Document Wizard (Assistant nouveau document)



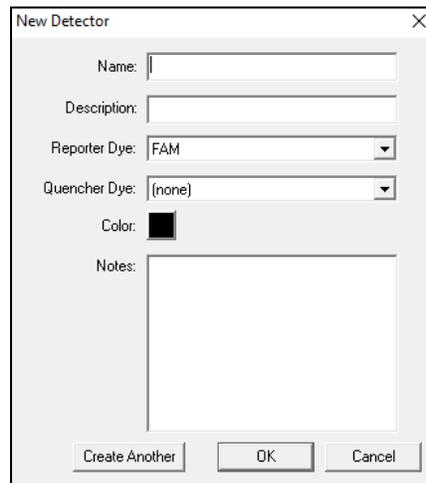
Dans **Select Detectors** (Sélectionner détecteurs) > sélectionner **New Detector** (Nouveau détecteur)

Définir les détecteurs comme indiqué ci-dessous (définir les couleurs au besoin) (indiqué dans le **Tableau 49** et la **Figure 19**)

Tableau 49. Définir détecteurs			
Détecteurs	Nom du détecteur	Colorant rapporteur	Désactiver
Détecteur 1	MgPa	FAM	None (Aucun)
Détecteur 2	23S rRNA mutation	JOE	None (Aucun)
Détecteur 3	IC	TAMRA	None (Aucun)

Sélectionner **OK**

Figure 19. Fenêtre New Detector (nouveau détecteur)

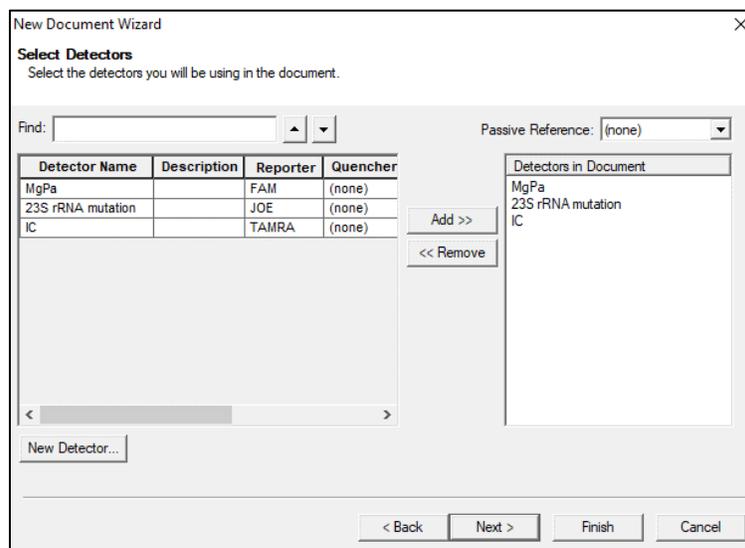


Sélectionner les détecteurs (Figure 20)

Sélectionner les détecteurs et **Add** (Ajouter) au document

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

Figure 20. Fenêtre Select Detectors (Sélectionner détecteurs)



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

Sélectionner les puits et assigner 3 détecteurs aux puits sélectionnés

- MgPa
- 23S rRNA mutation
- IC

Sélectionner **Next** (Suivant)

Pour permettre la détection automatique des échantillons dans le logiciel d'analyse, assurez-vous que le nom de la cible (indiqué dans le **Tableau 49**) corresponde à la référence de l'instrument cible définie dans le menu **Lab Configuration (Configuration du laboratoire) > Assays (Tests)** du logiciel d'analyse.

D'autre part, il faudra également assigner des identifiants d'échantillons aux puits de la plaque

Dans l'onglet **Setup** (Configuration) > ouvrez **Plate Setup** (Configuration de la plaque)

Éditez **Sample Name** (Non de l'échantillon) pour qu'il corresponde à l'identifiant défini dans le menu **Lab Configuration (Configuration de laboratoire) > Assays (Tests)** du logiciel d'analyse (voir la **rubrique 23.3**)

Les échantillons doivent être marqués avec l'identifiant comme préfixe. Les identifiants par défaut sont fournis pour les réactions de témoin (comme indiqué dans le **Tableau 50**). Les identifiants supplémentaires peuvent se définir aussi bien pour les échantillons réguliers que pour les témoins par le biais du logiciel d'analyse.

Remarque : les identifiants des échantillons sont insérés en respectant la casse. L'identifiant doit correspondre exactement à ceux assignés dans le fichier d'exécution.

Tableau 50. Exemples d'identifiants d'échantillons pour les logiciels d'analyse	
Type d'échantillon	Préfixe par défaut_ (dans le logiciel d'analyse)
Échantillon classique	Aucun par défaut – défini par l'utilisateur
Témoin négatif	NC
Absence de modèle de témoin	NTC
Témoin positif (MG, type mutant de l'ARNr 23S) (Pa)	Pa
Témoin positif (MG, type naturel de l'ARNr 23S) (Pb)	Pb

Sélectionner **Next** (Suivant)

Dans l'onglet **Instrument**

Dans la zone **Settings** (Paramètres)

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

Créer le protocole suivant de cycleur thermique (**Tableau 51 Figure 21** et **Figure 22**)

Tableau 51. Thermocycling Program (Programme de thermocyclage)				
Program name (Nom du programme)	Cycles	Target °C (Cible °C)	Hold (Temps d'arrêt)	Ramp (Rampe) [‡]
Polymerase activation (Activation de la polymérase)	1	95°C	2 min	100 %
Touch down cycling (Cyclage Touchdown) : Step down -0,5°C/cycle [§]	10	95°C	5 s	100 %
		61°C – 56,5°C [§]	30 s	100 %
Quantification cycling (Cyclage par quantification) [*] : Acquisition/Detection (Acquisition/Détection)	40	95°C	5 s	100 %
		52°C [*]	40 s	100 %

[‡] Vitesse de rampe par défaut

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

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

Figure 21. Protocole de cycleur thermique - Profil thermique

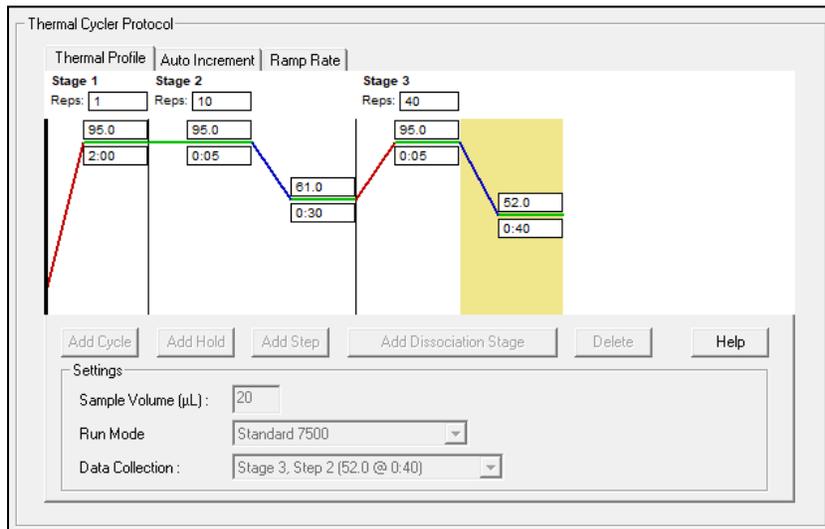
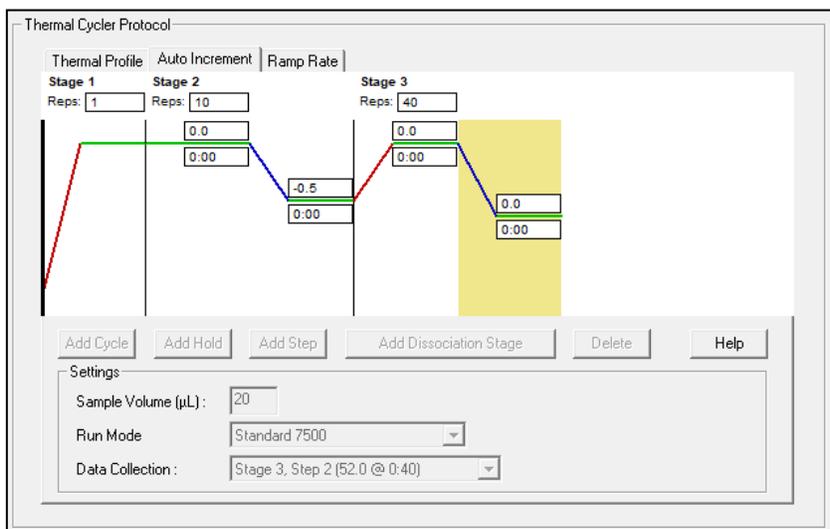


Figure 22. Protocole de cycleur thermique - Incrément automatique



21.2 Interprétation des résultats

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

Consulter la **Section 23** pour obtenir les instructions d'utilisation du logiciel d'analyse **ResistancePlus**® MG (7500).

22 Annexe 4 : Système de PCR en temps réel Bio-Rad CFX96™ Dx et CFX96 Touch™

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

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

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

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

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

Dans **Protocol Editor** (Éditeur de protocole) (voir la **Figure 23**)

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

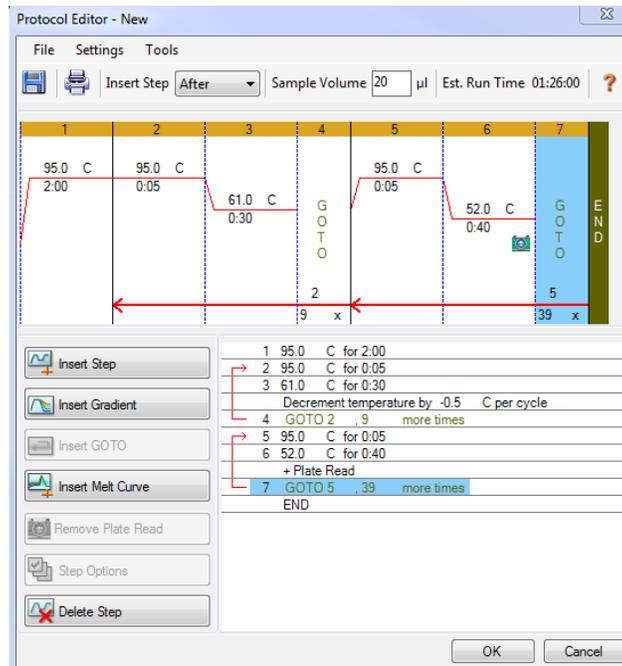
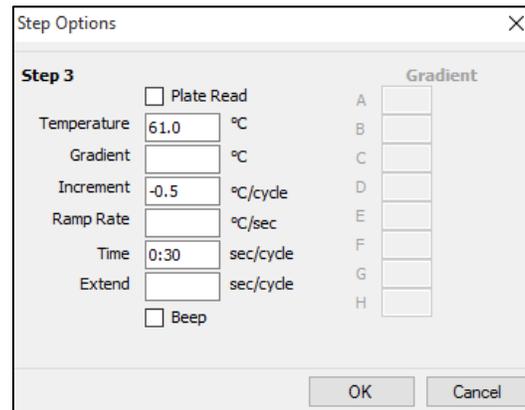
Créer le programme de thermocyclage suivant (**Tableau 52**) et l'enregistrer sous « **SpeedX PCR** ». Ce protocole peut être sélectionné pour de futures séries.

Pour le Touch down cycling (Cyclage Touchdown), sélectionner l'étape 3 puis **Step options**(Options d'étape) > Increment (Incrément) : -0,5 °C/cycle (présenté plus en détail dans la **Figure 24**)

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

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

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

Figure 23. Thermocycling Protocol (Prototype de thermocyclage) – Graphical view (Vue graphique)

Figure 24. Step Options (Options d'étape)


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

- Plate Read
- Temperature: 61.0 °C
- Gradient: °C
- Increment: -0.5 °C/cycle
- Ramp Rate: °C/sec
- Time: 0:30 sec/cycle
- Extend: sec/cycle
- Beep
- Gradient: A, B, C, D, E, F, G, H (checkboxes)

Buttons for 'OK' and 'Cancel' are at the bottom.

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

Sélectionner **Create New** (Créer)

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

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

Select Fluorophores (Sélectionner Fluorophores) > FAM, HEX, Quasar 705 (voir **Tableau 53**)

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

Enregistrer la plaque

Tableau 53. Canaux pour les cibles *ResistancePlus*[®] MG₍₆₇₅₎

MgPa	23S	IC
FAM	HEX	Quasar 705

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

Sélectionner le bloc

Start Run (Lancer la série)

Pour permettre la détection automatique des échantillons dans le logiciel d'analyse, assurez-vous que le nom de la cible (indiqué dans le **Tableau 53**) corresponde à la référence de l'instrument cible définie dans le menu **Lab Configuration** (Configuration du laboratoire) > **Assays** (Tests) du logiciel d'analyse.

D'autre part, il faudra également assigner des identifiants d'échantillons aux puits de la plaque

Ouvrez le module **Plate Setup** (Configuration de la plaque).

Sélectionnez un puits

Éditez **Sample Name** pour qu'il corresponde à l'identifiant défini dans le menu **Lab Configuration** (Configuration du laboratoire) > **Assays** (Tests) du logiciel d'analyse (voir la **rubrique 23.3**)

Les échantillons doivent être marqués avec l'identifiant comme préfixe. Les identifiants par défaut sont fournis pour les réactions de témoin (comme indiqué dans le **Tableau 54** et à la **Figure 25**). Les identifiants supplémentaires peuvent se définir aussi bien pour les échantillons réguliers que pour les témoins par le biais du logiciel d'analyse.

REMARQUE : les identifiants des échantillons sont insérés en respectant la casse. L'identifiant doit correspondre exactement à ceux assignés dans le fichier d'exécution.

Tableau 54. Exemples d'identifiants d'échantillons pour les logiciels d'analyse

Type d'échantillon	Préfixe par défaut_ (dans le logiciel d'analyse)
Échantillon classique	Aucun par défaut – défini par l'utilisateur
Témoin négatif	NC
Absence de modèle de témoin	NTC
Témoin positif (MG, type mutant de l'ARNr 23S) (Pa)	Pa
Témoin positif (MG, type naturel de l'ARNr 23S) (Pb)	Pb

Figure 25. Éditeur d'échantillons : assignation des identifiants aux puits

	1	2
A	Neg	Unk
	MgPa	MgPa
	23S	23S
	IC NC	IC Sample 1
B	NTC	Unk
	MgPa	MgPa
	23S	23S
	IC NTC	IC Sample 2
C	Pos	Unk
	MgPa	MgPa
	23S	23S
	IC PA	IC Sample 3
D	Pos	Unk
	MgPa	MgPa
	23S	23S
	IC PB	IC Sample 4

22.2 Interprétation des résultats

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

Consulter la **Section 23** pour obtenir les instructions d'utilisation du logiciel d'analyse **ResistancePlus**® MG (CFX) .

23 Annexe A : interprétation des résultats

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

Voir le **Tableau 55** pour le logiciel d'analyse approprié pour chaque instrument de PCR en temps réel. Le logiciel d'analyse peut être fourni sur demande. Contacter tech@speedx.com.au pour de plus amples informations.

Tableau 55. Logiciel d'analyse ResistancePlus ® MG		
Réf.	Logiciel d'analyse*	Instrument de PCR en temps réel
99003	ResistancePlus ® MG (LC480)	LC480 II
99002	ResistancePlus ® MG (7500)	7500 Fast et 7500 Fast Dx
99008	ResistancePlus ® MG (CFX)	CFX96 Dx et CFX96 Touch

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

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

23.1 Plate-forme FastFinder : configuration informatique minimale requise

Le logiciel d'analyse est disponible à partir de la plate-forme FastFinder (<https://www.ugentec.com/fastfinder/analysis>). Pour accéder à la plate-forme du logiciel, il est recommandé aux clients d'utiliser un réseau et un ordinateur sécurisés et fiables. Les configurations informatiques minimales requises pour accéder à la plate-forme FastFinder et pouvoir l'utiliser sont indiquées ci-dessous.

Configuration informatique requise

Connexion Internet par câble ou DSL

Résolution d'écran min. : 1366 x 768 pixels, optimale 1920 x 1080 pixels ou supérieure

Navigateurs compatibles

- Microsoft Edge 88 ou plus récent
- Firefox 83 ou plus récent
- Google Chrome 88 ou plus récent.

Configuration requise pour le pare-feu

Les hôtes suivants doivent être accessibles via HTTPS (port 443) :

- *.ugentec.app
- *.fastfinder.app
- *.pendo.io
- *.fonts.gstatic.com
- *.googleapis.com
- *.msecnd.net
- *.visualstudio.com
- *.browser-update.org

*.blob.core.windows.net
 *.powerbi.com
 *.analysis.windows.net
 *.pbideldicated.windows.net
 *.content.powerapps.com

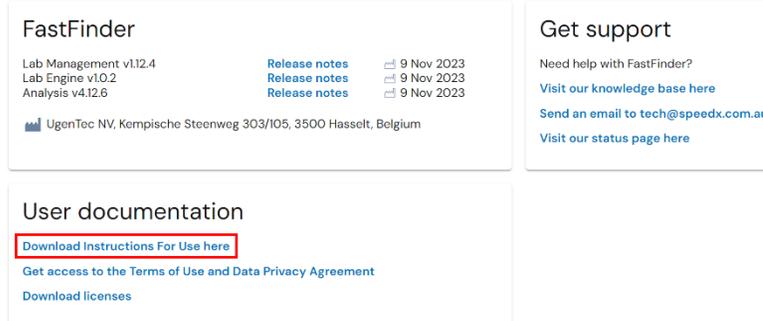
Le cas échéant, des exceptions de pare-feu devront être configurées pour ces hôtes. Pour accéder à l'intégralité du contenu des modes d'emploi dans l'application, l'hôte *.player.vimeo.com doit aussi être accessible.

Pour obtenir de plus amples informations sur la plate-forme **FastFinder**, veuillez consulter le **Mode d'emploi de FastFinder** disponible dans le menu **Support** (Assistance).

Accéder au menu Support (Assistance)

- Sélectionnez Support (Assistance) dans la liste des options de menu sur le panneau latéral gauche
- Sélectionnez **Download** (Télécharger) **Instructions For Use here** (Mode d'emploi ici) dans la rubrique **User Documentation** (Documentation de l'utilisateur)

Support



23.2 Plugin de FastFinder (nouvel utilisateur)

Veuillez consulter le **FastFinder Instructions For Use** (Mode d'emploi de FastFinder) pour obtenir des informations détaillées sur la configuration des tests, accessible depuis le menu **Support** (Assistance)

FastFinder est accessible directement via un navigateur Web en vous connectant avec votre nom d'utilisateur et votre mot de passe personnels sur <https://customer.fastfinder.app>.

- Sélectionnez **Lab Configuration** (Configuration de laboratoire) > **Assays** (Tests) dans le menu de gauche
- Sélectionnez **Add New Assay** (Ajouter un nouvel test)
 - > Pour LC480 II > Sélectionnez **ResistancePlus MG (LC480)** dans la liste
 - > Pour 7500 Fast et 7500 Fast Dx > Sélectionnez **ResistancePlus MG (7500)** dans la liste
 - > Pour CFX96 Dx et CFX96 Touch > Sélectionnez **ResistancePlus MG (CFX)** dans la liste
- Sélectionnez **Import Selected** (Importer Sélectionné)

Pour activer ou désactiver les versions du plugin de test

- > Dans l'onglet **General** (Général)
- > Accédez à **Status** (Statut)
- > Sélectionnez **Active** pour activer ou désactiver la version de test

23.3 Dénomination des échantillons

Des identifiants d'échantillons peuvent être assignés à un plugin de test afin d'automatiser la détection des puits et des types d'échantillons à analyser.

Sélectionnez Lab **Configuration** (Configuration de laboratoire) > **Assays** (Tests) dans le menu de gauche

- Dans l'onglet **General** (Général), accédez au tableau **Sample types** (Types d'échantillons) identifiants (préfixe), sélectionnez  pour ajouter un nouvel identifiant
 - > Saisissez le mot, l'acronyme ou la lettre de votre choix dans la zone de texte
 - > Les identifiants par défaut sont fournis pour les témoins. Vous pouvez les supprimer en sélectionnant  à côté de l'identifiant

- Dans le logiciel de l'instrument (avant ou après la fin de l'analyse) attribuez le même identifiant aux puits
 - > Pour **LC480 II**, consultez la **rubrique 19** pour obtenir des informations sur la configuration des identifiants d'échantillons dans le fichier d'analyse
 - > Pour **7500 Fast**, consultez la **rubrique 20** pour obtenir des informations sur la configuration des identifiants d'échantillons dans le fichier d'analyse
 - > Pour **7500 Fast Dx**, consultez la **rubrique 21** pour obtenir des informations sur la configuration des identifiants d'échantillons dans le fichier d'analyse
 - > Pour **CFX96 Dx et CFX96 Touch**, consultez la **rubrique 22** pour obtenir des informations sur la configuration des identifiants d'échantillons dans le fichier d'analyse

REMARQUE : les identifiants des échantillons sont insérés en respectant la casse. L'identifiant doit correspondre exactement à ceux assignés dans le fichier d'exécution.

23.4 Analyse

Sélectionnez **Analyses** dans le menu de gauche pour lancer une nouvelle analyse

Sélectionnez **+ Create New Analysis** (+ Créer une nouvelle analyse) en haut à droite de l'écran

Recherchez le fichier à télécharger pour analyse dans un répertoire spécifique.

- Sélectionnez le fichier d'exécution (données) dans le dossier pertinent
 - > Sélectionnez **Open** (Ouvrir)

L'analyse apparaîtra dans l'**onglet Open** (Ouvrir) comme une nouvelle ligne dans le tableau

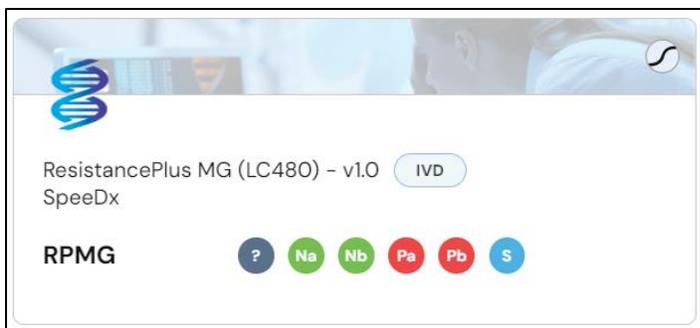
- Si tous les identifiants ont été placés et lus correctement, le statut apparaîtra comme **Ready for review** (Prêt pour la révision)
- Si les informations de tests doivent être assignées manuellement aux puits, le statut apparaîtra comme **Manual PCR setup required** (Configuration PCR manuelle requise)

Assignez manuellement les informations des tests à la plaque si la dénomination des échantillons n'a pas été configurée dans le menu Lab **Configuration** (Configuration du laboratoire) > **Assays** (Tests) ou si les noms/cibles des échantillons n'ont pas été saisis dans le logiciel de l'instrument

Sélectionnez le fichier d'exécution dans l'**onglet Open** (Ouvrir) du menu **Analyses**

La configuration des plaques s'affichera dans l'onglet **PCR setup** (Configuration du PCR) pour l'analyse ouverte.

- Pour LC480 II > Sélectionnez **ResistancePlus MG (LC480)**



- Pour 7500 Fast et 7500 Fast Dx > Sélectionnez **ResistancePlus MG (7500)**



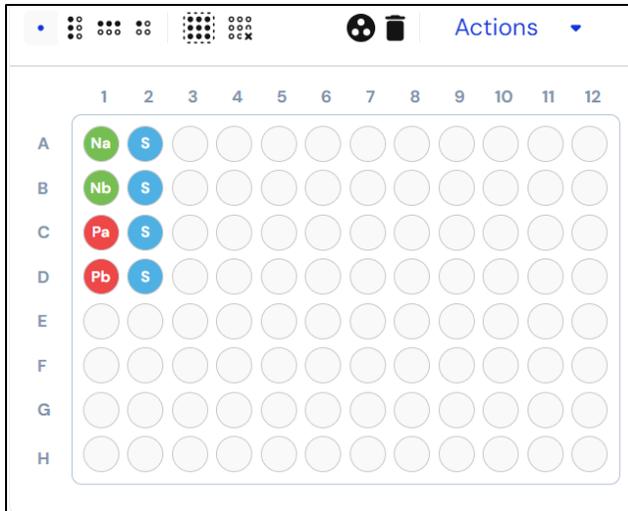
- Pour CFX96 Dx et CFX96 Touch > Sélectionnez **ResistancePlus MG (CFX)**



- Sélectionnez les puits et assignez-les comme :
 - > Échantillon régulier (S)
 - > Témoin négatif (Na)
 - > Pas de modèle de témoin (Nb)
 - > Témoin positif (MG mutant de l'ARNr 23S) (Pa)
 - > Témoin positif (MG type naturel de l'ARNr 23S) (Pb)

Pour assigner des puits sur la plaque, vous pouvez :

- Cliquer et faire glisser les symboles colorés pour les placer sur la plaque
- Sélectionner un ou plusieurs puits (en utilisant les touches Ctrl et Maj) puis cliquer sur les symboles colorés appropriés pour les ajouter à la sélection.



- Sélectionner **Analyze** (Analyser)

23.5 Résultats

Veuillez consulter le **Tableau 57** pour obtenir un résumé des résultats possibles des échantillons rapportés.

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

23.5.1 Onglet Résumé

Les résultats du témoin de chaque test sont affichés en haut à gauche de l'onglet Résumé, ce qui permet d'évaluer la validité du témoin pour l'analyse. Vous trouverez plus de d'informations en agrandissant ce bloc, où s'affichent les données par témoin.

Control Results Filters | ⚙️

	<input checked="" type="checkbox"/> Assay			
	<input checked="" type="checkbox"/> WT_MG	<input checked="" type="checkbox"/> Mut_MG	<input checked="" type="checkbox"/> NEG_MG	<input checked="" type="checkbox"/> NEG_MG
	VALID	VALID	VALID	VALID
M. genitalium	⊕ Detected	⊕ Detected	⊖ Not detected	⊖ Not detected
23S rRNA mutation	⊖ Not detected	⊕ Detected	⊖ Not detected	⊖ Not detected

Si un témoin est non valide, tous les échantillons peuvent être marqués comme ayant échoué en sélectionnant **Fail all samples for this assay** (Échouer tous les échantillons pour ce tests)

Fail all samples for this assay

Failure reason ▼

Vous devez choisir un motif d'échec dans le menu déroulant

Les résultats des échantillons sont affichés en bas à gauche de l'onglet Résumé. À côté du titre, des icônes supplémentaires peuvent fournir un aperçu général des résultats de l'analyse et indiquer le nombre total d'échantillons associés à une icône particulière.

- Containing an error notification
- Containing a warning notification
- Marked for retest
- Containing at least one detected assay result
- Containing at least one not detected assay result
- Containing at least one invalid assay result
- Containing at least one inconclusive assay result

Chaque échantillon est affiché comme une ligne dans le tableau des résultats des échantillons.

▼ Sample Results 1 4 1 1

Filters |

<input type="checkbox"/>		Sample	Assay	Result
<input type="checkbox"/>		Sample_MG	ResistancePlus MG (CFX)	Invalid: M. genitalium, 23S rRNA mutation
<input type="checkbox"/>		Sample_MG	ResistancePlus MG (CFX)	Detected: M. genitalium
<input type="checkbox"/>		Sample_MG	ResistancePlus MG (CFX)	Detected: M. genitalium, 23S rRNA mutation
<input type="checkbox"/>		Sample_MG	ResistancePlus MG (CFX)	Detected: M. genitalium, 23S rRNA mutation
<input type="checkbox"/>		Sample_MG	ResistancePlus MG (CFX)	Not detected

Le menu déroulant fournit plus d'informations sur chaque résultat cible et Cq par échantillon (Voir les exemples fournis à la **rubrique 23.10**).

Chaque échantillon peut être marqué comme échoué si vous le souhaitez (par exemple, si l'échantillon est non valide) en sélectionnant **Fail this sample for this assay** (Échec de cet échantillon pour cet test)

Fail this sample for this assay

Failure reason ▼

Vous devez choisir un motif d'échec dans le menu déroulant

Les graphiques de fluorescence peuvent être visualisés en haut à droite de l'onglet Résumé

Une disposition de la plaque peut être visualisée en bas à droite de l'onglet Résumé

Vous trouverez des exemples d'informations et d'avertissements résumés dans le **Tableau 56** ci-dessous.

Tableau 56. Exemples d'informations et d'avertissements pour le logiciel d'analyse ResistancePlus® MG*		
Type d'échantillon	Erreur	Notification
Notifications de cibles des tests		
Échantillon classique	Non valide : Échec du CI	Mise en garde : CI non valide. Nouveau prélèvement et nouveau test de l'échantillon.
	Valide mais témoin non valide : mise en garde de témoin non valide sur un échantillon régulier avec résultat valide	Mise en garde : témoin non valide détecté. Nouveau prélèvement et nouveau test de l'échantillon.
Témoin négatif	Non valide : contamination	Mise en garde : possible contamination détectée.
Absence de modèle de témoin		
Notifications de cibles génétiques		
Échantillon classique	Cible Cq en dehors du seuil	Info : Cq en dehors du seuil
Témoin positif	Non valide : cible non détectée	Mise en garde : la réaction prévue ne s'est pas produite dans le témoin.
Témoin négatif	Non valide : contamination	Mise en garde : possible contamination
	Non valide : CI non détecté	Mise en garde : CI non détecté
	Non valide : CI Cq en dehors du seuil	Mise en garde : Cq en dehors du seuil
Absence de modèle de témoin	Non valide : contamination	Mise en garde : possible contamination
Échantillon ou témoin régulier	Signal de fluorescence instable	Mise en garde : signal de fluorescence instable. Révision requise
	Cq détecté avec une faible fluorescence	Fluorescence finale dRn inférieure au seuil

* Les exemples répertoriés ici peuvent ne pas s'appliquer à tous les plugin de test. Veuillez consulter le mode d'emploi de FastFinder pour toutes les notifications possibles, accessible depuis le menu Support (Assistance)

23.5.2 Onglet Détails

Toutes les cibles sont affichées pour chaque échantillon comme des lignes différentes dans le tableau de gauche. Sélectionnez une ou plusieurs lignes pour afficher les courbes de fluorescence correspondantes dans le graphique en haut à droite et pour mettre en évidence les puits dans la disposition de la plaque en bas à droite.

Sélectionnez **Filters** (Filtres) pour afficher les résultats en fonction de paramètres tels que le nom du test, le type d'échantillon, la cible et le résultat.

Finaliser l'analyse et empêcher toute modification ultérieure des utilisateurs

- > Sélectionnez **Authorize** (Autoriser)
- > Sélectionnez **Authorize** (Autoriser) à nouveau pour confirmer
- Assigner une seconde révision
 - > Sélectionnez **Actions, Assign label** (Actions, Assigner un libellé) et **Second Review** (Deuxième révision)
- Assigner l'analyse à un autre utilisateur
 - > Sélectionnez **Actions** et **Assign User** (Assigner un utilisateur)
 - > Sélectionnez l'utilisateur souhaité dans la liste déroulante
- Rejeter l'analyse
 - > Sélectionnez **Actions** et **Discard Analysis** (Rejeter l'analyse)
 - > Ajoutez un commentaire et sélectionnez **Discard** (Rejeter) pour confirmer

23.6 Courbe de référence

Vous pouvez enregistrer une courbe de référence et l'utiliser pour comparer des échantillons sur la même plaque ou sur des plaques différentes.

- Sélectionnez l'échantillon souhaité dans l'onglet **Summary** (Résumé) ou **Details** (Détails)
- Dans le menu du graphique d'amplification, cliquez sur > Sélectionner 
 - > Cochez la case de la courbe souhaitée et sélectionnez **Mark as reference** (Marquer comme référence)

Cette courbe de référence apparaîtra dorénavant associée à l'essai dans le menu **Lab Configuration** (Configuration du laboratoire) > **Assays** (tests) dans l'onglet **PCR** et pourra être désactivée à tout moment.

23.7 Exporter des résultats

- Pour exporter les résultats d'une analyse autorisée sous forme de fichier CSV ou PDF :
 - > Sélectionnez **Actions > Downloads** (Téléchargements) dans l'angle supérieur droit
 - > Sélectionnez l'un des types de rapport suivants : **Analyse (CSV)** ou **Analyse (PDF)**
- Pour exporter les résultats de plusieurs analyses préalablement autorisées dans un seul fichier CSV :
 - > Accédez au menu **Archive > Sample Results** (Exemples de résultats)
 - > Utilisez les filtres en haut de la page pour afficher les résultats souhaités (le fichier CSV est limité à 10 000 résultats)
 - > Sélectionnez **Export CSV** (Exporter CSV) dans l'angle supérieur droit

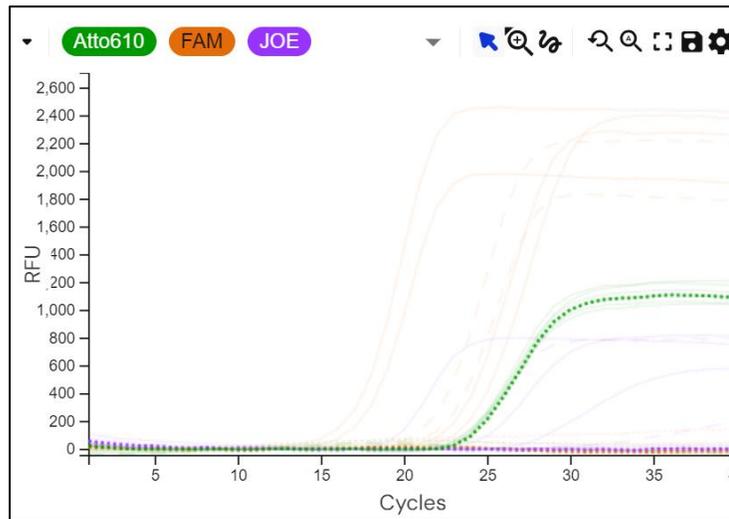
23.8 Récupération des analyses autorisées

- Toutes les analyses autorisées sont disponibles en sélectionnant **Archive > Analysis Results** (Archive > Résultats d'analyse). Sélectionnez une ligne pour revenir à l'aperçu des résultats de cette analyse précise
- Tous les échantillons réguliers autorisés sont sauvegardés dans le menu **Archive > Sample Results** (Archive > Résultats des échantillons). Lorsque vous sélectionnez un échantillon, vous obtenez des informations supplémentaires, notamment le nom de l'analyse et un descriptif des résultats
- Les résultats obtenus pour chaque cible de tous les échantillons réguliers et témoins autorisés sont sauvegardés dans le menu **Archive > Target Results** (Archive > Résultats des cibles). Sélectionnez une cible pour la mettre en évidence sur le graphique de fluorescence. Sélectionnez le nom de l'analyse pour revenir à l'aperçu des résultats de cette analyse précise.

23.9 Graphiques d'exemple de témoins

Les exemples suivants montrent les courbes d'amplification (courbes d'amplification corrigées par rapport aux valeurs de référence) et l'aperçu des résultats du logiciel d'analyse **ResistancePlus MG (LC480)** pour les types d'échantillons témoins.

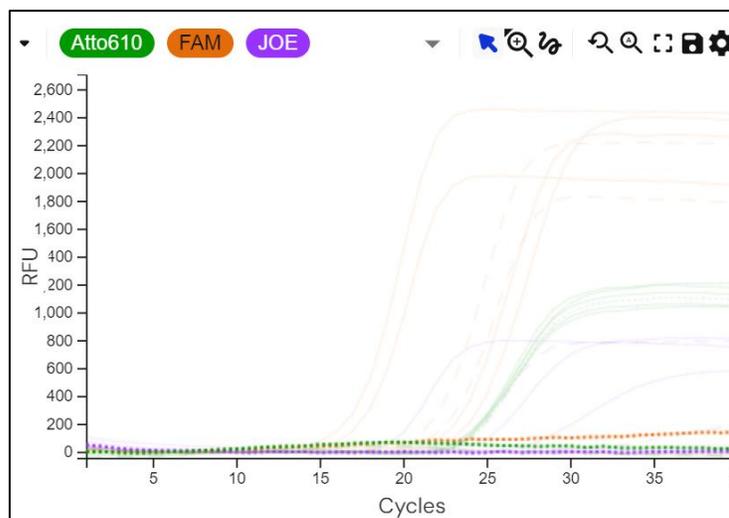
23.9.1 Témoign négatif de *M. genitalium* (Na) (échantillon négatif)



CI MgPa mutations de l'ARNr 23S

Échantillon	Test	Résultat
Na	ResistancePlus MG (LC480)	Valide
	M. genitalium	⊖ Not detected
	23S rRNA mutation	⊖ Not detected

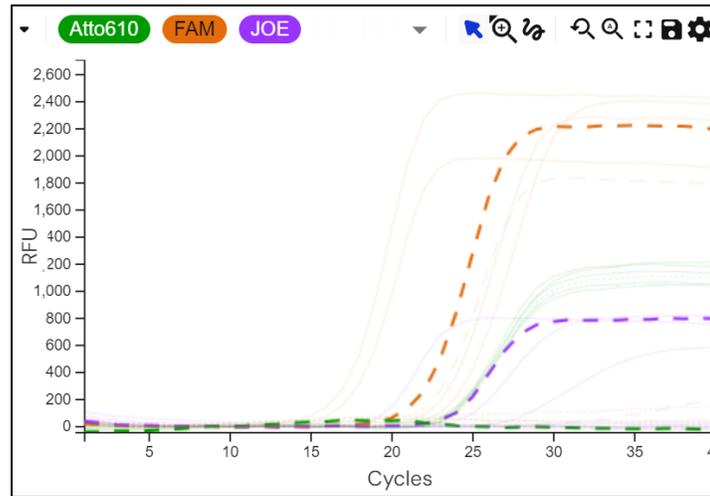
23.9.2 Controle sans matrice (No template control)



CI MgPa mutation de l'ARNr 23S

Échantillon	Test	Résultat
Nb	ResistancePlus MG (LC480)	Valide
	M. genitalium	⊖ Not detected
	23S rRNA mutation	⊖ Not detected

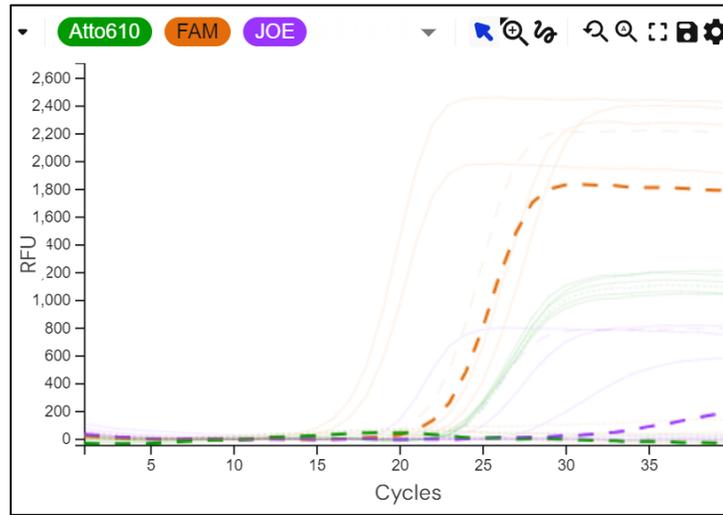
23.9.3 *M. genitalium*, témoin mutant de l'ARNr 23S (Pa)



CI MgPa mutation de l'ARNr 23S

Échantillon	Test	Résultat
Pa	ResistancePlus MG (LC480)	Valide
	M. genitalium	⊕ Detected
	23S rRNA mutation	⊕ Detected

23.9.4 *M. genitalium*, témoin de type sauvage de l'ARNr 23S (Pb)



CI MgPa mutation de l'ARNr 23S

Échantillon	Test	Résultat
Pb	ResistancePlus MG (LC480)	Valide
	M. genitalium	⊕ Detected
	23S rRNA mutation	⊖ Not detected

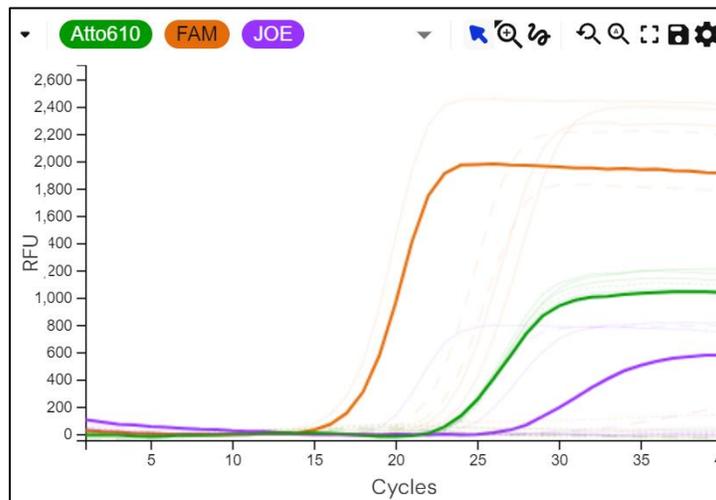
23.10 Exemples

Vous trouverez des exemples de résultats obtenus avec le logiciel d'analyse **ResistancePlus® MG** dans le **Tableau 57**.

Tableau 57. Exemples de résultats pour interprétation du logiciel d'analyse ResistancePlus® MG			
	Échantillon	Test	Résultat
	Échantillon 101	ResistancePlus MG (LC480)	Non détecté
	Échantillon 102	ResistancePlus MG (LC480)	Détecté : <i>M. genitalium</i>
	Échantillon 103	ResistancePlus MG (LC480)	Détecté : <i>M. genitalium</i>, mutation de l'ARNr 23S
¹	Échantillon 104	ResistancePlus MG (LC480)	Non valide : <i>M. genitalium</i>, mutation de l'ARNr 23S

¹ Un échantillon interprété comme non valide sera signalé par Mise en garde : CI non valide. Nouveau prélèvement et nouveau test de l'échantillon.

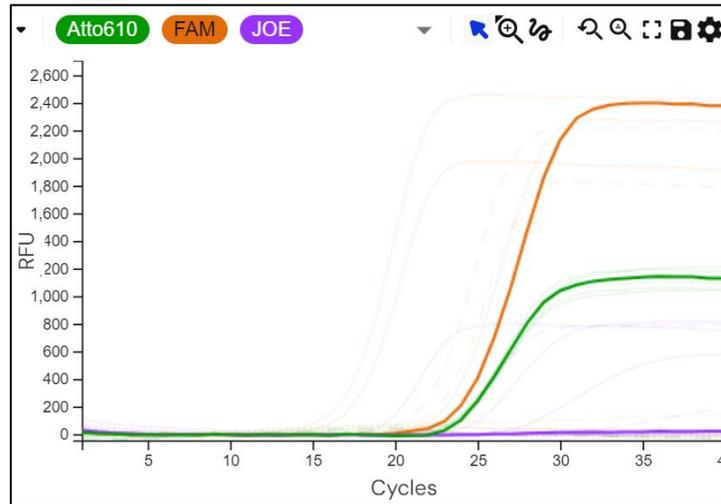
23.10.1 Exemple 1. Échantillon *M. genitalium*, échantillon ARNr 23S de type sauvage avec un nombre faible de copies



CI MgPa mutation de l'ARNr 23S

Échantillon	Test	Résultat
Échantillon 105	ResistancePlus MG (LC480)	Détecté : <i>M. genitalium</i>
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="border: 1px solid #ccc; padding: 5px; width: 40%;"> <p>Assay results</p> <p><i>M. genitalium</i> ⊕ Detected</p> <p>23S rRNA mut... ⊖ Not detected</p> </div> <div style="width: 55%;"> <p>MgPa</p> <p>↳ A2 ● Detected 17.451</p> <hr/> <p>23S rRNA mutation</p> <p>↳ A2 ● Detected 27.229</p> <hr/> <p>IC</p> <p>↳ A2 ● Detected 23.307</p> </div> </div>		

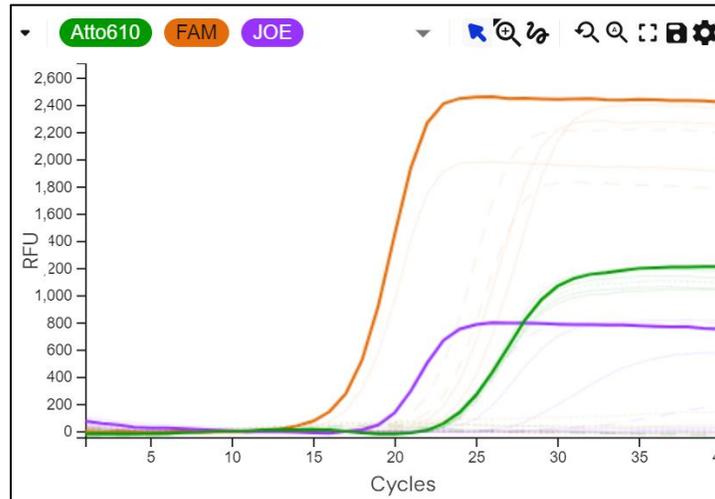
23.10.2 Exemple 2. Échantillon *M. genitalium*, échantillon ARNr 23S de type sauvage avec un nombre faible de copies



CI MgPa mutation de l'ARNr 23S

Échantillon	Test	Résultat				
Échantillon 106	ResistancePlus MG (LC480)	Déecté : <i>M. genitalium</i>				
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>Assay results</p> <table border="1"> <tr> <td>M. genitalium</td> <td>⊕ Detected</td> </tr> <tr> <td>23S rRNA mut...</td> <td>⊖ Not detected</td> </tr> </table> </div> <div style="width: 50%;"> <p>MgPa</p> <p>↳ F2 ● Detected 24.094</p> <hr/> <p>23S rRNA mutation</p> <p>↳ F2 ● Not detected</p> <hr/> <p>IC</p> <p>↳ F2 ● Detected 23.587</p> </div> </div>			M. genitalium	⊕ Detected	23S rRNA mut...	⊖ Not detected
M. genitalium	⊕ Detected					
23S rRNA mut...	⊖ Not detected					

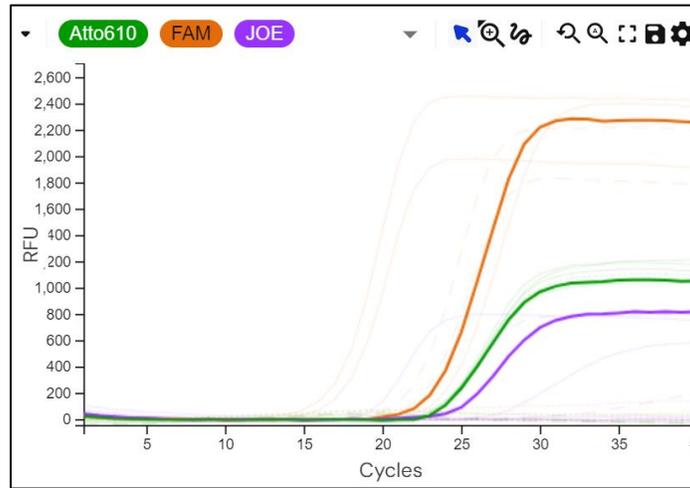
23.10.3 Exemple 3. Échantillon *M. genitalium*, échantillon ARNr 23S de type mutant avec un nombre élevé de copies



CI MgPa mutation de l'ARNr 23S

Échantillon	Test	Résultat
Échantillon 107	ResistancePlus MG (LC480)	Déecté : <i>M. genitalium</i> , mutation de l'ARNr 23S
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="border: 1px solid #ccc; padding: 5px; width: 40%;"> <p>Assay results</p> <p>M. genitalium ⊕ Detected</p> <p>23S rRNA mut... ⊕ Detected</p> </div> <div style="width: 55%;"> <p>MgPa</p> <p>↳ D2 ● Detected 16.767</p> <hr/> <p>23S rRNA mutation</p> <p>↳ D2 ● Detected 19.125</p> <hr/> <p>IC</p> <p>↳ D2 ● Detected 23.421</p> </div> </div>		

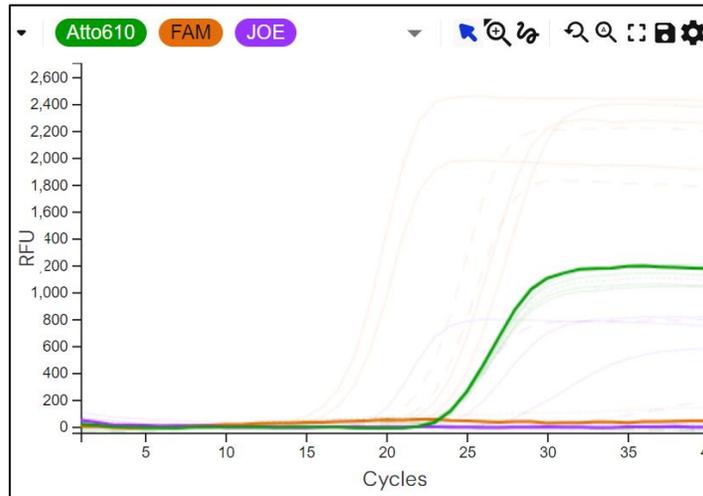
23.10.4 Exemple 4. Échantillon *M. genitalium*, échantillon ARNr 23S de type mutant avec un nombre faible de copies



CI MgPa mutation de l'ARNr 23S

Échantillon	Test	Résultat
Échantillon 108	ResistancePlus MG (LC480)	Déecté : <i>M. genitalium</i> , mutation de l'ARNr 23S
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>Assay results</p> <ul style="list-style-type: none"> M. genitalium + Detected 23S rRNA mut... + Detected </div> <div style="width: 50%;"> <p>MgPa</p> <p>↳ C2 • Detected 23.191</p> <hr/> <p>23S rRNA mutation</p> <p>↳ C2 • Detected 24.539</p> <hr/> <p>IC</p> <p>↳ C2 • Detected 23.528</p> </div> </div>		

23.10.5 Exemple 5. Échantillon négatif



CI MgPa mutation de l'ARNr 23S

Échantillon	Test	Résultat
Échantillon 109	ResistancePlus MG (LC480)	Non détecté

Assay results

M. genitalium ⊖ Not detected

23S rRNA mut... ⊖ Not detected

MgPa

↳ E2 ● Not detected

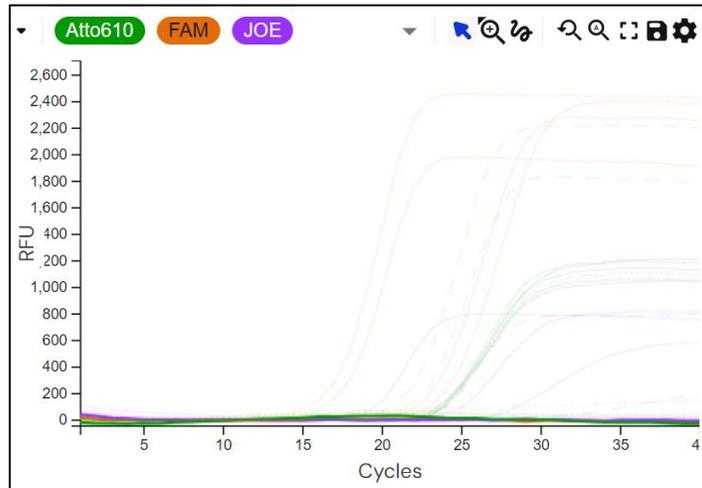
23S rRNA mutation

↳ E2 ● Not detected

IC

↳ E2 ● Detected 23.583

23.10.6 Exemple 6. Échantillon non valide



CI MgPa mutation de l'ARNr 23S

Échantillon	Test	Résultat
Échantillon 110	ResistancePlus MG (LC480)	Non valide : <i>M. genitalium</i> , mutation de l'ARNr 23S

Assay results

M. genitalium	⚠ Invalid	Warning: IC invalid. Re-extract and re-test sample.
23S rRNA mut...	⚠ Invalid	Warning: IC invalid. Re-extract and re-test sample.

MgPa

↳ B2 ● Not detected ▼

23S rRNA mutation

↳ B2 ● Not detected ▼

IC

↳ B2 ● Not detected ▼

Dans cet exemple, le CI n'a pas été amplifié et n'a donc pas été détecté. Pour les échantillons de CI non valides, effectuez un nouveau prélèvement de l'échantillon, puis répétez le test.

24 Glossaire



Conformité européenne
Pour usage de diagnostic *in vitro*



Référence catalogue



Code de lot



Représentant autorisé
Dans la Communauté européenne



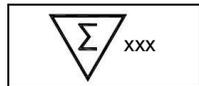
Fabricant



Date de fabrication



Limite de température



Quantité suffisante pour
xxx déterminations



Date de péremption



Importateur européen



Marque d'évaluation de la
conformité au Royaume-Uni

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

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

© Copyright 2025 SpeedX Pty. Ltd.