



ResistancePlus[®] MG

Multiplex-Realtime-PCR-Assay zur Identifikation von *Mycoplasma genitalium* und zum Nachweis von Mutationen, die mit einer Resistenz gegenüber Azithromycin in Verbindung stehen



IVDR Certified

Produkt	Plattform	Größe (Reaktionen)	Bestellnr.
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
Zubehörprodukte – Analysesoftware			
ResistancePlus [®] MG (LC480)			REF 99003
ResistancePlus [®] MG (7500)			REF 99002
ResistancePlus [®] MG (CFX)			REF 99008



MedEnvoy
Prinzessinnen Margrietplantsoen 33 – Suite 123
2595 AM Den Haag
Die Niederlande



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

NUR ZUR VERWENDUNG DURCH FACHPERSONAL

Nicht zum Verkauf in den USA

Inhalt

1	Produktbeschreibung	5
2	Verwendungszweck	5
3	Informationen zu Pathogenen	5
4	Kitinhalt	6
5	Versand und Lagerung	7
6	Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen	8
6.1	Allgemeines	8
6.2	Labor	8
6.3	Handhabung der Proben	8
6.4	Assay	8
6.5	Sicherheitsvorkehrungen	8
6.6	Assay-Plugins: Warnhinweise/Vorsichtsmaßnahmen/Einschränkungen	8
7	Zugehörige Produkte und Verbrauchsmaterialien	9
8	Prinzip der Technologie	11
9	Verfahrensübersicht	13
10	Detaillierte Vorgehensweise	14
10.1	Probenentnahme, Transport und Lagerung	14
10.1.1	Validierte Geräte zur Probenentnahme	14
10.1.2	Saubere Sammlung, Transport und Lagerung von Urin	14
10.1.3	Entnahme, Transport und Lagerung von Trockenabstrichproben	14
10.1.4	multi-Collect Specimen Collection Kit (Abbott, Bestell-Nr. 9K12-01) Entnahme, Transport und Lagerung	14
10.1.5	Aptima®-Urine Collection Kit (Hologic, Bestell-Nr. 301040) Sammlung, Transport und Lagerung	15
10.1.6	Aptima® Multitest Swab Specimen Collection Kit (Hologic, Bestell-Nr. PRD-03546) Entnahme, Transport und Lagerung	15
10.1.7	DeltaSwab ViCUM® 2 mL + beflockter Standardtupfer (deltalab, Bestell-Nr. 304278) Entnahme, Transport und Lagerung	16
10.1.8	Vacumed® Urine ohne Konservierungsmittel (FL medical, Bestell-Nr. 44950) Sammlung, Transport und Lagerung	16
10.1.9	Regulärer FLOQSwab™ in 1 mL UTM™ Medium (Copan Bestell-Nr. 359C) Entnahme, Transport und Lagerung	16
10.1.10	cobas® PCR-Medium (Roche, Bestell-Nr. 06466281190) Entnahme, Transport und Lagerung	16
10.1.11	Validierte Probenextrakte	17
10.2	Probenbearbeitung	17
10.3	Internal Control (Interne Kontrolle) (IC)	17
10.3.1	Internal Control (Interne Kontrolle) auf dem MagNA Pure 96	18
10.3.2	Internal Control (Interne Kontrolle) auf dem MICROLAB STARlet IVD	18
10.3.3	Internal Control (Interne Kontrolle) auf dem QIASymphony® SP	18
10.3.4	Internal Control (Interne Kontrolle) auf dem easyMAG®	19
10.4	Vorbereitung der Echtzeit-PCR	20
10.4.1	Vorbereitung des Mastergemischs	20
10.4.2	Stabilität des Mastergemisches	21
11	Programmierung und Analyse	21
12	Interpretation der Ergebnisse	21
13	Einschränkungen	22
14	Qualitätskontrolle	23
15	Anweisungen für ResistancePlus® MG-Positivkontrollen	23

15.1	Gebrauchsanweisung.....	23
16	Leistungsmerkmale.....	24
16.1	Klinische Leistung	24
16.1.1	Klinische Studie 1	24
16.1.2	Klinische Studie 2.....	26
16.1.3	Klinische Studie 3.....	26
16.1.4	Klinische Studie 4.....	28
16.1.5	Klinische Studie 5.....	29
16.1.6	Klinische Studie 6.....	31
16.1.7	Klinische Studie 7.....	32
16.2	Analytische Leistung	33
16.2.1	Reproduzierbarkeit und Wiederholbarkeit	33
16.2.2	Analytische Sensitivität.....	36
16.2.3	Analytische Spezifität	36
16.2.4	Potentielle Störstoffe	37
16.2.5	Kreuzreaktivität mit anderen 23S-rRNA-Mutationen.....	39
17	Kundenservice und technischer Support	39
18	Literaturhinweise.....	40
19	Anhang 1: LightCycler® 480 Instrument II.....	41
19.1	Programmierung des LightCycler® 480 Instrument II (LC480 II).....	41
19.2	Farbkompensation für das LightCycler® 480 Instrument II	46
19.3	Interpretation der Ergebnisse	48
20	Anhang 2: Applied Biosystems® 7500 Fast.....	49
20.1	Programmieren des Applied Biosystems® 7500 Fast.....	49
20.2	Interpretation der Ergebnisse	52
21	Anhang 3: Applied Biosystems 7500 Fast Dx.....	53
21.1	Programmieren des Applied Biosystems® 7500 Fast Dx.....	53
21.2	Interpretation der Ergebnisse	56
22	Anhang 4: Bio-Rad CFX96™ Dx und CFX96 Touch™ Real-Time PCR System	57
22.1	Programmierung des CFX96™ Dx und CFX96 Touch™ Real-Time PCR System.....	57
22.2	Interpretation der Ergebnisse	60
23	Anhang A: Interpretation des Ergebnisses	61
23.1	FastFinder-Plattform – IT-Mindestanforderungen	61
23.2	Assay-Plug-in (neuer Benutzer).....	62
23.3	Probenbenennung.....	63
23.4	Analyse	63
23.5	Ergebnisse	65
23.5.1	Registerkarte „Summary“ (Zusammenfassung).....	65
23.5.2	Registerkarte „Details“ (Einzelheiten).....	67
23.6	Referenzkurve.....	68
23.7	Exportieren der Ergebnisse	68
23.8	Abrufen autorisierter Analysen	68
23.9	Beispieldiagramme für Kontrollen.....	68

23.9.1	<i>M. genitalium</i> , Negativkontrolle (Na) (negative Probe)	68
23.9.2	No-Template-Kontrolle (Nb)	70
23.9.3	<i>M. genitalium</i> , 23S-rRNA-Mutantenkontrolle (Pa)	70
23.9.4	<i>M. genitalium</i> , 23S-rRNA-Wildtypkontrolle (Pb).....	71
23.10	Beispiele	72
23.10.1	Beispiel 1. Probe mit hoher Kopienzahl von <i>M. genitalium</i> , 23S-rRNA-Wildtyp	72
23.10.2	Beispiel 2. Probe mit geringer Kopienzahl von <i>M. genitalium</i> , 23S-rRNA-Wildtyp	73
23.10.3	Beispiel 3. Probe mit hoher Kopienzahl von <i>M. genitalium</i> , 23S-rRNA-Mutante	74
23.10.4	Beispiel 4. Probe mit geringer Kopienzahl von <i>M. genitalium</i> , 23S-rRNA-Mutante	75
23.10.5	Beispiel 5. Negative Probe	76
23.10.6	Beispiel 6. Ungültige Probe.....	77
24	Glossar	78

1 Produktbeschreibung

Das **ResistancePlus**[®] MG Kit weist gleichzeitig *M. genitalium* sowie 4 Mutationen an den Positionen 2058 und 2059 im 23S-rRNA-Gen (*E.-coli*-Nummerierung) nach, die mit einer Resistenz gegenüber Azithromycin (einem Makrolidantibiotikum) in Verbindung stehen. Das **ResistancePlus**[®] MG Kit ist ein in einem einzigen Well ablaufender PCR-Multiplex mit 3 Ablesewerten. Ablesewert 1 zeigt das Vorliegen bzw. die Abwesenheit von *M. genitalium* durch Nachweis des MgPa-Gens an, Ablesewert 2 zeigt das Vorliegen einer A2058G-, A2059G-, A2058T- oder A2058C-Mutation im 23S-rRNA-Gen an und Ablesewert 3 ist eine interne Kontrolle zur Überwachung der Extraktionseffizienz und qPCR-Hemmung. Durch die Verwendung von **PlexZyme**[®] und **PlexPrime**[®] erreicht das **ResistancePlus**[®] MG Kit höchste Multiplex-Leistung und Spezifität. Das Assay wird mit Proben validiert, die mit dem MagNA Pure 96 System (Roche), MICROLAB STARlet IVD (Hamilton), QIAAsymphony[®] SP (QIAGEN), NUCLISENS[®] easyMAG[®] (Biomérieux) und der Real-Time-Detektion auf dem Roche LightCycler[®] 480 Instrument II (LC480 II), dem Applied Biosystems[®] 7500 Fast (7500 Fast), Applied Biosystems[®] 7500 Fast Dx (7500 Fast Dx) und den Bio-Rad CFX96[™] Dx (CFX96 Dx) und CFX96 Touch[™] (CFX96 Touch) Real-Time PCR Detection Systems extrahiert wurden.

2 Verwendungszweck

Das **ResistancePlus**[®] MG Kit ist ein qualitativer Realtime-Multiplex-PCR-Test für die *In-vitro*-Diagnostik zur Identifikation von *M. genitalium* und zum Nachweis von 4 Mutationen im 23S-rRNA-Gen (A2058G, A2059G, A2058T und A2058C, *Escherichia-coli*-Nummerierung), die mit einer Resistenz gegenüber Azithromycin (einem Makrolidantibiotikum) in Verbindung stehen. Es ist zur Verwendung als Hilfsmittel zur Diagnose von *M. genitalium* bestimmt und weist Mutationen bei *M. genitalium* nach, die mit einer Resistenz gegenüber Azithromycin in Verbindung stehen. Es ist zusammen mit klinischen und anderen Laborinformationen zu verwenden.

Das **ResistancePlus**[®] MG Kit kann an folgenden Patientenproben eingesetzt werden: Urin von Männern und Frauen sowie Vaginalabstriche von symptomatischen und asymptomatischen Patienten.

Ein negatives Ergebnis schließt eine Infektion mit *M. genitalium* nicht aus und bedeutet auch keine Bestätigung einer Sensibilität gegenüber Azithromycin, da eine Behandlung auch aufgrund anderer Mechanismen fehlschlagen kann.

Das **ResistancePlus**[®] MG Kit ist zur Verwendung im professionellen Bereich, z. B. in Krankenhäusern, Referenz- oder staatlichen Labors, bestimmt. Es ist nicht für Selbsttests oder zur Verwendung in der häuslichen Umgebung oder am Krankenbett bestimmt.

3 Informationen zu Pathogenen

M. genitalium ist ein kleines Bakterium, das im menschlichen Urogenitaltrakt vorkommt. *M. genitalium* ist mit einer Reihe sexuell übertragbarer Infektionen (Sexually Transmitted Infections, STIs) in Verbindung gebracht worden. Beim Mann ist es die zweithäufigste Ursache der nichtgonorrhöischen Urethritis (NGU) und ist darüber hinaus mit Prostatitis, Epididymitis und Balanoposthitis (Entzündung der Eichel und Vorhaut) assoziiert¹. Bei der Frau ist es mit Zervizitis, Unterleibsentzündungen (Pelvic Inflammatory Disease, PID) einschließlich Endometritis (Entzündung der Gebärmutter-schleimhaut) und Salpingitis (Eileiterentzündung) assoziiert^{1,2,3}.

Für die Behandlung von *M. genitalium* und für das Syndrommanagement von STIs wie NGU und Zervizitis wird gemeinhin Azithromycin eingesetzt. Azithromycin gehört zur Gruppe der Makrolidantibiotika und erzielt seine Wirkung dadurch, dass es sich an die 23S-rRNA bindet, um die Proteinsynthese zu hemmen. Punktmutationen in dem 23S rRNA-Gen von *M. genitalium*, A2058G, A2059G, A2058T, A2058C und A2059C (*E.-coli*-Nummerierung) sind mit Therapieversagen und/oder *in-vitro*-Resistenz gegenüber Azithromycin in Verbindung gebracht worden^{4,5}. Die häufigsten Mutationen sind A2058G und A2059G, die einer kürzlich veröffentlichten Studie zufolge 89 % der Makrolidresistenz-Mutationen ausmachen⁶.

4 Kitinhalt

Tabelle 1 Kitinhalt für <i>ResistancePlus</i> [®] MG				
Farbe des Deckels	Inhalt	Beschreibung	Bestell-Nr. 20001L-01 (100 Reaktionen)	Bestell-Nr. 2000125 (25 Reaktionen)
Blau	<i>Plex</i> Mastermix (Plex-Mastergemisch), 2x	Mastergemisch mit den für die qPCR erforderlichen Komponenten einschließlich dNTPs, MgCl ₂ , DNA-Polymerase und Puffer	1 x 1 mL	1 x 250 µL
Braun	MG+23S-Gemisch, 20x	Gemisch mit Oligonukleotiden [^] zur Amplifikation und Detektion von <i>M. genitalium</i> und 23S-rRNA-Mutationen	1 x 100 µL	1 x 25 µL
Weiß	Control Mix 1 (Kontrollgemisch 1), 20x	Gemisch mit Oligonukleotiden [^] zur Amplifikation und Detektion des Assays für die interne Kontrolle für LC480 II	1 x 100 µL	1 x 25 µL
Rot	Internal Control Cells (Interne Kontrollzellen) [#]	Interne Kontrollzellen mit dem DNA-Template für die interne Kontrolle zur Überwachung der Extraktions- und Amplifikationseffizienz	1 x 500 µL	1 x 100 µL
Neutral	Nuclease Free Water (Nuclease-freies Wasser)	Wasser in PCR-Qualität	1 x 1 mL	1 x 1 mL

[#] Die Template-Röhrchen sind von den Oligo-Gemischen getrennt, d. h. im Raum zur Behandlung von Templates oder Nukleinsäuren, zu lagern

[^] Oligonukleotide sind PCR-Primer-Paare (einschließlich *PlexPrime*[®]-Primer), *PlexZyme*[®]-Enzyme und fluoreszierende Sonden

Tabelle 2. Kitinhalt für <i>ResistancePlus</i> [®] MG ₍₅₅₀₎				
Farbe des Deckels	Inhalt	Beschreibung	Bestell-Nr. 2000201 (100 Reaktionen)	Bestell-Nr. 2000225 (25 Reaktionen)
Blau	<i>Plex</i> Mastermix (Plex-Mastergemisch), 2x	Mastergemisch mit den für die qPCR erforderlichen Komponenten einschließlich dNTPs, MgCl ₂ , DNA-Polymerase und Puffer	1 x 1 mL	1 x 250 µL
Braun	MG+23S-Gemisch, 20x	Gemisch mit Oligonukleotiden [^] zur Amplifikation und Detektion von <i>M. genitalium</i> und 23S-rRNA-Mutationen	1 x 100 µL	1 x 25 µL
Weiß	Control Mix 2 (Kontrollgemisch 2), 20x	Gemisch mit Oligonukleotiden [^] zur Amplifikation und Detektion des Assays für die interne Kontrolle für 7500 Fast und 7500 Fast Dx	1 x 100 µL	1 x 25 µL
Rot	Internal Control Cells (Interne Kontrollzellen) [#]	Interne Kontrollzellen mit dem DNA-Template für die interne Kontrolle zur Überwachung der Extraktions- und Amplifikationseffizienz	1 x 500 µL	1 x 100 µL
Neutral	Nuclease Free Water (Nuclease-freies Wasser)	Wasser in PCR-Qualität	1 x 1 mL	1 x 1 mL

[#] Die Template-Röhrchen sind von den Oligo-Gemischen getrennt, d. h. im Raum zur Behandlung von Templates oder Nukleinsäuren, zu lagern

[^] Oligonukleotide sind PCR-Primer-Paare (einschließlich *PlexPrime*[®]-Primer), *PlexZyme*[®]-Enzyme und fluoreszierende Sonden

Tabelle 3. Kitinhalt für <i>ResistancePlus</i> [®] MG ₍₆₇₅₎				
Farbe des Deckels	Inhalt	Beschreibung	Bestell-Nr. 2000301 (100 Reaktionen)	Bestell-Nr. 2000325 (25 Reaktionen)
Blau	<i>Plex</i> Mastermix (Plex-Mastergemisch), 2x	Mastergemisch mit den für die qPCR erforderlichen Komponenten einschließlich dNTPs, MgCl ₂ , DNA-Polymerase und Puffer	1 x 1 mL	1 x 250 µL
Braun	MG+23S-Gemisch, 20x	Gemisch mit Oligonukleotiden [^] zur Amplifikation und Detektion von <i>M. genitalium</i> und 23S-rRNA-Mutationen	1 x 100 µL	1 x 25 µL
Weiß	Control Mix 3, 20x (Kontrollgemisch 3)	Gemisch mit Oligonukleotiden [^] zur Amplifikation und Detektion des Assays für die interne Kontrolle für CFX96 Dx and CFX96 Touch	1 x 100 µL	1 x 25 µL
Rot	Internal Control Cells (Interne Kontrollzellen) [#]	Interne Kontrollzellen mit dem DNA-Template für die interne Kontrolle zur Überwachung der Extraktions- und Amplifikationseffizienz	1 x 500 µL	1 x 100 µL
Neutral	Nuclease Free Water (Nuklease-freies Wasser)	Wasser in PCR-Qualität	1 x 1 mL	1 x 1 mL

[#] Die Template-Röhrchen sind von den Oligo-Gemischen getrennt, d. h. im Raum zur Behandlung von Templates oder Nukleinsäuren, zu lagern

[^] Oligonukleotide sind PCR-Primer-Paare (einschließlich *PlexPrime*[®]-Primer), *PlexZyme*[®]-Enzyme und fluoreszierende Sonden

5 Versand und Lagerung

- Die Komponenten der *ResistancePlus*[®] MG-Kits werden auf Trockeneis oder in Eisgelpackungen versandt. Alle Komponenten sollten nach Erhalt bei -25 °C bis -15 °C gelagert werden. Es wird empfohlen, die Anzahl der Gefrier-/Auftauzyklen auf 15 zu begrenzen.
- Bei Lagerung unter den empfohlenen Bedingungen und sachgemäßer Handhabung bleibt die Aktivität des Kits bis zum auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum erhalten. Nicht nach dem Verfallsdatum verwenden.
- Jedes schwerwiegende Vorkommnis ist SpeedX unter tech@speedx.com.au zu melden.

6 Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

6.1 Allgemeines

- Nur für die *In-vitro*-Diagnostik.
- Lesen Sie diese Gebrauchsanweisung vor Gebrauch sorgfältig durch. Befolgen Sie die beschriebenen Verfahren genau, um die Zuverlässigkeit der Testergebnisse sicherzustellen. Jede Abweichung von diesen Verfahren kann die Testleistung beeinträchtigen.
- Die Benutzer sollten in der Verwendung des **ResistancePlus**[®] MG-Assays angemessen geschult sein.
- Jedes schwerwiegende Vorkommnis muss dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Mitgliedsstaates, in dem der Benutzer und/oder Patient ansässig ist, gemeldet werden.

6.2 Labor

- Es wird empfohlen, Probenvorbereitung/-extraktion, Zubereitung des Mastergemischs, Probenzugabe und Thermocycling an räumlich getrennten Arbeitsplätzen durchzuführen. Zumindest sollte das PCR-Instrument räumlich getrennt von den Bereichen für die Vorbereitung der Reaktionen aufgestellt sein.
- Es wird empfohlen, die üblichen Vorsichtsmaßnahmen zur Laborsicherheit zu befolgen. Beim Umgang mit Reagenzien ist angemessene persönliche Schutzausrüstung wie Handschuhe, Schutzbrille und Laborkittel zu tragen.
- In klinischen Proben können pathogene Organismen vorhanden sein. Behandeln Sie alle biologischen Proben als potenziell infektiös und befolgen Sie die Sicherheitsverfahren Ihrer Einrichtung für den Umgang mit Chemikalien und biologischen Proben.
- Befolgen Sie die Entsorgungsverfahren für gefährliche Abfälle Ihrer Einrichtung, um Proben, Reagenzien und andere potenziell kontaminierte Materialien ordnungsgemäß zu entsorgen.

6.3 Handhabung der Proben

- Proben müssen mittels der üblichen Labormethoden oder gemäß der Anleitung des Entnahmekits entnommen, transportiert und aufbewahrt werden.

6.4 Assay

- Grundlegende Vorsichtsmaßnahmen zur Verhinderung einer Kontamination der PCR-Reaktionen sind beispielsweise die Verwendung steriler Filterpipettenspitzen, die Verwendung einer neuen Pipettenspitze für jede Pipettieraktion und die räumliche Trennung der einzelnen Arbeitsschritte.
- PCR-Tests können leicht durch vorher verwendete PCR-Produkte kontaminiert werden. Reaktionsgefäße nach Abschluss der PCR niemals öffnen.
- Die Assayreagenzien enthalten einen IDTE-Puffer, der eine schwere Augenreizung verursachen kann. Es wird empfohlen, die Reagenzien in einem gut belüfteten Bereich zu verwenden und beim Umgang damit geeignete persönliche Schutzausrüstung wie Handschuhe, Schutzbrille und Laborkittel zu tragen.

6.5 Sicherheitsvorkehrungen

- Sicherheitsdatenblätter (Safety Data Sheets, SDS) sind auf Anfrage erhältlich. Für weitere Informationen senden Sie eine E-Mail an tech@speedx.com.au.

6.6 Assay-Plugins: Warnhinweise/Vorsichtsmaßnahmen/Einschränkungen

- Die SpeedX-Software kann die Analyse von mittels des Testkits erzeugten Rohdaten nur dann steuern, wenn sie mit dementsprechenden PCR-Instrument verwendet wird. Sie steuert nicht die Probenvorbereitung, die Reaktionen, die Programmierung der Geräte oder die Behandlung.
- Die Benutzer müssen angemessen in der Verwendung der **ResistancePlus**[®] MG-Analysesoftware geschult werden und der Zugriff muss auf den jeweils zugewiesenen Einzelbenutzer beschränkt sein.
- Es wird empfohlen, innerhalb des IT-Systems und der Infrastruktur, in denen die Software eingesetzt wird, eine Benutzerauthentifizierung und Cybersicherheitskontrollen wie eine Antivirus-Software oder Firewall zu implementieren.
- Sollten Sie einen Cybersicherheitsvorfall feststellen, z. B. unbefugten Zugriff und Ransomware-Angriffe, wenden Sie sich bitte an tech@speedx.com.au, um weitere Unterstützung zu erhalten.

7 Zugehörige Produkte und Verbrauchsmaterialien

Material für die Positivkontrolle

- **ResistancePlus**[®] MG-Positivkontrollkit (SpeedX, Kat.-Nr. 95001)

Allgemeines Verbrauchs- und Labormaterial

- Handschuhe und saubere Laborkittel
- Vortex-Mixer
- Tischzentrifuge für 0,5-mL- und 1,5-mL-Röhrchen
- Mikropipetten
- Sterile aerosolresistente Pipettenspitzen
- 0,5-mL-Röhrchen und 1,5-mL-Röhrchen (PCR-Qualität)
- 2,0-mL-Röhrchen (zur Vorverdünnung der Zellen für die interne Kontrolle)

Für das MagNA Pure 96 Instrument

- 1x phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)
- MagNA Pure 96 Internal Control Tube (Roche, Bestell-Nr. 06374905001)
- MagNA Pure 96 DNA und Viral NA Small Volume Kit (Roche, Best.-Nr. 06543588001)
- MagNA Pure 96 DNA und Viral NA Large Volume Kit (Roche, Best.-Nr. 06374891001)
- MagNA Pure 96 System Fluid (extern) (Roche, Bestell-Nr. 06640729001)
- MagNA Pure 96 Processing Cartridge (Roche, Bestell-Nr. 06241603001)
- MagNA Pure 96 Pure tip 1000 µL (Roche, Bestell-Nr. 6241620001)
- MagNA Pure 96 Output Plate (Roche, Bestell-Nr. 06241611001)
- MagNA Pure 96 Sealing Foil (Roche, Bestell-Nr. 06241638001)

Für das MICROLAB STARlet Instrument

- 1x phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)
- STARMag 96 x 4 Universal Cartridge Kit (384T) (Seegene, Best.-Nr. 744300.4.UC384)
- 2,0-mL-Röhrchen

Für QIASymphony[®] SP-Instrument

- 1x phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)
- Probenvorbereitungskartuschen, 8 Wells (Qiagen, Bestell-Nr. 997002)
- 8-Magnetstab-Schutzhülse (Qiagen, Bestell-Nr. 997004)
- Filterspitzen, 200 µL und 1500 µL (Qiagen, Best.-Nr. 990332 und 997024)
- 2-mL-Röhrchen (Sarstedt, Best.-Nr. 72.639 oder 72.694)
- 14-mL-Polystyrolröhrchen (Corning, Best.-Nr. 352051)
- DSP Virus/Pathogen Mini-Kit (QIAGEN, Katalog-Nr. 937036)

Für NucliSENS® easyMAG®-Instrument

- 1x phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)
- NucliSENS® easyMAG® Lysepuffer 4X1L (Biomérieux, Best.-Nr. 280134)
- NucliSENS® easyMAG® 2ML 48T (Biomérieux, Best.-Nr. 200292)
- NucliSENS® easyMAG® Magnetisches Silika (Biomérieux, Best.-Nr. 280133)
- NucliSENS® easyMAG® Extraktionspuffer 1 (Biomérieux, Best.-Nr. 280130)
- NucliSENS® easyMAG® Extraktionspuffer 2 (Biomérieux, Best.-Nr. 280131)
- NucliSENS® easyMAG® Extraktionspuffer 3 (Biomérieux, Best.-Nr. 280132)
- NucliSENS® easyMAG® Verbrauchsmaterialien (Biomérieux, Best.-Nr. 280135)

Für LightCycler® 480 Instrument II

- **PlexPCR®** Colour Compensation (CC) (Farbkompensations)-Kit (SpeedX, Bestell-Nr. 90001)
- LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 (Multiwell-Platte 96) (Roche, Best.-Nr. 04729692001)
- LightCycler® 480 Sealing Foil (Verschlussfolie) (Roche, Best.-Nr. 04729757001)

Für Applied Biosystems® 7500 Fast und 7500 Fast Dx

- MicroAmp® Optische 96-Well Reaktionsplatten (ThermoFisher Scientific, Katalog-Nr. 4316813)
- MicroAmp® Optical Adhesive Film (Optische Klebefolie) (ThermoFisher Scientific, Bestell-Nr. 4360954)

Für Bio-Rad CFX96™ Dx und CFX96 Touch™ Real-time PCR Detection System

- Multiplate™ 96-well PCR plates (Bio-rad, Best.-Nr. MLP9601)
- Microseal® 'B' PCR Plate Sealing Film, selbstklebend, optisch (Bio-rad, Best.-Nr. MSB1001)

Probenentnahmeverrichtungen

- Multi-Collect Probenentnahmekit (Abbott, Kat.-Nr. 9K12-01)
- Aptima® Urinsammelkit (Hologic, Kat.-Nr. 301040)
- Aptima® Multitest Abstrichprobenentnahmekit (Hologic, Cat no PRD-03546)
- DeltaSwab ViCUM® 2 mL + beflackter Standardtupfer (deltalab, Kat.-Nr. 304278)
- Vacumed® Urin ohne Konservierungsmittel (FL Medical, Kat.-Nr. 44950)
- Regular FLOQSwab™ in 1 mL UTM™ Medium (Copan, Kat.-Nr. 359C)
- cobas® PCR-Medium (Roche, Kat.-Nr. 06466281190)

8 Prinzip der Technologie

Mit der Realtime-PCR (qPCR) können spezifische Target-Nukleinsäuren von Pathogenen amplifiziert und nachgewiesen werden. **PlexPCR[®]** ist ein qPCR-Verfahren, das **PlexZyme[®]**-Enzyme zur Detektion und Meldung des amplifizierten Produkts durch Generation eines Fluoreszenzsignals (**Abbildung 1**) nutzt. **PlexPrime[®]**-Primer zur spezifischen Amplifikation von mutierten Sequenzen, die an die mutationsspezifische **PlexZyme[®]**-Erkennung gekoppelt sind (**Abbildung 2**).

PlexZyme[®]-Enzyme sind Katalysator-DNA-Komplexe, die aus zwei DNA-Oligos bestehen, die als Teilenzyme bezeichnet werden. Jedes Teilenzym verfügt über eine Target-spezifische Region, einen katalytischen Kern und eine universelle Sondenbindungsregion. Ist das Target-Produkt vorhanden, binden die beiden Teilenzyme nebeneinander an das Target-Produkt und bilden so das aktive **PlexZyme[®]**, das durch seine katalytische Aktivität eine markierte Sonde spaltet. Durch die Spaltung trennen sich Fluorophor und Quencher-Farbstoffe voneinander, wodurch ein fluoreszierendes Signal erzeugt wird, das in Echtzeit beobachtet werden kann. **PlexZyme[®]**-Enzyme verfügen gegenüber alternativen Nachweistechnologien über eine höhere Spezifität, da für den Nachweis zwei Teilenzyme gebunden werden müssen. **PlexZyme[®]**-Enzyme sind außerdem mehrfach verwendbare Enzyme. In jedem PCR-Zyklus können mehrere Sonden gespalten werden, sodass ein starkes, empfindliches Signal erzeugt wird. **PlexZyme[®]**-Assays sind hoch sensitiv und spezifisch und ideal für den Multiplexnachweis von Pathogenen geeignet.

PlexPrime[®]-Primer haben drei Funktionsregionen. Die lange 5'-Region verankert den Primer an einer bestimmten Stelle und die kurze 3'-Region zielt selektiv auf eine Verlängerung der mutierten Base. Eine Insertionssequenz liegt zwischen den Regionen 5' und 3' und fungiert als Brückenstruktur, die eine Target-unabhängige Sequenz in das resultierende Amplikon inseriert und den Selektionsdruck auf die 3'-Region erhöht. Im Multiplex ist jeder **PlexPrime[®]**-Primer dafür ausgelegt, auf eine spezifische mutierte Base zu zielen, und er enthält eine eindeutige Insertionssequenz, sodass unterscheidbare Sequenzen mutierter Amplikons erzeugt werden. Im Unterschied zu anderen sondenbasierten Detektionstechnologien kann das **PlexZyme[®]**-Enzym mit dem **PlexPrime[®]**-Primer überlappt werden, um auf das spezifische mutierte Amplikon zu zielen, das die mutierte Base und die eingebaute Insertionssequenz enthält. Die einzigartige Kombination von **PlexPrime[®]**-Primern, die an **PlexZyme[®]**-Enzyme gekoppelt sind, ermöglicht die spezifische Amplifikation von mutierten Sequenzen sowie einen sensitiven und spezifischen Nachweis im Multiplex.

Abbildung 1. Schematische Darstellung der **PlexZyme[®]**-Detektion und der universellen Signalisierung

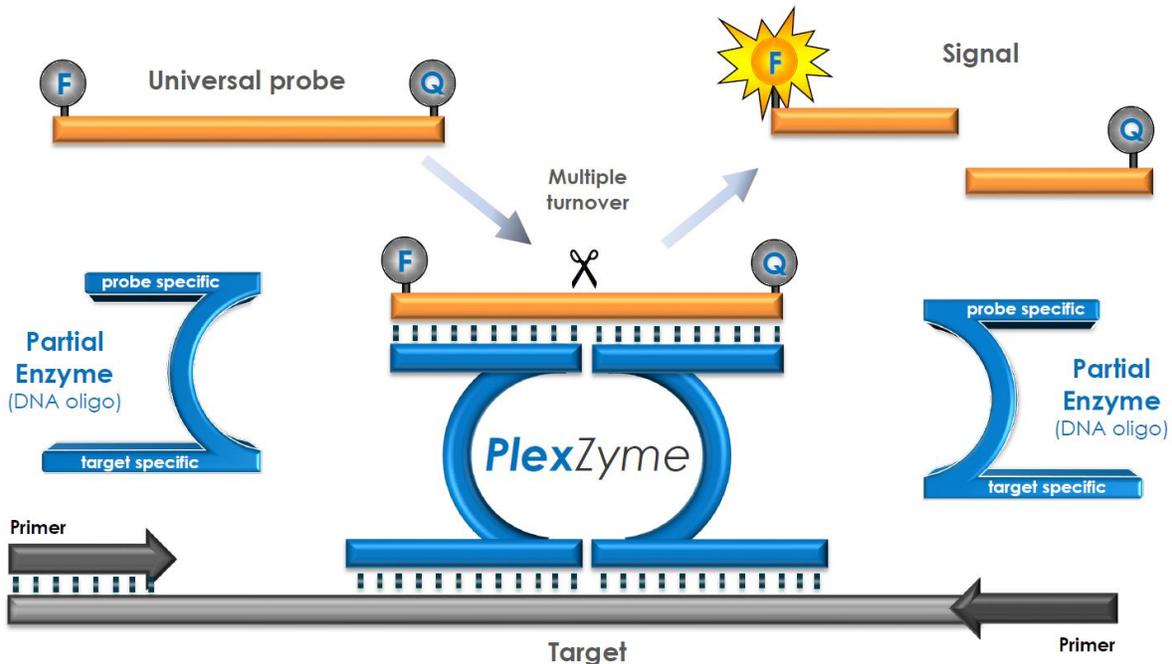
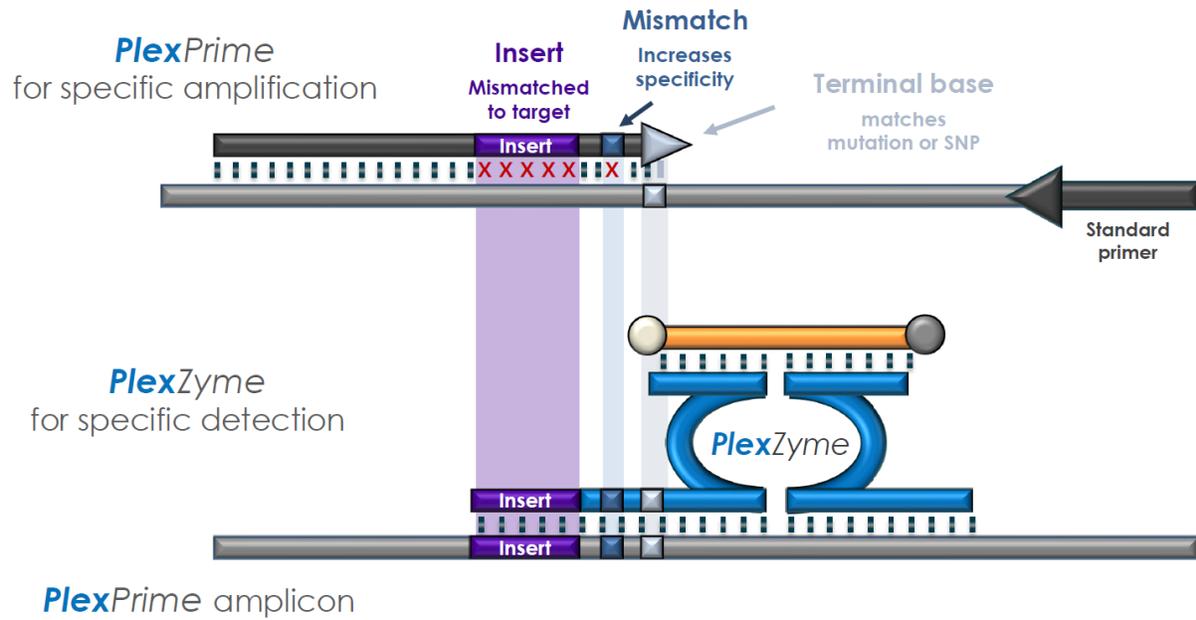
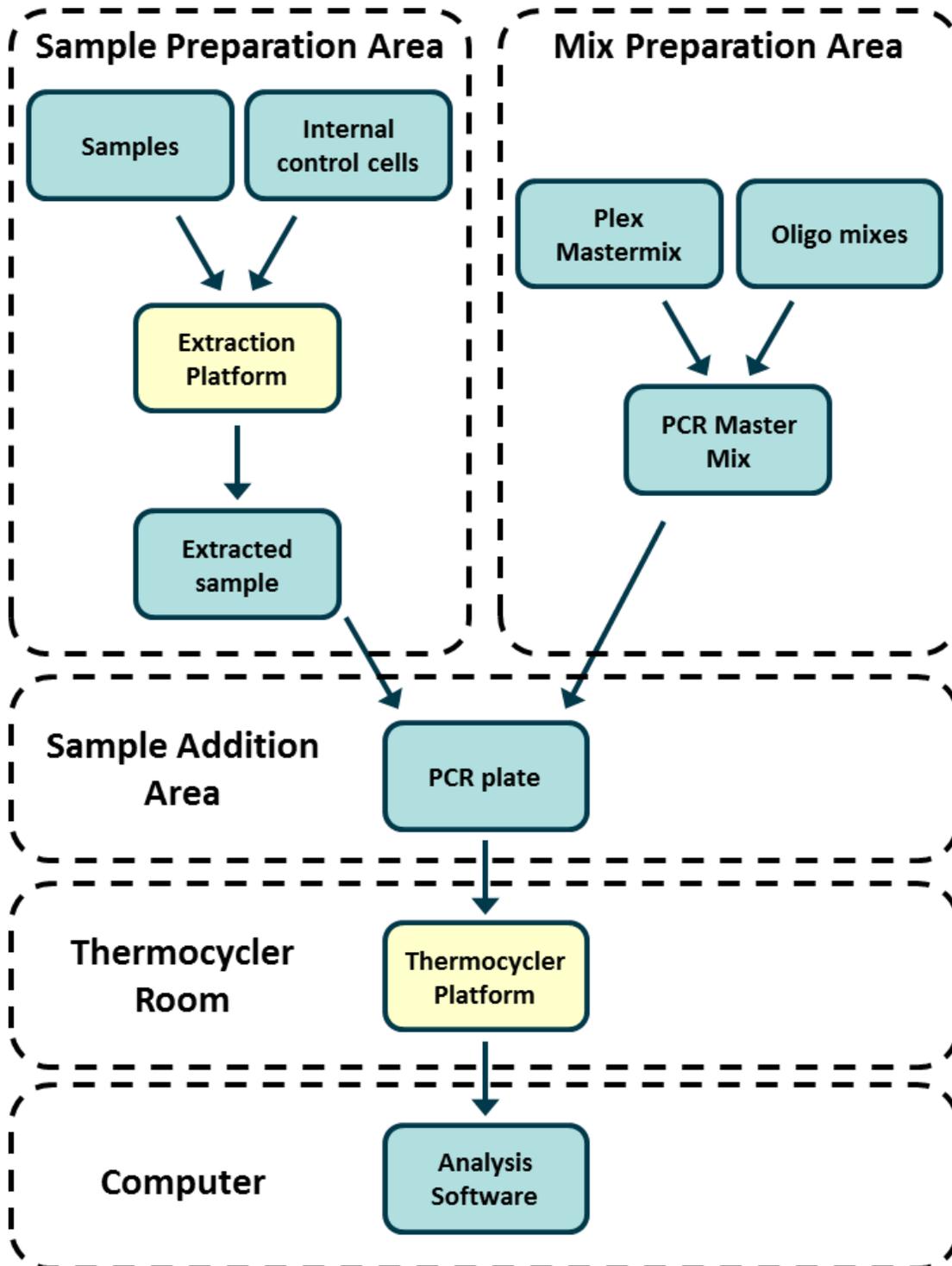


Abbildung 2. Schematische Darstellung des *PlexPrime*[®] Primers gekoppelt mit *PlexZyme*[®]-Detektion. Der *PlexPrime*[®] Primer amplifiziert spezifisch die mutierte Sequenz und *PlexZyme*[®] Enzyme weisen spezifisch das Amplikon nach.



9 Verfahrensübersicht



10 Detaillierte Vorgehensweise

Hinweis: Die Bezeichnung der mitgelieferten Reagenzien ist kursiv gedruckt und die Farbe der Röhrchenkappe folgt in Klammern.

10.1 Probenentnahme, Transport und Lagerung

Urin von Männern und Frauen sowie Vaginalabstriche von symptomatischen und asymptomatischen Patienten müssen unter Einhaltung der im Labor üblichen Standardmethoden oder gemäß Anleitung des Entnahme-Kits entnommen, transportiert und gelagert werden.

10.1.1 Validierte Geräte zur Probenentnahme

Erfolgen Entnahme, Lagerung und Transport von Proben auf unzureichende oder unsachgemäße Weise, sind falsche Testergebnisse möglich. Um die Qualität und Stabilität der Proben zu gewährleisten, wird eine Schulung für die Probenentnahme dringend empfohlen.

Geräte zur Probenentnahme, die für das **ResistancePlus**[®] MG Kit validiert wurden, sind im folgenden Abschnitt mit kurzen Hinweisen zu den Anweisungen des Herstellers zu Handhabung und Transport aufgelistet. Diese Hinweise sind nicht als Ersatz für die Anweisungen des Herstellers zu verstehen. Beachten Sie zur ordnungsgemäßen Probenentnahme stets die Anweisungen des Herstellers des Probenentnahmegeräts.

Vor jeder Probenentnahme müssen geschulte Mitarbeiter sicherstellen, dass sie mit dem Produkt zur Probenentnahme und der jeweiligen Methode hinreichend vertraut sind. Als Mindestanforderung müssen folgende Punkte der Testbeschreibung berücksichtigt werden: Angabe des Probentyps, ausreichendes Volumen, Verfahren, zur Entnahme erforderliche Materialien, Vorbereitung des Patienten sowie Anweisungen zur ordnungsgemäßen Handhabung und Aufbewahrung.

10.1.2 Saubere Sammlung, Transport und Lagerung von Urin

1. Es wird empfohlen, einen klaren, sterilen Urinsammelbecher ohne Konservierungsmittel oder Transportmedium für die Probenentnahme durch den Patienten zu verwenden
2. Der Patient sollte 20–50 mL des Erststrahlurins sammeln und den Behälter mit dem Deckel fest verschließen.
3. Es wird empfohlen, die Urinprobe in zwei Beuteln mit Saugelinge zu transportieren. Die Lagertemperaturen für Urinproben hängen von der geplanten Verarbeitungszeit ab.

10.1.3 Entnahme, Transport und Lagerung von Trockenabstrichproben

Zur Entnahme von Vaginalabstrichen können von Arzt und Patient Trockenabstrichtupfer verwendet werden. Aufgrund der Variabilität ist zur sachgerechten Probenentnahme die Packungsbeilage des Herstellers zu beachten.

10.1.4 multi-Collect Specimen Collection Kit (Abbott, Bestell-Nr. 9K12-01) Entnahme, Transport und Lagerung

Im Folgenden sind die Anweisungen für die Sammlung bzw. Entnahme und den Transport von Urinproben und Vaginalabstrichen mit dem multi-Collect Specimen Collection Kit (Abbott, Bestell-Nr. 9K12-01) zusammengefasst.

10.1.4.1 Sammlung, Transport und Lagerung von Urinproben

1. Der Patient sollte vor der Probenentnahme mindestens eine Stunde nicht uriniert haben.
2. Entsorgen Sie den Probenentnahmetupfer; dieser ist zur Sammlung der Urinprobe nicht erforderlich.
3. Mit dem Urinsammelbecher sollte der Patient die ersten 20 bis 30 mL des ausgeschiedenen Urins (des ersten Teils des Harnstrahls) auffangen.
4. Schrauben Sie die Kappe des Transportröhrchens ab und achten Sie darauf, den Transportpuffer nicht zu verschütten.
5. Gehen Sie mit der Kappe und dem Röhrchen vorsichtig um, um eine Kontamination zu vermeiden.
6. Verwenden Sie die Transferpipette aus Kunststoff, um den Urin aus dem Sammelbecher in das Transportröhrchen zu transferieren, bis der Flüssigkeitsstand im Röhrchen innerhalb des transparenten Füllfensters des daran angebrachten Etiketts liegt; andernfalls sollte eine weitere Probe gesammelt werden. Überfüllen Sie das Röhrchen nicht. Möglicherweise ist etwas mehr als die bei vollständigem Drücken des Pipettenballons der Transferpipette gewonnene Flüssigkeitsmenge erforderlich, um das benötigte Urinprobenvolumen zu überführen.
7. Verschließen Sie das Transportröhrchen wieder vorsichtig. Stellen Sie sicher, dass die Kappe fest verschlossen ist.
8. Versehen Sie das Transportröhrchen mit einem Haftetikett mit Angaben zur Probe, einschließlich des Datums der Sammlung. Achten Sie darauf, dass das Füllfenster am Transportröhrchen nicht verdeckt wird.
9. Transportieren und lagern Sie das Transportröhrchen nach der Urinsammlung bis zu 14 Tage lang bei 2 °C bis 30 °C. Wenn eine längere Lagerung erforderlich ist, lagern Sie es bis zu 90 Tage lang bei -10 °C oder darunter.

10.1.4.2 Entnahme, Transport und Lagerung von Vaginalabstrichproben

1. Entsorgen Sie die Einweg-Transferpipette; sie ist zur Entnahme von Vaginalabstrichen nicht erforderlich.
2. Entnehmen Sie den sterilen Tupfer aus der Verpackung und achten Sie darauf, die Tupferspitze nicht zu berühren oder auf eine Oberfläche zu legen.
3. Führen Sie die weiße Spitze des Probenentnahmetupfers etwa 5 cm in die Vagina ein.
4. Drehen Sie den Tupfer 15 bis 30 Sekunden lang vorsichtig gegen die Seitenwände der Vagina.
5. Ziehen Sie den Tupfer vorsichtig heraus.
6. Gehen Sie mit der Kappe und dem Röhrchen vorsichtig um, um eine Kontamination zu vermeiden.
7. Schrauben Sie das Transportröhrchen ab und legen Sie den Probenentnahmetupfer mit nach unten zeigender weißer Spitze sofort in das Transportröhrchen.
8. Brechen Sie den Tupfer an der eingekerbten Linie am Stiel vorsichtig ab; seien Sie vorsichtig, um ein Verspritzen des Inhalts zu vermeiden.
9. Verschließen Sie das Transportröhrchen wieder. Stellen Sie sicher, dass die Kappe fest verschlossen ist.
10. Versehen Sie das Transportröhrchen mit einem Haftetikett mit Angaben zur Probe, einschließlich des Datums der Sammlung.
11. Transportieren und lagern Sie das Transportröhrchen nach der Urinsammlung bis zu 14 Tage lang bei 2 °C bis 30 °C. Wenn eine längere Lagerung erforderlich ist, lagern Sie es bis zu 90 Tage lang bei -10 °C oder darunter.

10.1.5 Aptima® Urine Collection Kit (Hologic, Bestell-Nr. 301040) Sammlung, Transport und Lagerung

Im Folgenden sind die Anweisungen für die Sammlung und den Transport von männlichen und weiblichen Urinproben mit dem Aptima®-Urine Collection Kit (Hologic, Bestell-Nr. 301040) zusammengefasst. Bitte beachten Sie, dass die klinische Leistung dieses Produkts zur Probensammlung bisher nur an Proben gezeigt wurde, die mit MagNA Pure 96 System und dem MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Large Volume Kit extrahiert wurden. Weiterführende Informationen finden Sie in den Abschnitten 10.2 und 16.1.5.

1. Es wird empfohlen, einen klaren, sterilen Urinsammelbecher ohne Konservierungsmittel oder Transportmedium für die Probenentnahme durch den Patienten zu verwenden.
2. Der Patient wird angewiesen, 20–30 mL des Erststrahlurins in den bereitgestellten Urinsammelbecher abzugeben. Patientinnen sollten den Schambereich vor der Abgabe der Probe nicht reinigen.
3. Verwenden Sie die Pipette und das Transportröhrchen, die im Aptima® Urine Collection Kit enthalten sind, und überführen Sie 2 ml Urin mit der Pipette in das unverschlossene Probenröhrchen. Die Füllhöhe der korrekten Urinmenge muss innerhalb der schwarzen Fülllinien auf dem Urintransportröhrchen liegen. Der Urin muss innerhalb von 24 Stunden nach der Sammlung aus dem klaren, sterilen Urinbecher in das Aptima Urinprobenröhrchen überführt werden.
4. Verschließen Sie das Urintransportröhrchen wieder fest.
5. Nach der Urinsammlung müssen die verarbeiteten Urinproben im Aptima-Urintransportröhrchen bei 2 °C bis 30 °C transportiert und bis zur Testdurchführung bei 2 °C bis 30 °C gelagert werden. Beachten Sie die Anweisungen des Herstellers hinsichtlich einer optimalen Lagerung.

10.1.6 Aptima® Multitest Swab Specimen Collection Kit (Hologic, Bestell-Nr. PRD-03546) Entnahme, Transport und Lagerung

Im Folgenden sind die Anweisungen für die Entnahme und den Transport von Vaginalabstrichen mit dem Aptima® Multitest Swab Specimen Collection Kit (Hologic, Bestell-Nr. PRD-03546) zusammengefasst. Bitte beachten Sie, dass die klinische Leistung dieses Produkts zur Probensammlung bisher nur an Proben gezeigt wurde, die mit MagNA Pure 96 System und dem MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Large Volume Kit extrahiert wurden. Weiterführende Informationen finden Sie in den Abschnitten 10.2 und 16.1.5.

10.1.6.1 Entnahme, Transport und Lagerung von Vaginalabstrichproben

1. Öffnen Sie die Tupferpackung teilweise. Entnehmen Sie den Tupfer. Berühren Sie nicht die weiche Spitze oder legen Sie den Tupfer nicht ab. Wenn die weiche Spitze berührt, der Tupfer abgelegt oder der Tupfer fallen gelassen wird, verwenden Sie ein neues Aptima Multitest Swab Specimen Collection Kit.
2. Halten Sie den Tupfer, indem Sie die Einkerbung in der Mitte des Tupferschafts mit Daumen und Zeigefinger abdecken. Halten Sie den Tupferschaft nicht unterhalb der Einkerbung.
3. Führen Sie den Tupfer vorsichtig in die Vagina ungefähr 5 cm (2 Zoll) hinter den Scheideneingang ein und drehen Sie dann den Tupfer sanft 10 bis 30 Sekunden im Uhrzeigersinn. Stellen Sie sicher, dass der Tupfer die Wände der Vagina berührt, sodass Feuchtigkeit vom Tupfer aufgenommen wird. Ziehen Sie dann den Tupfer, ohne die Haut zu berühren, heraus.
4. Halten Sie den Tupfer in derselben Hand, mit der Sie die Schutzkappe vom Röhrchen abschrauben. Verschütten Sie den Inhalt des Röhrchens nicht. Wenn der Inhalt des Röhrchens verschüttet wird, verwenden Sie ein neues Multitest Swab Specimen Collection Kit.
5. Geben Sie den Tupfer sofort so in das Transportröhrchen, dass sich die Einkerbung am Rand des Röhrchens befindet.
6. Brechen Sie den Tupferschaft vorsichtig an der Einkerbung am Rand des Röhrchens ab.
7. Entsorgen Sie unverzüglich den oberen Teil des Tupferschafts.
8. Schrauben Sie die Kappe fest auf das Röhrchen. Transportieren Sie die Abstrichprobe nach der Entnahme im Transportröhrchen bei 2 °C bis 30 °C und lagern Sie diese bis zur Testdurchführung unter denselben Bedingungen.

10.1.7 DeltaSwab ViCUM® 2 mL + beflockter Standardtupfer (deltalab, Bestell-Nr. 304278) Entnahme, Transport und Lagerung

Im Folgenden sind die Anweisungen für die Entnahme und den Transport von Vaginalabstrichen mit dem DeltaSwab ViCUM® 2 mL + beflockter Standardtupfer (deltalab, Bestell-Nr. 304278) zusammengefasst.

1. Öffnen Sie die Aufreißverpackung mit beiden Händen, indem Sie an den gegenüberliegenden Seiten ziehen.
2. Schütteln Sie das Röhrchen vorsichtig.
3. Öffnen Sie die Flowpack-Verpackung und entnehmen Sie die Probe mit dem Tupfer.
4. Öffnen Sie das Röhrchen mit der anderen Hand und tauchen Sie den Tupfer vollständig in das Medium ein.
5. Richten Sie die Bruchstelle des Tupfers an der Oberkante des Röhrchens aus und drücken Sie den Tupfer leicht nach unten. Brechen Sie den Tupfer an der Bruchstelle ab, indem Sie ihn gegen die Innenkante des Röhrchens drücken.
6. Entsorgen Sie das Reststück des Stiels, schrauben Sie die Kappe fest und schütteln Sie die Probe, um sie in das Medium zu eluieren.
7. Transportieren Sie die Abstrichprobe nach der Entnahme im Transportröhrchen bei 4 °C bis 25 °C und lagern Sie diese bis zur Testdurchführung unter denselben Bedingungen.

10.1.8 Vacumed® Urine ohne Konservierungsmittel (FL medical, Bestell-Nr. 44950) Sammlung, Transport und Lagerung

Im Folgenden sind die Anweisungen für die Sammlung und den Transport von männlichem und weiblichem Urin mit dem Vacumed® Urinsammelröhrchen ohne Konservierungsmittel (FL medical, Bestell-Nr. 44950) zusammengefasst.

1. Nehmen Sie die Kappe des Urinsammelbehälters ab und legen Sie diese verkehrt herum auf eine saubere Oberfläche.
2. Berühren Sie nicht die Innenflächen des Behälters und der Kappe.
3. Sammeln Sie eine Urinprobe. Füllen Sie den Behälter bis zu $\frac{3}{4}$ des Fassungsvermögens.
4. Setzen Sie die Kappe wieder auf und drehen Sie diese im Uhrzeigersinn, um den Behälter dicht zu verschließen.
5. Schütteln Sie die Probe vorsichtig.
6. Heben Sie das Schutzetikett etwas an (entfernen Sie es nicht vollständig).
7. Setzen Sie das Probenröhrchen ein und üben Sie leichten Druck aus. Lassen Sie das Röhrchen verbunden, bis es voll ist (kein Fluss mehr).
8. Entfernen Sie das Probenröhrchen und kleben Sie das Schutzetikett wieder vollständig auf.
9. Lagern Sie das Probenröhrchen bis zur Testdurchführung bei 4 °C bis 25 °C.

10.1.9 Regulärer FLOQSwab™ in 1 mL UTM™ Medium (Copan Bestell-Nr. 359C) Entnahme, Transport und Lagerung

Im Folgenden sind die Anweisungen für die Entnahme und den Transport von Vaginalabstrichen mit dem regulärem FLOQSwab™ in 1 ml UTM™ Medium (Copan Bestell-Nr. 359C) zusammengefasst.

1. Öffnen Sie die UTM-Kit-Verpackung und entnehmen Sie das Teströhrchen mit dem Medium und den Innenbeutel mit dem sterilen Tupfer.
2. Nehmen Sie den sterilen Tupfer aus dem Beutel und entnehmen Sie die klinische Probe. Achten Sie darauf, dass die Tupferspitze nur mit der Entnahmestelle in Berührung kommt, um das Risiko einer Kontamination zu vermeiden.
3. Schrauben Sie die Kappe nach der Probenentnahme vom Teströhrchen ab und achten Sie darauf, das Medium nicht zu verschütten.
4. Führen Sie den Tupfer in das Teströhrchen ein, bis die Bruchstelle mit der Öffnung des Teströhrchens bündig ist.
5. Knicken Sie den Tupfer an der Bruchstelle und brechen Sie ihn ab, indem Sie das Teströhrchen von Ihrem Gesicht weghalten, und entsorgen Sie das Reststück.
6. Schrauben Sie die Kappe wieder auf das Teströhrchen und verschließen Sie es hermetisch.
7. Verarbeiten Sie die im UTM-Medium enthaltene Probe innerhalb von 48 Stunden nach der Entnahme und lagern Sie das Teströhrchen bei 2–25 °C.
8. Schütteln Sie das Teströhrchen vor der Probenverarbeitung 20 Sekunden lang, um die Ablösung von Probenmaterial vom Tupfer zu begünstigen und das Medium zu homogenisieren.

10.1.10 cobas® PCR-Medium (Roche, Bestell-Nr. 06466281190) Entnahme, Transport und Lagerung

Im Folgenden sind die Anweisungen für die Sammlung und den Transport von männlichen und weiblichen Urinproben mit dem cobas® PCR-Medium (Roche, Bestell-Nr. 06466281190) zusammengefasst.

1. Mischen Sie die Urinprobe und überführen Sie diese mit einer Einwegpipette (nicht im Lieferumfang enthalten) in das Röhrchen mit dem cobas®-Medium. Hinweis: Urin kann bis zu 24 Stunden bei 2 °C bis 30 °C gelagert werden, bevor er in das Röhrchen mit dem cobas® PCR-Medium überführt wird.
2. Die richtige Urinmenge wurde hinzugefügt, wenn der Flüssigkeitsstand zwischen den beiden schwarzen Linien auf dem Röhrchenetikett liegt.
3. Verschließen Sie das Röhrchen mit dem cobas®PCR-Medium wieder fest.
4. Drehen Sie das Röhrchen zum Mischen 5 Mal um. Die Probe ist nun bereit für den Transport und die Testdurchführung.
5. Transportieren und lagern Sie das Röhrchen mit dem cobas® PCR-Medium und der stabilisierten Urinprobe bei 2 °C bis 30 °C.

10.1.11 Validierte Probenextrakte

Eines der für die Verwendung validierten Probenextrakte ist:

- cobas® x480 (aus CT/NG-Protokoll)

10.2 Probenbearbeitung

Das **ResistancePlus**® MG Kit wurde für folgende Extraktionsinstrumente in **Tabelle 4** validiert.

Eine Anleitung zur Verwendung der internen Kontrolle finden Sie in **Abschnitt 10.3**.

Tabelle 4. Validierte Extraktionsprotokolle				
System	Extraktionskit	Probenvolumen	Protokoll	Elutionsvolumen
MagNA Pure 96 ^a	MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit	200 µL	Pathogen Universal 200	50 µL oder 100 µL
MagNA Pure 96 ^a	MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Large Volume Kit	1000 µL [^]	Viral NA Universal LV 1000 3.1	100 µL
MICROLAB STARlet IVD ^b	STARMag 96 x 4 Universalkartuschen-Set (Seegene)	200 µL	10 µl verdünnte Internal Control Cells (Interne Kontrollzellen) pro Probe hinzugefügt Um nur die Probenextraktion durchzuführen, wählen Sie „Pause vor dem PCR-Setup“	100 µL
QIASymphony SP ^c	DSP Virus/Pathogen Mini Kit	200 µL	Complex200_V6_DSP	110 µL
NucliSENS® easyMAG ^d	NucliSENS® easyMAG® Reagenzien	200 µL Abstrich	Generic 2.01; „On-board“ Workflow	100 µL
		1000 µL Urin	Generic 2.01; „Off-board“ Workflow	100 µL

^a Siehe 10.3.1 für eine Anleitung zur Verwendung der internen Kontrolle auf dem MagNA Pure 96

^b Siehe 10.3.2 für eine Anleitung zur Verwendung der internen Kontrolle auf dem STARlet IVD

^c See 10.3.3 für eine Anleitung zur Verwendung der internen Kontrolle auf dem QIASymphony SP

^d See 10.3.4 für eine Anleitung zur Verwendung der internen Kontrolle auf dem NucliSENS® easyMAG®

[^] Die klinische Leistungsfähigkeit von mit Aptima®-Entnahmekits entnommenen Proben wurde nur mit diesem Extraktionsprotokoll nachgewiesen. Weitere Informationen finden Sie in Abschnitt 16.1.5.

10.3 Internal Control (Interne Kontrolle) (IC)

Das Kit enthält eine interne Kontrolle zur Überwachung der Extraktionseffizienz und qPCR-Hemmung. Das Assay für die interne Kontrolle wird als *Control Mix* (Kontrollgemisch) (**WEISS**) und als *Internal Control Cells* (Interne Kontrollzellen) (**ROT**) geliefert. Das *Control Mix* (Kontrollgemisch) wird dem PCR Master Mix (**Tabelle 11**) zugesetzt. Die *Internal Control Cells* (Interne Kontrollzellen) enthalten das DNA-Template der internen Kontrolle. Die *Internal Control Cells* (Interne Kontrollzellen) werden verdünnt und wie nachfolgend beschrieben für das jeweilige Extraktionsinstrument bearbeitet. Das DNA-Template der internen Kontrolle wird daher mit der Probe mitextrahiert und in der Reaktion mitamplifiziert.

10.3.1 Internal Control (Interne Kontrolle) auf dem MagNA Pure 96

Verdünnen Sie die *Internal Control Cells* (Internen Kontrollzellen) (**ROT**) im Verhältnis 1 zu 200 in 1x PBS (**Tabelle 5**). Passen Sie das Volumen nach Bedarf an, indem Sie denselben Verdünnungsfaktor verwenden (das Mindestvolumen für die erforderliche Anzahl von Proben entnehmen Sie dem Handbuch des Extraktionskits). Die verdünnten internen Kontrollzellen werden in das interne Kontrollröhrchen auf dem MagNA Pure 96 geladen:

- Beim MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit (Pathogen Universal 200 Protokoll) werden jeder Probe automatisch 20 µL zugesetzt (Standardeinstellung).
- Beim MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Large Volume Kit (Viral NA Universal LV 1000 3.1 Protokoll) wird das Probenvolumen geteilt und in zwei separaten Wells der MagNA Pure 96 Kartusche verarbeitet. Insgesamt 40 µL verdünnter interner Kontrollzellen werden automatisch zu jeder Probe hinzugefügt (20 µL pro Well der Kartusche für die Anwendungen).

Hinweis: Verdünnte Internal Control Cells (Interne Kontrollzellen) NICHT lagern.

Tabelle 5. Verdünnung von Internal Control Cells (Internen Kontrollzellen) für das MagNA Pure 96 (Verdünnung 1 zu 200)			
Internal Control Cells (ROT) (µL)	1x PBS (µL)	Gesamtvolumen (µL)	Der Probe zugesetztes Volumen (µL)
18	3582	3600	20

10.3.2 Internal Control (Interne Kontrolle) auf dem MICROLAB STARlet IVD

Verdünnen Sie die *Internal Control Cells* (Internen Kontrollzellen) (**ROT**) im Verhältnis 1 zu 20 in 1x PBS (**Tabelle 6**). Passen Sie das Volumen nach Bedarf an, indem Sie denselben Verdünnungsfaktor verwenden (das Mindestvolumen für die erforderliche Anzahl von Proben entnehmen Sie dem Handbuch des Extraktionskits). Die verdünnten internen Kontrollzellen werden in ein 2-mL-Röhrchen geladen und in den Reagenzienständer gestellt, wobei jeder Probe automatisch 10 µL zugesetzt werden.

Hinweis: Verdünnte Internal Control Cells (Interne Kontrollzellen) NICHT lagern.

Tabelle 6. Verdünnung von Internal Control Cells (Internen Kontrollzellen) für das MICROLAB STARlet IVD (Verdünnung 1 zu 20)			
Internal Control Cells (ROT) (µL)	1x PBS (µL)	Gesamtvolumen (µL)	Der Probe zugesetztes Volumen (µL)
50	950	1000	10

10.3.3 Internal Control (Interne Kontrolle) auf dem QIASymphony® SP

Verdünnen Sie die *Internal Control Cells* (Internen Kontrollzellen) (**ROT**) im Verhältnis 1 zu 50 in 1x PBS (**Tabelle 7**). Passen Sie ggf. das Volumen mit demselben Verdünnungsfaktor entsprechend der erforderlichen Probenanzahl an.

Hinweis: Verdünnte Internal Control Cells (Interne Kontrollzellen) NICHT lagern.

Tabelle 7. Verdünnung von Internal Control Cells (Internen Kontrollzellen) für das QIASymphony® SP (Verdünnung 1 zu 50)		
Internal Control Cells (ROT) (µL)	1x PBS (µL)	Gesamtvolumen (µL)
40	1950	2000

Die verdünnten *Internal Control Cells* (Internen Kontrollzellen) werden dann verwendet, um ein Internal Control-carrier RNA-Puffer AVE-Gemisch herzustellen (siehe nachfolgend in **Tabelle 8**). Passen Sie das Volumen nach Bedarf an, indem Sie denselben Verdünnungsfaktor für die erforderliche Probenanzahl verwenden (das Mindestvolumen für die erforderliche Anzahl von Proben entnehmen Sie dem Handbuch des Extraktionskits). Das Internal Control-carrier RNA-Puffer AVE-Gemisch muss unmittelbar vor Beginn des Durchlaufs hergestellt werden.

Das Internal Control-carrier RNA-Puffer AVE-Gemisch wird in ein Röhrchen gegeben, das in einen Röhrchenständer eingesetzt und in die Aufnahme A der Probenschublade im QIASymphony® SP geladen wird. Zu jeder Probe werden 120 µL (Standard) des Gemisches gegeben.

Tabelle 8. Vorbereitung des Internal Control-carrier RNA-Puffer AVE-Gemisches für das QIA Symphony SP

Röhrchentyp	Anzahl von Proben	Volumen der verdünnten IC-Zellen (µL)	Stock carrier RNA (µL)	Puffer AVE (µL)	Gesamtvolumen (µL)
-	1	10	3	107	120
2 ml	1 + Hohlraumvolumen [^]	40	12	428	480
14 ml	1 + Hohlraumvolumen [#]	60	18	642	720

[^] 2-mL-Röhrchen erfordern 3 zusätzliche Proben (360 µL) zur Berücksichtigung des Hohlraumvolumens

[#] 14-mL-Röhrchen erfordern 5 zusätzliche Proben (600 µL) zur Berücksichtigung des Hohlraumvolumens

10.3.4 Internal Control (Interne Kontrolle) auf dem easyMAG[®]

Verdünnen Sie die *Internal Control Cells* (Internen Kontrollzellen) (**ROT**) im Verhältnis 1 zu 200 in 1x PBS (**Tabelle 9**) Passen Sie das Volumen nach Bedarf mit demselben Verdünnungsfaktor an. Bereiten Sie ein „Vorgemisch“ von verdünnten internen Kontrollzellen und NucliSENS[®] easyMAG[®] Magnetischem Silika für die erforderliche Anzahl von Proben (**Tabelle 10**) vor. Pro Probe werden 100 µL vorgemischtes Silika benötigt.

Hinweis: Verdünnte Internal Control Cells (Interne Kontrollzellen) NICHT lagern.

Tabelle 9. Verdünnung von Internal Control Cells (Internen Kontrollzellen) für das NucliSENS[®] easyMAG[®] (Verdünnung 1 zu 200)

Internal Control Cells (ROT) (µL)	1x PBS (µL)	Gesamtvolumen (µL)	Verdünnungsfaktor
10	1990	2000	200

Tabelle 10. Vorgemisch aus NucliSENS[®] easyMAG[®] Magnetischem Silika und verdünnten Internal Control Cells (Internen Kontrollzellen)

Anzahl von Proben	Volumen der verdünnten IC-Zellen (µL)	Volumen des Magnetischen Silika (µL)	Der Probe zugesetztes Volumen (µL)
1	50	50	100

Abhängig vom Probentyp wird der „On-Board“ oder „Off-Board“-Workflow verwendet. Der „Off-Board“-Workflow wird zur optimalen Nukleinsäuregewinnung aus Urinproben verwendet. Weitere Informationen finden Sie im NucliSENS[®] easyMAG[®] Benutzerhandbuch.

„On-Board“-Workflow (Abstriche)

Übertragen Sie die Proben in das Probengefäß.

Laden Sie die Probengefäße in das easyMAG.

Programmieren Sie die folgenden Extraktionsanforderungen:

Protokoll: Generic 2.0.1 (für Software-Version 2.0)

Matrix: Andere

Volumen (mL): 0,200

Eluat (µL): 100 µL

Typ: Primär

Geben Sie nach der On-Board-Lyse jeder Probe 100 µL vorgemischtes Silika hinzu.

Fahren Sie mit dem Extraktionsvorgang fort.

„Off-Board“-Workflow (Urin)

Zentrifugieren Sie kurz das NucliSENS-Lysepufferröhrchen herunter und geben Sie 1000 µL Urin hinzu. Schütteln Sie das Röhrchen.

Lassen Sie die Mischung 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen.

Übertragen Sie die Lysate nach der Lyse in die Probengefäße und laden Sie diese in das easyMAG.

Geben Sie jeder Probe 100 µL vorgemischtes Silika hinzu.

Programmieren Sie die folgenden Extraktionsanforderungen:

Protokoll: Generic 2.0.1 (für Software-Version 2.0)

Matrix: Andere

Volumen (mL): 1000

Eluat (µL): 100 µL

Typ: Lysiert

Fahren Sie mit dem Extraktionsvorgang fort.

10.4 Vorbereitung der Echtzeit-PCR

Hinweis: Tauen Sie die Reagenzien vor Gebrauch vollständig auf und vermischen Sie diese gründlich durch kurzes Vortexen.

Eine Beschreibung des Kitinhalts finden Sie in **Tabelle 1 – Tabelle 3**.

10.4.1 Vorbereitung des Mastergemischs

Bereiten Sie das Mastergemisch wie in **Tabelle 11** erläutert zu.

Für ein Reaktionsvolumen von 20 µL sind 15 µL Mastergemisch und 5 µL Probe erforderlich. Pipettieren Sie das Mastergemisch in die PCR-Platte und geben Sie anschließend der Reaktion die extrahierte Probe zu.

Bei jedem Durchlauf sollte eine Nicht-Template-Kontrolle (No Template Control, NTC) mitgeführt werden. Geben Sie für die NTC-Reaktion *Nuclease Free Water* (Nuklease-freies Wasser) (**NEUTRAL**) statt Probe zu.

Verschließen Sie die Platte mit der Klebefolie, zentrifugieren Sie die Platte und überführen Sie diese in den Thermocycler.

Tabelle 11. Mastergemisch		
Reagenz	Konzentration	Volumen pro 20-µL-Reaktion (µL)
Nuclease Free Water (Nuklease-freies Wasser) (NEUTRAL)	n. zutr.	3,0
Plex Mastermix (Plex-Mastergemisch) (BLAU)	2x	10,0
MG+23S-Gemisch (BRAUN)	20x	1,0
Kontrollgemisch* (WEISS)	20x	1,0
Gesamtvolumen (µl)		15,0
5 µL Probe für ein Endvolumen von 20 µL zugeben.		

* Das in jedem Kit enthaltene Control Mix (Kontrollgemisch) ist für das verwendete PCR-Instrument spezifisch; das korrekte Control Mix (Kontrollgemisch) geht aus **Tabelle 1 – Tabelle 3** hervor.

10.4.2 Stabilität des Mastergemisches

Das Mastergemisch kann in Großmengen vorbereitet und bei -20 °C bis zu 4 Wochen bzw. bei 4 °C bis zu 1 Woche lang aufbewahrt werden

11 Programmierung und Analyse

Informationen zur Programmierung und Auswertung finden Sie in **Abschnitt 19 – Abschnitt 22**.

Das **ResistancePlus®** MG Kit verfügt über drei Kanäle für den Nachweis von *M. genitalium*, 23S-rRNA-Mutation und Internal Control (interner Kontrolle) (**Tabelle 12**).

Tabelle 12. Kanäle für die ResistancePlus® MG Targets			
System	Kanal A	Kanal B	Kanal C
	Nachweis von <i>M. genitalium</i> (MgPa)	23S-rRNA-Mutation	Internal Control (Interne Kontrolle)
LC480 II	465-510	533-580	533-640
7500 Fast und 7500 Fast Dx	FAM	JOE	TAMRA
CFX96 Dx und CFX Touch	FAM	HEX	Quasar 705

12 Interpretation der Ergebnisse

Die Dateninterpretation erfordert die **ResistancePlus®** MG Analysesoftware. Während **PlexPrime®** Primer eine höhere Spezifität aufweisen als andere allelspezifische Primer, kann eine unspezifische Amplifikation aus dem 23S rRNA-Mutationsassay in Proben festgestellt werden, die hohe Konzentrationen des *M. genitalium* 23S rRNA-Wildtyps enthalten. Die **ResistancePlus®** MG Analysesoftware automatisiert die Auswertung der Amplifikationsergebnisse und optimiert den Arbeitsablauf. Anweisungen zur Verwendung der Analysesoftware finden Sie in **Abschnitt 23**.

Informationen zu geeigneter Analysesoftware für jedes Realtime-PCR-Instrument finden Sie in **Tabelle 13**. Die Analysesoftware ist auf Anfrage erhältlich. Für weitere Informationen senden Sie eine E-Mail an tech@speedx.com.au.

Tabelle 13. ResistancePlus® MG Analyse software		
Bestell-Nr.	Analysesoftware*	Realtime-PCR-Instrument
99003	ResistancePlus® MG (LC480)	LC480 II
99002	ResistancePlus® MG (7500)	7500 Fast und 7500 Fast Dx
99008	ResistancePlus® MG (CFX)	CFX96 Dx und CFX96 Touch

* Beachten Sie die Informationen auf der Website <https://plexpcr.com/products/sexually-transmitted-infections/resistanceplus-mg/#resources>, um sicherzustellen, dass Sie die neueste Version der Analysesoftware verwenden.

13 Einschränkungen

- Das **ResistancePlus**[®] MG-Assay zielt auf das *MgPa*-Gen für *M. genitalium* sowie Mutationen an den Positionen 2058 und 2059 im 23S-rRNA-Gen (A2058G, A2059G, A2058T, und A2058C, *E. coli*-Nummerierung) ab, die mit einer Resistenz gegenüber Azithromycin (einem Makrolidantibiotikum) in Verbindung stehen.
- Das **ResistancePlus**[®] MG Assay zeigt Kreuzreaktionen mit der *M. genitalium*, 23S-rRNA-Mutation A2059C.
- Die in Abschnitt 16.1 zusammengefassten Studien zur klinischen Leistung von **ResistancePlus**[®] MG umfassen Tests an männlichen und weiblichen Urinproben sowie an Vaginalabstrichen. Weitere Probentypen, u. a. Abstriche von Rektum, Zervix, Endozervix, Urethra, Penis, Pharynx und Meatus, wurden ebenfalls getestet, allerdings gibt es gegenwärtig nur wenige Daten, die eine Verwendung der genannten Probentypen unterstützen.
- Das **ResistancePlus**[®] MG-Assay darf nur von Personal durchgeführt werden, das in dem Verfahren geschult ist, und muss gemäß dieser Gebrauchsanweisung durchgeführt werden.
- Um zuverlässige Ergebnisse zu erhalten, müssen Proben angemessen entnommen, transportiert, gelagert und verarbeitet werden. Die Nichtbeachtung der Anweisungen für jeden dieser Schritte kann zu falschen Ergebnissen führen.
- Das **ResistancePlus**[®] MG-Assay ist ein qualitatives Assay, das keine quantitativen Werte oder Informationen zur Belastung des Organismus liefert.
- Die Testergebnisse müssen mit der Krankengeschichte, den epidemiologischen Daten, den Labordaten und allen anderen Daten, die dem Kliniker zur Verfügung stehen, korreliert werden.
- Die Prävalenz von *M. genitalium* und die Makrolidresistenz beeinflussen die positiven und negativen Vorhersagewerte für den Assay.
- Der Nachweis von Antibiotikaresistenz-Markern korreliert möglicherweise nicht mit der phänotypischen Genexpression.
- Ein Therapieversagen oder -erfolg lässt sich anhand der Untersuchungsergebnisse nicht feststellen, da die Nukleinsäure nach einer geeigneten antimikrobiellen Therapie bestehen bleiben kann.
- Negative Ergebnisse schließen die Möglichkeit einer Infektion nicht aus, da eine unsachgemäße Probenentnahme, ein technischer Fehler, das Vorhandensein von Inhibitoren, Verwechslungen oder eine geringe Anzahl von Organismen in der klinischen Probe vorliegen können.
- Negative Ergebnisse für die Resistenzmarker deuten nicht auf eine Anfälligkeit für nachgewiesene Mikroorganismen hin, da Resistenzmarker, die nicht im Assay gemessen wurden, oder andere potenzielle Mechanismen der Antibiotikaresistenz vorliegen können.
- Falsch positive Ergebnisse können aufgrund einer Kreuzkontamination durch Zielorganismen, deren Nukleinsäuren oder amplifizierte Produkte entstehen.

14 Qualitätskontrolle

Das **ResistancePlus**[®] MG Kit enthält eine interne Kontrolle zur Überwachung der Extraktionseffizienz und qPCR-Hemmung (**Abschnitt 10.3**).

Das **ResistancePlus**[®] MG Positive Control Kit (Bestell-Nr. 95001) wird als Positivkontrolle für die Nukleinsäureamplifikation empfohlen. In **Abschnitt 15** finden Sie eine Anleitung zur Verwendung der **ResistancePlus**[®] MG Positive Control Kits. Es wird empfohlen, eine bekannt negative Probe als Negativkontrolle zu verwenden.

15 Anweisungen für ResistancePlus[®] MG-Positivkontrollen

Das **ResistancePlus**[®] MG Positive Control Kit enthält positives Kontrollmaterial für *M. genitalium*-23S-rRNA-Mutationen und einen *M. genitalium*-23S-rRNA-Wildtyp (**Tabelle 14**).

Tabelle 14. Kitinhalt für ResistancePlus [®] MG Positive Control (Bestell-Nr. 95001)			
Farbe des Deckels	Inhalt	Beschreibung	Menge (10 Reaktionen)
Neutral	MG, 23S-rRNA-Wildtyp	Template für die Positivkontrolle für den Nachweis von <i>M. genitalium</i> , 23S-Wildtyp-rRNA	1 x 50 µL
Grün	MG, 23S-rRNA A2058G	Template für die Positivkontrolle für den Nachweis von <i>M. genitalium</i> , 23S rRNA A2058G-Mutation	1 x 50 µL
Rot	MG, 23S-rRNA A2059G	Template für die Positivkontrolle für den Nachweis von <i>M. genitalium</i> , 23S rRNA A2059G-Mutation	1 x 50 µL
Blau	MG, 23S-rRNA A2058T	Template für die Positivkontrolle für den Nachweis von <i>M. genitalium</i> , 23S rRNA A2058T-Mutation	1 x 50 µL
Gelb	MG, 23S-rRNA A2058C	Template für die Positivkontrolle für den Nachweis von <i>M. genitalium</i> , 23S rRNA A2058C-Mutation	1 x 50 µL

15.1 Gebrauchsanweisung

Bereiten Sie die qPCR-Reaktionen wie in **Abschnitt 10.4** beschrieben unter Verwendung einer Positivkontrolle als Probe vor.

Die Dateninterpretation erfordert die **ResistancePlus**[®] MG Analysesoftware, siehe **Abschnitt 23.9** für Beispielergebnisse.

16 Leistungsmerkmale

16.1 Klinische Leistung

16.1.1 Klinische Studie 1

Eine prospektiv-retrospektive klinische Studie wurde am Royal Women's Hospital (RWH) in Melbourne, Australien, durchgeführt. Die Proben wurden von Mai 2016 bis Juni 2016 entnommen. Anhand der klinischen Laborergebnisse wurden 144 Proben zur Aufnahme in die Studie ausgewählt. Die 144 Proben setzten sich zusammen aus 84 Urinproben von Männern sowie 33 Urinproben, 14 Vaginalabstrichen und 13 hohen Vaginalabstrichen von Frauen. Um die Eigenschaften des **ResistancePlus®** MG Kits zu ermitteln, wurde der Nachweis von *M. genitalium* mit den klinischen Laborergebnissen einer etablierten 16S-rRNA-qPCR verglichen, die am RWH auch zur Routinediagnostik eingesetzt wird². Der Nachweis von 23S-rRNA-Mutationen wurde mit der Sanger-Sequenzierung verglichen⁸. Das **ResistancePlus®** MG Kit wurde auf dem LC480 II durchgeführt, und zwar im Anschluss an die Probenextraktion auf dem MagNA Pure 96 Instrument unter Verwendung von MagNA Pure 96 DNA und des Viral NA Small Volume Kit mithilfe des Protokolls Universal Pathogen 200. Für den Nachweis von *M. genitalium* wurde für Proben mit abweichenden Ergebnissen eine Mischreferenz mit einer dritten, auf das MgPa-Gen abzielenden qPCR-Reaktion verwendet⁹. Für den Nachweis von 23S-rRNA-Mutationen wurde die Sanger-Sequenzierung als das richtige Ergebnis angenommen. Geklärte Ergebnisse sowie Sensitivität und Spezifität des **ResistancePlus®** MG Kits für den Nachweis von *M. genitalium* und den Nachweis von 23S-rRNA-Mutationen finden Sie in **Tabelle 15**. Zwei Patientenproben wurden ausgeschlossen, da das Ergebnis der Internal Control (internen Kontrolle) ungültig war (1 Urinprobe einer Frau und 1 Urinprobe eines Mannes). Die Analyse des Nachweises von 23S-rRNA-Mutationen umfasst nur Proben, bei denen der Mutationsstatus bestimmt werden konnte. Die Analyse der Ergebnisse nach Probentyp geht aus **Tabelle 16** hervor. Die Analyse der 23S rRNA-Mutationen geht aus **Tabelle 17** hervor.

Tabelle 15. Klinische Beurteilung des ResistancePlus® MG-Kits (Klinische Studie 1)						
		Nachweis von <i>M. genitalium</i> 16S rRNA qPCR		Nachweis von 23S-rRNA-Mutationen Sequenzierung		
		Positiv	Negativ	Mutant	Wildtyp	
ResistancePlus® MG	Positiv	83	0	Mutation nachgewiesen	52	2
	Negativ	1	58 [^]	Mutation nicht nachgewiesen	2	21
Sensitivität		98,8 % (95%-KI: 93,5–100,0 %)		Sensitivität		96,3 % (95%-KI: 87,3–99,6 %)
Spezifität		100,0 % (95%-KI: 93,8–100,0 %)		Spezifität		91,3 % (95%-KI: 72,0–98,9 %)

95 % KI – 95%iges Konfidenzintervall; Mutation – 23S-rRNA in den Positionen A2058G, A2059G, A2058T and A2058C (*E. coli*-Nummerierung); Wildtyp – Abwesenheit einer Mutation an diesen Positionen

[^] Das **ResistancePlus®** MG Kit wies 1 korrekt negatives Ergebnis für *M. genitalium* unter Verwendung der Mischreferenz nach; in der Tabelle sind die geklärten Ergebnisse angegeben.

Tabelle 16. Analyse der klinischen Ergebnisse nach Probe^a (Klinische Studie 1)

Probe	Erwartet <i>M.-genitalium</i> -negativ	Erwarteter <i>M.-genitalium</i> -23S-rRNA-Wildtyp	Erwartete <i>M.-genitalium</i> -23S-rRNA-Mutation
Urinproben von Männern	28/28	8/10 ¹	41/42 ¹
Urinproben von Frauen	12/13	11/11	4/6 ²
Vaginalabstrich	8/8	1/1	2/2 ³
Hoher Vaginalabstrich	9/9	1/1	4/4 ⁴

Mutant: 23S rRNA-Mutation an den Positionen A2058G, A2059G, A2058T und A2058C (*E. coli*-Nummerierung); Wildtyp – Abwesenheit einer Mutation an diesen Positionen

^a 2 Urinproben von Frauen, 3 Urinproben von Männern, 1 Vaginalabstrich ausgeschlossen, da die Sequenzierung fehlschlug und der Mutationsstatus nicht bestimmt werden konnte

¹ Urinproben von Männern: 2 Proben mit *M. genitalium*-Wildtyp falsch ausgewiesen als „*M. genitalium*-Mutation nachgewiesen“, 18 A2058G, 20 A2059G, 3 A2058T korrekt nachgewiesen; 1 A2058G falsch ausgewiesen als „*M. genitalium*-Mutation nicht nachgewiesen“

² Urinproben von Frauen: 1 A2058G, 3 A2059G korrekt nachgewiesen; 2 A2059G falsch ausgewiesen als „*M. genitalium* nachgewiesen, Mutation nicht nachgewiesen“

³ Vaginalabstrich: 2 A2059G korrekt nachgewiesen

⁴ Hoher Vaginalabstrich: 3 A2058G, 1 A2059G korrekt nachgewiesen

Tabelle 17. Analyse der *M.-genitalium*-23S-rRNA-Mutationen (Klinische Studie 1)

Ergebnis mit Referenzprodukt ^a	Ergebnis mit ResistancePlus [®] MG
Wildtyp	21/33 ¹
A2058G	22/23 ²
A2059G	26/28 ³
A2058T	3/3

^a Nur bei *M. genitalium*-positiven Proben

¹ Wildtyp: 2 Urinproben eines Mannes falsch ausgewiesen als „*M. genitalium*-Mutation nachgewiesen“

² A2058G: 1 Urinprobe eines Mannes falsch ausgewiesen als „*M. genitalium*-Mutation nicht nachgewiesen“

³ A2059G: 2 Urinproben von Frauen falsch ausgewiesen als „*M. genitalium*-Mutation nicht nachgewiesen“

16.1.2 Klinische Studie 2

Ein Subset der extrahierten Proben aus Studie 1 wurde mit dem ABI 7500 Fast untersucht. Die Ergebnisse wurden mit dem klinischen Ergebnis der 16S-rRNA-qPCR (Twin 2011) und der Sanger-Sequenzierung (Twin 2012) verglichen. Proben mit abweichenden Ergebnissen beim Nachweis von *M. genitalium* wurden aufgrund vermuteter Probenverschlechterung erneut mit 16S-rRNA-qPCR (Twin 2011) getestet. Die geklärten Ergebnisse sowie die Sensitivität und Spezifität des **ResistancePlus® MG₍₅₅₀₎**-Kits für den Nachweis von *M. genitalium* und den Nachweis der 23S-rRNA-Mutationen sind in **Tabelle 18** angegeben. Die Analyse des Nachweises von 23S-rRNA-Mutationen umfasst nur Proben, bei denen der Mutationsstatus bestimmt werden konnte.

Tabelle 18. Klinische Beurteilung des ResistancePlus® MG₍₅₅₀₎ -Kits (Klinische Studie 2)							
		Nachweis von <i>M. genitalium</i> 16S rRNA qPCR		Nachweis von 23S-rRNA-Mutationen Sequenzierung			
		Positiv	Negativ	Mutant	Wildtyp		
ResistancePlus® MG	Positiv	79	0 [^]	Mutation nachgewiesen	47	1	
	Negativ	2	43 [#]	Mutation nicht nachgewiesen	4	19	
Sensitivität		97,5 % (95%-KI: 91,4–99,7 %)		Sensitivität		92,2 % (95%-KI: 81,1–97,8 %)	
Spezifität		100,0 % (95%-KI: 91,8–100,0 %)		Spezifität		95,0 % (95%-KI: 75,1–99,9 %)	

95 % KI – 95%iges Konfidenzintervall; Mutation – 23S-rRNA in den Positionen A2058G, A2059G, A2058T and A2058C (*E. coli*-Nummerierung); Wildtyp – Abwesenheit einer Mutation an diesen Positionen

[^] Das **ResistancePlus® MG₍₅₅₀₎** Kit wies 1 korrekt positives Ergebnis für *M. genitalium* unter Verwendung des Referenztests nach; in der Tabelle sind die geklärten Ergebnisse dargestellt

[#] Das **ResistancePlus® MG₍₅₅₀₎**-Kit wies 10 korrekt negative Ergebnisse *M. genitalium* unter Verwendung des Referenztests nach; in der Tabelle sind die geklärten Ergebnisse dargestellt

16.1.3 Klinische Studie 3

In den Canterbury Health Laboratories (CHL) in Christchurch, Neuseeland, wurde eine retrospektive klinische Studie an charakterisierten, archivierten Proben aus den Jahren 2010 bis 2016 durchgeführt, die mit dem multi-Collect Specimen Collection Kit (Abbott) entnommen wurden. Die 137 Proben setzten sich zusammen aus 110 Urinproben von Männern sowie 11 Urinproben, 15 Vaginalabstrichen, 1 Urethral-/Vaginalabstrich, 1 Vaginal-/Zervixabstrich von Frauen. Um die Eigenschaften des **ResistancePlus® MG** Kits zu ermitteln, wurde der Nachweis von *M. genitalium* mit den klinischen Laborergebnissen einer etablierten MgPa-qPCR verglichen, die in den CHL auch zur Routinediagnostik eingesetzt wird (Jensen 2004). Der Nachweis von 23S-rRNA-Mutationen wurde mit der Sanger-Sequenzierung verglichen (Jensen 2008). Das **ResistancePlus® MG** Kit wurde auf dem LC480 II durchgeführt, und zwar im Anschluss an die Probenextraktion auf dem MagNA Pure 96 Instrument unter Verwendung von MagNA Pure 96 DNA und des Viral NA Small Volume Kit mithilfe des Protokolls Universal Pathogen 200. Für den Nachweis von *M. genitalium* wurde für Proben mit abweichenden Ergebnissen der routinemäßig verwendete MgPa-Test wiederholt. Für den Nachweis von 23S-rRNA-Mutationen wurde die Sanger-Sequenzierung als das richtige Ergebnis angenommen. Sensitivität und Spezifität des **ResistancePlus® MG** Kits für den Nachweis von *M. genitalium* und den Nachweis von 23S-rRNA-Mutationen finden Sie in **Tabelle 19**. Eine Probe wurde ausgeschlossen, da das Ergebnis der Internal Control (Internen Kontrolle) ungültig war. Die Analyse des Nachweises von 23S-rRNA-Mutationen umfasst nur Proben, bei denen der Mutationsstatus bestimmt werden konnte. Die Analyse der Ergebnisse nach Probenotyp geht aus **Tabelle 20** hervor. Die Analyse der 23S rRNA-Mutationen geht aus **Tabelle 21** hervor.

Tabelle 19. Klinische Beurteilung des <i>ResistancePlus</i> [®] MG-Kits (Klinische Studie 3)						
		Nachweis von <i>M. genitalium</i> 16S rRNA qPCR		Nachweis von 23S-rRNA-Mutationen Sequenzierung		
		Positiv	Negativ	Mutant	Wildtyp	
<i>ResistancePlus</i> [®] MG	Positiv	76	0	Mutation nachgewiesen	52	1
	Negativ	3	57 [^]	Mutation nicht nachgewiesen	5	19
Sensitivität		96,2 % (95%-KI: 89,3–99,2 %)		Sensitivität		91,2 % (95%-KI: 80,7–97,1 %)
Spezifität		100,0 % (95%-KI: 93,7–100,0 %)		Spezifität		95,0 % (95%-KI: 75,1–99,9 %)

95 % KI – 95%iges Konfidenzintervall; Mutation – 23S-rRNA in den Positionen A2058G, A2059G, A2058T und A2058C (*E. coli*-Nummerierung); Wildtyp – Abwesenheit einer Mutation an diesen Positionen

[^] In der Tabelle sind die geklärten Ergebnisse dargestellt

Tabelle 20. Analyse der klinischen Ergebnisse nach Probe (Klinische Studie 3)			
Probe	Erwartet <i>M.-genitalium</i> -negativ	Erwarteter <i>M.-genitalium</i> Wildtyp	Erwartete <i>M.-genitalium</i> -23S-rRNA-Mutation
Urinproben von Männern	45/45	17/18 ¹	38/45 ¹
Urinproben von Frauen	4/4	1/1	6/6 ²
Vaginalabstrich	6/6	1/1	8/8 ³
Urethral/Vaginalabstriche	1/1	0/0	0/0
Vaginal-/Zervixabstrich	1/1	0/0	0/0

Mutant: 23S rRNA-Mutation an den Positionen A2058G, A2059G, A2058T und A2058C (*E. coli*-Nummerierung); Wildtyp – Abwesenheit einer Mutation an diesen Positionen

¹ Urinproben von Männern: 1 *M. genitalium*-Wildtyp falsch ausgewiesen als „*M. genitalium*-Mutation nachgewiesen“, 4 A2058G, 32 A2059G, 1 A2058T, 1 A2058C korrekt nachgewiesen; 1 A2058G und 1 A2059G falsch ausgewiesen als „*M. genitalium*-Mutation nicht nachgewiesen“, 3 A2058G und 2 A2059G falsch ausgewiesen als „*M. genitalium*-Mutation nicht nachgewiesen“

² Urinproben von Frauen: 2 A2058G, 4 A2059G korrekt nachgewiesen

³ Vaginalabstrich: 1 A2058G, 7 A2059G korrekt nachgewiesen

Tabelle 21. Analyse der *M. genitalium*-23S-rRNA-Mutationen (Klinische Studie 3)

Ergebnis mit Referenzprodukt [^]	Ergebnis mit <i>ResistancePlus</i> [®] MG
Wildtyp	19/20 ¹
A2058G	7/10 ²
A2059G	43/45 ³
A2058T	1/1
A2058C	1/1

[^] Nur bei *M. genitalium*-positiven Proben

¹ Wildtyp: 1 Urinprobe eines Mannes falsch ausgewiesen als „*M. genitalium*-Mutation nachgewiesen“

² A2058G: 3 Urinproben von Männern falsch ausgewiesen als „*M. genitalium*-Mutation nicht nachgewiesen“

³ A2059G: 2 Urinproben von Männern falsch ausgewiesen als „*M. genitalium*-Mutation nicht nachgewiesen“

16.1.4 Klinische Studie 4

Am Vall d'Hebron University Hospital (HUVH) in Barcelona, Spanien, wurde eine retrospektive klinische Studie zur Bewertung der Leistungsfähigkeit des *ResistancePlus*[®] MG₍₆₇₅₎-Kits beim Nachweis von *M. genitalium* und von Mutationen, die mit einer Resistenz gegenüber Azithromycin in Verbindung stehen, an zwischen Dezember 2017 und April 2018 entnommenen retrospektiven Proben durchgeführt. Die Proben wurden mithilfe von DeltaSwab ViCUM[®] (Deltalab, Spanien) für Abstriche bzw. Vacumed[®] Urine (FL medical, Italien) für Urinproben entnommen. Die 86 Proben bestanden aus 46 Urinproben und 40 Vaginalabstrichen. Die Proben wurden mit dem STARlet IVD (Hamilton) extrahiert und auf dem Instrument CFX96 Dx (Bio-Rad) analysiert. Zur Beurteilung der Eigenschaften wurde der Nachweis von *M. genitalium* mit dem Allplex[™] STI Essential (Seegene) sowie dem *ResistancePlus*[®] MG-Kit (SpeedX) auf dem LC480 II sowohl für den Nachweis von *M. genitalium* als auch für den 23S-rRNA-Status verglichen. Sensitivität und Spezifität des *ResistancePlus*[®] MG₍₆₇₅₎-Kits zum Nachweis von *M. genitalium* im Vergleich zu Allplex[™] STI Essential (Seegene) sind in **Tabelle 22** erläutert. Sensitivität und Spezifität des *ResistancePlus*[®] MG₍₆₇₅₎ im Vergleich zu *ResistancePlus*[®] MG sind in **Tabelle 23** dargestellt. Die Analyse der Ergebnisse nach Probentyp geht aus **Tabelle 24** hervor.

Tabelle 22 Vergleich des *ResistancePlus*[®] MG₍₆₇₅₎-Kits mit Allplex[™] STI Essential (Klinische Studie 4)

		Nachweis von <i>M. genitalium</i>	
		Allplex [™] STI Essential	
		Positiv	Negativ
<i>ResistancePlus</i> [®] MG ₍₆₇₅₎	Positiv	40	0
	Negativ	0	46
Sensitivität		100,0 % (95%-KI: 91,2–100,0 %)	
Spezifität		100,0 % (95%-KI: 92,3–100,0 %)	

Tabelle 23. Klinische Beurteilung des *ResistancePlus*[®] MG₍₆₇₅₎-Kits (Klinische Studie 4)

		Nachweis von <i>M. genitalium</i> <i>ResistancePlus</i> [®] MG (LC480 II)		Nachweis von 23S-rRNA-Mutationen [#] <i>ResistancePlus</i> [®] MG (LC480 II)			
		Positiv	Negativ	Mutation nachgewiesen	Mutation nicht nachgewiesen		
<i>ResistancePlus</i> [®] MG ₍₆₇₅₎	Positiv	40	0	Mutation nachgewiesen	20	0	
	Negativ	0	46	Mutation nicht nachgewiesen	1	20	
Sensitivität		100,0 % (95%-KI: 91,2–100,0 %)		Sensitivität		100,0 % (95%-KI: 83,2–100,0 %)	
Spezifität		100,0 % (95%-KI: 92,3–100,0 %)		Spezifität		100,0 % (95%-KI: 83,2–100,0 %)	

95 % KI – 95%iges Konfidenzintervall; Mutation – 23S-rRNA in den Positionen A2058G, A2059G, A2058T and A2058C (*E. coli*-Nummerierung); Wildtyp – Abwesenheit einer Mutation an diesen Positionen

[#] 1 Probe wurde von der Analyse ausgeschlossen, da sie als Gemisch aus Wildtyp und Mutation sequenziert wurde.

Tabelle 24. Analyse der klinischen Ergebnisse nach Probe (Klinische Studie 4)

Probe	Erwartet <i>M.-genitalium</i> -negativ	Erwarteter <i>M.-genitalium</i> -23S-rRNA-Wildtyp	Erwartete <i>M.-genitalium</i> -23S-rRNA-Mutation
Urinproben von Männern	26/26	5/5	15/15
Vaginalabstrich	20/20	15/15	5/5

16.1.5 Klinische Studie 5

Am Royal Women's Hospital (RWH), Melbourne, Australien wurde von Juni 2017 bis November 2017 eine retrospektive klinische Studie an mit Aptima[®] entnommenen Urinproben und Abstrichen durchgeführt. Die gepaarten Patientenproben bestanden aus Proben, die als unverdünnter Urin (Routineprobe) oder mit dem Aptima[®] Urine Specimen Collection kit (Hologic) bzw. als Trockenabstrich (Routineprobe) oder mit dem Aptima[®] Unisex Swab Specimen Collection kit (Hologic) entnommen wurden. Die 147 Proben bestanden aus 122 Urinproben und 25 Vaginalabstrichen. Zur Bestimmung der Eigenschaften der mit Aptima[®] entnommenen Proben mit dem *ResistancePlus*[®] MG Kit wurde der Nachweis von *M. genitalium* und 23S-rRNA-Mutationen mit den Ergebnissen der klinischen Diagnose des *ResistancePlus*[®] Kits (SpeedX) mit der Routineprobe verglichen. Die Tests der mit Aptima[®] entnommenen Proben wurden auf dem LC480 II durchgeführt, und zwar im Anschluss an die Probenextraktion auf dem MagNA Pure 96 Instrument unter Verwendung von MagNA Pure 96 DNA und des Viral NA Small Volume Kit mithilfe des Protokolls Viral NA Universal LV 1000. Klinische Diagnoseergebnisse des RWH, die von einer gepaarten diagnostischen Probe stammten, die mit dem *ResistancePlus*[®] MG Kit (SpeedX) getestet wurde, wurden als das echte Ergebnis für *M. genitalium* angesehen. Für den Nachweis der 23S-rRNA-Mutation wurde das Ergebnis mit dem Diagnoseergebnis und der Sanger-Sequenzierung verglichen.

Sensitivität und Spezifität des *ResistancePlus*[®] MG Kits für den Nachweis von *M. genitalium* und den Nachweis von 23S-rRNA-Mutationen finden Sie in **Tabelle 25**. Die Analyse des Nachweises von 23S-rRNA-Mutationen umfasst nur Proben, bei denen der Mutationsstatus bestimmt werden konnte. Die Analyse der Ergebnisse nach Probentyp geht aus **Tabelle 26** hervor.

Tabelle 25. Klinische Beurteilung des *ResistancePlus*[®] MG-Kits (Klinische Studie 5)

		Nachweis von <i>M. genitalium</i> <i>ResistancePlus</i> [®] MG (Routineprobe)		Nachweis von 23S-rRNA- Mutationen <i>ResistancePlus</i> [®] MG (Routineprobe)		
		Positiv	Negativ	Mutant	Wildtyp	
<i>ResistancePlus</i> [®] MG (mit 1 ml Aptima-Probe)	Positiv	77	3	Mutation nachgewiesen	51	0
	Negativ	3	64	Mutation nicht nachgewiesen	2	24
Sensitivität		96,3 % (95%-KI: 89,4–99,2 %)		Sensitivität		96,2 % (95%-KI: 87,0–99,5 %)
Spezifität		95,5 % (95%-KI: 87,5–99,1 %)		Spezifität		100,0 % (95%-KI: 86,0– 100,0 %)

Tabelle 26. Analyse der klinischen Ergebnisse nach Probe (Klinische Studie 5)

Probe	Erwartet <i>M.-genitalium</i> - negativ	Erwarteter <i>M.-genitalium</i> Wildtyp	Erwartete <i>M.-genitalium</i> -23S- rRNA-Mutation
Urin	50/52 ¹	21/22 ¹	45/48 ¹
Vaginalabstrich	14/15 ²	3/4 ²	6/6

Mutant: 23S rRNA-Mutation an den Positionen A2058G, A2059G, A2058T und A2058C (*E. coli*-Nummerierung); Wildtyp – Abwesenheit einer Mutation an diesen Positionen

¹ Urin: 2 *M. genitalium*-negative Proben falsch ausgewiesen als „*M. genitalium*-Wildtyp“ bzw. als Mutation; 1 *M. genitalium*-Wildtyp falsch ausgewiesen als „*M. genitalium*-negativ“; 2 *M. genitalium*-Mutationen falsch ausgewiesen als „*M. genitalium*-Wildtyp“, 1 *M. genitalium*-Mutation falsch ausgewiesen als „*M. genitalium*-negativ“

² Vaginalabstrich: 1 *M. genitalium*-negativ falsch ausgewiesen als „*M. genitalium*-Wildtyp“; 1 *M. genitalium*-Wildtyp falsch ausgewiesen als „*M. genitalium*-negativ“

16.1.6 Klinische Studie 6

Eine retrospektive klinische Studie wurde am University of Queensland Centre for Clinical Research (UQCCR) in Australien unter Verwendung von cobas® x480-Extrakten aus Urin- und Abstrichproben durchgeführt, die von Februar 2017 bis Februar 2019 entnommen wurden. Die Proben wurden als unverdünnter Urin oder mit dem cobas® PCR-Medien-Sammelkit (Roche) entnommen und mit dem cobas® x480 (cobas® 4800, Roche) unter Verwendung des „Full Workflow“- und „CT/NG“-Protokolls extrahiert und ohne Zugabe von SpeedX Internal Control Cells (Interne Kontrollzellen) extrahiert. Die 109 Extrakte bestanden aus 10 Vaginalabstrichen, 5 hohen Vaginalabstrichen sowie 84 Urinproben von Männern und 10 Urinproben von Frauen.

Um die Leistung von cobas®-Extrakten mit dem **ResistancePlus®** MG₍₅₅₀₎-Kit zu bestimmen, wurde der *M. genitalium*-Nachweis mit dem routinemäßigen diagnostischen Ergebnis (MgPa PCR-Assay (Trembizki *et al.*, 2017)) verglichen und die 23S rRNA-Mutationsbestimmung wurde mit der Sanger-Sequenzierung verglichen. Das **ResistancePlus®** MG₍₅₅₀₎-Kit wurde auf dem ABI 7500 Fast Dx durchgeführt. Sensitivität und Spezifität des **ResistancePlus®** MG₍₅₅₀₎-Kits für den Nachweis von *M. genitalium* und den Nachweis von 23S-rRNA-Mutationen finden Sie in **Tabelle 27**. Die Analyse des Nachweises von 23S-rRNA-Mutationen umfasst nur Proben, bei denen der Mutationsstatus bestimmt werden konnte. Die Analyse der Ergebnisse nach Probenotyp geht aus **Tabelle 28** hervor. Die Analyse der 23S rRNA-Mutationen geht aus **Tabelle 29** hervor.

Tabelle 27. Klinische Beurteilung des ResistancePlus® MG ₍₅₅₀₎ -Kits (Klinische Studie 6)						
		Nachweis von <i>M. genitalium</i> MgPa qPCR		Nachweis von 23S-rRNA-Mutationen Sanger-Sequenzierung		
		Positiv	Negativ	Mutant	Wildtyp	
ResistancePlus® MG ₍₅₅₀₎	Positiv	54	0	Mutation nachgewiesen	37 [^]	0
	Negativ	1	51	Mutation nicht nachgewiesen	0	17
Sensitivität		98,2 % (95%-KI: 90,3–100,0 %)		Sensitivität		100,0 % (95%-KI: 90,5–100,0 %)
Spezifität		100,0 % (95%-KI: 93,0–100,0 %)		Spezifität		100,0 % (95%-KI: 80,5–100,0 %)

[^] 1 Vaginalprobe ergab ein gemischtes Wildtyp/A2059G-Sequenzierungsergebnis, das mit dem **ResistancePlus®** MG₍₅₅₀₎-Assay korrekt als Mutation nachgewiesen wurde

Tabelle 28. Analyse der klinischen Ergebnisse nach Probe (Klinische Studie 6) [#]			
Probe	Erwartet <i>M.-genitalium</i> -negativ	Erwarteter <i>M.-genitalium</i> -23S-rRNA-Wildtyp	Erwartete <i>M.-genitalium</i> -23S-rRNA-Mutation
Urinproben von Männern	42/42	13/13	26/27 ¹
Urinproben von Frauen	6/6	1/1	3/3 ²
Vaginalabstrich	1/1	1/1	7/7 ^{3^}
Hoher Vaginalabstrich	2/2	2/2	1/1 ⁴

[#] 3 wurden ausgeschlossen, da die Sequenzierung fehlgeschlagen war und der richtige 23S-Status nicht bestimmt werden konnte, einschließlich: 2 Urin- und 1 Vaginalprobe

¹ Urinproben von Männern: 8 A2058G, 3 A2058T und 15 A2059G wurden korrekt nachgewiesen; 1 A2058T wurde falsch ausgewiesen als „*M. genitalium* nicht nachgewiesen“.

² Urinproben von Frauen: 2 A2058G und 1 A2059G wurden korrekt nachgewiesen.

³ Vaginalabstrich: 3 A2058G, 2 A2058T und 1 A2059G wurden korrekt nachgewiesen; [^] 1 Vaginalabstrich wurde als Gemisch WT/A2059G nachgewiesen

⁴ Hoher Vaginalabstrich: 1 A2059G wurde korrekt nachgewiesen.

Tabelle 29. Analyse der <i>M. genitalium</i> -23S-rRNA-Mutationen (Klinische Studie 6)	
Ergebnis mit Referenzprodukt [^]	Ergebnis mit <i>ResistancePlus</i> [®] MG
Wildtyp	17/17
A2058G	13/13
A2059G	19/19 ¹
A2058T	5/5
A2058C	-

[^] Nur bei *M. genitalium*-positiven Proben

¹ A2059G: 1 Vaginalabstrich gemischter Wildtyp/A2059G korrekt ausgewiesen als „*M. genitalium* nachgewiesen, 23S-Mutation nachgewiesen“

16.1.7 Klinische Studie 7

Eine retrospektive klinische Studie wurde in der Microbiological Diagnostic Unit Public Health Unit (MDU), Victoria, Australien, unter Verwendung von Trockenabstrichen und unverdünntem Urin durchgeführt, die von Oktober 2018 bis Januar 2019 entnommen wurden. Die Proben bestanden aus 19 Vaginalabstrichen, 2 hohen Vaginalabstrichen sowie 44 Urinproben.

Das *ResistancePlus*[®] MG-Kit wurde nach der Probenextraktion auf dem QIA Symphony SP (QIAGEN)-Instrument und unter Verwendung des DSP Virus/Pathogen Mini Kits und des Complex200_V6_DSP-Protokolls auf dem LC480 II durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit den Routinediagnoseergebnissen mit dem *ResistancePlus*[®] Kit (SpeedX) und mit dem MagNA Pure 96 Instrument (MP96) entnommenen Proben verglichen. Für abweichende Ergebnisse wurde ein 16S rRNA qPCR (Twin 2011)-Test für den Nachweis von *M. genitalium* und eine Sanger-Sequenzierung (Twin 2012) für den Nachweis einer 23S rRNA-Mutation durchgeführt. Sensitivität und Spezifität des *ResistancePlus*[®] MG Kits für den Nachweis von *M. genitalium* und den Nachweis von 23S-rRNA-Mutationen finden Sie in **Tabelle 30**. Die Analyse des Nachweises von 23S-rRNA-Mutationen umfasst nur Proben, bei denen der Mutationsstatus bestimmt werden konnte. Die Analyse der Ergebnisse nach Probenart geht aus **Tabelle 31** hervor.

Tabelle 30. Klinische Beurteilung des <i>ResistancePlus</i> [®] MG-Kits (Klinische Studie 7)							
		Nachweis von <i>M. genitalium</i> <i>ResistancePlus</i> [®] MG (MP96)		Nachweis von 23S-rRNA-Mutationen <i>ResistancePlus</i> [®] MG (MP96)			
		Positiv	Negativ	Mutant	Wildtyp		
<i>ResistancePlus</i> [®] MG (QIA Symphony SP)	Positiv	36	0	Mutation nachgewiesen	16	1	
	Negativ	1	27	Mutation nicht nachgewiesen	1	18	
Sensitivität		97,3 % (95%-KI: 85,8–99,9 %)		Sensitivität		94,1 % (95%-KI: 71,3–99,9 %)	
Spezifität		100,0 % (95%-KI: 87,2–100,0 %)		Spezifität		94,7 % (95%-KI: 74,0–99,9 %)	

Tabelle 31. Analyse der klinischen Ergebnisse nach Probe (Klinische Studie 7) *

Probe	Erwartet <i>M.-genitalium</i> -negativ	Erwarteter <i>M.-genitalium</i> -23S-rRNA-Wildtyp	Erwartete <i>M.-genitalium</i> -23S-rRNA-Mutation
Urinproben von Männern	17/17	9/9	12/14 ¹
Urinproben von Frauen	1/1	1/2 ²	1/1
Vaginalabstrich	8/8 [#]	7/7	3/3
Hoher Vaginalabstrich	1/1	1/1	-

1 Vaginalabstrich wurde ausgeschlossen, da er mit dem **ResistancePlus**® MG-Kit ein ungültiges Ergebnis ergab.

¹ Urinproben von Männern: 1 *M. genitalium* 23S-rRNA-Wildtyp wurde falsch ausgewiesen als „*M. genitalium* nicht erkannt“; 1 *M. genitalium* 23S-rRNA-Mutation wurde falsch ausgewiesen als „*M. genitalium* erkannt, 23S-rRNA-Mutation nicht erkannt“.

² Urinproben von Frauen: 1 Probe falsch ausgewiesen als „*M. genitalium* erkannt, 23S-rRNA-Mutation erkannt“.

16.2 Analytische Leistung

16.2.1 Reproduzierbarkeit und Wiederholbarkeit

Die Reproduzierbarkeit und Wiederholbarkeit des **ResistancePlus**® MG-Kits auf dem LC480 II wurden anhand eines quantifizierten synthetischen Templates für die Targets *M. genitalium*, MgPa und 23S-rRNA-Targets (A2058G, A2059G, A2058T und A2058C) bei 10.000 Kopien und der dreifachen Kopiezahl an der Nachweisgrenze (3x LOD, Limit of Detection) pro Reaktion mit 6 Replikaten untersucht (sofern nicht anders angegeben). Die Versuche wurden auf dem LC480 II durchgeführt.

Die Variabilität zwischen den Chargen wurde anhand von Tests zweier Chargen bestimmt, die auf einem Gerät von einem Bediener durchgeführt wurden (**Tabelle 32**). Die beiden Chargen zeigten eine gute Reproduzierbarkeit mit einem Variationskoeffizienten (VK%) zwischen 0,35 und 2,37 % für alle Targets.

Tabelle 32. Variabilität zwischen Chargen

	Durchschnittlicher Cq	St.-Abw.	VK%	Anz. Proben
MgPa 10.000 Kopien	16,9	0,15	0,89	12/12
MgPa 30 Kopien	25,5	0,52	2,05	12/12
A2058G 10.000 Kopien	20,4	0,48	2,37	12/12
A2058G 36 Kopien	27,8	0,43	1,54	12/12
A2059G 10.000 Kopien	18,0	0,06	0,35	12/12
A2059G 30 Kopien	25,6	0,50	1,94	12/12
A2058T 10.000 Kopien	18,7	0,09	0,46	12/12
A2058T 30 Kopien	26,2	0,30	1,14	12/12
A2058C 10.000 Kopien	17,7	0,13	0,75	12/12
A2058C 30 Kopien	25,4	0,29	1,15	12/12

Die Variabilität von Tag zu Tag wurde durch Tests an drei aufeinander folgenden Tagen bestimmt, die von einem Bediener auf demselben Gerät durchgeführt wurden (**Tabelle 33**). Die drei Durchläufe zeigten eine gute Reproduzierbarkeit an den verschiedenen Tagen mit einem Variationskoeffizienten zwischen 0,88 und 2,31 % für alle Targets.

Tabelle 33. Variabilität von Tag zu Tag				
	Durchschnittlicher Cq	St.-Abw.	VK%	Anz. Proben
MgPa 10.000 Kopien	17,0	0,18	1,09	18/18
MgPa 30 Kopien	25,6	0,59	2,31	18/18
A2058G 10.000 Kopien	20,2	0,37	1,83	18/18
A2058G 36 Kopien	27,9	0,51	1,84	18/18
A2059G 10.000 Kopien	18,1	0,24	1,34	18/18
A2059G 30 Kopien	25,7	0,32	1,23	18/18
A2058T 10.000 Kopien	18,7	0,23	1,22	18/18
A2058T 30 Kopien	26,3	0,31	1,17	18/18
A2058C 10.000 Kopien	17,8	0,16	0,88	18/18
A2058C 30 Kopien	25,5	0,31	1,22	18/18

Die Variabilität zwischen den Durchläufen wurde durch Vergleich von drei qPCR-Durchläufen bestimmt, die am selben Tag vom selben Bediener durchgeführt wurden (**Tabelle 34**). Die drei Durchläufe zeigten eine gute Reproduzierbarkeit mit einem Variationskoeffizienten zwischen 0,40 und 3,20 % für alle Targets.

Tabelle 34. Variabilität zwischen den Durchläufen				
	Durchschnittlicher Cq	St.-Abw.	VK%	Anz. Proben
MgPa 10.000 Kopien	17,0	0,07	0,40	18/18
MgPa 30 Kopien	25,7	0,47	1,83	18/18
A2058G 10.000 Kopien	19,8	0,63	3,20	18/18
A2058G 36 Kopien	27,5	0,51	1,85	18/18
A2059G 10.000 Kopien	18,4	0,11	0,61	18/18
A2059G 30 Kopien	25,7	0,39	1,52	18/18
A2058T 10.000 Kopien	18,7	0,22	1,18	18/18
A2058T 30 Kopien	26,4	0,42	1,59	18/18
A2058C 10.000 Kopien	17,8	0,08	0,46	18/18
A2058C 30 Kopien	25,5	0,31	1,22	18/18

Die Bedienervariabilität wurde durch Vergleich von zwei Durchläufen bestimmt, die von zwei verschiedenen Bedienern durchgeführt wurden (**Tabelle 35**). Die beiden Durchläufe mit verschiedenen Bedienern zeigten eine gute Reproduzierbarkeit mit einem Variationskoeffizienten zwischen 0,54 und 1,62 % für alle Targets.

Tabelle 35. Bedienervariabilität				
	Durchschnittlicher Cq	St.-Abw.	VK%	Anz. Proben
MgPa 10.000 Kopien	16,8	0,12	0,73	12/12
MgPa 30 Kopien	25,3	0,41	1,61	12/12
A2058G 10.000 Kopien	20,2	0,24	1,21	12/12
A2058G 36 Kopien	27,9	0,45	1,62	12/12
A2059G 10.000 Kopien	17,9	0,10	0,58	12/12
A2059G 30 Kopien	25,5	0,39	1,53	12/12
A2058T 10.000 Kopien	18,6	0,10	0,54	12/12
A2058T 30 Kopien	26,1	0,31	1,20	12/12
A2058C 10.000 Kopien	17,7	0,13	0,71	12/12
A2058C 30 Kopien	25,2	0,27	1,06	12/12

Die Instrumentenvariabilität wurde durch Vergleich von zwei Durchläufen auf zwei verschiedenen Geräten bestimmt, die vom selben Bediener durchgeführt wurden (**Tabelle 36**). Die Durchläufe der verschiedenen Instrumente zeigten eine gute Reproduzierbarkeit mit einem Variationskoeffizienten zwischen 0,30 und 2,62 % für alle Targets.

Tabelle 36. Instrumentenvariabilität				
	Durchschnittlicher Cq	St.-Abw.	VK%	Anz. Proben
MgPa 10.000 Kopien	16,7	0,10	0,60	12/12
MgPa 30 Kopien	25,4	0,67	2,62	12/12
A2058G 10.000 Kopien	20,0	0,07	0,33	12/12
A2058G 36 Kopien	27,8	0,51	1,82	12/12
A2059G 10.000 Kopien	17,8	0,05	0,30	12/12
A2059G 30 Kopien	25,3	0,36	1,41	12/12
A2058T 10.000 Kopien	18,5	0,09	0,50	12/12
A2058T 30 Kopien	25,9	0,30	1,16	12/12
A2058C 10.000 Kopien	17,6	0,13	0,75	12/12
A2058C 30 Kopien	25,3	0,36	1,44	12/12

Die Variabilität innerhalb eines Durchlaufs wurde durch Vergleich von drei Versuchen bestimmt, die separat vom gleichen Bediener konfiguriert wurden und bei denen jedes Target auf derselben Platte verarbeitet wurde (**Tabelle 37**). Die drei Versuche zeigten eine gute Reproduzierbarkeit mit einem Variationskoeffizienten zwischen 0,57 und 3,12 % für alle Targets.

Tabelle 37. Variabilität innerhalb eines Durchlaufs				
	Durchschnittlicher Cq	St.-Abw.	VK%	Anz. Proben
MgPa 10.000 Kopien	17,3	0,36	2,09	18/18
MgPa 30 Kopien	25,9	0,81	3,12	18/18
A2058G 10.000 Kopien	20,2	0,11	0,57	18/18
A2058G 36 Kopien	28,0	0,65	2,31	18/18
A2059G 10.000 Kopien	17,9	0,15	0,83	18/18
A2059G 30 Kopien	25,8	0,38	1,46	18/18
A2058T 10.000 Kopien	18,8	0,12	0,66	18/18
A2058T 30 Kopien	26,8	0,38	1,41	18/18
A2058C 10.000 Kopien	17,8	0,15	0,83	18/18
A2058C 30 Kopien	25,5	0,36	1,41	18/18

16.2.2 Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität des **ResistancePlus®** MG Kits auf dem LC480 II wurde anhand eines Durchlaufs begrenzter Verdünnungsserien unter Verwendung eines quantifizierten synthetischen Templates für die Targets *M.-genitalium*-MgPa und 23S-rRNA (A2058G, A2059G, A2058T und A2058C) bestimmt. Die Sensitivität für jedes Target wurde als die Anzahl an Kopien pro Reaktion mit einem Nachweis von ≥ 95 % bestimmt, siehe **Tabelle 38**.

Tabelle 38. Analytische Sensitivität	
	Analytische Sensitivität (Kopien/Reaktion)
MgPa	10
A2058G	12
A2059G	10
A2058T	10
A2058C	10

16.2.3 Analytische Spezifität

Diese Studie wurde durchgeführt, um das **ResistancePlus®** MG-Kit zu evaluieren, wenn Nichtzielorganismen in hohen Konzentrationen vorhanden sind. Ein Panel von 65 Mikroorganismen (4 Viren, 2 Protozoen, 4 Pilze und 55 Bakterien), die Krankheitserreger oder Flora repräsentieren, die üblicherweise im Urogenitalsystem vorhanden sind oder eng mit *M. genitalium* verwandt sind, wurde untersucht. Sofern nicht anders angegeben, wurde jeder Bakterienstamm mit 1×10^6 Genomen/ml getestet. Sofern nicht anders angegeben, wurde jeder Virenstamm mit 1×10^5 Genomen/ml getestet. Alle anderen Organismen wurden in den angegebenen Konzentrationen getestet. Alle Organismen wurden unter Verwendung von qPCR quantifiziert, mit Ausnahme derjenigen, die als koloniebildende Einheiten (KBE) oder plaquebildende Einheiten (PBE) (**Tabelle 39**) quantifiziert wurden. Alle Mikroorganismen wurden dreifach getestet. Alle getesteten Mikroorganismen wurden in eine negative klinische Matrix (entweder Urin oder Vaginalabstrich) verdünnt.

Die Ergebnisse zeigten, dass keiner dieser Organismen falsche positive Ergebnisse in den negativen Matrizen von *M. genitalium* (**Tabelle 39**) hervorbrachte.

In einer *in-silico*-Analyse wurde auch untersucht, ob die Oligonukleotide im **ResistancePlus®** MG Assay Nukleinsäuresequenzen von Nichtzielorganismen, die in BLAST verfügbar sind, amplifizieren und nachweisen können. Es wurden keine signifikanten Wechselwirkungen festgestellt.

Tabelle 39. Auf analytische Spezifität getestete Mikroorganismen

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

* Zahl in Klammern gibt die Anzahl der getesteten Stämme an

[^] quantifiziert als PBE/ml

[#] quantifiziert als KBE/ml

16.2.4 Potentielle Störstoffe

Eine Studie mit Störsubstanzen wurde durchgeführt, um zu untersuchen, ob Substanzen oder Bedingungen, die in Urin- oder Vaginalabstrichproben vorhanden sein können, die Leistung des **ResistancePlus**[®] MG Assays beeinträchtigen können. Das Panel bestand aus körpereigenen Substanzen wie Blut, Mucin, Leukozyten und Medikamenten (verschreibungspflichtig und rezeptfrei), die zur Behandlung von Urogenitalerkrankungen eingesetzt werden könnten. Alle Substanzen wurden anhand der Leistung der Internal Control (internen Kontrolle) bewertet, die die Extraktion und die qPCR-Hemmung überwacht. Alle Testproben wurden dreifach getestet. Die Substanzen wurden nach Bedarf in einer negativen klinischen Matrix (entweder Urinprobe oder Vaginalabstrich) verdünnt.

Die Ergebnisse zeigten, dass keine der Substanzen und Bedingungen die Erkennung der Internal Control (internen Kontrolle) beeinträchtigten oder zu falsch positiven Ergebnissen führten.

Die Ergebnisse sind in **Tabelle 40** und **Tabelle 41** zusammengefasst.

Tabelle 40. Potenzielle Störsubstanzen in Urinproben

Klasse/Substanz	Produktname	Testkonzentration
Vollblut	--	1 Vol.-%
Sperma	--	5,0 Vol.-%
Schleim	Muzin	0,8 Gew.-%
Antibiotika	Azithromycin	1,8 mg/mL
	Doxycyclin	3,6 mg/mL
Analgetika	Aspirin	40 mg/mL
	Paracetamol	3,2 mg/mL
Intravaginale Hormone	--	7 mg/ml Progesteron + 0,07 mg/ml Beta-Estradiol
Leukozyten	--	10 ⁵ Zellen/mL
Albumin	Rinderserumalbumin	10 mg/mL
Glucose	--	10 mg/mL
Saurer Urin (pH 4,0)	Urin + N-Acetyl-L-Cystein	pH 4,0
Alkalischer Urin (pH 9,0)	Urin + Ammoniumcitrat	pH 9,0
Bilirubin	--	1 mg/ml

Tabelle 41. Potenzielle Störsubstanzen in Vaginalabstrichen		
Klasse/Substanz	Produktname	Testkonzentration
Blut	--	60 Vol.-%
Samenflüssigkeit	--	5,0 Vol.-%
Schleim	Muzin	0,8 Gew.-%
Rezeptfreie Vaginalprodukte und Verhütungsmittel	Vagisil Anti-Itch Crème (1.0 oz)	0,25 Gew.-%
	K-Y Jelly (4.0 oz)	0,25 Gew.-%
	Options Gynol II Vaginal Contraceptive Gel	0,25 Gew.-%
	Walgreens Clotrimazole Vaginal Cream (1.5 oz)	0,25 Gew.-%
	Vagisil Sensitive Skin Formula Maximum Strength Anti-Itch Creme with Oatmeal (1.0 oz)	0,25 Gew.-%
	Vagisil ProHydrate Natural Feel Internal Moisturizing Gel (0.2 oz x 8 pack)	0,25 Gew.-%
	Vagisil Daily Intimate Deodorant Powder (8.0 oz)	0,25 Gew.-%
	Summer's Eve Medicated Douche	0,25 Vol.-%
Deodorants und Puder	Summer's Eve Deodorant spray (2.0 oz)	0,25 Vol.-%
Hämorrhoidencreme	Preparation H Hemorrhoidal Cream (0.9 oz)	0,25 Gew.-%
Verschreibungspflichtige Medikamente	Metronidazole Vaginal Gel, 0.75%	0,25 Gew.-%
	Estrace® (estradiolhaltige Vaginalcreme, USP 0,01 %)	0,25 Gew.-%
Leukozyten	--	10 ⁵ Zellen/ml
Intravaginale Hormone	--	7 mg/ml Progesteron + 0,07 mg/ml Beta-Estradiol

16.2.5 Kreuzreaktivität mit anderen 23S-rRNA-Mutationen

Die Kreuzreaktivität des **ResistancePlus**® MG-Kits wurde mit einem quantifizierten synthetischen Template für die Targets *M. genitalium*-MgPa und 23S-rRNA (A2059C) mit 10.000 und 45 Kopien pro Reaktion bewertet. Die Ergebnisse zeigten, dass der **ResistancePlus**® MG Test mit dem Target *M. genitalium*, 23S rRNA A2059C mit einer Trefferquote von 100 % eine Kreuzreaktivität zeigt.

17 Kundenservice und technischer Support

Bitte wenden Sie sich mit Fragen zu Reaktionsaufbau, Zyklusbedingungen und anderen Anliegen an den technischen Support.

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

18 Literaturhinweise

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 Anhang 1: LightCycler® 480 Instrument II

Die folgenden Informationen basieren auf der LightCycler® 480 Software (Version 1.5).

Das **ResistancePlus®** MG-Kit enthält Farbstoffe für das LightCycler® 480 Instrument II. Für die LC480 II-Analyse muss das **PlexPCR®** Colour Compensation-Kit (Bestell-Nr. 90001) eingesetzt werden (siehe **Abschnitt 19.2**). Dieses Kit ist auf Anfrage erhältlich.

19.1 Programmierung des LightCycler® 480 Instrument II (LC480 II)

Nachweisformat

Erstellen eines benutzerdefinierten **Nachweisformats**

Öffnen Sie **Tools** (Werkzeuge) > **Detection Formats** (Nachweisformate).

Wählen Sie „New Detection Format“ (Neues Nachweisformat), um ein neues Nachweisformat zu erstellen, und nennen Sie es **SpeedX PlexPCR** (kann beim Erstellen der SpeedX-Farbkompensationsdatei erstellt werden) (siehe **Abbildung 3**).

Wählen Sie bei **Filter Combination Selection** (Auswahl der Filterkombinationen) Folgendes aus (Excitation-Emission [Anregung-Emission]), wie in **Tabelle 42** gezeigt.

Tabelle 42. Filterkombinationen [^]						
LC480 II	440–488	465–510	533–580	533–610	533–640	618–660

[^] Diese Filterkombinationen sind die Standardnamen für die Kanäle.

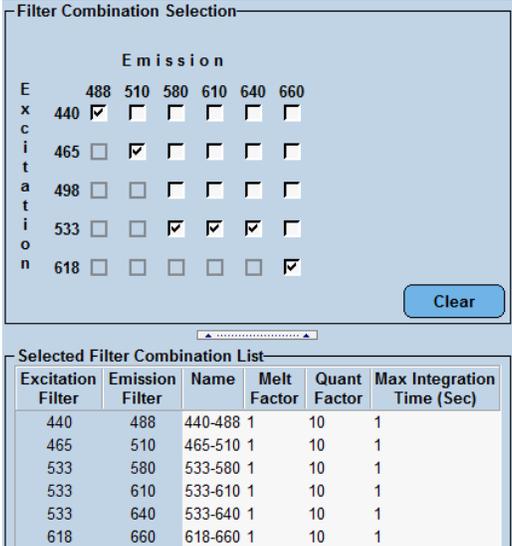
Legen Sie die **Selected Filter Combination List** (Liste der ausgewählten Filterkombinationen) für alle Kanäle wie folgt fest:

Melt Factor (Schmelzfaktor): 1

Quant Factor (Quantfaktor): 10

Max Integration Time (sec) (Max. Integrationszeit [s]): 1

Abbildung 3. Benutzerdefiniertes SpeedX-Nachweisformat



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	

Geräteeinstellungen

Erstellen eines benutzerdefinierten **Nachweisformats**

Öffnen Sie **Tools** (Werkzeuge) > **Instruments** (Geräte).

Wählen Sie unter **Instrument Settings** (Geräteeinstellungen) > **Barcode Enabled** (Barcode aktiviert).

Einrichtung des Experiments

Wählen Sie **New Experiment** (Neues Experiment).

Auf der Registerkarte **Run Protocol** (Protokoll ausführen)

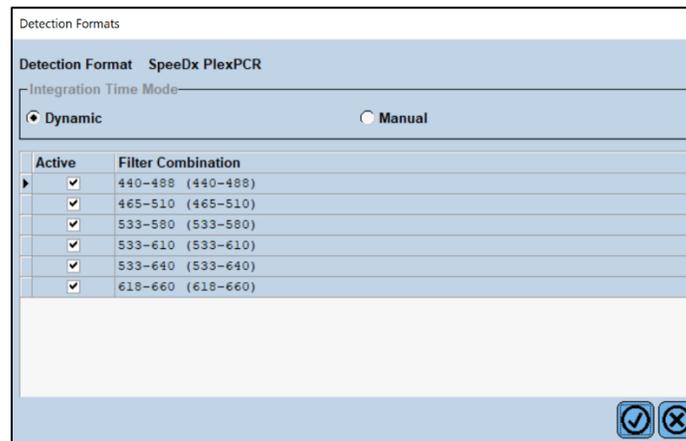
Wählen Sie bei **Detection Format** (Nachweisformat) das benutzerdefinierte **SpeedX PlexPCR** (**Abbildung 4**).

Wählen Sie **Customize** (Anpassen) >

Wählen Sie **Integration Time Mode** (Integrationszeit-Modus) > **Dynamic** (Dynamisch).

Wählen Sie alle **Filter Combinations** (Filterkombinationen) in **Abbildung 4**, bei denen das Kontrollkästchen unter „Active“ (Aktiv) aktiviert ist.

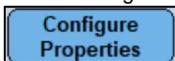
Abbildung 4. Nachweisformat anpassen



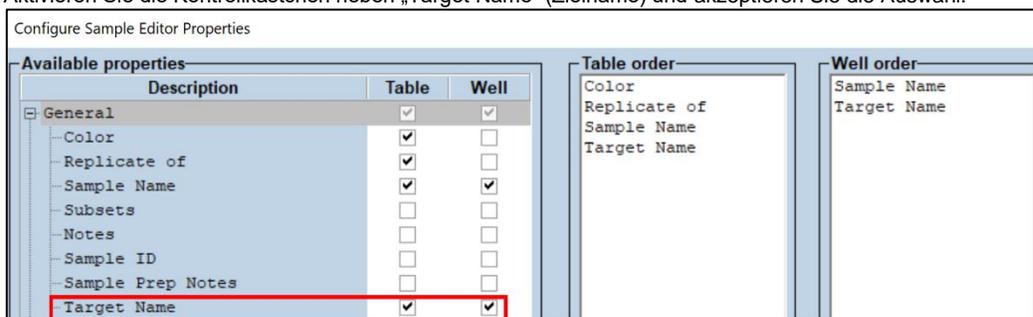
Um die automatische Probenerkennung in der Analysesoftware zu aktivieren, weisen Sie den Vertiefungen der Platte Kennzeichnungen zu.

Öffnen Sie das Modul **Sample Editor** (Probeneditor).

Zum Hinzufügen von Zielnamen wählen Sie **Configure Properties** (Eigenschaften konfigurieren).



Aktivieren Sie die Kontrollkästchen neben „Target Name“ (Zielname) und akzeptieren Sie die Auswahl.



Bearbeiten Sie den **Target Name** (Zielname) für jeden Kanal damit er mit der Zielinstrumentenreferenz übereinstimmt, die im Menü „Lab Configuration > Assays“ (Laborkonfiguration > Assays) der Analysesoftware festgelegten und in **Tabelle 43** aufgeführten Zielnamen übereinstimmt..

Tabelle 43. Kanäle für *ResistancePlus*[®] MG-Ziele

Ziel	MgPa	23S rRNA mutation	IC
LC480 II	465–510	533–580	533–640

Wählen Sie die Vertiefung, um Kennzeichnungen zuzuweisen.

Bearbeiten Sie den **Sample Name** (Probenname) so, dass er mit der im Menü Lab Configuration > Assays (Laborkonfiguration > Assays) der Analysesoftware festgelegten Kennzeichnung übereinstimmt (siehe **Abschnitt 23.3**).

Proben sollten als Präfix die Kennzeichnung erhalten. Für die Kontrollreaktionen sind Standardkennzeichnungen vorgegeben (wie in **Tabelle 44** und **Abbildung 5** gezeigt). Zusätzliche Kennzeichnungen können sowohl für reguläre Proben als auch für Kontrollen in der Analysesoftware festgelegt werden.

Hinweis: Bei den Probenkennzeichnungen ist Groß-/Kleinschreibung zu beachten. Die Kennzeichnung muss genau mit der in der Testlaufdatei zugewiesenen Kennzeichnung übereinstimmen.

Tabelle 44 Probenkennzeichnungen für die Analysesoftware

Probentyp	Standardpräfix (in der Analysesoftware)
Reguläre Probe	Nicht voreingestellt – benutzerdefiniert
Negativkontrolle	NC
No-Template-Kontrolle	NTC
Positivkontrolle (MG, 23S-rRNA-Mutantentyp) (Pa)	Pa
Positivkontrolle (MG, 23S-rRNA-Wildtyp) (Pb)	Pb

Abbildung 5. Probeneditor – Zuweisen von Kennzeichnungen zu Vertiefungen

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

Legen Sie das **Reaction Volume** (Reaktionsvolumen) auf 20 µl fest.

Erstellen Sie das folgende Programm in **Tabelle 45** (ausführlicher dargestellt in den **Abbildung 6 – 9**):

Tabelle 45. Thermocycling-Programm

Programmname	Cycles (Zyklen)	Target (Zieltemperatur) °C	Hold (Dauer)	Ramp rate (Rampenrate) (°C/s) [†]
Polymerase activation (Polymeraseaktivierung)	1	95°C	2 min	4,4
Touch down cycling (Touchdown-Zyklen) [‡] :	10	95°C	5 s	4,4
Step down (Schrittweise Reduzierung um) -0,5° °C/Zyklus		61°C – 56.5°C [‡]	30 s	2,2
Quantification cycling (Quantifizierungszyklus) [†] :	40	95°C	5 s	4,4
Acquisition/Detection (Aufnahme/Erkennung)		52°C [†]	40 s	2,2
Cooling (Abkühlung)	1	40°C	30 s	2,2

[†] Standard-Rampenrate (96-Well-Platte)

[‡] Step size (Schrittgröße): -0,5°C/Zyklus, Sec Target (Sek. Ziel):°56C

[†] Analysis mode (Analysemodus): Quantification (Quantifizierung). Acquisition mode (Aufnahmemodus): Single (Einzeln)

Abbildung 6. Thermocycling program (Thermocycling-Programm) – Polymerase activation (Polymeraseaktivierung)

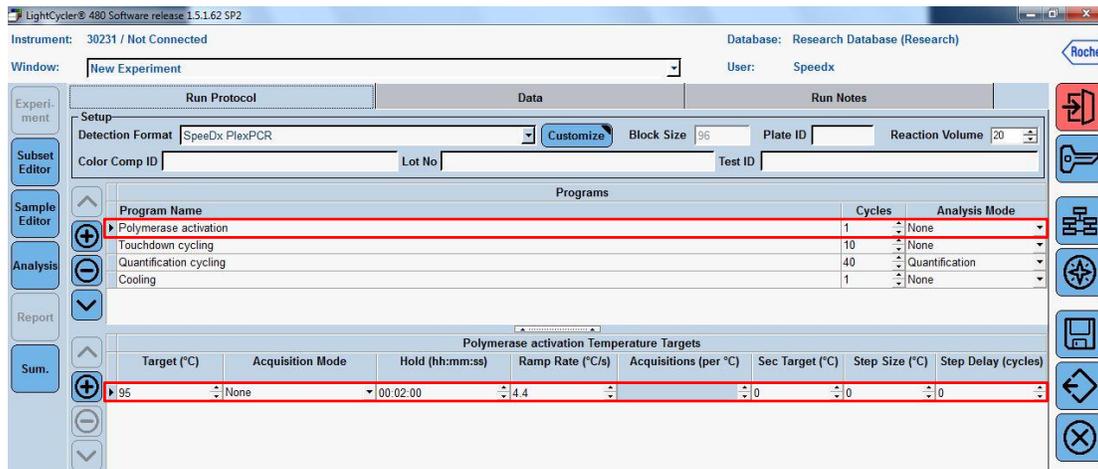


Abbildung 7. Thermocycling-Programm – Touchdown-Zyklen

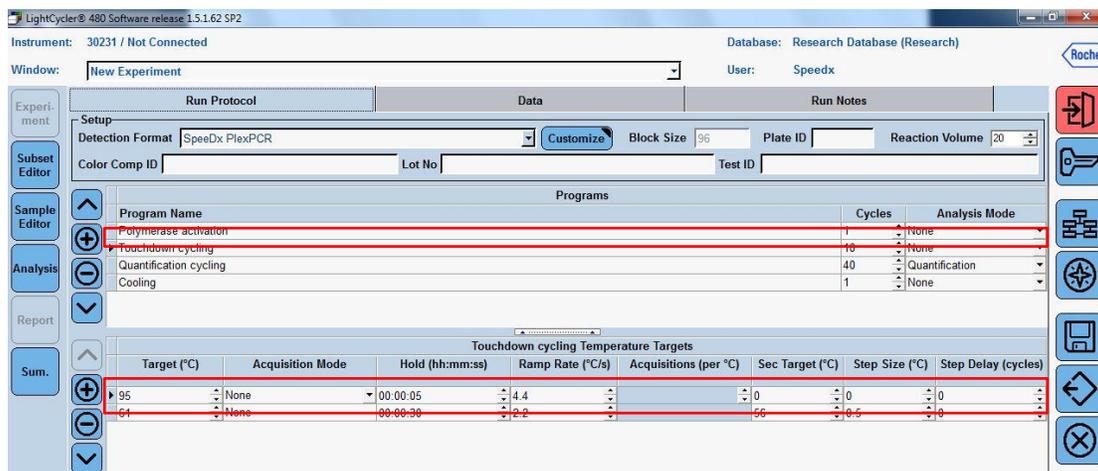
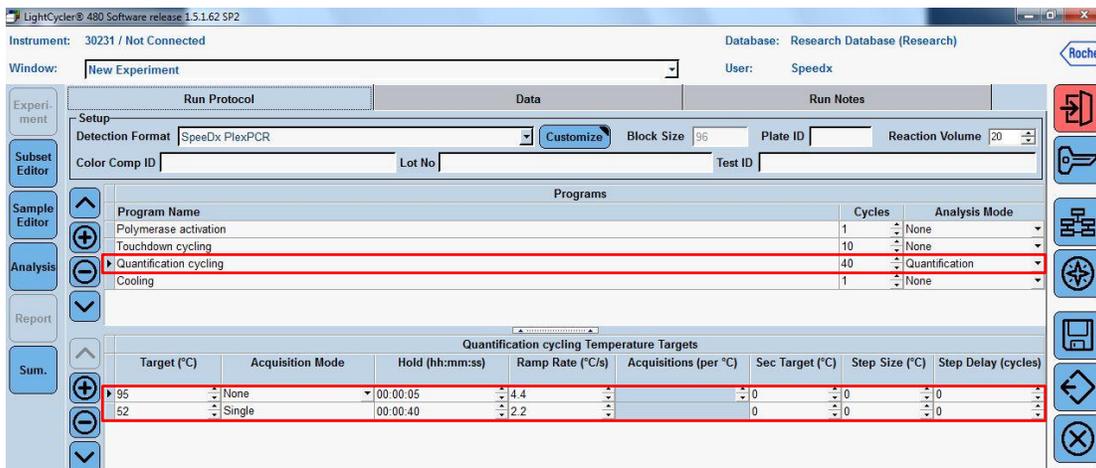


Abbildung 8. Thermocycling-Programm – Quantifizierungszyklen



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

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

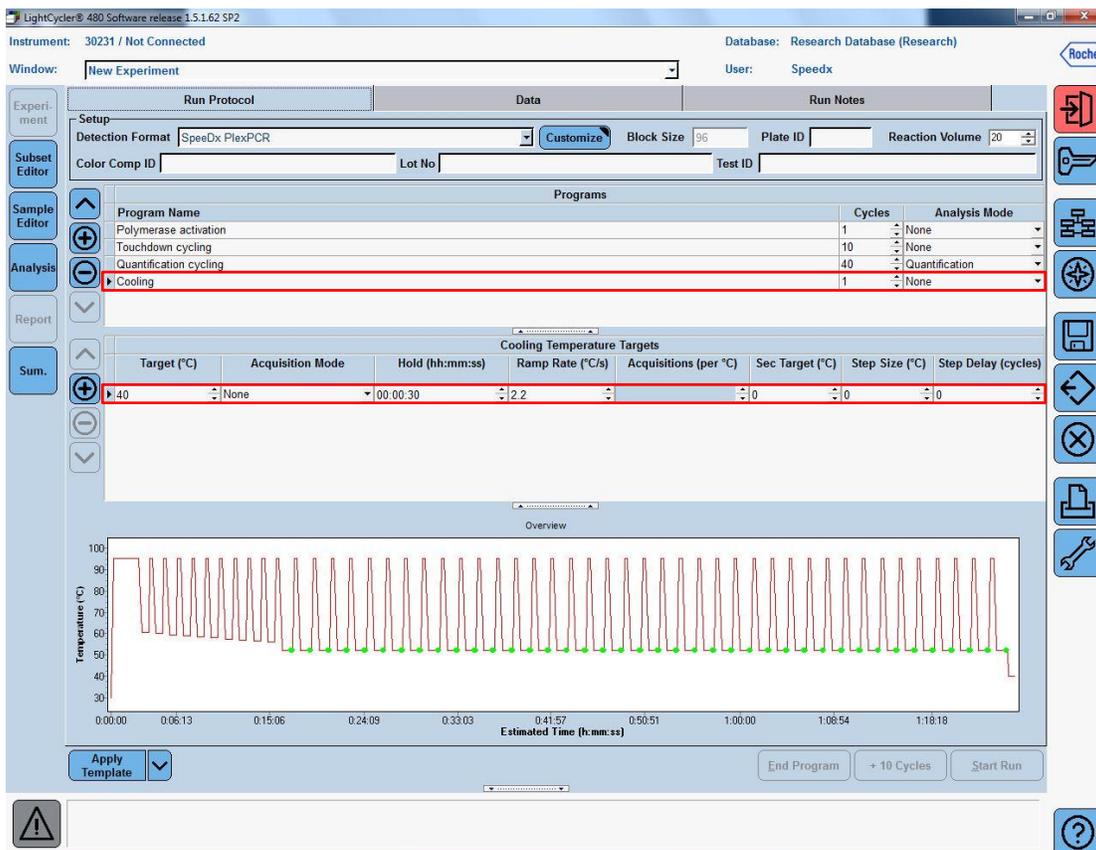
Programs

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

Quantification cycling Temperature Targets

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

Abbildung 9. Thermozyklen-Programm – Abkühlung



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

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

Programs

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

Cooling Temperature Targets

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

Overview

Temperature (°C) vs. Estimated Time (h:mm:ss)

00:00.00 0:06.13 0:15.06 0:24.09 0:33.03 0:41.57 0:50.51 1:00.00 1:08.54 1:18.18

Apply Template End Program + 10 Cycles Start Run

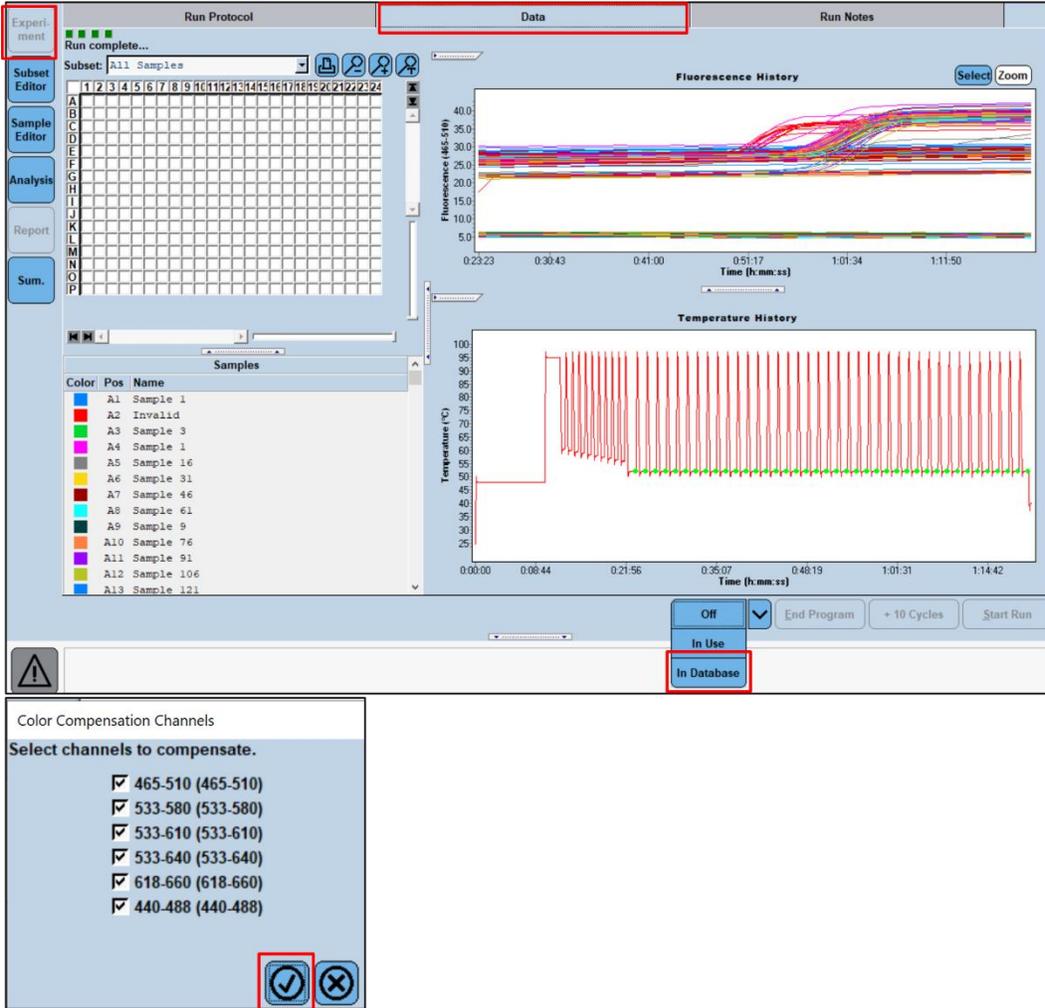
> Start Run (Durchlauf starten)

Wenn das Zyklenprogramm beendet ist, hängen Sie das CC-Objekt an die Testlaufdatei an, wie in **Abbildung 10** gezeigt, und exportieren Sie diese als .ixo-Datei zur Analyse in der **ResistancePlus®** MG-Analysesoftware. Anweisungen zum Erstellen des CC-Objekts und zum Speichern dieses Objekts in der LightCycler 480-Software-Datenbank finden Sie im **Abschnitt 19.2**.

Wählen Sie **Experiment > Data** (Experiment > Daten).

Klicken Sie auf den Dropdown-Pfeil neben **Colour Comp (Off)** (Farbkompensation [Aus]) und wählen Sie **In Database** (In der Datenbank).

Abbildung 10. Anhängen des CC-Objekts an die Testlaufdatei



The screenshot shows the SpeedX software interface. The 'Data' tab is selected, and the 'Colour Comp' dropdown menu is open, showing 'In Database' as the selected option. The interface includes a 'Run Protocol' section with a 'Run complete...' status, a 'Subset' dropdown set to 'All Samples', and a grid for sample selection. Below the grid is a 'Samples' list with columns for Color, Pos, and Name. The 'Fluorescence History' and 'Temperature History' plots are visible on the right. The 'Colour Comp Channels' dialog box is open, showing a list of channels with checkboxes, and the 'OK' button is highlighted.

Wählen Sie das entsprechende CC-Objekt, stellen Sie sicher, dass alle Kanäle ausgewählt sind, und klicken Sie auf das

Häkchensymbol .

Wählen Sie das Symbol für **Save** (Speichern) .

Wählen Sie das Symbol für **Export** (Exportieren) .

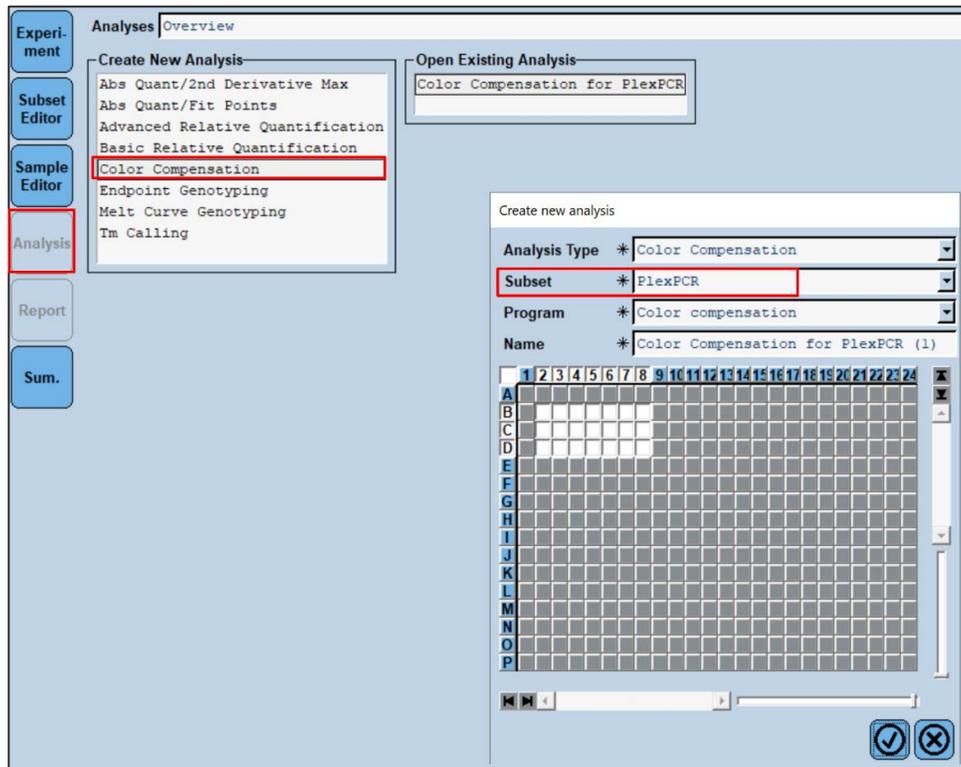
Speichern Sie die Datei an einem leicht identifizierbaren Ort.

19.2 Farbkompensation für das LightCycler® 480 Instrument II

HINWEIS: Für die LC480 II-Analyse muss das **PlexPCR®** Colour Compensation-Kit (Bestell-Nr. 90001) eingesetzt werden. Dieses Kit ist auf Anfrage erhältlich.

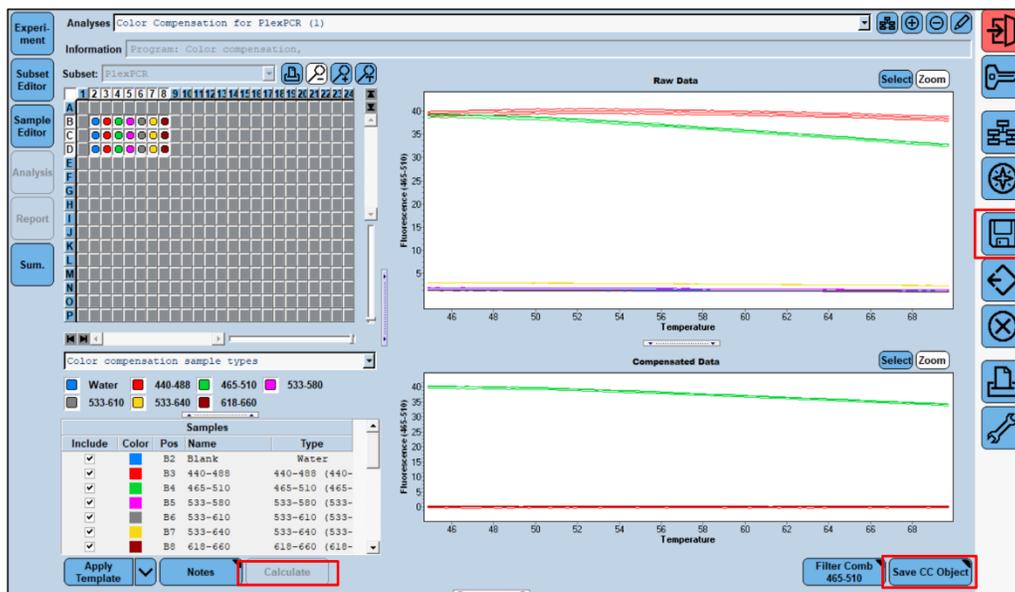
Analysieren Sie die Farbkompensationsdatei über **Analysis > Colour Compensation** (Analyse > Farbkompensation) und wählen Sie die richtige Teilmenge, die in **Abbildung 11** dargestellt ist.

Abbildung 11. Analyse – Farbkompensation



Wählen Sie **Calculate** (Berechnen) (**Abbildung 12**).

Abbildung 12. CC-Objekt berechnen und speichern



Weitere Informationen zum korrekten Erstellen der Farbkompensationsdatei finden Sie in der Gebrauchsanweisung für PlexPCR Colour Compensation (IF-IV0001).

Wählen Sie **Save** (Speichern) .

19.3 Interpretation der Ergebnisse

Dateninterpretation erfordert die **ResistancePlus**[®] MG (LC480) Analysesoftware. Die Analysesoftware ist auf Anfrage erhältlich. Für weitere Informationen senden Sie bitte eine E-Mail an tech@speedx.com.au

In **Abschnitt 23** finden Sie Anweisungen zur Verwendung der **ResistancePlus**[®] MG (LC480) Analysesoftware.

20 Anhang 2: Applied Biosystems® 7500 Fast

Die folgenden Angaben beziehen sich auf die 7500 Software v2.3.

Das **ResistancePlus**® MG₍₅₅₀₎-Kit enthält Farbstoffe für den Applied Biosystems® (ABI) 7500 Fast. Für alle Kanäle werden standardmäßige Farbstoffkalibrierungen verwendet. Eine benutzerdefinierte Kalibrierung ist nicht erforderlich.

20.1 Programmieren des Applied Biosystems® 7500 Fast

Wählen Sie **Advanced Setup** (Erweitertes Setup)

Öffnen Sie unter **Setup** (Einstellungen) > die Option **Experiment Properties** (Versuchseigenschaften) und wählen Sie dort die folgenden Optionen.

Geben Sie dem Versuch einen Namen.

Instrument > 7500 Fast (96 Wells)

Type of experiment (Art des Versuchs) > Quantitation – Standard Curve (Quantifizierung – Standardkurve)

Reagents (Reagenzien) > Other (Sonstige)

Ramp Speed (Rampengeschwindigkeit) > Standard

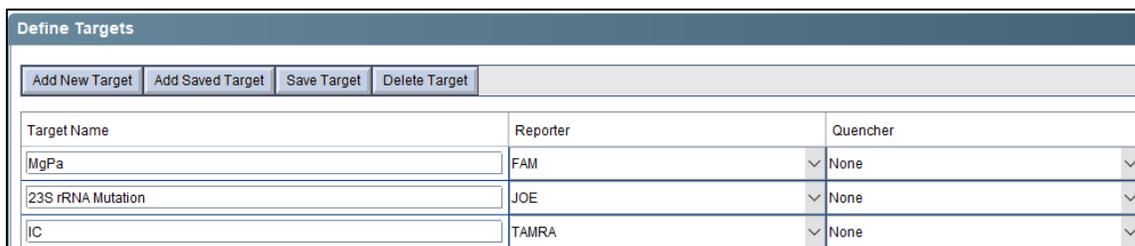
Öffnen Sie in **Setup** (Einrichtung) > **Plate Setup** (Platteneinrichtung).

Auf der Registerkarte **Define Targets and Samples** (Ziele und Proben festlegen) >

Define Targets (Ziele festlegen) wie unten in **Tabelle 46** und **Abbildung 13** gezeigt (Farben nach Bedarf festlegen)

Zielname	Reporter	Quencher
MgPa	FAM	None
23S rRNA mutation	JOE	None
IC	TAMRA	None

Abbildung 13. Ziele und Proben festlegen



Define Targets		
Add New Target	Add Saved Target	Save Target
Delete Target		
Target Name	Reporter	Quencher
MgPa	FAM	None
23S rRNA Mutation	JOE	None
IC	TAMRA	None

Festlegen von Proben (Farben nach Bedarf festlegen)

Um die automatische Probenerkennung in der Analysesoftware zu aktivieren, stellen Sie sicher, dass der Zielname (siehe **Tabelle 46**) mit der Zielgerätreferenz übereinstimmt, die in der Menü **Lab Configuration > Assays** (Laborkonfiguration > Assays) der Analysesoftware festgelegten Zielnamen übereinstimmt.

Zusätzlich müssen den Vertiefungen der Platte auch Probenkennzeichnungen zugewiesen werden.

Öffnen Sie in **Setup** (Einrichtung) > **Plate Setup** (Platteneinrichtung).

Auf der Registerkarte **Define Targets and Samples** (Ziele und Proben festlegen) >

Proben festlegen

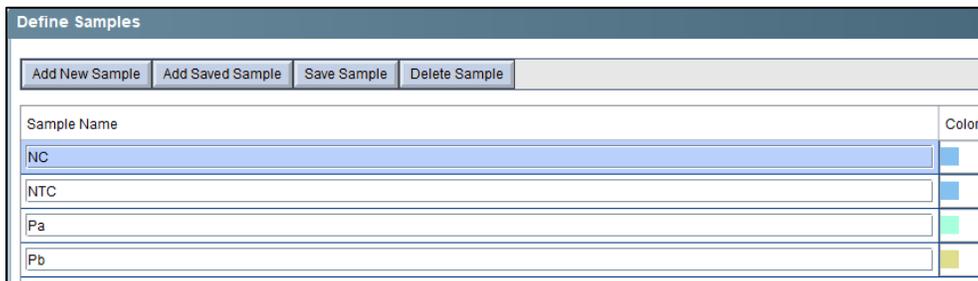
Bearbeiten Sie den **Sample Name** (Probenname) so, dass er mit der im Menü **Lab Configuration > Assays** (Laborkonfiguration > Assays) der Analysesoftware festgelegten Kennzeichnung übereinstimmt (**Abschnitt 23.3**).

Proben sollten als Präfix die Kennzeichnung erhalten. Für die Kontrollreaktionen sind Standardkennzeichnungen vorgegeben (wie in **Tabelle 47** und **Abbildung 14** gezeigt). Zusätzliche Kennzeichnungen können sowohl für reguläre Proben als auch für Kontrollen in der Analysesoftware festgelegt werden.

Hinweis: Bei den Probenkennzeichnungen ist Groß-/Kleinschreibung zu beachten. Die Kennzeichnung muss genau mit der in der Testlaufdatei zugewiesenen Kennzeichnung übereinstimmen.

Tabelle 47. Probenkennzeichnungen für die Analysesoftware	
Probentyp	Standardpräfix (in der Analysesoftware)
Reguläre Probe	Nicht voreingestellt – benutzerdefiniert
Negativkontrolle	NC
No-Template-Kontrolle	NTC
Positivkontrolle (MG, 23S-rRNA-Mutantentyp) (Pa)	Pa
Positivkontrolle (MG, 23S-rRNA-Wildtyp) (Pb)	Pb

Abbildung 14. Probeneditor – Zuweisen von Kennzeichnungen zu Vertiefungen



Auf der Registerkarte **Assign Targets and Samples** (Ziele und Proben zuweisen) >

Wählen Sie Vertiefungen aus und weisen Sie diesen Ziele und Proben zu.

Wählen Sie **Passive reference** (Passive Referenz) > None (Keine).

Öffnen Sie in **Setup** (Einrichtung) > **Run Method** (Testlaufmethode).

Legen Sie das **Reaction Volume Per Well** (Reaktionsvolumen pro Vertiefung) auf 20 µL fest.

Erstellen Sie das folgende Programm in **Tabelle 48** (ausführlicher dargestellt in der grafischen Ansicht (**Abbildung 15** und **Abbildung 16**) und in der tabellarischen Ansicht (**Abbildung 17**):

Tabelle 48. Thermocycling-Programm

Programmname	Cycles (Zyklen)	Target (Zieltemperatur) °C	Hold (Dauer)	Rampe [‡]
Polymerase activation (Polymeraseaktivierung)	1	95°C	2 min	100 %
Touch down cycling (Touchdown-Zyklen): Step down (Schrittweise Reduzierung um) -0,5° °C/Zyklus [§]	10	95°C	5 s	100 %
		61°C – 56,5°C [§]	30 s	100 %
Quantification cycling (Quantifizierungszyklus) [‡] : Acquisition/Detection (Aufnahme/Erkennung)	40	95°C	5 s	100 %
		52°C ⁺	40 s	100 %

[‡] Standard-Rampenrate

[§] Enable AutoDelta (AutoDelta aktivieren): -0,5°C/Zyklus

⁺ Collect data on hold (Daten bei Halt erfassen)

Abbildung 15. Run method (Methode ausführen) – Graphical View (Grafische Ansicht)

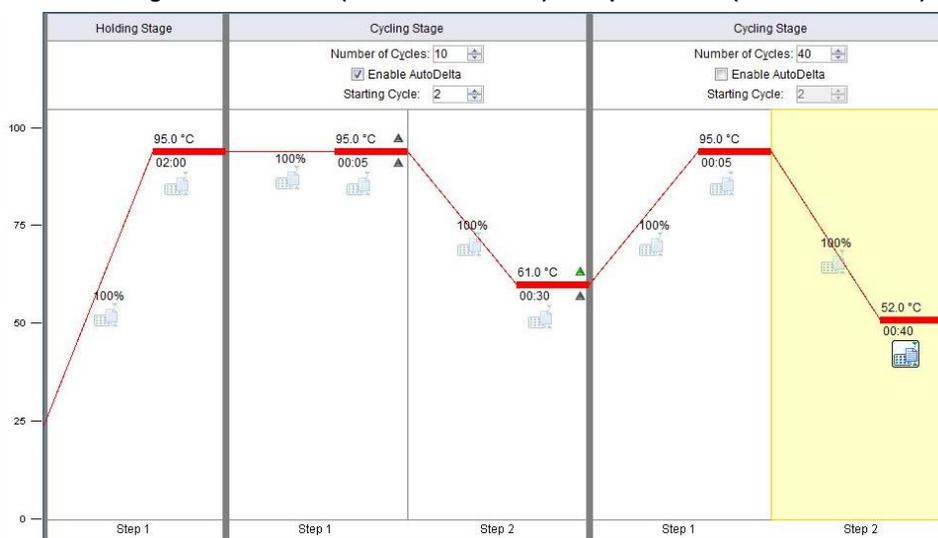


Abbildung 16. Run method (Methode ausführen) – Graphical View (Grafische Ansicht) – Enable AutoDelta

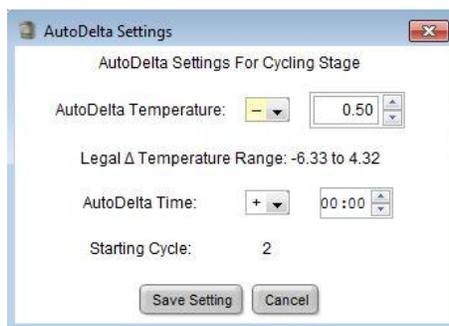


Abbildung 17. Run method (Methode ausführen) – Tabular View (Tabellenansicht)

	Holding Stage	Cycling Stage		Cycling Stage	
		Number of Cycles: 10		Number of Cycles: 40	
		<input checked="" type="checkbox"/> Enable AutoDelta		<input type="checkbox"/> Enable AutoDelta	
		Starting Cycle: 2		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

Öffnen Sie in **Setup** > die Option **Run Method** (Durchlaufmethode)

Wählen Sie **Start Run** (Ausführung starten)

20.2 Interpretation der Ergebnisse

Dateninterpretation erfordert die **ResistancePlus**® MG (7500) Analysesoftware. Die Analysesoftware ist auf Anfrage erhältlich. Für weitere Informationen senden Sie bitte eine E-Mail an tech@speedx.com.au.

Abschnitt 23 enthält Anweisungen zur Verwendung der **ResistancePlus**® MG (7500) Analysesoftware.

21 Anhang 3: Applied Biosystems 7500 Fast Dx

Die folgenden Informationen basieren auf SDS Software v1.4.1. für den 7500 Fast Dx.

Das **ResistancePlus**[®] MG₍₅₅₀₎-Kit enthält Farbstoffe für den Applied Biosystems[®] (ABI) 7500 Fast Dx. Für alle Kanäle werden standardmäßige Farbstoffkalibrierungen verwendet. Eine benutzerdefinierte Kalibrierung ist nicht erforderlich.

21.1 Programmieren des Applied Biosystems[®] 7500 Fast Dx

Wählen Sie Create New Document (Neues Dokument erstellen)

Wählen Sie im **New Document Wizard** (Assistent für neue Dokumente) Folgendes (**Abbildung 18**):

Assay > Standard Curve (Absolute Quantification)

Container (Behälter) > 96-Well Clear

Template (Vorlage) > Blank document (Leeres Dokument)

Run mode (Durchlaufmodus) > Standard 7500

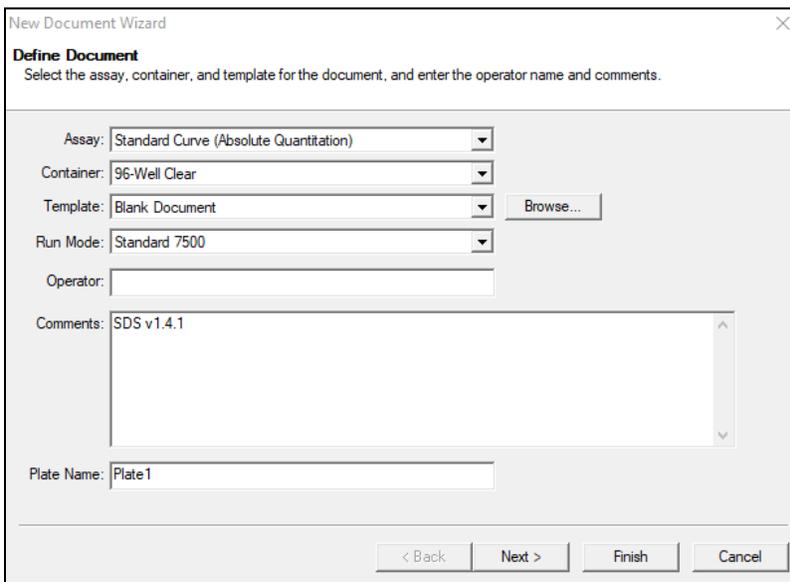
Operator (Bediener) > Geben Sie den Namen des Bedieners ein.

Comments (Bemerkungen) > Geben Sie Kommentare oder zusätzliche Hinweise für die Ausführungsdatei ein.

Plate Name (Plattenname) > Weisen Sie der Durchlaufdatei einen eindeutigen Namen zu.

Wählen Sie **Next** (Weiter).

Abbildung 18. Fenster New Document Wizard (Assistent für neue Dokumente)



Wählen Sie in **Select Detectors** (Detektoren auswählen) > **New Detector** (Neuer Detektor)

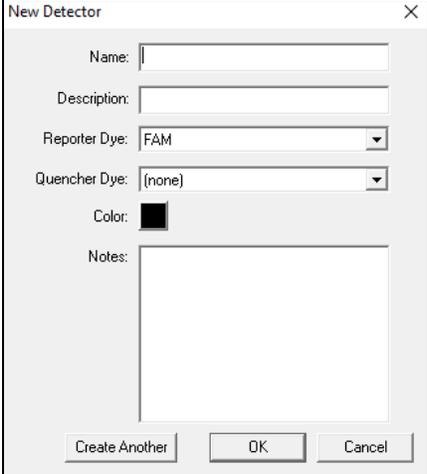
Definieren Sie die Detektoren wie im folgenden Beispiel (legen Sie hier gegebenenfalls Farben fest

Tabelle 49 und **Abbildung 19**)

Tabelle 49. Detektoren definieren			
Detektoren	Name des Detektors	Reporterfarbstoff	Quencher
Detektor 1	MgPa	FAM	None (Kein)
Detektor 2	23S rRNA mutation	JOE	None (Kein)
Detektor 3	IC	TAMRA	None (Kein)

OK auswählen

Abbildung 19. Fenster „New Detector“ (Neuer Detektor)

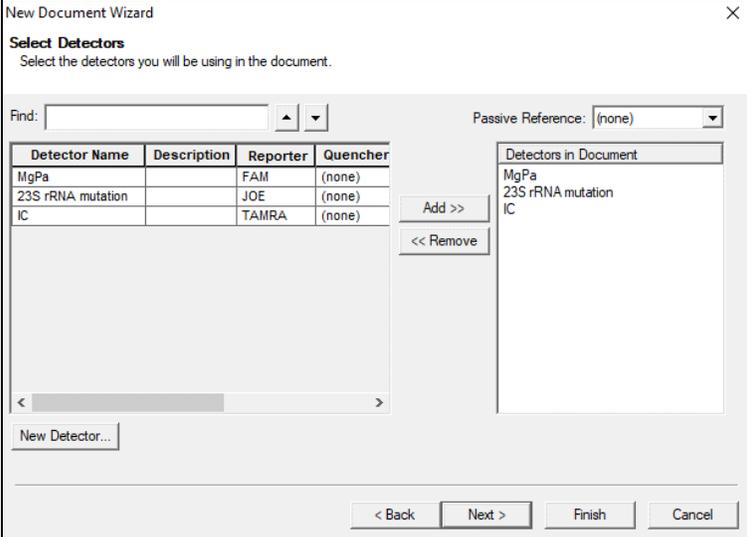


Wählen Sie **Detektoren** aus (Abbildung 20).

Wählen Sie Detektoren und fügen Sie diese mit **Add** (Hinzufügen) zum Dokument hinzu

Wählen Sie **Passive reference** (Passive Referenz) > **None** (Keine)

Abbildung 20. Fenster Select Detectors (Detektoren auswählen)



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

Detectors in Document
MgPa
23S rRNA mutation
IC

In **Set Up** sample plate > (Probenplatte einrichten)

Wählen Sie Wells aus und weisen Sie den ausgewählten Wells 3 Detektoren zu

- MgPa
- 23S rRNA mutation
- IC

Wählen Sie **Next** (Weiter).

Um die automatische Probenerkennung in der Analysesoftware zu aktivieren, stellen Sie sicher, dass der Detektorname (siehe **Tabelle 49**) mit der Zielgerätereferenz übereinstimmt, die in der Menü **Lab Configuration > Assays** (Laborkonfiguration > Assays) der Analysesoftware festgelegten Zielnamen übereinstimmt.

Zusätzlich müssen den Vertiefungen der Platte auch Kennzeichnungen zugewiesen werden.

Öffnen Sie in **Setup** (Einrichtung) > **Plate Setup** (Platteneinrichtung).

Bearbeiten Sie den **Sample Name** (Probenname) so, dass er mit der im Menü **Lab Configuration > Assays** (Laborkonfiguration > Assays) der Analysesoftware festgelegten Kennzeichnung übereinstimmt (siehe **Abschnitt 23.3**).

Proben sollten als Präfix die Kennzeichnung erhalten. Für die Kontrollreaktionen sind Standardkennzeichnungen vorgegeben (wie in **Tabelle 50** gezeigt). Zusätzliche Kennzeichnungen können sowohl für reguläre Proben als auch für Kontrollen in der Analysesoftware festgelegt werden.

Hinweis: Bei den Probenkennzeichnungen ist Groß-/Kleinschreibung zu beachten. Die Kennzeichnung muss genau mit der in der Testlaufdatei zugewiesenen Kennzeichnung übereinstimmen.

Tabelle 50. Probenkennzeichnungen für die Analysesoftware	
Probentyp	Standardpräfix (in der Analysesoftware)
Reguläre Probe	Nicht voreingestellt – benutzerdefiniert
Negativkontrolle	NC
No-Template-Kontrolle	NTC
Positivkontrolle (MG, 23S-rRNA-Mutantentyp) (Pa)	Pa
Positivkontrolle (MG, 23S-rRNA-Wildtyp) (Pb)	Pb

In der Registerkarte **Instrument**

Im Kästchen **Settings** (Einstellungen)

Für **Sample Volume** (Probenvolumen) (µL): Geben Sie 20 µL ein

Erstellen Sie das folgende Thermocycler-Protokoll (siehe **Tabelle 51** und **Abbildung 21** und **Abbildung 22**).

Tabelle 51. Thermocycler-Protokoll				
Programmname	Cycles (Zyklen)	Target (Zieltemperatur) °C	Hold (Dauer)	Rampe [‡]
Polymerase activation (Polymeraseaktivierung)	1	95 °C	2 min	100 %
Touch down cycling (Touchdown-Zyklen): Step down (Schrittweise Reduzierung um) -0,5° °C/Zyklus [§]	10	95°C	5 s	100 %
		61°C – 56.5°C [§]	30 s	100 %
Quantification cycling (Quantifizierungszyklus) [‡] : Acquisition/Detection (Aufnahme/Nachweis)	40	95°C	5 s	100 %
		52°C ⁺	40 s	100 %

[‡] Standard-Rampenrate

[§] Enable AutoDelta (AutoDelta aktivieren): -0,5°C/Zyklus

⁺ Collect data on hold (Daten bei Halt erfassen)

Abbildung 21. Thermocycler-Protokoll – Thermisches Profil

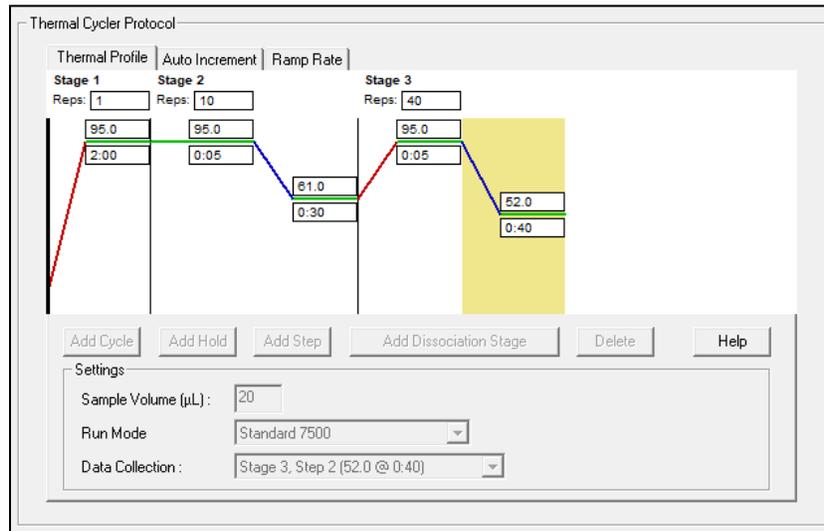
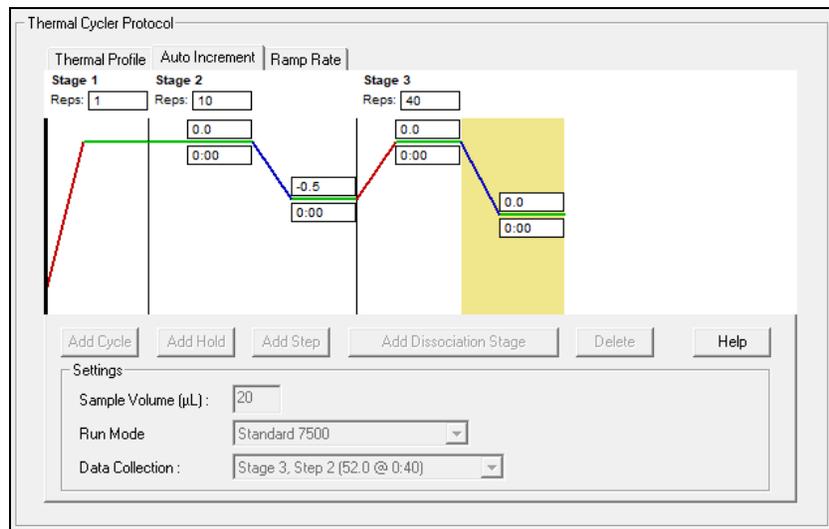


Abbildung 22. Thermocycler-Protokoll – Auto increment (Auto-Schrittweite)



21.2 Interpretation der Ergebnisse

Dateninterpretation erfordert die **ResistancePlus**® MG (7500) Analysesoftware. Die Analysesoftware ist auf Anfrage erhältlich. Für weitere Informationen senden Sie bitte eine E-Mail an tech@speedx.com.au.

Abschnitt 23 enthält Anweisungen zur Verwendung der **ResistancePlus**® MG (7500) Analysesoftware.

22 Anhang 4: Bio-Rad CFX96™ Dx und CFX96 Touch™ Real-Time PCR System

Die folgenden Angaben beziehen sich auf Bio-Rad CFX Manager v3.1.

Das **ResistancePlus**® MG₍₆₇₅₎-Kit enthält Farbstoffe für das CFX96 Real-Time PCR System. Für alle Kanäle werden standardmäßige Farbstoffkalibrierungen verwendet. Eine benutzerdefinierte Kalibrierung ist nicht erforderlich.

22.1 Programmierung des CFX96™ Dx und CFX96 Touch™ Real-Time PCR System

Wählen Sie **View** (Anzeigen) > Öffnen Sie **Run Setup** (Einstellungen ausführen)

In **Run Setup** (Durchlaufeinrichtung) > **Registerkarte Protocol** (Protokoll) > Wählen Sie **Create New** (Neu erstellen)

Im **Protocol Editor** (Protokolleditor) (siehe **Abbildung 23**):

Stellen Sie das **Sample Volume** (Probenvolumen) auf > 20 µL ein.

Erstellen Sie das folgende Thermocycling-Programm (**Tabelle 52**) und speichern Sie es als „**SpeedX PCR**“. Dieses Protokoll kann für künftige Durchläufe ausgewählt werden.

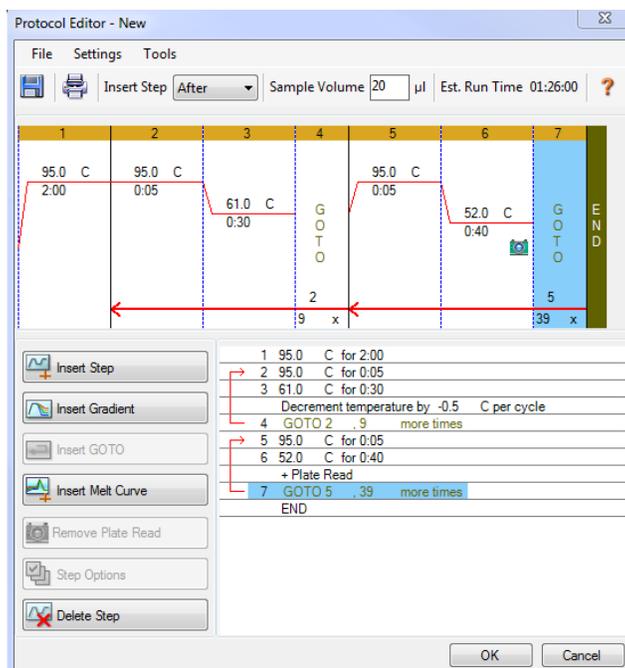
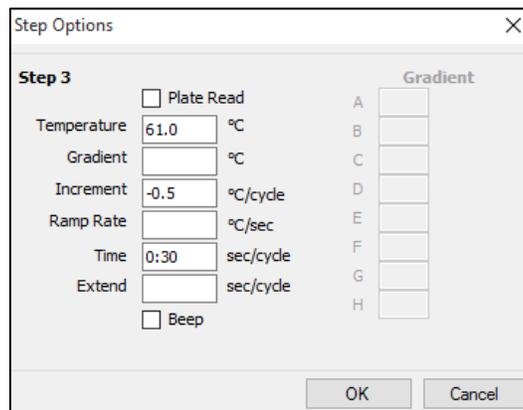
Wählen Sie für Touchdown-Zyklen Schritt 3 und anschließend **Step options** (Schrittoptionen) > Increment (Schrittweite): -0,5 °C/Zyklus (in **Abbildung 24** näher dargestellt).

Tabelle 52. Thermocycling-Programm

Programmname	Cycles (Zyklen)	Target° (Zieltemperatur) C	Hold (Dauer)
Polymerase activation (Polymeraseaktivierung)	1	95°C	2 min
Touch down cycling (Touchdown-Zyklen) ^δ :	10	95°C	5 s
Step down (Schrittweise Reduzierung um) -0,5° °C/Zyklus		61°C – 56,5°C ^δ	30 s
Quantification cycling (Quantifizierungszyklus) ⁺ : Acquisition/Detection (Aufnahme/Nachweis)	40	95°C	5 s
		52°C ⁺	40 s

^δ **Step options** (Schrittoptionen) > Increment (Schrittweite): -0,5°C/Zyklus

⁺ **Add Plate Read to Step** (Plattenablesung zum Schritt hinzufügen)

Abbildung 23. Thermocycling Protocol (Thermocycling-Protokoll) – Graphical view (Grafische Ansicht)

Abbildung 24. Step Options (Schrittoptionen)


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

- Step 3**
- 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-H): A, B, C, D, E, F, G, H (all empty)

At the bottom, there are 'OK' and 'Cancel' buttons.

In **Run Setup** (Durchlaufeinrichtung) > Registerkarte **Plate** (Platte)

Wählen Sie **Create New** (Neu erstellen)

Wählen Sie **Settings** (Einstellungen) > **Plate Type** (Plattentyp) > Wählen Sie **BR Clear** (BR clear)

Stellen Sie **Scan mode** (Scanmodus) > All channels (Alle Kanäle) ein.

Wählen Sie Fluorophores (Fluorophore) > FAM, HEX, Quasar 705 (siehe **Tabelle 53**)

Wählen Sie Wells, die Proben enthalten, weisen Sie einen **Sample Type** (Probentyp) zu und prüfen Sie **Load** (Laden) auf Fluorophore (FAM, HEX, Quasar 705)

Platte speichern

Tabelle 53. Kanäle für die <i>ResistancePlus</i> [®] MG ₍₆₇₅₎ -Targets		
MgPa	23S	IC
FAM	HEX	Quasar 705

Im **Run Setup > Start Run** tab

Block auswählen

Start Run

Um die automatische Probenerkennung in der Analysesoftware zu aktivieren, stellen Sie sicher, dass der Zielname und Kanal (siehe **Tabelle 53**) mit der Zielgeräterefferenz übereinstimmt, die in der Menü **Lab Configuration > Assays** (Laborkonfiguration > Assays) der Analysesoftware festgelegten Zielnamen übereinstimmen.

Zusätzlich müssen den Vertiefungen der Platte auch Kennzeichnungen zugewiesen werden.

Öffnen Sie das Modul **Plate Setup** (Platteneinrichtung).

Wählen Sie eine Vertiefung aus.

Bearbeiten Sie den **Sample Name** (Probenname) so, dass er mit der im Modul **Lab Configuration > Assays** (Laborkonfiguration > Assays) der Analysesoftware festgelegten Kennzeichnung übereinstimmt (siehe **Abschnitt 23.3**).

Proben sollten als Präfix die Kennzeichnung erhalten. Für die Kontrollreaktionen sind Standardkennzeichnungen vorgegeben (wie in **Tabelle 54** und **Abbildung 25** gezeigt). Zusätzliche Kennzeichnungen können sowohl für reguläre Proben als auch für Kontrollen in der Analysesoftware festgelegt werden.

HINWEIS: Bei den Probenkennzeichnungen ist Groß-/Kleinschreibung zu beachten. Die Kennzeichnung muss genau mit der in der Testlaufdatei zugewiesenen Kennzeichnung übereinstimmen.

Tabelle 54. Probenkennzeichnungen für die Analysesoftware	
Probentyp	Standardpräfix (in der Analysesoftware)
Reguläre Probe	Nicht voreingestellt – benutzerdefiniert
Negativkontrolle	NC
No-Template-Kontrolle	NTC
Positivkontrolle (MG, 23S-rRNA-Mutantentyp) (Pa)	Pa
Positivkontrolle (MG, 23S-rRNA-Wildtyp) (Pb)	Pb

Abbildung 25. Probeneditor – Zuweisen von Kennzeichnungen zu Vertiefungen

	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 Interpretation der Ergebnisse

Dateninterpretation erfordert die **ResistancePlus**[®] MG (CFX) Analysesoftware. Die Analysesoftware ist auf Anfrage erhältlich. Für weitere Informationen senden Sie bitte eine E-Mail an tech@speedx.com.au

In **Abschnitt 23** finden Sie Anweisungen zur Verwendung der **ResistancePlus**[®] MG (CFX) Analysesoftware.

23 Anhang A: Interpretation des Ergebnisses

Dateninterpretation erfordert die **ResistancePlus**[®] MG-Analysesoftware. Während **PlexPrime**[®]-Primer eine höhere Spezifität aufweisen als andere allelspezifische Primer, kann eine unspezifische Amplifikation aus dem 23S rRNA-Mutationsassay in Proben festgestellt werden, die hohe Konzentrationen des *M. genitalium* 23S rRNA-Wildtyps enthalten. Die **ResistancePlus**[®] MG Analysesoftware automatisiert die Auswertung der Amplifikationsergebnisse und optimiert den Arbeitsablauf.

Informationen zu geeigneter Analysesoftware für jedes Realtime-PCR-Instrument finden Sie in **Tabelle 55**. Die Analysesoftware ist auf Anfrage erhältlich. Für weitere Informationen senden Sie bitte eine E-Mail an tech@speedx.com.au

Tabelle 55 ResistancePlus [®] MG Analysesoftware		
Best.-Nr.	Analysesoftware*	Realtime-PCR-Instrument
99003	ResistancePlus [®] MG (LC480)	LC480 II
99002	ResistancePlus [®] MG (7500)	7500 Fast und 7500 Fast Dx
99008	ResistancePlus [®] MG (CFX)	CFX96 Dx und CFX96 Touch

* Beachten Sie die Informationen auf der Website <https://plexpcr.com/products/sexually-transmitted-infections/resistanceplus-mg/#resources>, um sicherzustellen, dass Sie die neueste Version der Analysesoftware verwenden.

HINWEIS: Bei der Übermittlung, Berichterstattung und Speicherung von Ergebnissen sind die üblichen Laborverfahren zu befolgen, um den Verlust von Probanddaten zu vermeiden.

23.1 FastFinder-Plattform – IT-Mindestanforderungen

Die Analysesoftware ist auf der FastFinder-Plattform (<https://www.ugentec.com/fastfinder/analysis>) verfügbar. Kunden wird empfohlen, über ein sicheres und vertrauenswürdiges Netzwerk und einen entsprechenden Computer auf die Softwareplattform zuzugreifen. Die IT-Mindestanforderungen für den Zugriff auf die FastFinder-Plattform und deren Nutzung sind unten aufgeführt.

Hardwareanforderungen

Internetverbindung über Kabel oder DSL

Min. Bildschirmauflösung: 1366 x 768 Pixel, optimale Auflösung 1920 x 1080 Pixel oder höher

Unterstützte Browser

- Microsoft Edge 88 oder höher
- Firefox 83 oder höher
- Google Chrome 88 oder höher

Firewall-Anforderungen

Die folgenden Hosts müssen über HTTPS (Port 443) erreichbar sein:

- *.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
 *.pbidedicated.windows.net
 *.content.powerapps.com

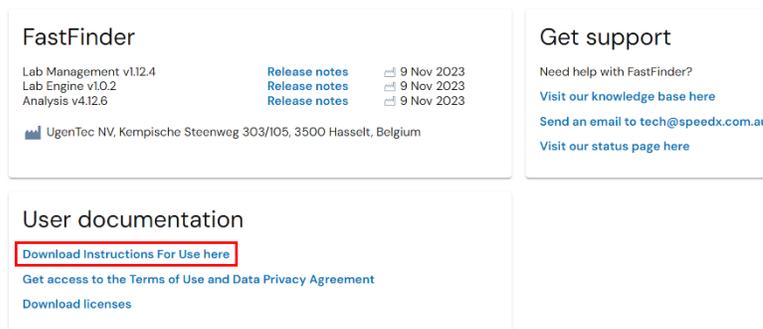
Bei Bedarf müssen Firewall-Ausnahmen für diese Hosts konfiguriert werden. Für den Zugriff auf alle Inhalte von In-App-Benutzerhandbüchern muss auch der Host *.player.vimeo.com erreichbar sein.

Weitere detaillierte Anweisungen zur **FastFinder**-Plattform finden Sie in der **FastFinder-Gebrauchsanweisung**, die über das Menü **Support** aufgerufen werden kann.

So greifen Sie auf das Menü Support zu:

- Wählen Sie „Support“ aus der Liste der Menüoptionen im linken Bereich.
- Wählen Sie **Download Instructions For Use here** (Gebrauchsanweisung hier herunterladen) im Abschnitt **User Documentation** (Benutzerdokumentation).

Support



23.2 Assay-Plug-in (neuer Benutzer)

Eine ausführliche Anleitung zum Einrichten von Assays sind der **FastFinder-Gebrauchsanweisung** zu entnehmen, die über das Menü **Support** aufgerufen werden kann.

Auf FastFinder können Sie direkt über einen Webbrowser zugreifen, indem Sie sich unter <https://customer.fastfinder.app> mit Ihrem eindeutigen Benutzernamen und Ihrem Passwort anmelden.

- Wählen Sie **Lab Configuration > Assays** (Laborkonfiguration > Assays) aus dem Menü auf der linken Seite.
- Wählen Sie **Add New Assay** (Neuen Assay hinzufügen).
 - > Für LC480 II > Wählen Sie **ResistancePlus MG (LC480)** aus der Liste.
 - > Für 7500 Fast und 7500 Fast Dx > Wählen Sie **ResistancePlus MG (7500)** aus der Liste.
 - > Für CFX96 Dx und CFX96 Touch > Wählen Sie **ResistancePlus MG (CFX)** aus der Liste.
- Wählen Sie **Import Selected** (Auswahl importieren).

So aktivieren bzw. deaktivieren Sie Versionen des Assay-Plug-ins:

- > Auf der Registerkarte **General** (Allgemein)
- > Navigieren Sie zum Status.
- > Wählen Sie **Active** (Aktiv), um die Version des Assays zu aktivieren bzw. deaktivieren.

23.3 Probenbenennung

Probenkennzeichnungen können einem Assay-Plug-in zugewiesen werden, um die Erkennung von Vertiefungen und Probenotypen für die Analyse zu automatisieren.

Wählen Sie **Lab Configuration > Assays** (Laborkonfiguration > Assays) aus dem Menü auf der linken Seite.

- Navigieren Sie auf der Registerkarte **General** (Allgemein) zu der Tabelle **Sample types** (Probenotypen) mit den Kennzeichnungen (Präfix) und wählen Sie , um eine neue Kennzeichnung hinzuzufügen.
 - > Fügen Sie das Wort, das Akronym oder den Buchstaben Ihrer Wahl in das Textfeld ein.
 - > Für die Kontrollen sind Standardkennzeichnungen vorgegeben. Durch Auswahl von  neben einer Standardkennzeichnung kann diese entfernt werden.

- Weisen Sie in der Gerätesoftware (vor oder nach Abschluss des Testlaufs) den entsprechenden Vertiefungen dieselbe Kennzeichnung zu.
 - > Eine Anleitung zum Programmieren von Probenkennzeichnungen in der Testdatei für **LC480 II** finden Sie im **Abschnitt 19**.
 - > Eine Anleitung zum Programmieren von Probenkennzeichnungen in der Testdatei für **7500 Fast** finden Sie im **Abschnitt 20**.
 - > Eine Anleitung zum Programmieren von Probenkennzeichnungen in der Testdatei für **7500 Fast Dx** finden Sie im **Abschnitt 21**.
 - > Eine Anleitung zum Programmieren von Probenkennzeichnungen in der Testdatei für **CFX96 Dx** und **CFX96 Touch** finden Sie im **Abschnitt 22**.

HINWEIS: Bei den Probenkennzeichnungen ist Groß-/Kleinschreibung zu beachten. Die Kennzeichnung muss genau mit der in der Testlaufdatei zugewiesenen Kennzeichnung übereinstimmen.

23.4 Analyse

Wählen Sie **Analyses** (Analysen) aus dem Menü auf der linken Seite, um eine neue Analyse zu starten.

Wählen Sie **+ Create New Analysis** (+ Neue Analyse erstellen) oben rechts auf dem Bildschirm.

Suchen Sie in einem ausgewählten Verzeichnis nach der Datei, die zur Analyse hochgeladen werden soll.

- Wählen Sie die Testlaufdatei (Daten) aus dem entsprechenden Ordner.
 - > Wählen Sie **Open** (Öffnen).

Die Analyse wird auf der Registerkarte **Open** (Öffnen) als neue Zeile in der Tabelle angezeigt.

- Wenn alle Kennzeichnungen korrekt vergeben und gelesen wurden, wird der Status **Ready for review** (Bereit zur Überprüfung) angezeigt.
- Wenn die Assay-Informationen manuell den Vertiefungen zugewiesen werden müssen, wird der Status **Manual PCR setup required** (Manuelle PCR-Einrichtung erforderlich) angezeigt.

Weisen Sie die Assay-Informationen manuell der Platte zu, wenn die Probenbenennung im Menü **Lab Configuration > Assays** (Laborkonfiguration > Assays) nicht konfiguriert wurde oder die Probennamen/Ziele in der Gerätesoftware nicht angewendet wurden.

Wählen Sie die Testlaufdatei auf der Registerkarte **Offen** im Menü **Analyses** (Analysen).

Die Plattenkonfiguration wird auf der Registerkarte **PCR setup** (PCR-Einrichtung) für die offene Analyse angezeigt.

- Für **LC480 II** > Wählen Sie **ResistancePlus MG (LC480)**.



- Für **7500 Fast** und **7500 Fast Dx** > Wählen Sie **ResistancePlus MG (7500)**.



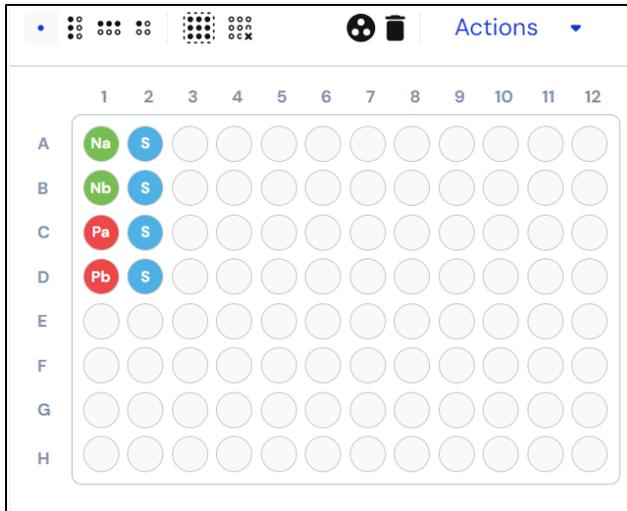
- Für **CFX96 Dx** und **CFX96 Touch** > Wählen Sie **ResistancePlus MG (CFX)**.



- Wählen Sie Vertiefungen aus und weise Sie diese wie folgt zu:
 - > Reguläre Probe (S)
 - > Negativkontrolle (Na)
 - > No-Template-Kontrolle (Nb)
 - > Positivkontrolle (MG 23S-rRNA-Mutante) (Pa)
 - > Positivkontrolle (MG 23S-rRNA-Wildtyp) (Pb)

Um Vertiefungen auf der Platte zuzuweisen, haben Sie zwei Möglichkeiten:

- Klicken Sie auf die farbigen Symbole und ziehen Sie sie auf die Platte.
- Wählen Sie eine oder mehrere Vertiefungen aus (mit der Strg- und der Umschalttaste) und klicken Sie dann auf die entsprechenden farbigen Symbole, um sie der Auswahl zuzuweisen.



- Wählen Sie **Analyze** (Analysieren).

23.5 Ergebnisse

In **Tabelle 57** finden Sie eine Zusammenfassung möglicher gemeldeter Probenergebnisse.

HINWEIS: Es wird dringend empfohlen, die Amplifikationskurven für alle positiven Proben zu bestätigen.

23.5.1 Registerkarte „Summary“ (Zusammenfassung)

Die Kontrollergebnisse für jeden Assay werden oben links auf der Registerkarte „Summary“ (Zusammenfassung) angezeigt, sodass die Gültigkeit der Kontrollen für den Testlauf bewertet werden kann. Wenn Sie diesen Block erweitern, werden weitere Details pro Kontrolle angezeigt.

Control Results				
Filters ⚙️				
<input checked="" type="checkbox"/>	!	Assay	Status	Info
See all assay details →				
<input checked="" type="checkbox"/>		WT_MG	<input checked="" type="checkbox"/>	Mut_MG
		VALID		VALID
		M. genitalium	+ Detected	+ Detected
		23S rRNA mutation	- Not detected	+ Detected
<input checked="" type="checkbox"/>		NEG_MG	<input checked="" type="checkbox"/>	NEG_MG
		VALID		VALID
		M. genitalium	- Not detected	- Not detected
		23S rRNA mutation	- Not detected	- Not detected

Wenn eine Kontrolle ungültig ist, können alle Proben als fehlgeschlagen markiert werden, indem Sie **Fail all samples for this assay** (Alle Proben für diesen Assay als fehlgeschlagen markieren) wählen.

Fail all samples for this assay

Failure reason ▼

Aus dem Dropdown-Menü muss eine Fehlerursache gewählt werden.

Die Probenergebnisse werden unten links auf der Registerkarte „Summary“ (Zusammenfassung) angezeigt. Neben der Überschrift können zusätzliche Symbole einen allgemeinen Überblick über die Analyseergebnisse bieten und die Gesamtzahl der Proben anzeigen, die einem bestimmten Symbol entsprechen.

	• 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

Jede Probe wird in der Tabelle „Sample Results“ (Probenergebnisse) als Zeile angezeigt..

▼ 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

Aus dem Dropdown-Menü können Sie weitere Details zu jedem Zielergebnis und Cq pro Probe entnehmen (siehe Beispiele im **Abschnitt 23.10**).

Einzelne Proben können bei Bedarf als fehlgeschlagen markiert werden (z. B. wenn die Probe ungültig ist), indem **Fail this sample for this assay** (Diese Probe für diesen Assay als fehlgeschlagen markieren) gewählt wird.

Fail this sample for this assay

Failure reason ▼

Aus dem Dropdown-Menü muss eine Fehlerursache gewählt werden.

Auf der Registerkarte „Summary“ (Zusammenfassung) werden oben rechts Fluoreszenzdiagramme angezeigt.

Auf der Registerkarte „Summary“ (Zusammenfassung) wird unten rechts ein Plattenlayout angezeigt.

In **Tabelle 56** sind beispielhafte Informationen und Warnmeldungen zusammengefasst.

Tabelle 56. Beispielhafte Informationen und Warnmeldungen für die ResistancePlus® MG-Analysesoftware*		
Probentyp	Fehler	Warnmeldung
Warnmeldungen zu Assay-Zielen		
Reguläre Probe	Ungültig – IK-Fehler	Warnung: IK ungültig. Probe erneut extrahieren und analysieren.
	Gültig, aber Kontrolle ungültig – Warnung wegen ungültiger Kontrolle bei regulärer Probe mit gültigem Ergebnis	Warnung: Ungültige Kontrolle vorhanden. Probe erneut extrahieren und analysieren.
Negativkontrolle	Ungültig – Kontamination	Warnung: Mögliche Kontamination festgestellt.
No-Template-Kontrolle		
Warnmeldungen zu Genzielen		
Reguläre Probe	Ziel-Cq außerhalb des Grenzbereichs	Info: Cq außerhalb des Grenzbereichs
Positivkontrolle	Ungültig – Ziel nicht erkannt	Warnung: Die erwartete Reaktion blieb bei der Kontrolle aus.
Negativkontrolle	Ungültig – Kontamination	Warnung: Mögliche Kontamination
	Ungültig – IK nicht erkannt	Warnung: IK nicht erkannt
	Ungültig – Ziel-Cq außerhalb des Grenzbereichs	Warnung: Cq außerhalb des Grenzbereichs
No-Template-Kontrolle	Ungültig – Kontamination	Warnung: Mögliche Kontamination
Reguläre Probe oder Kontrolle	Uneindeutiges Fluoreszenzsignal	Warnung: Uneindeutiges Fluoreszenzsignal. Überprüfung erforderlich.
	Cq bei geringer Fluoreszenz erkannt	dRn-Endfluoreszenz unter dem Grenzwert

*Die hier aufgeführten Beispiele treffen möglicherweise nicht auf alle Assay-Plug-ins zu. Eine Liste aller möglichen Warnmeldungen finden Sie in der FastFinder-Gebrauchsanweisung, die über das Menü Support aufgerufen werden kann.

23.5.2 Registerkarte „Details“ (Einzelheiten)

Für jede Probe werden alle Ziele in der Tabelle auf der linken Seite in separaten Zeilen angezeigt. Bei Auswahl einer oder mehrerer Zeilen werden die entsprechenden Fluoreszenzkurven im Diagramm oben rechts angezeigt und die Vertiefungen im Plattenlayout unten rechts hervorgehoben.

Wählen Sie **Filters** (Filter), um die Ergebnisse nach Parametern wie Assay-Name, Probentyp, Ziel und Ergebnis anzuzeigen.

So schließen Sie die Analyse ab und verhindern weitere Änderungen durch Benutzer:

- > Wählen Sie **Authorize** (Autorisieren).
- > Wählen Sie zum Bestätigen erneut **Authorize** (Autorisieren).
- So weisen Sie eine zweite Überprüfung zu:
 - > Wählen Sie **Actions** (Aktionen), **Assign label** (Kennung zuweisen) und **Second Review** (Zweite Überprüfung).
- So weisen Sie die Analyse einem anderen Benutzer zu:
 - > Wählen Sie **Actions** (Aktionen) und **Assign User** (Benutzer zuweisen).
 - > Wählen Sie den entsprechenden Benutzer aus der Dropdown-Liste.
- So lehnen Sie die Analyse ab:
 - > Wählen Sie **Actions** (Aktionen) und **Discard Analysis** (Analyse verwerfen).
 - > Fügen Sie einen Kommentar hinzu und wählen Sie **Discard** (Verwerfen), um die Aktion zu bestätigen.

23.6 Referenzkurve

Zum Vergleich mit Proben auf derselben oder auf verschiedenen Platten kann eine Referenzkurve gespeichert und verwendet werden.

- Wählen Sie die gewünschte Probe auf der Registerkarte **Summary** (Zusammenfassung) oder **Details** (Einzelheiten) aus.
- Wählen Sie im Menü „Amplification Graph“ (Amplifikationsdiagramm) > 
 - > Aktivieren Sie das Kontrollkästchen für die gewünschte Kurve und wählen Sie **Mark as reference** (Als Referenz markieren).

Diese Referenzkurve ist nun mit dem Assay verknüpft und wird als solche im Menü **Lab Configuration > Assays** (Laborkonfiguration > Assays) auf der Registerkarte **PCR** angezeigt. Sie kann jederzeit deaktiviert werden.

23.7 Exportieren der Ergebnisse

- So exportieren Sie die Ergebnisse für einen einzelnen autorisierten Testlauf in eine CSV- oder PDF-Datei:
 - > Wählen Sie **Actions > Downloads** (Aktionen > Download) in der oberen rechten Ecke.
 - > Wählen Sie einen der folgenden Berichtstypen aus: **Analysis (CSV)** (Analyse [CSV]) oder **Analysis (PDF)** (Analyse [PDF]).
- So exportieren Sie die Ergebnisse für mehrere zuvor autorisierte Testläufe in eine einzige CSV-Datei:
 - > Navigieren Sie zum Menü **Archive > Sample Results** (Archiv > Probenergebnisse).
 - > Verwenden Sie die Filter oben auf der Seite, um die gewünschten Ergebnisse anzuzeigen (die CSV-Datei ist auf maximal 10.000 Ergebnisse begrenzt).
 - > Wählen Sie **Export CSV** (CSV exportieren) in der oberen rechten Ecke.

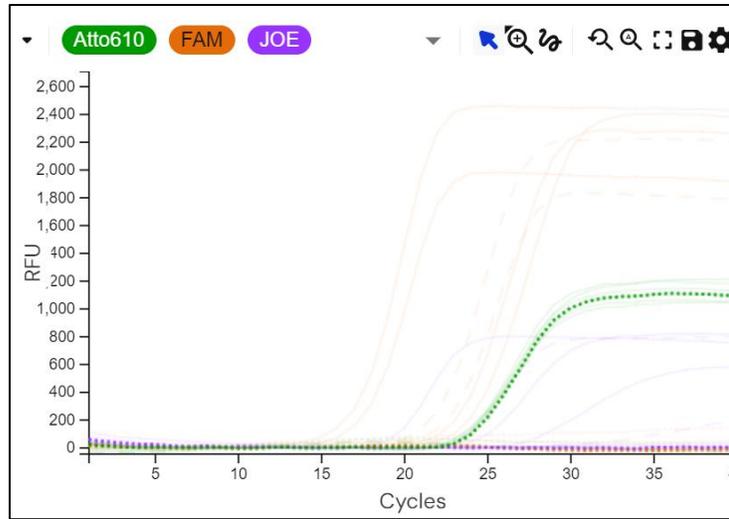
23.8 Abrufen autorisierter Analysen

- Alle autorisierten Analysen sind über **Archive > Analysis Results** (Archiv > Analyseergebnisse) verfügbar. Wählen Sie eine Zeile aus, um zur Ergebnisübersicht für die jeweilige Analyse zurückzukehren.
- Alle autorisierten regulären Proben werden im Menü **Archive > Sample Results** (Archiv > Probenergebnisse) gespeichert. Bei Auswahl einer Probe werden weitere Informationen angezeigt, darunter der Name der Analyse und die Einzelheiten zum Ergebnis.
- Die einzelnen Zielergebnisse für alle autorisierten regulären Proben und Kontrollen werden im Menü **Archive > Target Results** (Archiv > Zielergebnisse) gespeichert. Durch Auswahl eines Ziels wird dieses im Fluoreszenzdiagramm hervorgehoben. Bei Auswahl des Namens der Analyse gelangen Sie wieder zur Ergebnisübersicht für die jeweilige Analyse.

23.9 Beispieldiagramme für Kontrollen

Die folgenden Beispiele veranschaulichen die Amplifikationskurven (Baseline-korrigierte Amplifikationskurven) und die Ergebnisübersicht der **ResistancePlus MG (LC480)**-Analysesoftware für Proben vom Typ „Kontrolle“.

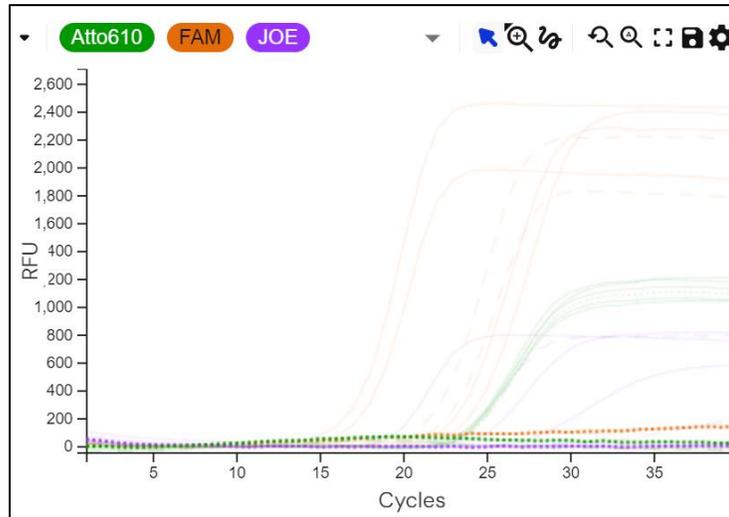
23.9.1 *M. genitalium*, Negativkontrolle (Na) (negative Probe)



IK MgPa 23S-rRNA-Mutation

Probe	Assay	Ergebnis
Na	ResistancePlus MG (LC480)	Gültig
	M. genitalium	⊖ Not detected
	23S rRNA mutation	⊖ Not detected

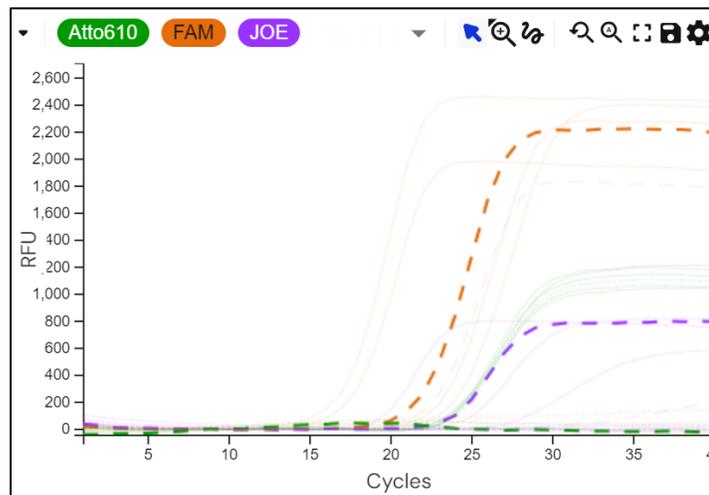
23.9.2 No-Template-Kontrolle (Nb)



IK MgPa 23S-rRNA-Mutation

Probe	Assay	Ergebnis
Nb	ResistancePlus MG (LC480)	Gültig
	M. genitalium	⊖ Not detected
	23S rRNA mutation	⊖ Not detected

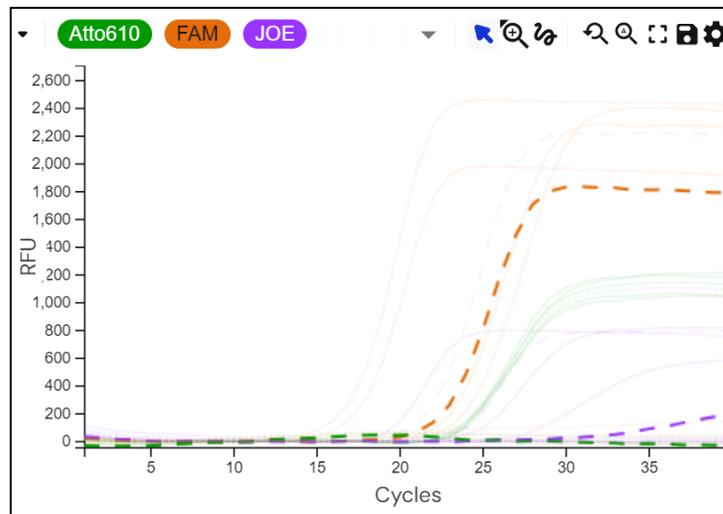
23.9.3 M. genitalium, 23S-rRNA-Mutantenkontrolle (Pa)



IK MgPa 23S-rRNA-Mutation

Probe	Assay	Ergebnis
Pa	ResistancePlus MG (LC480)	Gültig
<p>M. genitalium ⊕ Detected</p> <p>23S rRNA mutation ⊕ Detected</p>		

23.9.4 M. genitalium, 23S-rRNA-Wildtypkontrolle (Pb)



IK MgPa 23S-rRNA-Mutation

Probe	Assay	Ergebnis
Pb	ResistancePlus MG (LC480)	Gültig
<p>M. genitalium ⊕ Detected</p> <p>23S rRNA mutation ⊖ Not detected</p>		

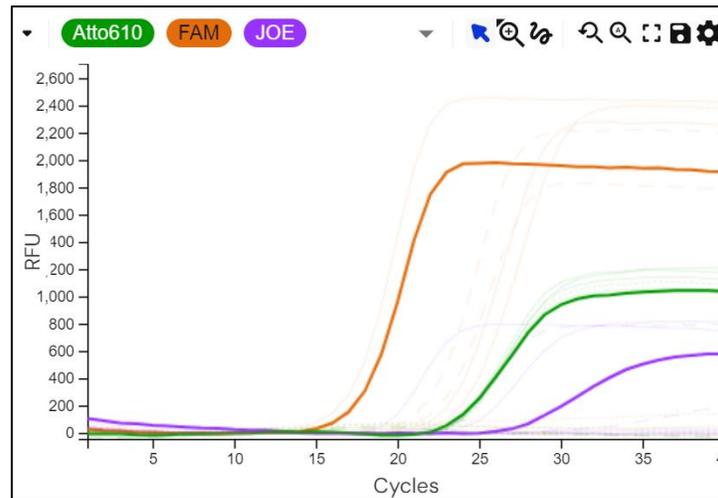
23.10 Beispiele

Beispielsergebnisse für die **ResistancePlus[®]** MG-Analysesoftware sind in **Tabelle 57** aufgeführt.

Tabelle 57. Beispielsergebnisse zur Interpretation für die ResistancePlus [®] MG-Analysesoftware			
Probe	Assay	Ergebnis	
Probe 101	ResistancePlus MG (LC480)	Nicht nachgewiesen	
Probe 102	ResistancePlus MG (LC480)	Nachgewiesen: M. genitalium	
Probe 103	ResistancePlus MG (LC480)	Nachgewiesen: M. genitalium, 23S-rRNA-Mutation	
¹ Probe 104	ResistancePlus MG (LC480)	Ungültig: M. genitalium, 23S-rRNA-Mutation	

¹ Eine als ungültig interpretierte Probe ist mit der Warnung versehen : IC invalid. Re-extract and re-test sample. (IK ungültig. Probe erneut extrahieren und analysieren.)

23.10.1 Beispiel 1. Probe mit hoher Kopienzahl von *M. genitalium*, 23S-rRNA-Wildtyp



IK MgPa 23S-rRNA-Mutation

Probe	Assay	Ergebnis
Probe 105	ResistancePlus MG (LC480)	Nachgewiesen: M. genitalium

Assay results

- M. genitalium ⊕ Detected
- 23S rRNA mut... ⊖ Not detected

MgPa

↳ A2 ● Detected 17.451

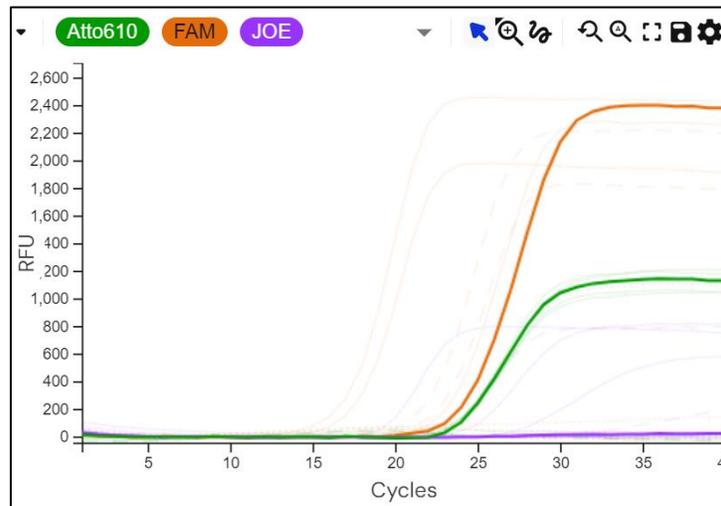
23S rRNA mutation

↳ A2 ● Detected 27.229

IC

↳ A2 ● Detected 23.307

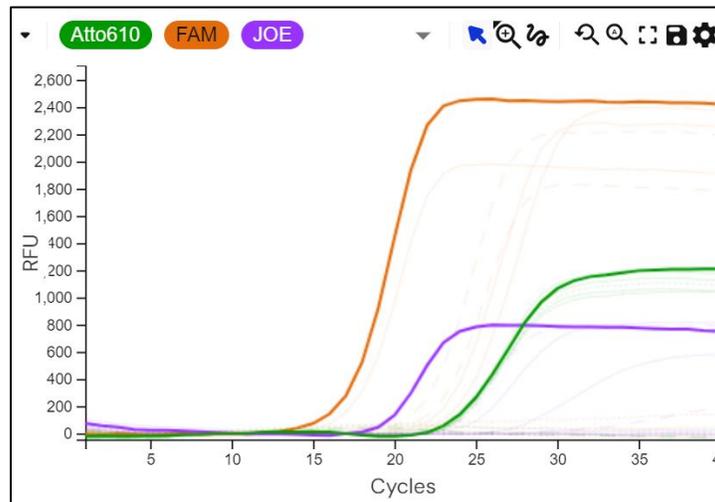
23.10.2 Beispiel 2. Probe mit geringer Kopienzahl von *M. genitalium*, 23S-rRNA-Wildtyp



IK MgPa 23S-rRNA-Mutation

Probe	Assay	Ergebnis
Probe 106	ResistancePlus MG (LC480)	Nachgewiesen: <i>M. genitalium</i>
<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... ⊖ Not detected </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>		

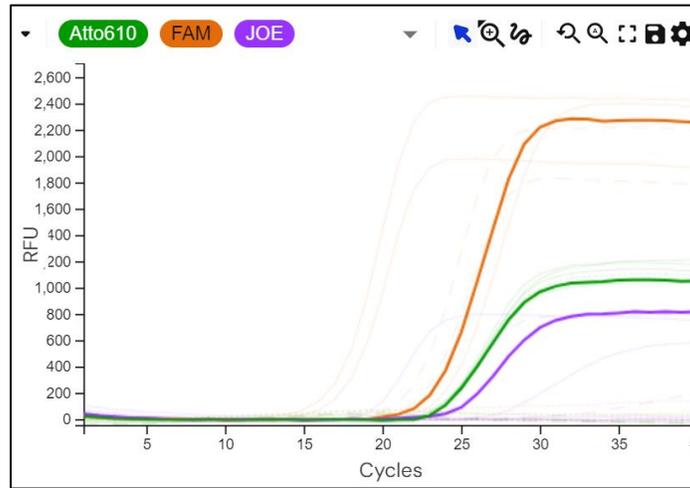
23.10.3 Beispiel 3. Probe mit hoher Kopienzahl von *M. genitalium*, 23S-rRNA-Mutante



IK MgPa 23S-rRNA-Mutation

Probe	Assay	Ergebnis
Probe 107	ResistancePlus MG (LC480)	Nachgewiesen: <i>M. genitalium</i> , 23S-rRNA-Mutation
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>Assay results</p> <ul style="list-style-type: none"> <i>M. genitalium</i> ⊕ Detected 23S rRNA mut... ⊕ Detected </div> <div style="width: 50%;"> <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>		

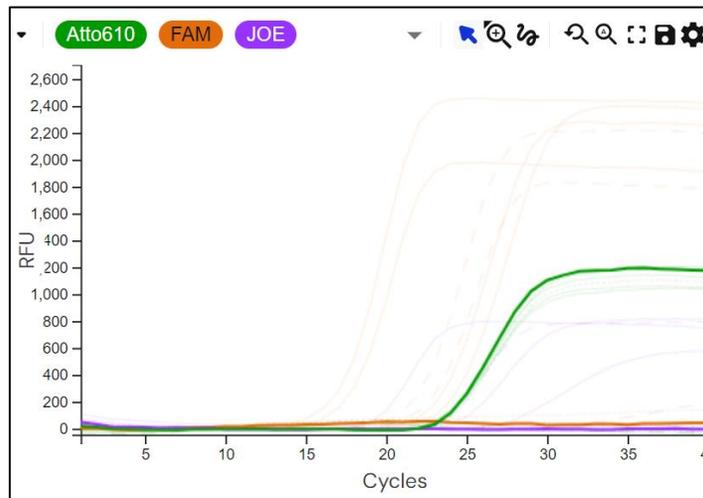
23.10.4 Beispiel 4. Probe mit geringer Kopienzahl von *M. genitalium*, 23S-rRNA-Mutante



IK MgPa 23S-rRNA-Mutation

Probe	Assay	Ergebnis
Probe 108	ResistancePlus MG (LC480)	Nachgewiesen: <i>M. genitalium</i> , 23S-rRNA-Mutation
<div style="border: 1px solid #ccc; padding: 5px; margin-bottom: 10px;"> <p>Assay results</p> <p><i>M. genitalium</i> ⊕ Detected</p> <p>23S rRNA mut... ⊕ Detected</p> </div>		<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>

23.10.5 Beispiel 5. Negative Probe



IK MgPa 23S-rRNA-Mutation

Probe	Assay	Ergebnis
Probe 109	ResistancePlus MG (LC480)	Nicht nachgewiesen

MgPa

↳ E2 ● Not detected ▼

23S rRNA mutation

↳ E2 ● Not detected ▼

IC

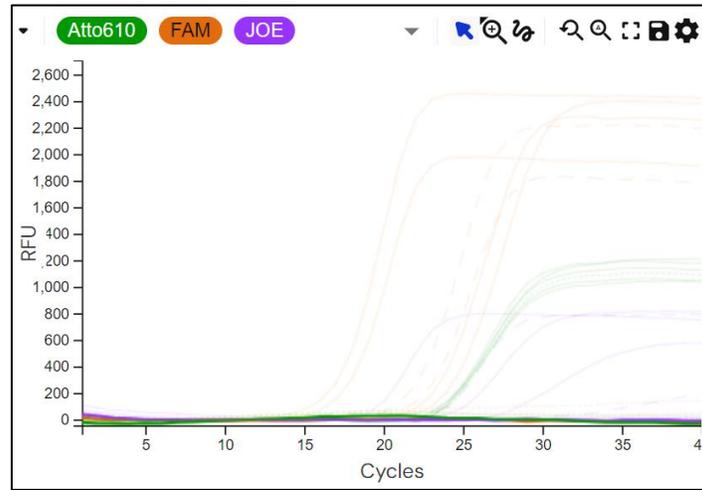
↳ E2 ● Detected ▼ 23.583

Assay results

M. genitalium ⊖ Not detected

23S rRNA mut... ⊖ Not detected

23.10.6 Beispiel 6. Ungültige Probe



IK MgPa 23S-rRNA-Mutation

Probe	Assay	Ergebnis
Probe 110	ResistancePlus MG (LC480)	Ungültig: M. genitalium, 23S-rRNA-Mutation

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 ▼

In diesem Beispiel wurde die IK nicht amplifiziert und daher nicht erkannt. Bei ungültigen IK-Proben müssen Sie die Probe erneut extrahieren und den Test anschließend wiederholen.

24 Glossar



CE-Kennzeichnung Bestellnummer
Für die *In-vitro*-Diagnostik



Chargenbezeichnung



Batch-Code



Bevollmächtigter in der
Europäischen Gemeinschaft



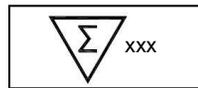
Hersteller



Herstellungsdatum



Temperaturbereich



Inhalt reicht aus für
xxx Bestimmungen



Verwendbar bis



Europäischer Importeur



Konformitätsprüfzeichen des
Vereinigten Königreichs

SpeedX-Produkte unterliegen unter Umständen einem oder mehreren in- oder ausländischen Patenten. Unter www.plexpcr.com/patents finden Sie weitere Informationen dazu.

PlexPCR[®], **ResistancePlus**[®], **PlexPrime**[®] Und **PlexZyme**[®] sind Marken von SpeedX. Andere Urheberrechte und Marken sind Eigentum ihrer jeweiligen Inhaber.

© Copyright 2025 SpeedX Pty. Ltd.