



## ResistancePlus<sup>®</sup> MG

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



IVDR Certified

Prodotto	Piattaforma	Capacità (reazioni)	N. catalogo
ResistancePlus <sup>®</sup> MG	LC480 II	100	<b>REF</b> 20001L-01
ResistancePlus <sup>®</sup> MG	LC480 II	25	<b>REF</b> 2000125
ResistancePlus <sup>®</sup> MG <sub>(550)</sub>	ABI 7500 Fast ABI 7500 Fast Dx	100	<b>REF</b> 2000201
ResistancePlus <sup>®</sup> MG <sub>(550)</sub>	ABI 7500 Fast ABI 7500 Fast Dx	25	<b>REF</b> 2000225
ResistancePlus <sup>®</sup> MG <sub>(675)</sub>	CFX96 <sup>™</sup> Dx CFX96 <sup>™</sup> Touch	100	<b>REF</b> 2000301
ResistancePlus <sup>®</sup> MG <sub>(675)</sub>	CFX96 <sup>™</sup> Dx CFX96 <sup>™</sup> Touch	25	<b>REF</b> 2000325

### Prodotti accessori – Software di analisi

ResistancePlus <sup>®</sup> MG (LC480)	<b>REF</b> 99003
ResistancePlus <sup>®</sup> MG (7500)	<b>REF</b> 99002
ResistancePlus <sup>®</sup> MG (CFX)	<b>REF</b> 99008



**MedEnvoy**  
Prinses Margrietplantsoen 33 – Suite 123  
2595 AM L'Aia  
Paesi Bassi



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

### ESCLUSIVAMENTE PER USO PROFESSIONALE

Non per la vendita negli Stati Uniti

## Contenuto

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

15.1	Istruzioni per l'uso .....	24
16	Caratteristiche di prestazione .....	25
16.1	Prestazione clinica .....	25
16.1.1	Studio clinico 1 .....	25
16.1.2	Studio clinico 2 .....	26
16.1.3	Studio clinico 3 .....	27
16.1.4	Studio clinico 4 .....	28
16.1.5	Studio clinico 5 .....	30
16.1.6	Studio clinico 6 .....	31
16.1.7	Studio clinico 7 .....	32
16.2	Prestazione analitica .....	33
16.2.1	Riproducibilità e ripetibilità .....	33
16.2.2	Sensibilità analitica .....	36
16.2.3	Specificità analitica .....	36
16.2.4	Sostanze potenzialmente interferenti .....	37
16.2.5	Reazione incrociata con altre mutazioni di rRNA 23S .....	39
17	Assistenza clienti e assistenza tecnica .....	39
18	Bibliografia .....	40
19	Allegato 1: strumento LightCycler® 480 II .....	41
19.1	Programmazione dello strumento LightCycler® 480 II (LC480 II) .....	41
19.2	Compensazione del colore per lo strumento LightCycler® 480 II .....	47
19.3	Interpretazione dei risultati .....	48
20	Allegato 2: Biosystems® 7500 Fast applicato .....	49
20.1	Programmazione di Applied Biosystems® 7500 Fast .....	49
20.2	Interpretazione dei risultati .....	52
21	Allegato 3: Biosystems 7500 Fast Dx applicato .....	53
21.1	Programmazione dell'Applied Biosystems® 7500 Fast Dx .....	53
21.2	Interpretazione dei risultati .....	56
22	Allegato 4: sistema PCR real-time Bio-Rad CFX96™ Dx e CFX96 Touch™ .....	57
22.1	Programmazione dei sistemi PCR in tempo reale CFX96™ Dx e CFX96 Touch™ .....	57
22.2	Interpretazione dei risultati .....	60
23	Allegato A: interpretazione del risultato .....	61
23.1	Piattaforma FastFinder – Requisiti IT minimi .....	61
23.2	Plug-in del dosaggio (nuovo utente) .....	62
23.3	Denominazione del campione .....	63
23.4	Analisi .....	63
23.5	Risultati .....	65
23.5.1	Scheda Summary (Riepilogo) .....	65
23.5.2	Scheda Details (Dettagli) .....	67
23.6	Curva di riferimento .....	68
23.7	Esportazione dei risultati .....	68
23.8	Recupero delle analisi autorizzate .....	68
23.9	Grafici di esempio del controllo .....	68

23.9.1	Controllo negativo per <i>M. genitalium</i> (Na) (campione negativo) .....	68
23.9.2	Controllo senza template (Nb) .....	69
23.9.3	<i>M. genitalium</i> , controllo mutante di 23S rRNA (Pa) .....	70
23.9.4	<i>M. genitalium</i> , controllo tipo selvaggio di 23S rRNA (Pb) .....	70
23.10	Esempi .....	72
23.10.1	Esempio 1. Alto numero di copie di <i>M. genitalium</i> , campione di tipo selvaggio di 23S rRNA .....	72
23.10.2	Esempio 2. Basso numero di copie di <i>M. genitalium</i> , campione di tipo selvaggio di 23S rRNA .....	73
23.10.3	Esempio 3. Alto numero di copie di <i>M. genitalium</i> , campione di mutante di 23S rRNA .....	74
23.10.4	Esempio 4. Basso numero di copie di <i>M. genitalium</i> , campione di mutante di 23S rRNA .....	75
23.10.5	Esempio 5. Campione negativo .....	76
23.10.6	Esempio 6. Campione non valido .....	77
24	Glossario .....	78

## 1 Descrizione del prodotto

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

## 2 Uso previsto

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

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

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

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

## 3 Informazioni sui patogeni

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

L'azitromicina viene comunemente utilizzata nel trattamento di *M. genitalium* e nella gestione sindromica delle IST come la NGU e la cervicite. L'azitromicina appartiene alla classe degli antibiotici macrolidi e agisce legandosi all'rRNA 23S per inibire la sintesi proteica. Le mutazioni puntiformi a carico del gene rRNA 23S del *M. genitalium*, A2058G, A2059G, A2058T, A2058C e A2059C (numerazione di *E. coli*) sono state associate al fallimento del trattamento e/o alla resistenza *in vitro* all'azitromicina<sup>4,5</sup>. Le mutazioni più comuni sono A2058G e A2059G, che, secondo un recente studio, contribuiscono all'89% delle mutazioni di resistenza ai macrolidi<sup>6</sup>.

#### 4 Contenuto del kit

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

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

<sup>^</sup> Gli oligonucleotidi sono coppie di primer PCR (compresi primer *PlexPrime*<sup>®</sup>), enzimi *PlexZyme*<sup>®</sup> e sonda fluorescente

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

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

<sup>^</sup> Gli oligonucleotidi sono coppie di primer PCR (compresi primer *PlexPrime*<sup>®</sup>), enzimi *PlexZyme*<sup>®</sup> e sonda fluorescente

**Tabella 3. Contenuto dei kit *ResistancePlus*<sup>®</sup> MG<sub>(675)</sub>**

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

<sup>#</sup> Conservare le provette di template separatamente dalle miscele di oligonucleotidi, ovvero nella sala di manipolazione degli acidi nucleici o del template

<sup>^</sup> Gli oligonucleotidi sono coppie di primer PCR (compresi primer *PlexPrime*<sup>®</sup>), enzimi *PlexZyme*<sup>®</sup> e sonda fluorescente

## 5 Spedizione e conservazione

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

## 6 Avvertenze e precauzioni

### 6.1 Generalità

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

### 6.2 Laboratorio

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

### 6.3 Manipolazione dei campioni

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

### 6.4 Test

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

### 6.5 Precauzioni di sicurezza

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

### 6.6 Plugin del test: Avvertenze/Precauzioni/Limiti

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

## 7 Prodotti e materiali di consumo associati

### Materiale di Controllo Positivo

- Kit di Controllo positivo **ResistancePlus**<sup>®</sup> MG (SpeedX, numero catalogo 95001)

### Materiali di consumo generali per laboratorio

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

### Per MagNA Pure 96 Instrument

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

### Per lo strumento MICROLAB STARlet

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

### Per lo strumento QIASymphony<sup>®</sup> SP

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

*Per lo strumento NucliSENS® easyMAG®*

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

*Per il LightCycler® Instrument II e l'analizzatore*

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

*Per Applied Biosystems® 7500 Fast e 7500 Fast Dx*

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

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

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

*Dispositivi di prelievo dei campioni*

- Kit raccolta campioni Multi-Collect (Abbott, numero catalogo 9K12-01)
- Kit raccolta urine Aptima® (Hologic, numero catalogo 301040)
- Kit raccolta campione tampone Multitest Aptima® (Hologic, numero catalogo PRD-03546)
- DeltaSwab ViCUM® 2 mL + tampone floccato standard (deltalab, numero catalogo 304278)
- Vacumed® urine senza conservante (FL medical, numero catalogo 44950)
- Regular FLOQSwab™ in 1 mL di soluzione UTM™ (Copan numero catalogo 359C)
- cobas® PCR media (Roche, numero catalogo 06466281190)

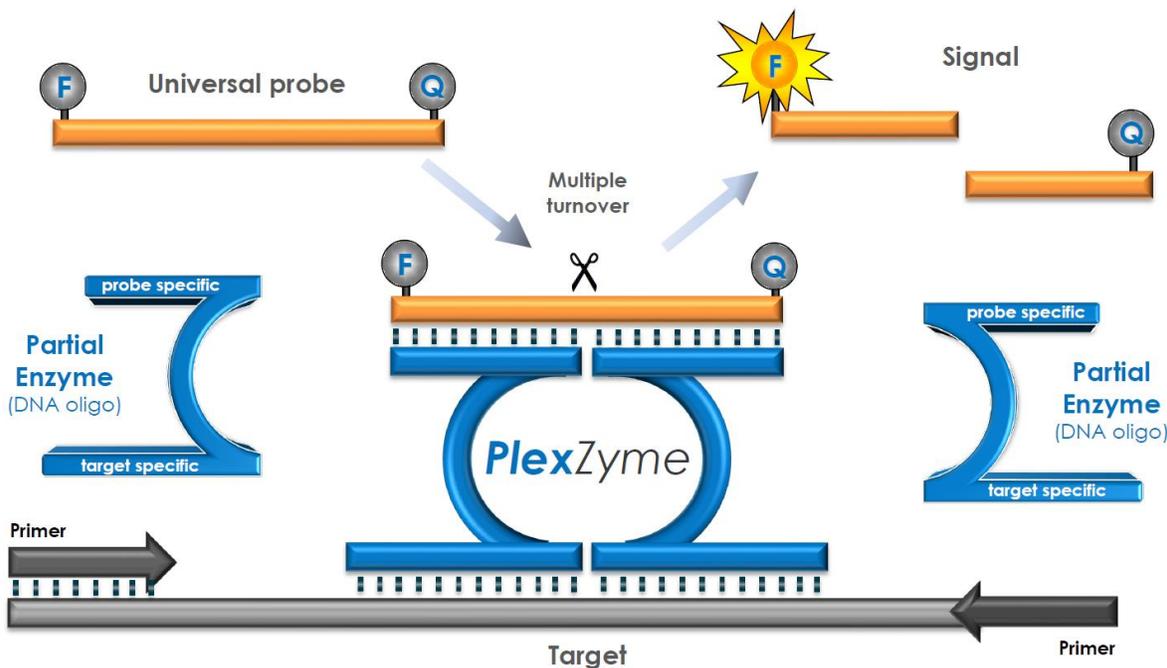
## 8 Principi della tecnologia

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

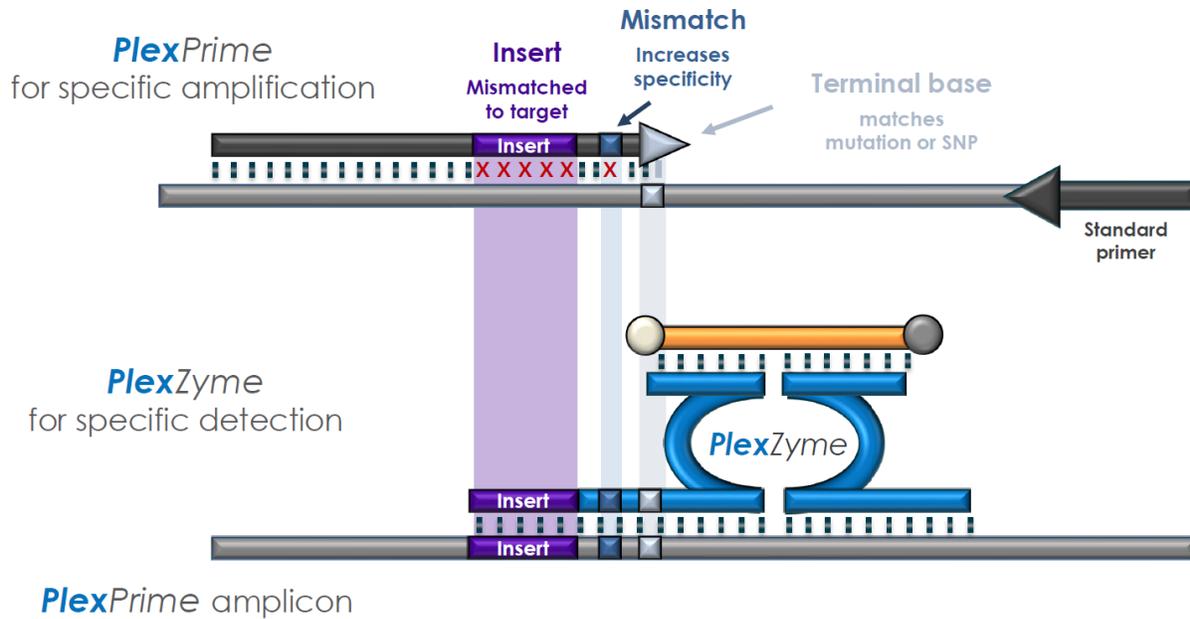
Gli enzimi **PlexZyme<sup>®</sup>** sono complessi di DNA catalitici composti da due oligonucleotidi di DNA denominati "enzimi parziali". Ogni enzima parziale ha una regione specifica per un target, un nucleo catalitico e una regione universale di legame della sonda. Quando è presente un prodotto target,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

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

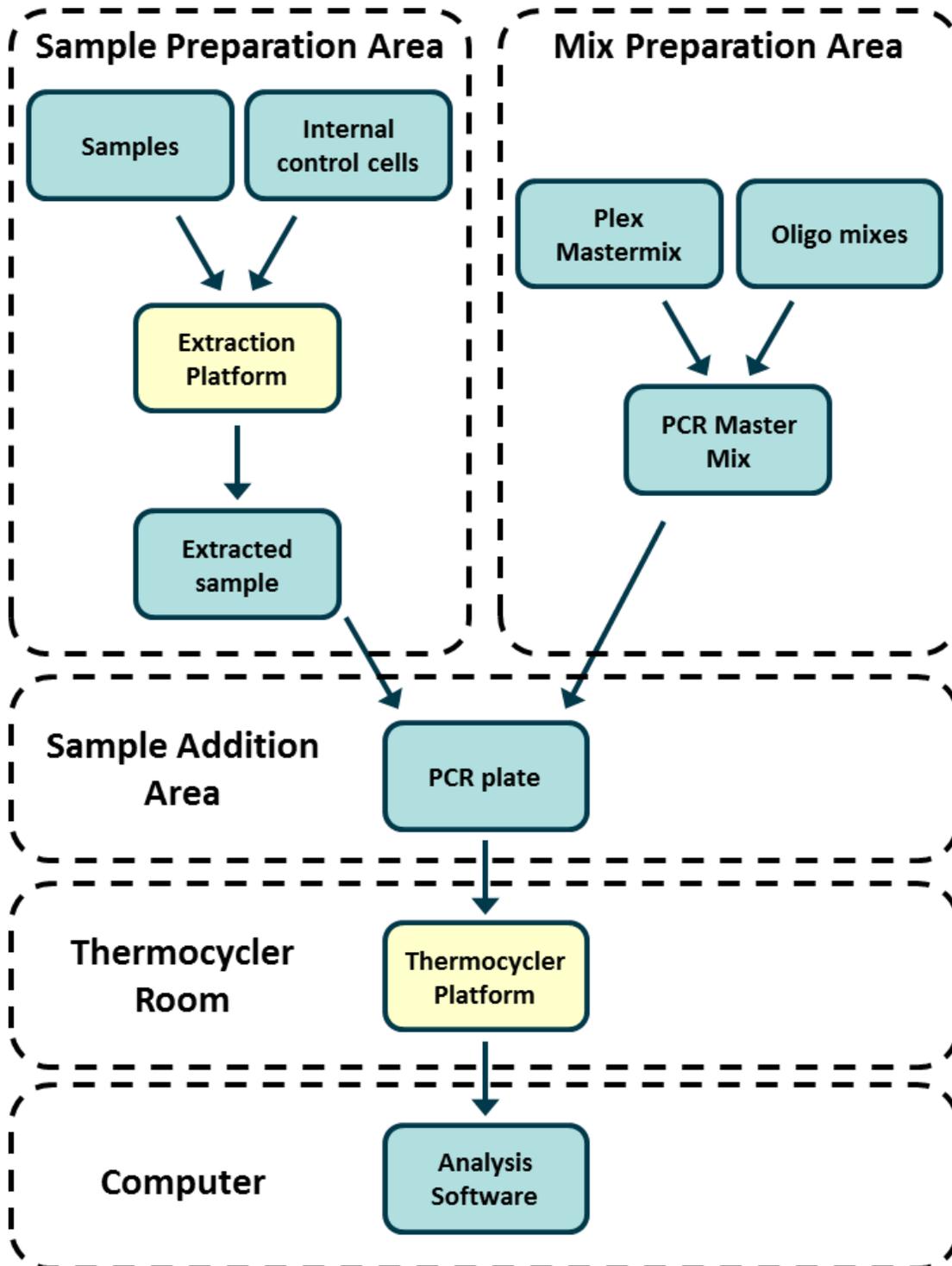
Figura 1. Rappresentazione schematica del rilevamento con **PlexZyme<sup>®</sup>** e della segnalazione universale



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



## 9 Panoramica della procedura



## 10 Procedura dettagliata

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

### 10.1 Raccolta, trasporto e conservazione del campione

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

#### 10.1.1 Dispositivi di raccolta campioni convalidati

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

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

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

#### 10.1.2 Raccolta, trasporto e conservazione dell'urina pura

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

#### 10.1.3 Raccolta, trasporto e conservazione del tampone secco

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

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

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

##### 10.1.4.1 Raccolta, trasporto e conservazione di campioni di urina

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

#### 10.1.4.2 Raccolta, trasporto e conservazione di campioni di tampone vaginale

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

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

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

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

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

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

##### 10.1.6.1 Raccolta, trasporto e conservazione di campioni di tampone vaginale

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### 10.1.11 Estratti di campioni convalidati

Gli estratti di campioni convalidati per l'uso comprendono:

- cobas® x480 (dal protocollo CT/NG)

## 10.2 Elaborazione del campione

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

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

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

<sup>a</sup> Vedere 10.3.1 per istruzioni su come utilizzare il controllo interno con MagNA Pure 96

<sup>b</sup> Vedere 10.3.2 per istruzioni su come utilizzare il controllo interno con STARlet IVD

<sup>c</sup> Vedere 10.3.3 per istruzioni su come utilizzare il controllo interno con QIA Symphony SP

<sup>d</sup> Vedere 10.3.4 per istruzioni su come utilizzare il controllo interno con NucliSENS® easyMAG®

<sup>^</sup> Le prestazioni cliniche dei campioni prelevati con i kit di prelievo Aptima® sono state dimostrate solo con questo protocollo di estrazione. Per ulteriori dettagli, consultare la Sezione 16.1.5.

### 10.3 Controllo interno (IC)

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

#### 10.3.1 Controllo interno su MagNA Pure 96

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

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

**Nota:** NON conservare le cellule di Controllo interno diluite

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

#### 10.3.2 Controllo interno sul MICROLAB STARlet IVD

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

**Nota:** NON conservare le cellule di Controllo interno diluite

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

#### 10.3.3 Controllo interno su QIASymphony® SP

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

**Nota:** NON conservare le cellule di Controllo interno diluite

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

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

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

Tabella 8. Preparazione della miscela di Controllo interno- RNA carrier-tampone AVE per QIAAsymphony SP					
Tipo di provetta	Numero di campioni	Volume di cellule IC diluite (µL)	Quantità di RNA carrier (µL)	Tampone AVE (µL)	Volume totale (µL)
-	1	10	3	107	120
2 mL	1 + portata a volume <sup>^</sup>	40	12	428	480
14 mL	1 + portata a volume <sup>#</sup>	60	18	642	720

<sup>^</sup> La provetta da 2 mL richiede 3 campioni aggiuntivi (360 µL) per portare a volume

<sup>#</sup> La provetta da 14 mL richiede 5 campioni aggiuntivi (600 µL) per portare a volume

#### 10.3.4 Controllo interno su easyMAG®

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

**Nota:** NON conservare le cellule di Controllo interno diluite

Tabella 9. Diluizione delle cellule di Controllo interno per NucliSENS® easyMAG® (diluizione 1 a 200)			
Cellule di Controllo interno ( <b>ROSSO</b> ) (µL)	1x PBS (µL)	Volume totale (µL)	Fattore di diluizione
10	1.990	2.000	200

Tabella 10. Premiscela di silice magnetica NucliSENS® easyMAG® e cellule di Controllo interno diluite			
Numero di campioni	Volume di cellule IC diluite (µL)	Volume di silice magnetica (µL)	Volume aggiunto al campione (µL)
1	50	50	100

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

#### Flusso di lavoro "on-board" (tamponi)

Trasferire i campioni nel contenitore per campioni.

Caricare i contenitori per campioni su easyMAG.

Programmare le seguenti richieste di estrazione:

Protocollo: Generico 2.0.1 (per la versione software 2.0)

Matrice: altro

Volume (mL): 0,200

Eluato (µL): 100 µL

Tipo: primario

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

Proseguire con il processo di estrazione.

#### Flusso di lavoro "off-board" (urina)

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

Lasciar riposare la miscela a temperatura ambiente per 10 minuti.

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

Aggiungere 100 µl di silice premiscelata a ciascun campione.

Programmare le seguenti richieste di estrazione:

Protocollo: Generico 2.0.1 (per la versione software 2.0)

Matrice: altro

Volume (mL): 1.000

Eluato (µL): 100 µL

Tipo: lisato

Proseguire con il processo di estrazione.

### **10.4 Preparazione della PCR in tempo reale**

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

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

#### **10.4.1 Preparazione della Master Mix**

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

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

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

Sigillare la piastra, centrifugare e trasferire al termociclatore.

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

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

#### 10.4.2 Stabilità della Master Mix

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

## 11 Programmazione e analisi

I dettagli per la programmazione e l'analisi sono descritti nelle **Sezioni 19 e 22**.

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

Tabella 12. Canali per i target di <b>ResistancePlus<sup>®</sup> MG</b>			
Strumento	Canale A	Canale B	Canale C
	Rilevamento di <i>M. genitalium</i> (MgPa)	Mutazione di rRNA 23S	Controllo interno
LC480 II	465-510	533-580	533-640
7500 Fast e 7500 Fast Dx	FAM	JOE	TAMRA
CFX96 Dx e CFX Touch	FAM	HEX	Quasar 705

## 12 Interpretazione dei risultati

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

Vedere la **Tabella 13** per individuare il software di analisi adatto a ciascuno strumento PCR in tempo reale. Il software di analisi può essere fornito su richiesta. Per maggiori informazioni, scrivere all'indirizzo [tech@speedx.com.au](mailto:tech@speedx.com.au).

Tabella 13. Software di analisi <b>ResistancePlus<sup>®</sup> MG</b>		
N. cat.	Software di analisi*	Strumento PCR in tempo reale
99003	<b>ResistancePlus<sup>®</sup> MG</b> (LC480)	LC480 II
99002	<b>ResistancePlus<sup>®</sup> MG</b> (7500)	7500 Fast e 7500 Fast Dx
99008	<b>ResistancePlus<sup>®</sup> MG</b> (CFX)	CFX96 Dx e CFX96 Touch

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

### 13 Limiti

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

## 14 Controllo qualità

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

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

## 15 Istruzioni per **ResistancePlus**<sup>®</sup> MG Positive Control

Il kit **ResistancePlus**<sup>®</sup> MG Positive Control contiene materiale per il controllo positivo per mutanti dell'rRNA 23S di *M. genitalium* e un rRNA 23S di *M. genitalium* wild type (**Tabella 14**).

Tabella 14. Contenuto del kit <b>ResistancePlus</b> <sup>®</sup> MG Positive Control (n. cat. 95001)			
Colore del tappo	Contenuto	Descrizione	Quantità (10 reazioni)
Neutro	MG, rRNA 23S wild type	Templato di controllo positivo per il rilevamento dell'rRNA 23S di <i>M. genitalium</i> , wild type	1 x 50 µL
Verde	MG, rRNA 23S A2058G	Templato di controllo positivo per il rilevamento della mutazione A2058G dell'rRNA 23S di <i>M. genitalium</i>	1 x 50 µL
Rosso	MG, rRNA 23S A2059G	Templato di controllo positivo per il rilevamento della mutazione A2059G dell'rRNA 23S di <i>M. genitalium</i> 23S	1 x 50 µL
Blu	MG, rRNA 23S A2058T	Templato di controllo positivo per il rilevamento della mutazione A2058T dell'rRNA 23S di <i>M. genitalium</i>	1 x 50 µL
Giallo	MG, 23S rRNA A2058C	Templato di controllo positivo per il rilevamento della mutazione A2058C dell'rRNA 23S di <i>M. genitalium</i>	1 x 50 µL

### 15.1 Istruzioni per l'uso

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

L'interpretazione dei dati richiede il software di analisi **ResistancePlus**<sup>®</sup> MG, fare riferimento alla **Sezione 23.9** per i risultati degli esempi.

## 16 Caratteristiche di prestazione

### 16.1 Prestazione clinica

#### 16.1.1 Studio clinico 1

Uno studio clinico prospettico-retrospettivo è stato condotto presso il Royal Women's Hospital (RWH) di Melbourne, Australia. I campioni sono stati raccolti da maggio 2016 a giugno 2016 e sulla base dei risultati clinici di laboratorio. Sono stati selezionati 144 campioni da includere nello studio. Dei 144 campioni 84 erano di urina maschile, 33 di urina femminile, 14 tamponi vaginali e 13 tamponi vaginali alti. Per determinare la prestazione del kit **ResistancePlus**<sup>®</sup> MG, il rilevamento di *M. genitalium* è stato confrontato con i risultati clinici di laboratorio ottenuti da una qPCR di rRNA 16S convalidata, utilizzata per diagnosi di routine presso l'istituto RWH<sup>7</sup>, e il rilevamento del mutante di rRNA 23S è stato confrontato con il sequenziamento Sanger<sup>8</sup>. Il kit **ResistancePlus**<sup>®</sup> MG è stato utilizzato sull'LC480 II, dopo l'estrazione del campione sullo strumento MagNA Pure 96 utilizzando il kit MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume e il protocollo Universal Pathogen 200. Per il rilevamento di *M. genitalium* è stato utilizzato un riferimento composito per i campioni discordanti utilizzando una terza reazione qPCR mirata al gene MgPa<sup>9</sup>. Per il rilevamento del mutante di rRNA 23S, il sequenziamento Sanger è stato considerato come il risultato vero. I risultati risolti e la sensibilità e specificità del kit **ResistancePlus**<sup>®</sup> MG per il rilevamento di *M. genitalium* e del mutante rRNA S23 sono mostrati nella **Tabella 15**. Due campioni sono stati esclusi poiché il risultato del Controllo interno non era valido (1 campione di urina femminile e 1 campione di urina maschile). L'analisi del rilevamento della mutazione dell'rRNA 23S include solo i campioni in cui è stato possibile determinare lo stato mutante. L'analisi dei risultati in base al tipo di campione è mostrata nella **Tabella 16**. L'analisi della mutazione dell'rRNA 23S è mostrata nella **Tabella 17**.

Tabella 15. Valutazione clinica del kit <b>ResistancePlus</b> <sup>®</sup> MG (Studio clinico 1)						
		Rilevamento di <i>M. genitalium</i> qPCR di rRNA 16S		Rilevamento del mutante di rRNA 23S Sequenziamento		
		Positivo	Negativo	Mutante rilevato	Mutante	Wild type
<b>ResistancePlus</b> <sup>®</sup> MG	Positivo	83	0	Mutante rilevato	52	2
	Negativo	1	58 <sup>^</sup>	Mutante non rilevato	2	21
Sensibilità		98,8% (IC 95% 93,5-100,0%)		Sensibilità		96,3% (IC 95% 87,3-99,6%)
Specificità		100,0% (IC 95% 93,8-100,0%)		Specificità		91,3% (IC 95% 72,0-98,9%)

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

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

**Tabella 16. Analisi del risultato clinico in base al campione<sup>^</sup> (Studio clinico 1)**

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

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

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

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

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

<sup>3</sup> Tampone vaginale: 2 A2059G rilevato correttamente

<sup>4</sup> Tampone vaginale alto: 3 A2058G, 1 A2059G rilevati correttamente

**Tabella 17. *M. genitalium* – analisi della mutazione di rRNA 23S (Studio clinico 1)**

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

<sup>^</sup> Per *M. genitalium* solo campioni positivi

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

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

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

#### 16.1.2 Studio clinico 2

Un sottogruppo dei campioni estratti dallo studio 1 è stato analizzato sull'ABI 7500 Fast. I risultati sono stati confrontati con il risultato clinico della qPCR di rRNA 16S (Twin 2011) e del sequenziamento Sanger (Twin 2012). I campioni discordanti per il rilevamento di *M. genitalium* sono stati nuovamente sottoposti al test della qPCR di rRNA 16S (Twin 2011) a causa di una sospetta degradazione del campione. I risultati risolti e la sensibilità e specificità del kit *ResistancePlus*<sup>®</sup> MG<sub>(650)</sub> per il rilevamento di *M. genitalium* e del mutante di rRNA S23 sono mostrati nella **Tabella 18**. L'analisi del rilevamento della mutazione dell'rRNA 23S include solo i campioni in cui è stato possibile determinare lo stato mutante.

Tabella 18. Valutazione clinica del kit <i>ResistancePlus</i> <sup>®</sup> MG <sub>(550)</sub> (Studio clinico 2)						
		Rilevamento di <i>M. genitalium</i> qPCR di rRNA 16S		Rilevamento del mutante di rRNA 23S Sequenziamento		
		Positivo	Negativo	Mutante	Wild type	
<i>ResistancePlus</i> <sup>®</sup> MG	Positivo	79	0 <sup>^</sup>	Mutante rilevato	47	1
	Negativo	2	43 <sup>#</sup>	Mutante non rilevato	4	19
Sensibilità		97,5% (IC 95% 91,4-99,7%)		Sensibilità		92,2% (IC 95% 81,1-97,8%)
Specificità		100,0% (IC 95% 91,8-100,0%)		Specificità		95,0% (IC 95% 75,1-99,9%)

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

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

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

### 16.1.3 Studio clinico 3

È stato condotto uno studio clinico retrospettivo presso i Canterbury Health Laboratories (CHL) di Christchurch, Nuova Zelanda, su campioni caratterizzati e archiviati dal 2010 al 2016, raccolti con il multi-Collect Specimen Collection Kit (Abbott). Dei 137 campioni 110 erano di urina maschile, 11 di urina femminile, 15 tamponi vaginali, 1 tampone vaginale/uretrale e 1 tampone vaginale/cervicale. Per determinare la prestazione del kit *ResistancePlus*<sup>®</sup> MG, il rilevamento di *M. genitalium* è stato confrontato con i risultati clinici di laboratorio ottenuti da una qPCR MgPa convalidata, utilizzata anche per diagnosi di routine presso l'istituto CHL (Jensen 2004), e il rilevamento del mutante di rRNA 23S è stato confrontato con il sequenziamento Sanger (Jensen 2008). Il kit *ResistancePlus*<sup>®</sup> MG è stato utilizzato sull'LC480 II, dopo l'estrazione del campione sullo strumento MagNA Pure 96 utilizzando il kit MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume e il protocollo Universal Pathogen 200. Per il rilevamento di *M. genitalium*, il test di routine MgPa è stato ripetuto per i campioni discordanti. Per il rilevamento del mutante di rRNA 23S, il sequenziamento Sanger è stato considerato come il risultato vero. La sensibilità e specificità del kit *ResistancePlus*<sup>®</sup> MG per il rilevamento di *M. genitalium* e del mutante di rRNA S23 sono mostrate nella **Tabella 19**. Un campione è stato escluso perché il risultato del Controllo interno non era valido. L'analisi del rilevamento della mutazione dell'rRNA 23S include solo i campioni in cui è stato possibile determinare lo stato mutante. L'analisi dei risultati in base al tipo di campione è mostrata nella **Tabella 20**. L'analisi della mutazione dell'rRNA 23S è mostrata nella **Tabella 21**.

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

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

<sup>^</sup> La tabella illustra i risultati risolti

**Tabella 20. Analisi del risultato clinico in base al campione (Studio clinico 3)**

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

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

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

<sup>2</sup> Urina femminile: 2 A2058G, 4 A2059G rilevati correttamente

<sup>3</sup> Tampone vaginale: 1 A2058G, 7 A2059G rilevati correttamente

**Tabella 21. *M. genitalium* – analisi della mutazione di rRNA 23S (Studio clinico 3)**

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

<sup>^</sup> Per *M. genitalium* solo campioni positivi

<sup>1</sup> Wild type: 1 campione di urina maschile erroneamente denominato *M. genitalium* rilevato

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

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

#### 16.1.4 Studio clinico 4

È stato condotto uno studio clinico retrospettivo presso il Vall d'Hebron University Hospital (HUVH), Barcellona, Spagna, per valutare le prestazioni del kit *ResistancePlus*<sup>®</sup> MG<sub>(675)</sub> per il rilevamento di *M. genitalium* e di mutazioni associate alla resistenza all'azitromicina in campioni retrospettivi raccolti tra dicembre 2017 e aprile 2018. I campioni sono stati raccolti utilizzando il DeltaSwab ViCUM<sup>®</sup> (Deltalab, Spagna) per i tamponi o il Vacumed<sup>®</sup> Urine (FL medical, Italia) per le urine. Degli 86 campioni, 46 erano di urina e 40 di tamponi vaginali. I campioni sono stati estratti con lo STARlet IVD (Hamilton) ed analizzati sullo strumento CFX96 Dx (Bio-Rad). Per valutarne le prestazioni, il rilevamento di *M. genitalium* è stato confrontato con Allplex<sup>™</sup> STI Essential (Seegene) e con il kit *ResistancePlus*<sup>®</sup> MG (SpeedX) su LC480 II sia per il rilevamento di *M. genitalium* sia per lo stato dell'rRNA 23S. La sensibilità e specificità del kit *ResistancePlus*<sup>®</sup> MG<sub>(675)</sub> per il rilevamento di *M. genitalium* rispetto ad Allplex<sup>™</sup> STI Essential (Seegene) sono mostrate nella **Tabella 22**. La sensibilità e la specificità di *ResistancePlus*<sup>®</sup> MG<sub>(675)</sub> rispetto a *ResistancePlus*<sup>®</sup> MG sono mostrate nella **Tabella 23**. L'analisi dei risultati in base al tipo di campione è mostrata nella **Tabella 24**.

Tabella 22. Confronto tra il kit <i>ResistancePlus</i> <sup>®</sup> MG <sub>(675)</sub> e Allplex <sup>™</sup> STI essential (Studio clinico 4)			
		Rilevamento di <i>M. genitalium</i>	
		Allplex <sup>™</sup> STI Essential	
		Positivo	Negativo
<i>ResistancePlus</i> <sup>®</sup> MG <sub>(675)</sub>	Positivo	40	0
	Negativo	0	46
Sensibilità		100,0% (IC 95% 91,2-100,0%)	
Specificità		100,0% (IC 95% 92,3-100,0%)	

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

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

<sup>#</sup> 1 campione escluso dall'analisi poiché è stato sequenziato come wild type misto e mutante

Tabella 24. Analisi del risultato clinico in base al campione (Studio clinico 4)			
Campione	Previsto <i>M. genitalium</i> negativo	Previsto rRNA 23S di <i>M. genitalium</i> wild type	Previsto mutante di rRNA 23S di <i>M. genitalium</i>
Urina maschile	26/26	5/5	15/15
Tampone vaginale	20/20	15/15	5/5

## 16.1.5 Studio clinico 5

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

La sensibilità e specificità del kit **ResistancePlus<sup>®</sup> MG** per il rilevamento del *M. genitalium* e del mutante rRNA S23 sono mostrate nella **Tabella 25**. L'analisi del rilevamento della mutazione dell'rRNA 23S include solo i campioni in cui è stato possibile determinare lo stato mutante. L'analisi dei risultati in base al tipo di campione è mostrata nella **Tabella 26**.

Tabella 25. Valutazione clinica del kit <b>ResistancePlus<sup>®</sup> MG</b> (Studio clinico 5)							
		Rilevamento di <i>M. genitalium</i> <b>ResistancePlus<sup>®</sup> MG</b> (campione di routine)		Rilevamento del mutante di rRNA 23S <b>ResistancePlus<sup>®</sup> MG</b> (campione di routine)			
		Positivo	Negativo	Mutante	Wild type		
<b>ResistancePlus<sup>®</sup> MG</b> (con 1 ml di campione Aptima)	Positivo	77	3	Mutante rilevato	51	0	
	Negativo	3	64	Mutante non rilevato	2	24	
Sensibilità		96,3% (IC 95% 89,4-99,2%)		Sensibilità		96,2% (IC 95% 87,0-99,5%)	
Specificità		95,5% (IC 95% 87,5-99,1%)		Specificità		100,0% (IC 95% 86,0-100,0%)	

Tabella 26. Analisi del risultato clinico in base al campione (Studio clinico 5)			
Campione	Previsto <i>M. genitalium</i> negativo	Previsto <i>M. genitalium</i> wild type	Previsto mutante di rRNA 23S di <i>M. genitalium</i>
Urina	50/52 <sup>1</sup>	21/22 <sup>1</sup>	45/48 <sup>1</sup>
Tampone vaginale	14/15 <sup>2</sup>	3/4 <sup>2</sup>	6/6

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

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

<sup>2</sup> Tampone vaginale: 1 *M. genitalium* negativo erroneamente denominato *M. genitalium* wild type; 1 *M. genitalium* wild type erroneamente denominato *M. genitalium* negativo

## 16.1.6 Studio clinico 6

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

Per determinare le prestazioni degli estratti di cobas® con il kit **ResistancePlus®** MG<sub>(550)</sub>, il rilevamento di *M. genitalium* è stato confrontato con il risultato diagnostico di routine (test PCR MgPa (Trembizki *et al.*, 2017)) e il rilevamento del mutante di rRNA 23S con il sequenziamento Sanger. Il kit **ResistancePlus®** MG<sub>(550)</sub> è stato utilizzato sull'ABI 7500 Fast Dx. La sensibilità e la specificità del kit **ResistancePlus®** MG<sub>(550)</sub> per il rilevamento di *M. genitalium* e del mutante di rRNA 23S sono mostrate nella **Tabella 27**. L'analisi del rilevamento della mutazione dell'rRNA 23S include solo i campioni in cui è stato possibile determinare lo stato mutante. L'analisi dei risultati in base al tipo di campione è mostrata nella **Tabella 28**. L'analisi della mutazione dell'rRNA 23S è mostrata nella **Tabella 29**.

Tabella 27. Valutazione clinica del kit <b>ResistancePlus®</b> MG <sub>(550)</sub> (Studio clinico 6)						
		Rilevamento di <i>M. genitalium</i> MgPa qPCR		Rilevamento del mutante di rRNA 23S Sequenziamento Sanger		
		Positivo	Negativo	Mutante	Wild type	
<b>ResistancePlus®</b> MG <sub>(550)</sub>	Positivo	54	0	Mutante rilevato	37 <sup>^</sup>	
	Negativo	1	51	Mutante non rilevato	17	
Sensibilità		98,2% (IC 95% 90,3-100,0%)		Sensibilità		100,0% (IC 95% 90,5-100,0%)
Specificità		100,0% (IC 95% 93,0-100,0%)		Specificità		100,0% (IC 95% 80,5-100,0%)

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

Tabella 28. Analisi del risultato clinico in base al campione (Studio clinico 6) *			
Campione	Previsto <i>M. genitalium</i> negativo	Previsto rRNA 23S di <i>M. genitalium</i> wild type	Previsto mutante di rRNA 23S di <i>M. genitalium</i>
Urina maschile	42/42	13/13	26/27 <sup>1</sup>
Urina femminile	6/6	1/1	3/3 <sup>2</sup>
Tampone vaginale	1/1	1/1	7/7 <sup>3^</sup>
Tampone vaginale alto	2/2	2/2	1/1 <sup>4</sup>

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

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

<sup>2</sup> Urina femminile: 2 A2058G e 1 A2059G correttamente identificati

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

<sup>4</sup> Tampone vaginale alto: 1 A2059G correttamente identificato

**Tabella 29. *M. genitalium* – analisi della mutazione di rRNA 23S (Studio clinico 6)**

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

<sup>^</sup> Per *M. genitalium* solo campioni positivi

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

#### 16.1.7 Studio clinico 7

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

Il kit *ResistancePlus*<sup>®</sup> MG è stato utilizzato sull'LC480 II, dopo l'estrazione del campione sullo strumento QIA Symphony SP (QIAGEN) utilizzando il mini kit DSP Virus/Pathogen e seguendo il protocollo Complex200\_V6\_DSP. I risultati sono stati confrontati con i risultati diagnostici di routine ottenuti dal kit *ResistancePlus*<sup>®</sup> MG (SpeedX) utilizzando campioni estratti sullo strumento MagNA Pure 96 (MP96). Per i risultati discordanti, è stato eseguito un test qPCR di rRNA 16S (Twin 2011) per il rilevamento di *M. genitalium*, ed è stato eseguito un sequenziamento Sanger (Twin 2012) per il rilevamento del mutante di rRNA 23S. La sensibilità e specificità del kit *ResistancePlus*<sup>®</sup> MG per il rilevamento di *M. genitalium* e del mutante rRNA S23 sono mostrate nella **Tabella 30**. L'analisi del rilevamento della mutazione dell'rRNA 23S include solo i campioni in cui è stato possibile determinare lo stato mutante. L'analisi dei risultati in base al tipo di campione è mostrata nella **Tabella 31**.

**Tabella 30. Valutazione clinica del kit *ResistancePlus*<sup>®</sup> MG (Studio clinico 7)**

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

Tabella 31. Analisi del risultato clinico in base al campione (Studio clinico 7) <sup>*</sup>			
Campione	Previsto <i>M. genitalium</i> negativo	Previsto rRNA 23S di <i>M. genitalium</i> wild type	Previsto mutante di rRNA 23S di <i>M. genitalium</i>
Urina maschile	17/17	9/9	12/14 <sup>1</sup>
Urina femminile	1/1	1/2 <sup>2</sup>	1/1
Tampone vaginale	8/8 <sup>#</sup>	7/7	3/3
Tampone vaginale alto	1/1	1/1	-

<sup>#</sup> 1 tampone vaginale è stato escluso in quanto ha prodotto un risultato non valido con il kit **ResistancePlus**<sup>®</sup> MG

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

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

## 16.2 Prestazione analitica

### 16.2.1 Riproducibilità e ripetibilità

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

Per determinare la variabilità da lotto a lotto, sono stati testati due lotti, analizzati su una macchina gestita da un operatore (**Tabella 32**). I due lotti hanno mostrato una buona riproducibilità con coefficiente di variazione (%CV) compreso tra 0,35 e 2,37% per tutti i target.

Tabella 32. Variabilità da lotto a lotto				
	Media Cq	STDEV	%CV	N. campioni
<b>MgPa 10.000 copie</b>	16,9	0,15	0,89	12/12
<b>MgPa 30 copie</b>	25,5	0,52	2,05	12/12
<b>A2058G 10.000 copie</b>	20,4	0,48	2,37	12/12
<b>A2058G 36 copie</b>	27,8	0,43	1,54	12/12
<b>A2059G 10.000 copie</b>	18,0	0,06	0,35	12/12
<b>A2059G 30 copie</b>	25,6	0,50	1,94	12/12
<b>A2058T 10.000 copie</b>	18,7	0,09	0,46	12/12
<b>A2058T 30 copie</b>	26,2	0,30	1,14	12/12
<b>A2058C 10.000 copie</b>	17,7	0,13	0,75	12/12
<b>A2058C 30 copie</b>	25,4	0,29	1,15	12/12

Per determinare la variabilità da giorno a giorno, i test sono stati eseguiti per tre giorni da un solo operatore sulla stessa macchina (**Tabella 33**). Le tre analisi hanno mostrato una buona riproducibilità in giorni diversi con coefficiente di variazione compreso tra 0,88 e 2,31% per tutti i target.

Tabella 33. Variabilità da giorno a giorno				
	Media Cq	STDEV	%CV	N. campioni
MgPa 10.000 copie	17,0	0,18	1,09	18/18
MgPa 30 copie	25,6	0,59	2,31	18/18
A2058G 10.000 copie	20,2	0,37	1,83	18/18
A2058G 36 copie	27,9	0,51	1,84	18/18
A2059G 10.000 copie	18,1	0,24	1,34	18/18
A2059G 30 copie	25,7	0,32	1,23	18/18
A2058T 10.000 copie	18,7	0,23	1,22	18/18
A2058T 30 copie	26,3	0,31	1,17	18/18
A2058C 10.000 copie	17,8	0,16	0,88	18/18
A2058C 30 copie	25,5	0,31	1,22	18/18

Per determinare la variabilità da analisi ad analisi, sono state confrontate tre analisi qPCR, eseguite lo stesso giorno dallo stesso operatore (**Tabella 34**). Le tre analisi hanno mostrato una buona riproducibilità con coefficiente di variazione compreso tra 0,40 e 3,20% per tutti i target.

Tabella 34. Variabilità da analisi ad analisi				
	Media Cq	STDEV	%CV	N. campioni
MgPa 10.000 copie	17,0	0,07	0,40	18/18
MgPa 30 copie	25,7	0,47	1,83	18/18
A2058G 10.000 copie	19,8	0,63	3,20	18/18
A2058G 36 copie	27,5	0,51	1,85	18/18
A2059G 10.000 copie	18,4	0,11	0,61	18/18
A2059G 30 copie	25,7	0,39	1,52	18/18
A2058T 10.000 copie	18,7	0,22	1,18	18/18
A2058T 30 copie	26,4	0,42	1,59	18/18
A2058C 10.000 copie	17,8	0,08	0,46	18/18
A2058C 30 copie	25,5	0,31	1,22	18/18

Per determinare la variabilità da operatore a operatore, sono state confrontate due analisi di due operatori (**Tabella 35**). Le due analisi eseguite da operatori diversi hanno mostrato una buona riproducibilità con coefficiente di variazione compreso tra 0,54 e 1,62% per tutti i target.

Tabella 35. Variabilità da operatore a operatore				
	Media Cq	STDEV	%CV	N. campioni
MgPa 10.000 copie	16,8	0,12	0,73	12/12
MgPa 30 copie	25,3	0,41	1,61	12/12
A2058G 10.000 copie	20,2	0,24	1,21	12/12
A2058G 36 copie	27,9	0,45	1,62	12/12
A2059G 10.000 copie	17,9	0,10	0,58	12/12
A2059G 30 copie	25,5	0,39	1,53	12/12
A2058T 10.000 copie	18,6	0,10	0,54	12/12
A2058T 30 copie	26,1	0,31	1,20	12/12
A2058C 10.000 copie	17,7	0,13	0,71	12/12
A2058C 30 copie	25,2	0,27	1,06	12/12

Per determinare la variabilità da strumento a strumento, sono state confrontate due analisi ottenute da due macchine, eseguite dallo stesso operatore (**Tabella 36**). Le due analisi eseguite su strumenti diversi hanno mostrato una buona riproducibilità con coefficiente di variazione compreso tra 0,30 e 2,62% per tutti i target.

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

Per determinare la variabilità nell'ambito di una stessa analisi, sono stati confrontati tre esperimenti, impostati separatamente dallo stesso operatore che ha analizzato ogni target sulla stessa piastra (**Tabella 37**). I tre esperimenti hanno mostrato una buona riproducibilità con coefficiente di variazione compreso tra 0,57 e 3,12% per tutti i target.

Tabella 37. Variabilità nell'ambito di una stessa analisi				
	Media Cq	STDEV	%CV	N. campioni
MgPa 10.000 copie	17,3	0,36	2,09	18/18
MgPa 30 copie	25,9	0,81	3,12	18/18
A2058G 10.000 copie	20,2	0,11	0,57	18/18
A2058G 36 copie	28,0	0,65	2,31	18/18
A2059G 10.000 copie	17,9	0,15	0,83	18/18
A2059G 30 copie	25,8	0,38	1,46	18/18
A2058T 10.000 copie	18,8	0,12	0,66	18/18
A2058T 30 copie	26,8	0,38	1,41	18/18
A2058C 10.000 copie	17,8	0,15	0,83	18/18
A2058C 30 copie	25,5	0,36	1,41	18/18

#### 16.2.2 Sensibilità analitica

La sensibilità analitica del kit **ResistancePlus**<sup>®</sup> MG sull'LC480 II è stata determinata eseguendo serie limitate di diluizioni usando un template sintetico quantificato per i target MgPa e rRNA 23S di *M. genitalium* (A2058G, A2059G, A2058T e A2058C). La sensibilità per ciascun target è stata determinata come il numero di copie per reazione con rilevamento  $\geq 95\%$  come mostrato nella **Tabella 38**.

Tabella 38. Sensibilità analitica	
	Sensibilità analitica (copie/reazione)
MgPa	10
A2058G	12
A2059G	10
A2058T	10
A2058C	10

#### 16.2.3 Specificità analitica

Lo studio è stato condotto per valutare il kit **ResistancePlus**<sup>®</sup> MG quando sono presenti organismi non target ad alte concentrazioni. È stato valutato un pannello di 65 microrganismi (4 virus, 2 protozoi, 4 funghi e 55 batteri) che rappresentano patogeni o flora comunemente presenti nell'apparato urogenitale o strettamente correlati a *M. genitalium*. Ogni ceppo batterico è stato testato a  $1 \times 10^6$  genomi/ml, salvo diversa indicazione. I ceppi virali sono stati testati a  $1 \times 10^5$  genomi/ml, salvo diversa indicazione. Tutti gli altri organismi sono stati testati alle concentrazioni indicate. Tutti gli organismi sono stati quantificati usando qPCR, eccetto quelli quantificati come unità formanti colonie (CFU) o unità formanti placca (PFU) (**Tabella 39**). Tutti i microrganismi sono stati testati in triplicato. Tutti i microrganismi testati sono stati diluiti in una matrice clinica negativa (campione di urina o tampone vaginale).

I risultati hanno indicato che nessuno di questi organismi ha prodotto risultati falsi positivi nelle matrici negative di *M. genitalium* (**Tabella 39**).

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

Tabella 39. Microrganismi testati per la specificità analitica

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

\* il numero tra parentesi indica il numero di ceppi testati

<sup>^</sup> quantificati come PFU/ml

<sup>#</sup> quantificati come CFU/ml

#### 16.2.4 Sostanze potenzialmente interferenti

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

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

I risultati sono riassunti nella **Tabella 40** e nella **Tabella 41**.

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

Tabella 41. Sostanze potenzialmente interferenti nei campioni di tampone vaginale		
Classe/Sostanza	Nome del prodotto	Concentrazione testata
Sangue	--	60% v/v
Liquido seminale	--	5,0% v/v
Muco	Mucina	0,8% p/v
Prodotti vaginali da banco e contraccettivi	Crema anti-prurito Vagisil (1,0 g)	0,25% p/v
	Gel K-Y (4,0 g)	0,25% p/v
	Gel anticoncezionale vaginale Gynol II Options	0,25% p/v
	Crema vaginale al clotrimazolo Walgreens (1,5 g)	0,25% p/v
	Crema antiprurito Vagisil Sensitive Skin Formula Maximum Strength con farina di avena (28,3 g)	0,25% p/v
	Gel idratante interno Vagisil ProHydrate Natural Feel (0,2 g x conf. 8 pz)	0,25% p/v
	Deodorante intimo giornaliero in polvere Vagisil (227 g)	0,25% p/v
	Doccia medicata Summer's Eve	0,25% v/v
Deodoranti e polveri	Deodorante spray Summer's Eve (56,7 g)	0,25% v/v
Crema per emorroidi	Crema per emorroidi Preparazione H (25,5 g)	0,25% p/v
Farmaci solo su prescrizione	Gel vaginale al metronidazolo, 0,75%	0,25% p/v
	Estrace® (crema vaginale a base di estradiolo, USP 0,01%)	0,25% p/v
Leucociti	--	10 <sup>5</sup> cellule/ml
Ormoni intravaginali	--	7 mg/ml progesterone + 0,07 mg/ml beta estradiolo

#### 16.2.5 Reazione incrociata con altre mutazioni di rRNA 23S

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

## 17 Assistenza clienti e assistenza tecnica

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

Tel: +61 2 9209 4169, Email: [tech@speedx.com.au](mailto:tech@speedx.com.au)

**18 Bibliografia**

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

## 19 Allegato 1: strumento LightCycler® 480 II

Le seguenti informazioni si basano sul software LightCycler® 480 (versione 1.5).

Il kit **ResistancePlus®** MG contiene coloranti per lo strumento LightCycler® 480 II. Il kit di compensazione del colore **Plex PCR®** (n. cat. 90001) deve essere eseguito e applicato per l'analisi LC480 II (vedere la **Sezione 19.2**). Questo kit può essere fornito su richiesta.

### 19.1 Programmazione dello strumento LightCycler® 480 II (LC480 II)

#### Formato di rilevamento

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

Aprire **Tools** (Strumenti) > **Detection Formats** (Formati di rilevamento)

Creare un nuovo formato di rilevamento e chiamarlo "**SpeedX PlexPCR**" (può essere creato durante la generazione del file per la compensazione del colore SpeedX) (Vedere **Figura 3**).

Per **Filter Combination Selection** (Selezione della combinazione di filtri) selezionare la seguente (Eccitazione-Emissione) mostrata nella **Tabella 42**.

Tabella 42. Combinazioni di filtri <sup>^</sup>						
LC480 II	440-488	465-510	533-580	533-610	533-640	618-660

<sup>^</sup> Queste combinazioni di filtri sono i nomi predefiniti per i canali

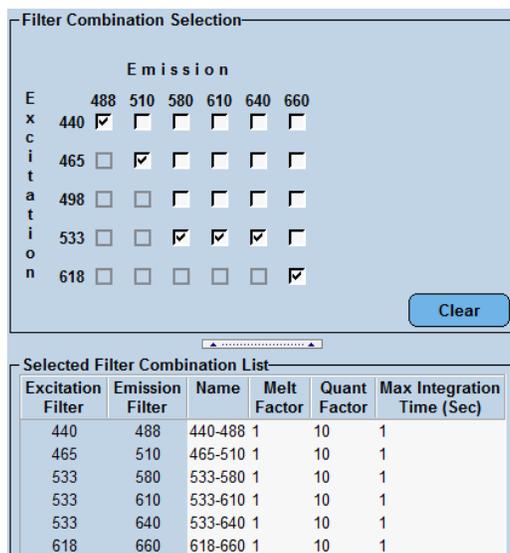
Impostare la **Selected Filter Combination List** (Lista delle combinazioni di filtri selezionati) per tutti i canali come segue:

Melt Factor (Fattore di fusione): 1

Quant Factor (Fattore di quantificazione): 10

Max Integration Time (Sec) (Tempo di integrazione max (sec)): 1

**Figura 3. Formato di rilevamento SpeedX personalizzato**



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	

#### Impostazioni dello strumento

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

Aprire **Tools** (Strumenti) > **Instruments** (Strumentazione)

Per **Instrument Settings** (Impostazioni della strumentazione) > selezionare **Barcode Enabled** (Codice a barre attivato)

### Configurazione dell'esperimento

Selezionare **New Experiment** (Nuovo esperimento)

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

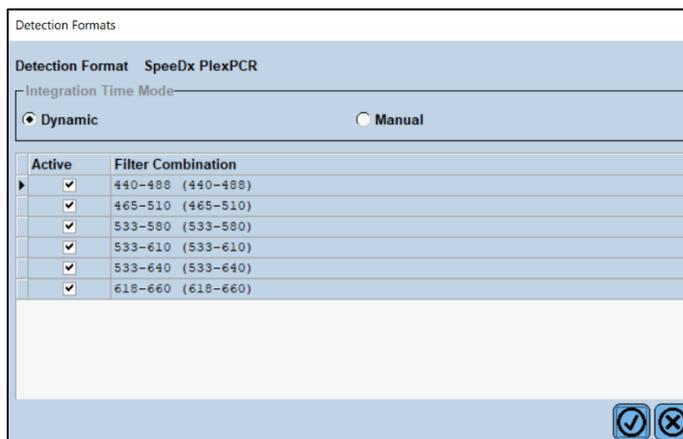
Per **Detection Format** (Formato di rilevamento) selezionare "**SpeedX PlexPCR**" (Figura 4)

Selezionare **Customize** (Personalizza) >

Selezionare **Integration Time Mode** (Modalità tempo di integrazione) > **Dynamic** (Dinamico)

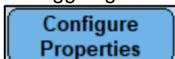
Selezionare tutte le **Filter Combination** (Combinazioni di filtri) attive mostrate nella Figura 4).

Figura 4. Personalizzazione del formato di rilevamento

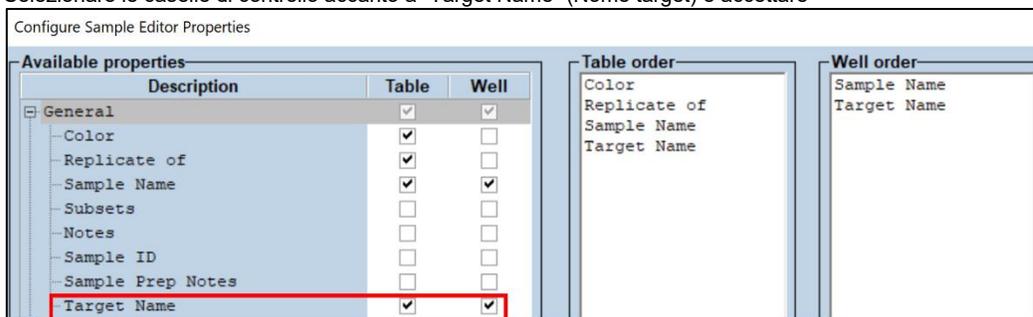


Per attivare il rilevamento automatico del campione nel software di analisi, assegnare le etichette identificative ai pozzetti sulla piastra  
Aprire il modulo **Sample Editor** (Editor del campione)

Per aggiungere i nomi target, selezionare **Configure Properties** (Configura proprietà)



Selezionare le caselle di controllo accanto a "Target Name" (Nome target) e accettare



Modificare il **Target Name** (Nome target) per ogni canale per abbinare il riferimento dello strumento target definito nel menu Lab Configuration (Configurazione del laboratorio) > Assays (Dosaggi) del software di analisi e mostrato nella **Tabella 43**.

Tabella 43. Canali per i target di *ResistancePlus*<sup>®</sup> MG

Target	MgPa	23S rRNA mutation	IC
LC480 II	465-510	533-580	533-640

Per assegnare le etichette identificative, selezionare il pozzetto

Modificare il **Sample Name** (Nome del campione) affinché corrisponda all'etichetta identificativa definita nel menu Lab Configuration (Configurazione del laboratorio) > Assays (Dosaggi) del software di analisi (vedere la **Sezione 23.3**)

I campioni devono essere etichettati con l'etichetta identificativa come prefisso. Per le reazioni di controllo sono fornite etichette identificative predefinite (come indicato nella **Tabella 44** e nella **Figura 5**). Il software di analisi consente di definire ulteriori etichette identificative, sia per i campioni normali sia per i controlli.

**Nota:** le etichette identificative del campione sono sensibili alle maiuscole e alle minuscole. L'etichetta identificativa deve corrispondere esattamente alle etichette assegnate nel file di esecuzione.

Tabella 44. Etichette identificative del campione per il software di analisi	
Tipo di campione	Prefisso predefinito (nel software di analisi)
Campione regolare	Nessun valore predefinito – Definito dall'utente
Controllo negativo	NC
Controllo senza template	NTC
Controllo positivo (MG, tipo mutante di 23S rRNA) (Pa)	Pa
Controllo positivo (MG, wild type di 23S rRNA) (Pb)	Pb

**Figura 5. Editor del campione – Assegnazione delle etichette identificative ai pozzetti**

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

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

Creare il seguente programma nella **Tabella 45** (mostrato in dettaglio nella **Figura 6** e **Figura 9**):

Tabella 45. Programma Thermocycling (termociclaggio)

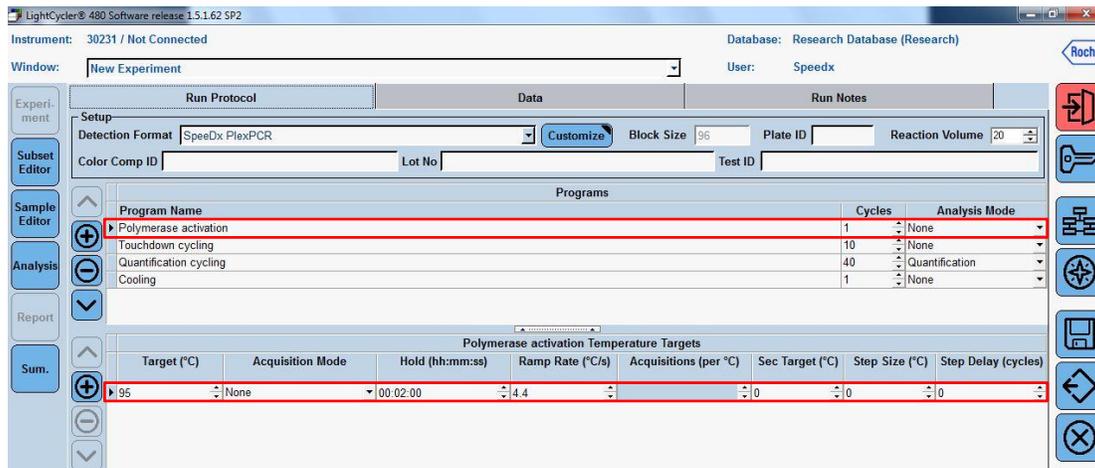
Program Name (nome del programma)	Cycles (cicli)	Target °C	Hold (mantenimento)	Ramp rate (velocità di rampa) (°C/s) <sup>*</sup>
Polymerase activation (attivazione della polimerasi)	1	95°C	2 min	4,4
Touch down cycling (cicli di touchdown) <sup>o</sup> :	10	95°C	5 s	4,4
Step down (riduzione) -0,5° C/ciclo		61°C – 56.5°C <sup>o</sup>	30 s	2,2
Quantification cycling (cicli di quantificazione) <sup>+</sup> :	40	95°C	5 s	4,4
Acquisition/Detection (acquisizione/rilevamento)		52°C <sup>+</sup>	40 s	2,2
Cooling (raffreddamento)	1	40°C	30 s	2,2

<sup>\*</sup> Velocità di rampa predefinita (piastra a 96 pozzetti)

<sup>o</sup> **Step size (passo):** -0.5°C/Ciclo, **Sec Target (target secondario):** 56°C

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

Figura 6. Programma termociclaggio – Attivazione della polimerasi



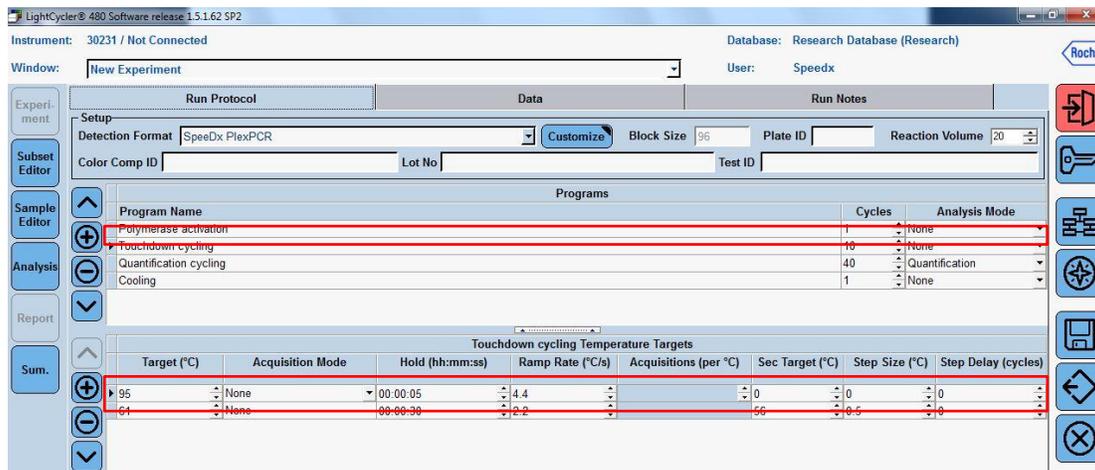
The screenshot shows the 'Programs' table in the software interface. The table has columns for Program Name, Cycles, and Analysis Mode. The 'Polymerase activation' program is highlighted with a red box. Below the table, the 'Polymerase activation Temperature Targets' table is visible, showing parameters for the 95°C step.

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

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

Figura 7. Programma termociclaggio – Cicli di Touchdown

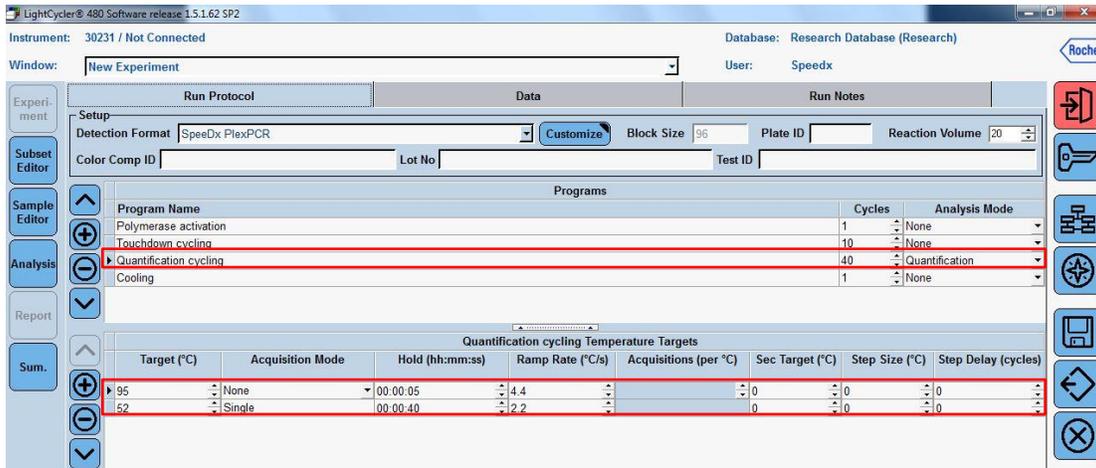


The screenshot shows the 'Programs' table in the software interface. The 'Touchdown cycling' program is highlighted with a red box. Below the table, the 'Touchdown cycling Temperature Targets' table is visible, showing parameters for the 95°C and 61°C steps.

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

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

**Figura 8. Programma termociclaggio – Cicli di quantificazione**


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

Run Protocol | Data | Run Notes

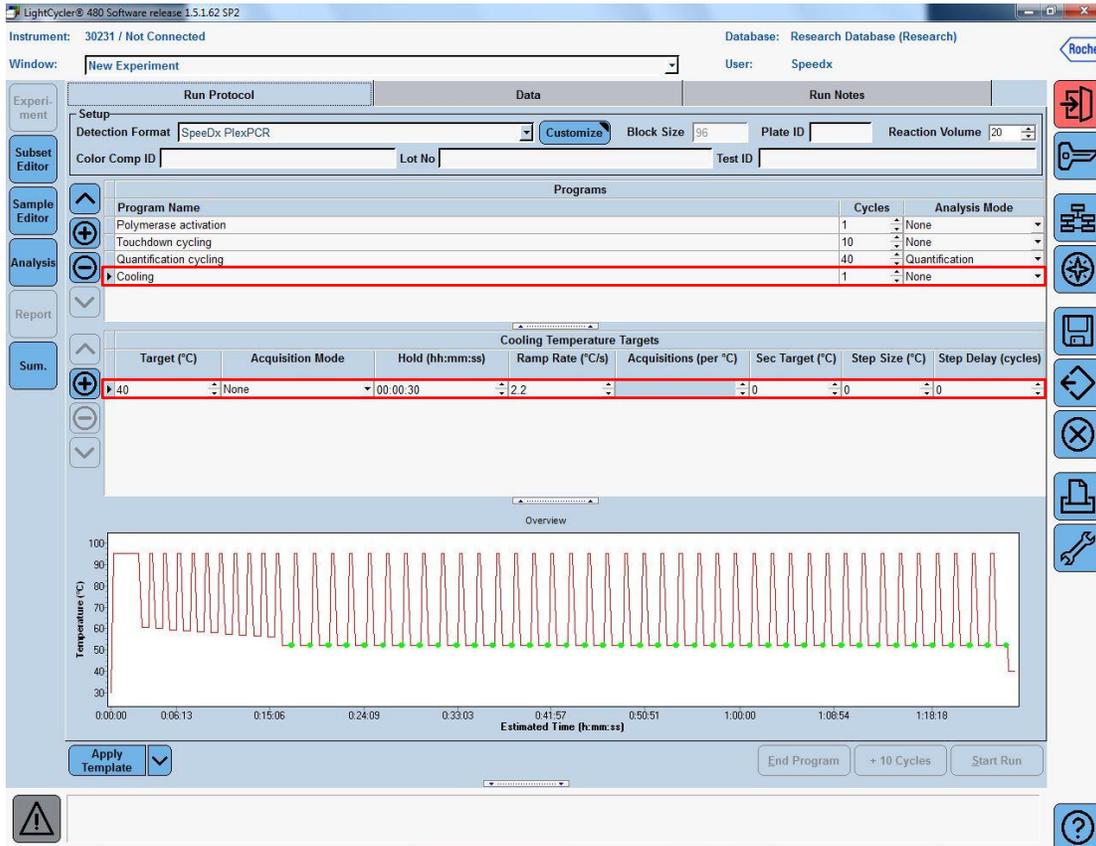
Setup  
 Detection Format: SpeedX PlexPCR | Customize | Block Size: 96 | Plate ID: | Reaction Volume: 20  
 Color Comp ID: | Lot No: | Test ID: |

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

**Figura 9. Programma del termociclatore – Raffreddamento**


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

Run Protocol | Data | Run Notes

Setup  
 Detection Format: SpeedX PlexPCR | Customize | 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)

Graph showing temperature cycling from 95°C to 52°C and then cooling to 40°C.

Buttons: Apply Template, End Program, + 10 Cycles, Start Run

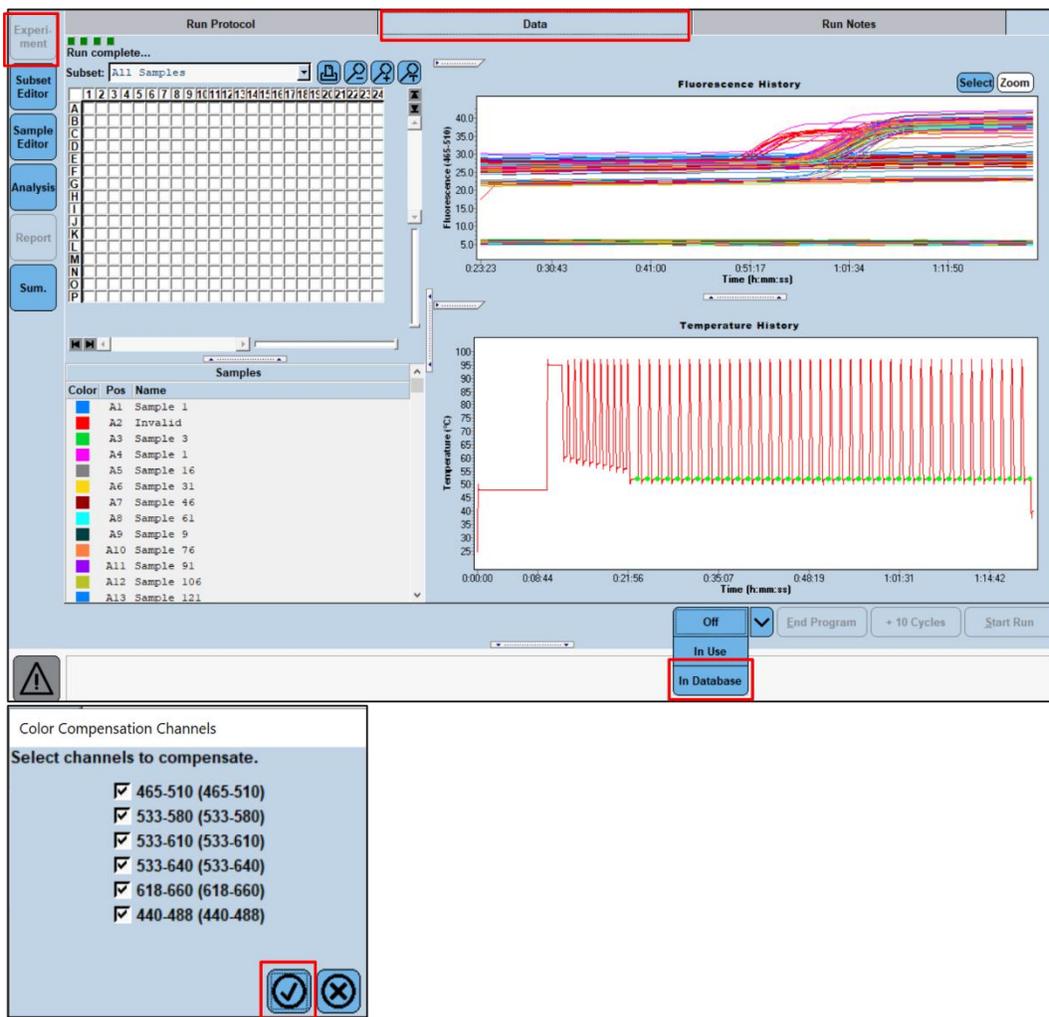
> **Start Run** (avvia esecuzione)

Una volta terminato il programma di termociclaggio, allegare l'oggetto CC al file di esecuzione come mostrato nella **Figura 10** ed esportare come file .IXO per l'analisi nel software di analisi **ResistancePlus®** MG. Consultare la **Sezione 19.2** per istruzioni sui modi per creare l'oggetto CC e memorizzarlo nel database del software LightCycler 480.

Selezionare **Experiment** (Esperimento) > **Data** (Dati)

Fare clic sulla freccia a discesa accanto a **Colour Comp (Off)** (Compensazione di colore disattivata) e selezionare **In database** (Nel database)

**Figura 10. Collegamento dell'oggetto CC al file di esecuzione**



The screenshot shows the 'Data' tab in the software. The 'Colour Comp (Off)' dropdown menu is open, and 'In Database' is selected. A 'Color Compensation Channels' dialog box is also visible, showing a list of channels with checkboxes and a 'Save' button.

Color	Pos	Name
A1	Sample 1	
A2	Invalid	
A3	Sample 3	
A4	Sample 1	
A5	Sample 16	
A6	Sample 31	
A7	Sample 46	
A8	Sample 61	
A9	Sample 9	
A10	Sample 76	
A11	Sample 91	
A12	Sample 106	
A13	Sample 121	

Color Compensation Channels  
Select channels to compensate.

- 465-510 (465-510)
- 533-580 (533-580)
- 533-610 (533-610)
- 533-640 (533-640)
- 618-660 (618-660)
- 440-488 (440-488)

Selezionare l'oggetto CC appropriato, assicurarsi che tutti i canali siano selezionati e selezionare l'icona del **segno di spunta** 

Selezionare l'icona **Save** (Salva) 

Selezionare l'icona **Export** (Esporta) 

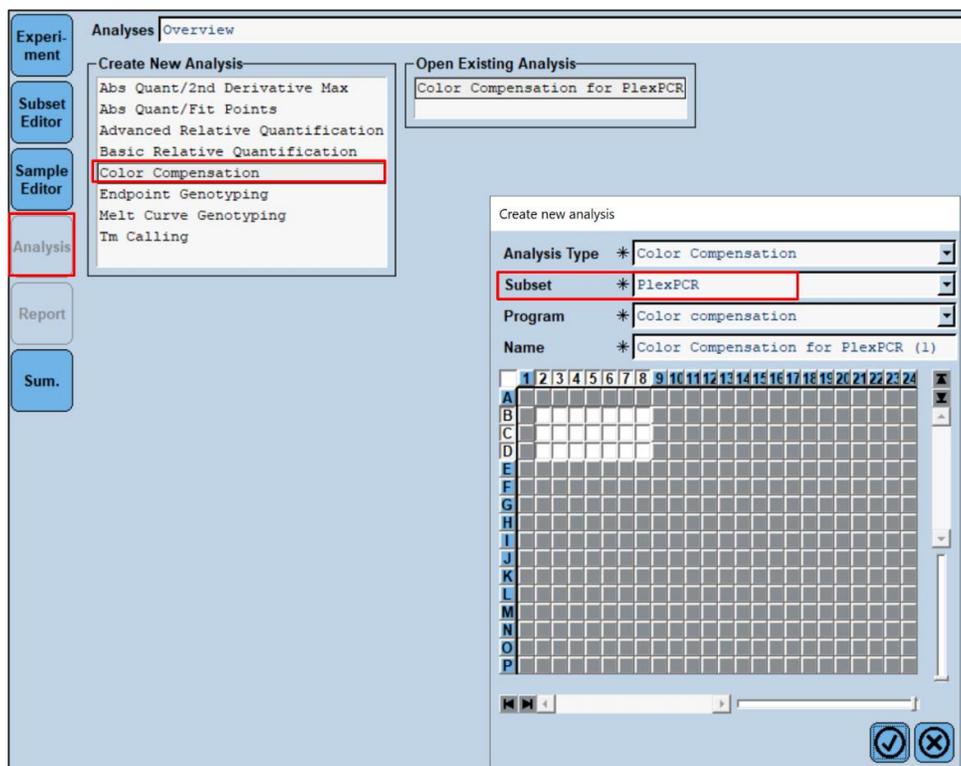
Salvare in una posizione facilmente identificabile

## 19.2 Compensazione del colore per lo strumento LightCycler® 480 II

**NOTA:** per l'analisi LC480 II è necessario eseguire e applicare il kit per la compensazione del colore **PlexPCR®** (n. cat. 90001). Questo kit può essere fornito su richiesta.

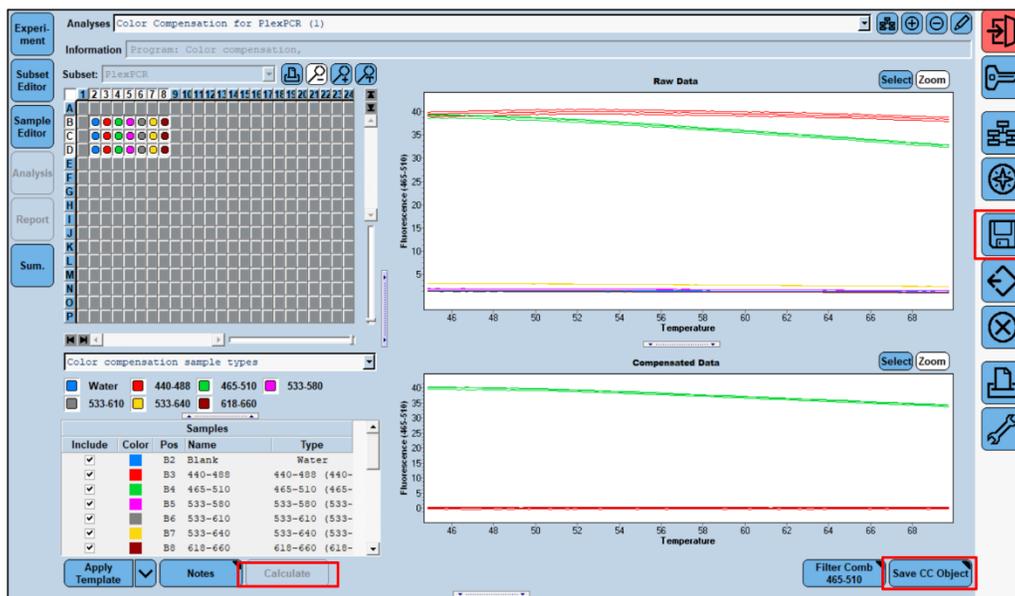
Analizzare il file di compensazione del colore tramite **Analysis** (Analisi) > **Colour Compensation** (Compensazione del colore) e selezionare il sottoinsieme corretto, mostrato nella **Figura 11**.

**Figura 11. Analisi – Compensazione del colore**



Selezionare **Calculate** (Calcola) (**Figura 12**).

Figura 12. Calcolo e salvataggio dell'oggetto CC



Per ulteriori dettagli, consultare le Istruzioni per l'uso relative alla compensazione del colore di PlexPCR (IF-IV0001) per garantire la creazione corretta del file della compensazione del colore.

Selezionare **Save** (Salva)



### 19.3 Interpretazione dei risultati

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

Consultare la **Sezione 23** per istruzioni sull'utilizzo del software di analisi **ResistancePlus**<sup>®</sup> MG (LC480).

## 20 Allegato 2: Biosystems® 7500 Fast applicato

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

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

### 20.1 Programmazione di Applied Biosystems® 7500 Fast

Selezionare **Advanced Setup**(impostazioni avanzate)

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

Dare un nome all'esperimento

**Instrument** (strumento) > 7500 Fast (96 pozzetti)

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

**Reagents** (reagenti) > Other (altro)

**Ramp Speed (velocità di rampa)** > Standard

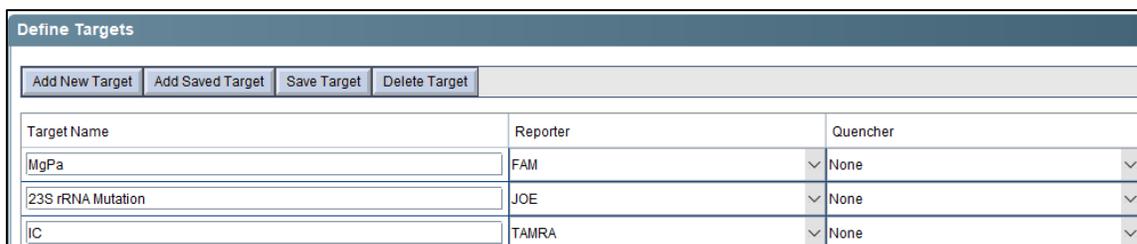
In **Setup** (Configurazione) > aprire **Plate Setup** (Configurazione piastra)

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

**Definire i target** come mostrato di seguito nella **Tabella 46** e nella **Figura 13** (definire i colori come richiesto)

Tabella 46. Definizione dei target		
Nome del target	Reporter	Quencher
MgPa	FAM	Nessuno
23S rRNA mutation	JOE	Nessuno
IC	TAMRA	Nessuno

Figura 13. Definizione dei target e dei campioni



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

**Definire i campioni** (definire i colori come richiesto)

Per attivare il rilevamento automatico del campione nel software di analisi, assicurarsi che il Target Name (Nome target) (mostrato nella **Tabella 46**) corrisponda al Target Instrument Reference (riferimento dello strumento target) definito nel menu **Lab Configuration** (Configurazione del laboratorio) > **Assays** (Dosaggi) del software di analisi

Inoltre, sarà necessario assegnare ai pozzetti sulla piastra le etichette identificative del campione

In **Setup** (Configurazione) > aprire **Plate Setup** (Configurazione piastra)

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

#### Definire i campioni

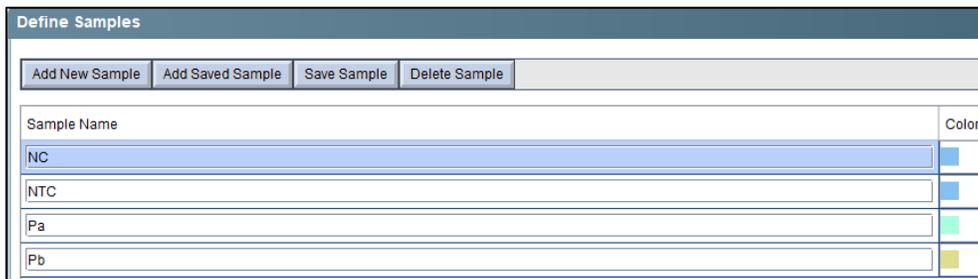
Modificare il **Sample Name** (Nome del campione) affinché corrisponda all'etichetta identificativa definita nel menu **Lab Configuration** (Configurazione del laboratorio) > **Assays** (Dosaggi) del software di analisi (**Sezione 23.3**)

I campioni devono essere etichettati con l'etichetta identificativa come prefisso. Per le reazioni di controllo sono fornite etichette identificative predefinite (come indicato nella **Tabella 47** e nella **Figura 14**). Il software di analisi consente di definire ulteriori etichette identificative, sia per i campioni normali sia per i controlli.

**Nota:** le etichette identificative del campione sono sensibili alle maiuscole e alle minuscole. L'etichetta identificativa deve corrispondere esattamente alle etichette assegnate nel file di esecuzione.

Tabella 47. Etichette identificative del campione per il software di analisi	
Tipo di campione	Prefisso predefinito (nel software di analisi)
Campione regolare	Nessun valore predefinito – Definito dall'utente
Controllo negativo	NC
Controllo senza template	NTC
Controllo positivo (MG, tipo mutante di 23S rRNA) (Pa)	Pa
Controllo positivo (MG, tipo selvaggio di 23S rRNA) (Pb)	Pb

**Figura 14. Editor del campione – Assegnazione delle etichette identificative ai pozzetti**



Sample Name	Color
NC	Blue
NTC	Blue
Pa	Green
Pb	Yellow

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

Selezionare i pozzetti e assegnare target e campioni ai pozzetti selezionati

Selezionare **Passive reference** (Riferimento passivo) > **None** (Nessuno)

In **Setup** (Configurazione) > aprire **Run Method** (Esegui metodo)

Impostare il **Reaction Volume Per Well** (Volume di reazione per pozzetto) > 20 µL

Creare il seguente programma nella **Tabella 48** (mostrato in dettaglio nella visualizzazione grafica (**Figura 15** e **Figura 16**) e nella visualizzazione tabellare (**Figura 17**).

Tabella 48. Programma Thermocycling (termociclaggio)				
Program Name (nome del programma)	Cycles (cicli)	Target °C	Hold (mantenimento)	Ramp (rampa)*
Polymerase activation (attivazione della polimerasi)	1	95°C	2 min	100%
Touch down cycling (cicli di touchdown): Step down (riduzione) -0,5°C/cycle <sup>⊖</sup>	10	95°C	5 s	100%
		61°C – 56.5°C <sup>⊖</sup>	30 s	100%
Quantification cycling (cicli di quantificazione) <sup>+</sup> : Acquisition/Detection (acquisizione/rilevamento)	40	95°C	5 s	100%
		52°C <sup>+</sup>	40 s	100%

\* Default ramp rate (velocità di rampa predefinita)

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

+ Collect data on hold (raccolta dati in attesa)

Figura 15. Metodo d'esecuzione – Graphical View (vista grafica)

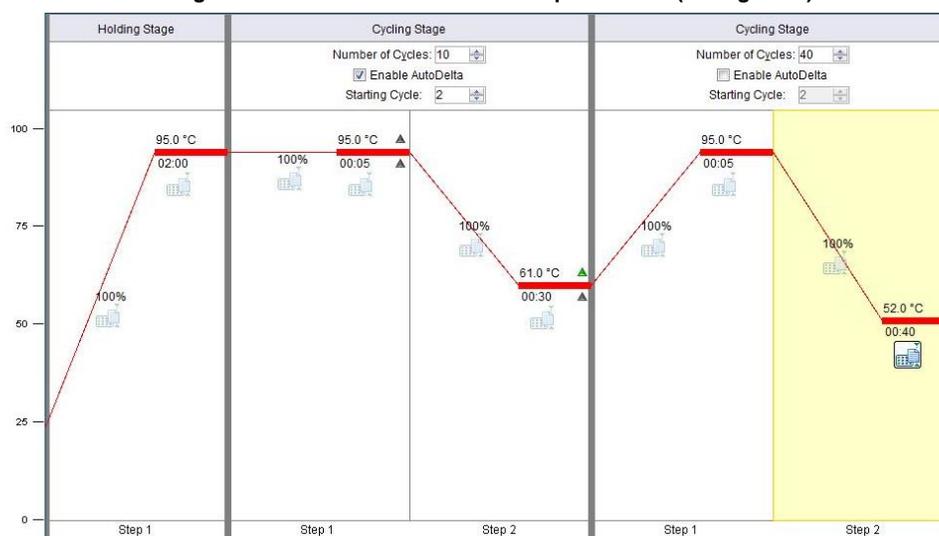
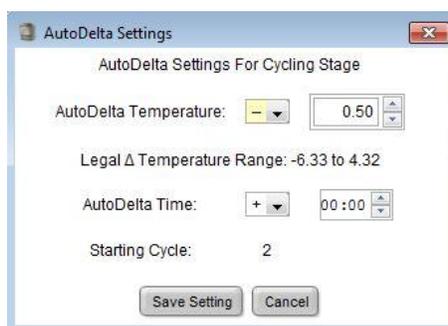


Figura 16. Metodo d'esecuzione – Graphical View (vista grafica) – Enable AutoDelta (abilita AutoDelta)



**Figura 17. Metodo d'esecuzione – Tabular View (vista tabulare)**

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

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

Selezionare **Start Run** (avvia analisi)

## 20.2 Interpretazione dei risultati

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

Consultare la **Sezione 23** per istruzioni sull'utilizzo del software di analisi **ResistancePlus**® MG (7500).

## 21 Allegato 3: Biosystems 7500 Fast Dx applicato

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

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

### 21.1 Programmazione dell'Applied Biosystems<sup>®</sup> 7500 Fast Dx

Selezionare Create New Document (crea nuovo documento)

Nel **New Document Wizard** (procedura guidata di creazione del nuovo documento), effettuare le seguenti selezioni (**Figura 18**).

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

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

**Template** (modello) > Blank document (documento vuoto)

**Run mode** (modalità di esecuzione) > Standard 7500

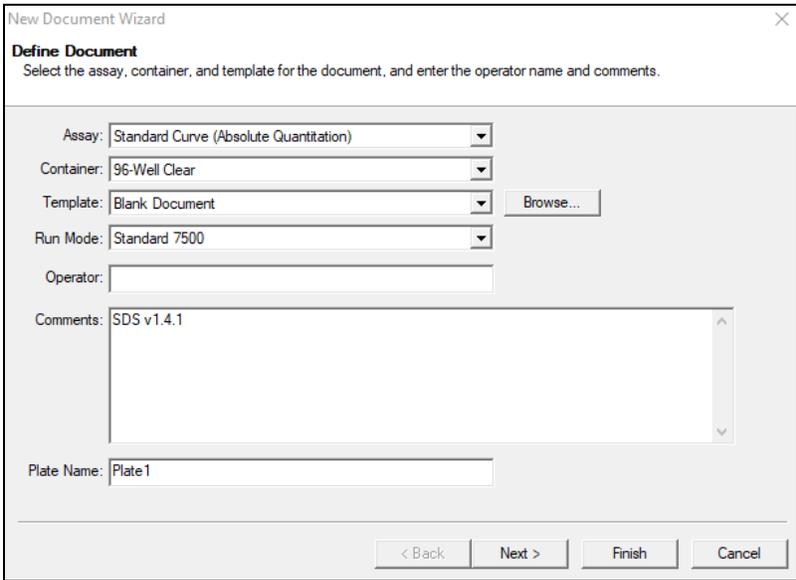
**Operator** (operatore) > Enter Operator's name (Inserire il nome dell'operatore)

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

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

Selezionare **Next** (avanti)

**Figura 18. Finestra della procedura guidata di creazione di un nuovo documento**



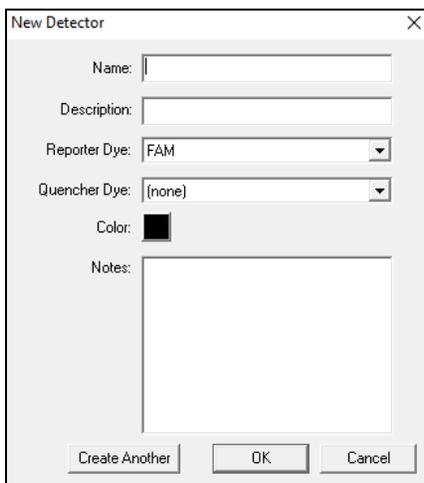
In **Select Detectors** (seleziona rilevatori) > selezionare **New Detector** (nuovo rilevatore)

Definire i rilevatori come indicato di seguito (definire i colori secondo la necessità) (**Tabella 49 e Figura 19**)

Tabella 49. Definizione dei rilevatori			
Rilevatori	Nome rilevatore	Colorante reporter	Quencher
Rilevatore 1	MgPa	FAM	Nessuno
Rilevatore 2	23S rRNA mutation	JOE	Nessuno
Rilevatore 3	IC	TAMRA	Nessuno

Selezionare **OK**

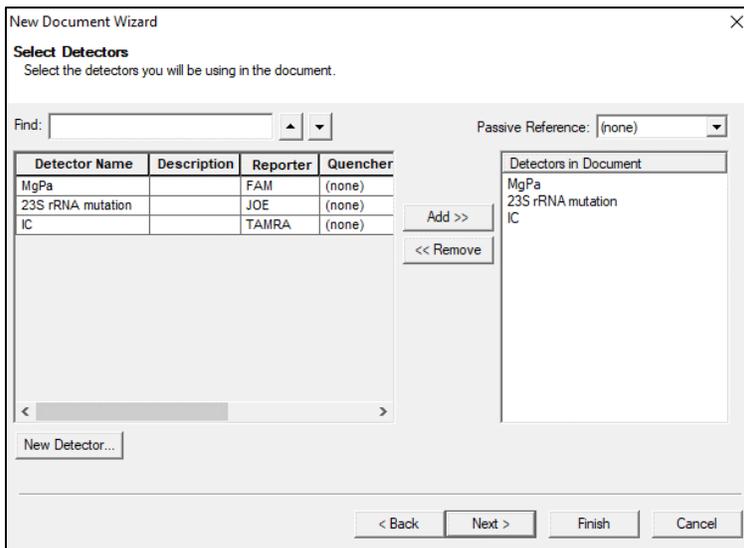
Figura 19. Finestra nuovo rilevatore


**Selezionare Detectors (rilevatori) (Figura 20)**

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

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

Figura 20. Finestra di selezione dei rilevatori



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

Detectors in Document
MgPa
23S rRNA mutation
IC

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

Selezionare i pozzetti e assegnare 3 rilevatori ai pozzetti selezionati

- MgPa
- 23S rRNA mutation
- IC

Selezionare **Next** (avanti)

Per attivare il rilevamento automatico del campione nel software di analisi, assicurarsi che il **Detector Name** (Nome del rilevatore) (mostrato nella **Tabella 49**) corrisponda al **Target Instrument Reference** (riferimento dello strumento target) definito nel menu **Lab Configuration** (Configurazione del laboratorio) > **Assays** (Dosaggi) del software di analisi

Inoltre, sarà necessario assegnare ai pozzetti sulla piastra le etichette identificative del campione

In **Setup** (Configurazione) > aprire **Plate Setup** (Configurazione piastra)

Modificare il **Sample Name** (Nome del campione) affinché corrisponda all'etichetta identificativa definita nel menu **Lab Configuration** (Configurazione del laboratorio) > **Assays** (Dosaggi) del software di analisi (vedere la **Sezione 23.3**)

I campioni devono essere etichettati con l'etichetta identificativa come prefisso. Per le reazioni di controllo sono fornite etichette identificative predefinite (come indicato nella **Tabella 50**). Il software di analisi consente di definire ulteriori etichette identificative, sia per i campioni normali sia per i controlli.

**Nota:** le etichette identificative del campione sono sensibili alle maiuscole e alle minuscole. L'etichetta identificativa deve corrispondere esattamente alle etichette assegnate nel file di esecuzione.

Tabella 50. Etichette identificative del campione per il software di analisi	
Tipo di campione	Prefisso predefinito_ (nel software di analisi)
Campione regolare	Nessun valore predefinito – Definito dall'utente
Controllo negativo	NC
Controllo senza template	NTC
Controllo positivo (MG, tipo mutante di 23S rRNA) (Pa)	Pa
Controllo positivo (MG, tipo selvaggio di 23S rRNA) (Pb)	Pb

Selezionare **Next** (avanti)

Nella scheda **Instrument** (strumento)

Nel riquadro **Settings** (impostazioni)

Per **Sample Volume** (volume del campione) ( $\mu\text{L}$ ): Inserire 20  $\mu\text{L}$

Creare il protocollo del termociclatore che segue (**Tabella 51** e **Figura 21** e **Figura 22**).

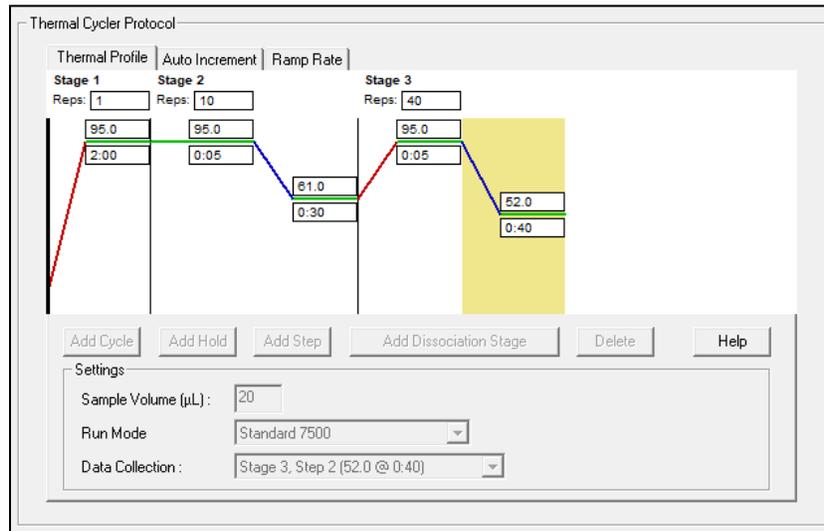
Tabella 51. Protocollo del termociclatore				
Program Name (nome del programma)	Cycles (cicli)	Target °C	Hold (mantenimento)	Ramp <sup>‡</sup>
Polymerase activation (attivazione della polimerasi)	1	95°C	2 min	100%
Touch down cycling (cicli di touchdown): Step down (riduzione) -0.5°C/ciclo <sup>§</sup>	10	95°C	5 s	100%
		61°C – 56.5°C <sup>§</sup>	30 s	100%
Quantification cycling (cicli di quantificazione)*: Acquisition/Detection (acquisizione/rilevamento)	40	95°C	5 s	100%
		52°C <sup>+</sup>	40 s	100%

<sup>‡</sup> Default ramp rate (velocità di rampa predefinita)

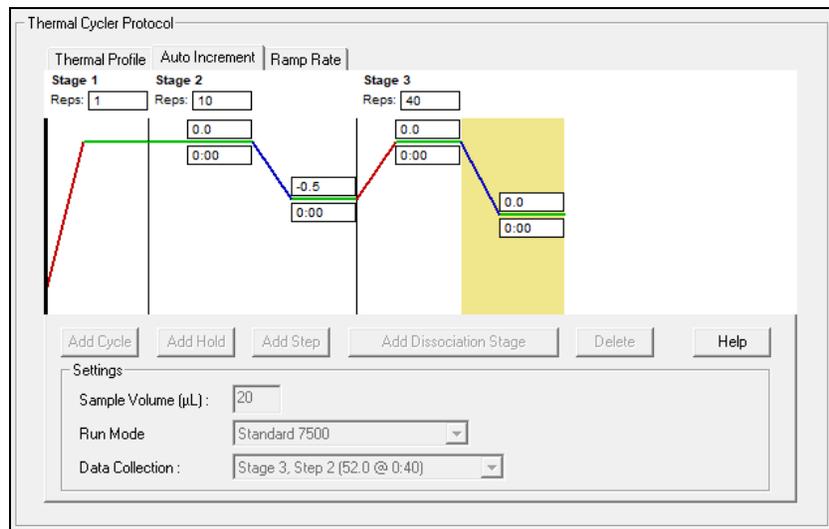
<sup>§</sup> Enable AutoDelta (Abilita AutoDelta): -0.5°C/ciclo

<sup>+</sup> Collect data on hold (raccolta dati in attesa)

**Figura 21. Protocollo del termociclatore – Profilo termico**



**Figura 22. Protocollo del termociclatore – Incremento automatico**



## 21.2 Interpretazione dei risultati

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

Consultare la **Sezione 23** per istruzioni sull'utilizzo del software di analisi **ResistancePlus**<sup>®</sup> MG (7500).

## 22 Allegato 4: sistema PCR real-time Bio-Rad CFX96™ Dx e CFX96 Touch™

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

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

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

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

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

Nel **Protocol Editor** (editor protocollo) (vedere **Figura 23**):

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

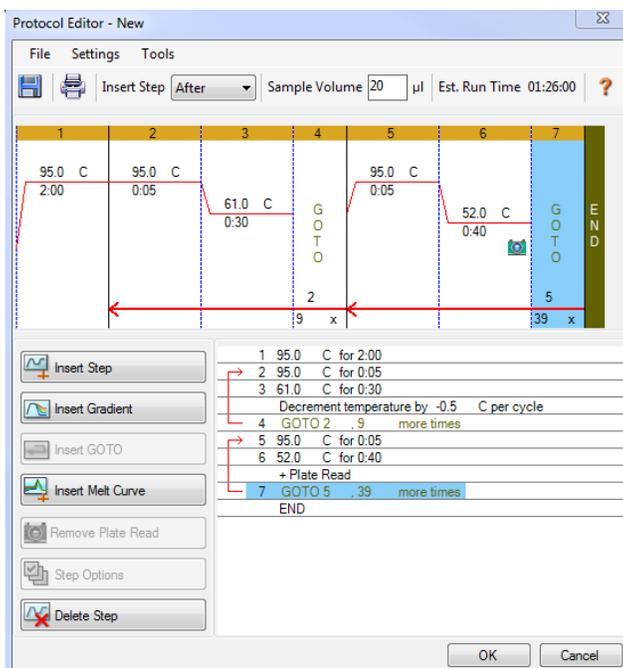
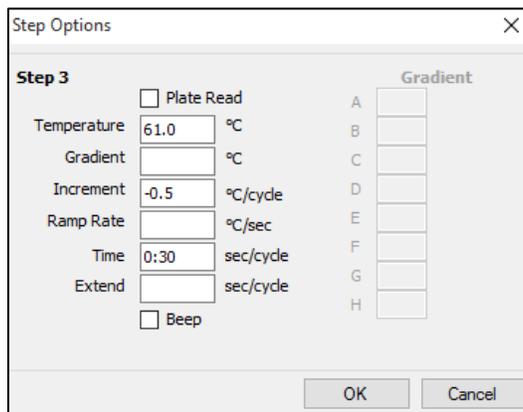
Creare il programma di termociclaggio seguente (Tabella 52) e salvarlo come '**SpeedX PCR**'. Questo protocollo potrà essere selezionato per analisi future.

Per i cicli di touchdown, selezionare la Fase 3 e **Step options** (Opzioni fase) > Increment (incremento): -0,5°C/ciclo (mostrato più dettagliatamente nella **Figura 24**).

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

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

<sup>+</sup> **Add Plate Read to Step** (Aggiungi lettura piastra a fase)

**Figura 23. Thermocycling Protocol (Protocollo di termociclaggio) - Graphical view (Visualizzazione grafica)**

**Figura 24. Step options (opzioni fase)**


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

- Plate Read
- Temperature: 61.0 °C
- Gradient: °C
- Increment: -0.5 °C/cycle
- Ramp Rate: °C/sec
- Time: 0:30 sec/cycle
- Extend: sec/cycle
- Beep

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

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

Selezionare **Create New** (crea nuova)

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

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

**Select Fluorophores** (Selezionare fluorofori) > FAM, HEX, Quasar 705 (vedere **Tabella 53**)

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

Salvare la piastra

Tabella 53. Canali per i target <i>ResistancePlus</i> <sup>®</sup> MG <sub>(675)</sub>		
MgPa	23S	IC
FAM	HEX	Quasar 705

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

Selezionare blocco

**Start Run (avvia analisi)**

Per attivare il rilevamento automatico del campione nel software di analisi, assicurarsi che il Target Name (Nome target) (mostrato nella **Tabella 53**) corrisponda al Target Instrument Reference (riferimento dello strumento target) definito nel menu **Lab Configuration** (Configurazione del laboratorio) > **Assays** (Dosaggi) del software di analisi

Inoltre, sarà necessario assegnare ai pozzetti sulla piastra le etichette identificative del campione

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

Selezionare il pozzetto

Modificare il **Sample Name** (Nome del campione) affinché corrisponda all'etichetta identificativa definita nel modulo **Lab Configuration** (Configurazione del laboratorio) > **Assays** (Dosaggi) del software di analisi (vedere la **Sezione 23.3**)

I campioni devono essere etichettati con l'etichetta identificativa come prefisso. Per le reazioni di controllo sono fornite etichette identificative predefinite (come indicato nella **Tabella 54** e nella **Figura 25**). Il software di analisi consente di definire ulteriori etichette identificative, sia per i campioni normali sia per i controlli.

**NOTA:** le etichette identificative del campione sono sensibili alle maiuscole e alle minuscole. L'etichetta identificativa deve corrispondere esattamente alle etichette assegnate nel file di esecuzione.

Tabella 54. Etichette identificative del campione per il software di analisi	
Tipo di campione	Prefisso predefinito_ (nel software di analisi)
Campione regolare	Nessun valore predefinito – Definito dall'utente
Controllo negativo	NC
Controllo senza template	NTC
Controllo positivo (MG, tipo mutante di 23S rRNA) (Pa)	Pa
Controllo positivo (MG, tipo selvaggio di 23S rRNA) (Pb)	Pb

Figura 25. Editor del campione – Assegnazione delle etichette identificative ai pozzetti

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

## 22.2 Interpretazione dei risultati

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

Consultare la **Sezione 23** per istruzioni sull'utilizzo del software di analisi **ResistancePlus®** MG (CFX).

## 23 Allegato A: interpretazione del risultato

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

Vedere la **Tabella 55** per il software di analisi idoneo per ciascuno strumento PCR in tempo reale. Il software di analisi è disponibile su richiesta. Per ulteriori informazioni contattare [tech@speedx.com.au](mailto:tech@speedx.com.au).

Tabella 55. Software di analisi <b>ResistancePlus</b> <sup>®</sup> MG		
N. di cat.	Software di analisi*	Strumento PCR in tempo reale
99003	<b>ResistancePlus</b> <sup>®</sup> MG (LC480)	LC480 II
99002	<b>ResistancePlus</b> <sup>®</sup> MG (7500)	7500 Fast e 7500 Fast Dx
99008	<b>ResistancePlus</b> <sup>®</sup> MG (CFX)	CFX96 Dx e CFX96 Touch

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

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

### 23.1 Piattaforma FastFinder – Requisiti IT minimi

Il software di analisi è disponibile nella piattaforma FastFinder (<https://www.ugentec.com/fastfinder/analysis>). Si raccomanda ai clienti di accedere alla piattaforma software da una rete e da un computer protetti e affidabili. Di seguito sono elencati i requisiti IT minimi per l'accesso e l'utilizzo della piattaforma FastFinder.

#### Requisiti hardware

Connessione a Internet: cavo o DSL

Risoluzione min. dello schermo: 1366 x 768 pixel, ottimale 1920 x 1080 pixel o superiore

#### Browser supportati

- Microsoft Edge 88 o più recente
- Firefox 83 o più recente
- Google Chrome 88 o più recente.

#### Requisiti del firewall

I seguenti host devono essere raggiungibili tramite HTTPS (porta 443):

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

- \*.powerbi.com
- \*.analysis.windows.net
- \*.pbidedicated.windows.net
- \*.content.powerapps.com

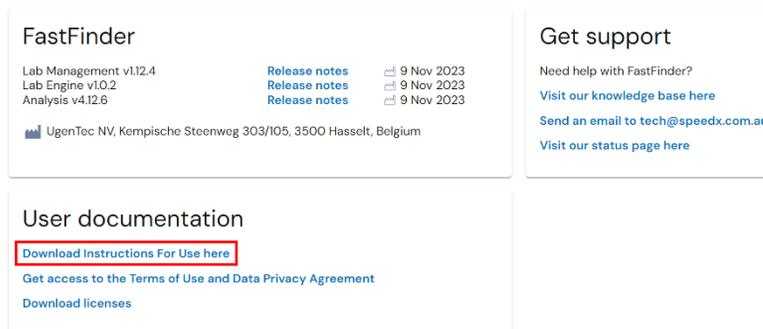
Se necessario, occorre configurare le eccezioni del firewall per questi host. Per poter accedere a tutti i contenuti delle guide utente in-app, è necessario che sia raggiungibile anche l'host \*.player.vimeo.com.

Per ulteriori istruzioni dettagliate sulla piattaforma **FastFinder**, consultare il documento **FastFinder Instructions For Use (Istruzioni per l'uso di FastFinder)** accessibili dal menu **Support** (Supporto).

Per accedere al menu **Support** (Supporto)

- Selezionare **Support** (Supporto) dall'elenco delle opzioni di menu sul pannello laterale sinistro
- Selezionare **Download Instructions For Use here** (Scarica Istruzioni per l'uso qui) nella sezione **User Documentation** (Documentazione utente)

### Support



### 23.2 Plug-in del dosaggio (nuovo utente)

Per istruzioni dettagliate sui modi per impostare i dosaggi, consultare il documento **FastFinder Instructions For Use** (Istruzioni per l'uso di FastFinder) accessibili dal menu **Support** (Supporto)

È possibile accedere a FastFinder direttamente tramite un browser Web effettuando l'accesso con il proprio nome utente e la propria password all'indirizzo <https://customer.fastfinder.app>.

- Selezionare **Lab Configuration** (Configurazione del laboratorio) > **Assays** (Dosaggi) nel menu a sinistra
- Selezionare **Add New Assay** (Aggiungi nuovo dosaggio)
  - > Per LC480 II > selezionare **ResistancePlus MG (LC480)** dall'elenco
  - > Per 7500 Fast e 7500 Fast Dx > selezionare **ResistancePlus MG (7500)** dall'elenco
  - > Per CFX96 Dx e CFX96 Touch > selezionare **ResistancePlus MG (CFX)** dall'elenco
- Selezionare **Import Selected** (Importa selezionati)

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

- > Nella scheda **General** (Generale)
- > Andare a **Status** (Stato)
- > Selezionare  **Active** per attivare o disattivare la versione del dosaggio

### 23.3 Denominazione del campione

È possibile assegnare etichette identificative dei campioni a un plug-in del dosaggio per automatizzare il rilevamento dei pozzetti e dei tipi di campione da analizzare.

Selezionare **Lab Configuration** (Configurazione del laboratorio) > **Assays** (Dosaggi) nel menu a sinistra

- Nella scheda **General** (Generale), andare alle etichette identificative della tabella **Sample types** (Tipi di campione) (prefisso), e selezionare  per aggiungere una nuova etichetta identificativa
  - > Aggiungere alla casella di testo la parola, l'acronimo o la lettera desiderati
  - > Sono previste etichette identificative predefinite per i controlli. Queste possono essere rimosse selezionando la  accanto all'etichetta identificativa
  
- Nel software dello strumento (prima o dopo il completamento dell'esecuzione) assegnare la stessa etichetta identificativa ai pozzetti appropriati
  - > Per **LC480 II** vedere la **Sezione 19** per le istruzioni sulla programmazione delle etichette identificative del campione nel file di esecuzione
  - > Per **7500 Fast** vedere la **Sezione 20** per le istruzioni sulla programmazione delle etichette identificative del campione nel file di esecuzione
  - > Per **7500 Fast Dx** vedere la **Sezione 21** per le istruzioni sulla programmazione delle etichette identificative del campione nel file di esecuzione
  - > Per **CFX96 Dx** e **CFX96 Touch** vedere la **Sezione 22** per le istruzioni sulla programmazione delle etichette identificative del campione nel file di esecuzione

**NOTA:** le etichette identificative del campione sono sensibili alle maiuscole e alle minuscole. L'etichetta identificativa deve corrispondere esattamente alle etichette assegnate nel file di esecuzione.

### 23.4 Analisi

Selezionare **Analyses** (Analisi) nel menu a sinistra per iniziare una nuova analisi

Selezionare **+ Create New Analysis** (+ Crea nuova analisi) dall'angolo superiore destro della schermata

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

- Selezionare il file di esecuzione (dati) dalla cartella pertinente
  - > Selezionare **Open** (Apri)

L'analisi apparirà nella scheda **Open** (Apri) come una nuova riga nella tabella

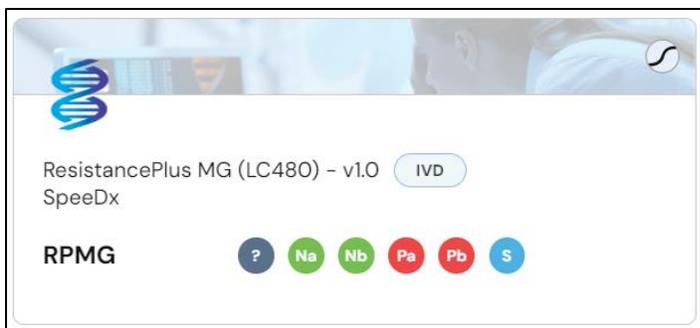
- Se tutte le etichette identificative sono state applicate e lette correttamente, lo stato apparirà come **Ready for review** (Pronto per la revisione)
- Se le informazioni del dosaggio devono essere assegnate manualmente ai pozzetti, lo stato apparirà come **Manual PCR setup required** (Necessaria configurazione manuale della PCR)

Assegnare manualmente le informazioni del dosaggio alla piastra se la denominazione del campione non è stata impostata nel menu **Lab Configuration** (Configurazione del laboratorio) > **Assays** (Dosaggi) o se i nomi/target dei campioni non sono stati applicati nel software dello strumento

Selezionare il file di esecuzione dalla scheda **Open** (Apri) nel menu **Analyses** (Analisi)

La configurazione della piastra apparirà nella scheda **PCR setup** (Configurazione PCR) per l'analisi aperta

- Per **LC480 II** > selezionare **ResistancePlus MG (LC480)**



- Per **7500 Fast** e **7500 Fast Dx** > selezionare **ResistancePlus MG (7500)**



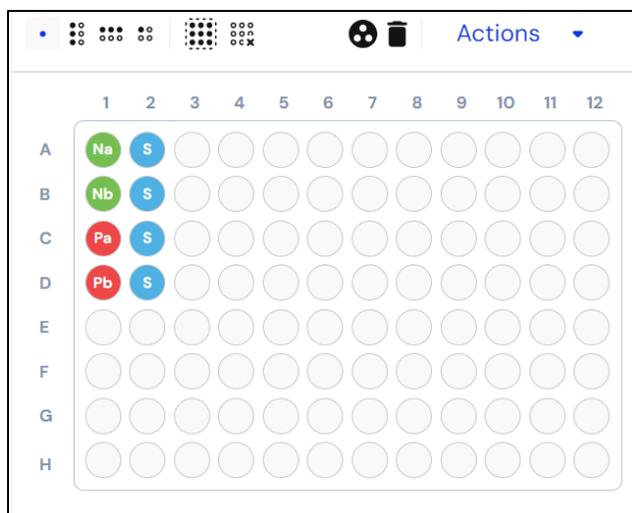
- Per **CFX96 Dx** e **CFX96 Touch** > selezionare **ResistancePlus MG (CFX)**



- Selezionare i pozzetti e assegnarli come:
  - > Campione regolare (S)
  - > Controllo negativo (Na)
  - > Controllo senza template (Nb)
  - > Controllo positivo (mutante di 23S rRNA MG) (Pa)
  - > Controllo positivo (MG, tipo selvaggio di 23S rRNA) (Pb)

Per assegnare i pozzetti sulla piastra:

- Fare clic e trascinare i simboli colorati per collocarli sulla piastra
- Selezionare uno o più pozzetti (utilizzare i tasti Ctrl e Maiusc), quindi fare clic sui simboli colorati pertinenti per assegnarli alla selezione.



- Selezionare **Analyze** (Analizza)

### 23.5 Risultati

Vedere la **Tabella 57** per un riepilogo dei possibili risultati del campione segnalati.

**NOTA:** si raccomanda vivamente di confermare le curve di amplificazione per tutti i campioni positivi.

#### 23.5.1 Scheda Summary (Riepilogo)

I risultati del controllo per ogni dosaggio sono mostrati in alto a sinistra nella scheda Summary (Riepilogo), che consente di analizzare la validità del controllo per l'esecuzione. Per maggiori dettagli, espandere questo blocco, visualizzando i dettagli per controllo.

Control Results Filters | ⚙️

	<input checked="" type="checkbox"/> Assay	Status	Info
<a href="#">See all assay details →</a>			
	<input checked="" type="checkbox"/> WT_MG	<input checked="" type="checkbox"/> Mut_MG	<input checked="" type="checkbox"/> NEG_MG
	VALID	VALID	VALID
M. genitalium	⊕ Detected	⊕ Detected	⊖ Not detected
23S rRNA mutation	⊖ Not detected	⊕ Detected	⊖ Not detected

Se un controllo è non valido, tutti i campioni possono essere contrassegnati come non riusciti selezionando **Fail all samples for this assay** (Rendi non riusciti tutti i campioni per questo dosaggio)

Fail all samples for this assay

Failure reason ▼

È necessario scegliere un motivo della mancata riuscita dal menu a discesa

I risultati del campione sono visualizzati in basso a sinistra nella scheda Summary (Riepilogo). Accanto all'intestazione, ulteriori icone possono fornire una panoramica di alto livello dei risultati dell'analisi, come pure indicare il numero totale di campioni corrispondenti a un'icona specifica.

	• 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

Ogni campione viene visualizzato come una riga nella tabella dei risultati del campione.

▼ Sample Results  1  4  1  1

Filters | 

		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

Il menu a discesa offre maggiori dettagli su ogni risultato e Cq target per campione (consultare gli esempi mostrati nella **Sezione 23.10**).

Se desiderato, è possibile contrassegnare i singoli campioni come non riusciti (ad es. se il campione è non valido) selezionando **Fail this sample for this assay** (Rendi non riusciti tutti i campioni per questo dosaggio)

Fail this sample for this assay

Failure reason ▼

È necessario scegliere un motivo della mancata riuscita dal menu a discesa

I grafici della fluorescenza possono essere visualizzati in alto a destra della scheda Summary (Riepilogo)

Un layout della piastra può essere visualizzato nella parte inferiore destra della scheda Summary (Riepilogo)

La **Tabella 56** di seguito riepiloga le informazioni di esempio e le notifiche di avvertenza.

Tabella 56. Informazioni di esempio e notifiche di avvertenza per il software di analisi ResistancePlus® MG*		
Tipo di campione	Errore	Notifica
<b>Notifiche target dosaggio</b>		
Campione regolare	Non valido – Errore IC	Avvertenza: IC non valido. Ripetere l'estrazione e rianalizzare il campione.
	Valido ma controllo non valido – Avvertenza di controllo non valido su un campione regolare con risultato valido	Avvertenza: presenza di un controllo non valido. Ripetere l'estrazione e rianalizzare il campione.
Controllo negativo	Non valido – Contaminazione	Avvertenza: possibile contaminazione rilevata.
Controllo senza template		
<b>Notifiche target genico</b>		
Campione regolare	Cq target fuori cut-off	Info: Cq fuori cut-off
Controllo positivo	Non valido – Target non rilevato	Avvertenza: non si è verificata la reazione prevista nel controllo.
Controllo negativo	Non valido – Contaminazione	Avvertenza: possibile contaminazione
	Non valido – IC non rilevato	Avvertenza: IC non rilevato
	Non valido – IC Cq fuori cut-off	Avvertenza: Cq fuori cut-off
Controllo senza template	Non valido – Contaminazione	Avvertenza: possibile contaminazione
Campione regolare o controllo	Segnale di fluorescenza incerto	Avvertenza: segnale di fluorescenza incerto. Revisione necessaria.
	Cq rilevato con bassa fluorescenza	Fluorescenza finale dRn sotto il cut-off

\*È possibile che gli esempi elencati qui non siano applicabili a tutti i plug-in del dosaggio. Per tutte le possibili notifiche, consultare le Istruzioni per l'uso di FastFinder, accessibili dal menu Support (Supporto)

### 23.5.2 Scheda Details (Dettagli)

Tutti i target sono mostrati per ogni campione come righe separate nella tabella sul lato sinistro. Selezionando una o più righe saranno visualizzate le curve della fluorescenza corrispondenti sul grafico in alto a destra e saranno inoltre evidenziati i pozzetti nel layout della piastra mostrata nella parte inferiore destra.

Selezionare **Filters** (Filtri) per visualizzare i risultati in base a parametri quali nome del dosaggio, tipo di campione, target e risultato.

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

- > Selezionare **Authorize** (Autorizza)
- > Selezionare di nuovo **Authorize** (Autorizza) per confermare
- Per assegnare una seconda revisione
  - > Selezionare **Actions** (Azioni), **Assign label** (Assegna etichetta) e **Second Review** (Seconda revisione)
- Per assegnare l'analisi a un utente diverso
  - > Selezionare **Actions** (Azioni) e **Assign User** (Assegna utente)
  - > Selezionare l'utente appropriato dall'elenco a discesa
- Per rifiutare l'analisi
  - > Selezionare **Actions** (Azioni) e **Discard Analysis** (Scarta analisi)
  - > Aggiungere un commento e selezionare **Discard** (Scarta) per confermare

### 23.6 Curva di riferimento

È possibile salvare e utilizzare una curva di riferimento per confrontare i campioni sulla stessa piastra o su piastre diverse

- Selezionare il campione di interesse nella scheda **Summary** (Riepilogo) o **Details** (Dettagli)
- Dal menu relativo al grafico dell'amplificazione > selezionare 
  - > Selezionare la casella di controllo per la curva di interesse e selezionare **Mark as reference** (Contrassegna come riferimento)

Questa curva di riferimento apparirà ora collegata al dosaggio nel menu **Lab Configuration** (Configurazione del laboratorio) > **Assays** (Dosaggi) nella scheda **PCR** e può essere disattivata in qualsiasi momento.

### 23.7 Esportazione dei risultati

- Per esportare i risultati da un'esecuzione individuale autorizzata come file CSV o PDF:
  - > Selezionare **Actions** (Azioni) > **Downloads** (Download) nell'angolo superiore destro
  - > Selezionare uno dei seguenti tipi di rapporti: **Analysis** (Analisi) (**CSV**) o **Analysis** (Analisi) (**PDF**)
- Per esportare i risultati di più esecuzioni già autorizzate come un unico file CSV:
  - > Andare al menu **Archive** (Archivio) > **Sample Results** (Risultati del campione)
  - > Utilizzare i filtri sulla parte superiore della pagina per visualizzare i risultati di interesse (il file CSV è limitato a un massimo di 10.000 risultati)
  - > Selezionare **Export CSV** (Esporta CSV) nell'angolo superiore destro

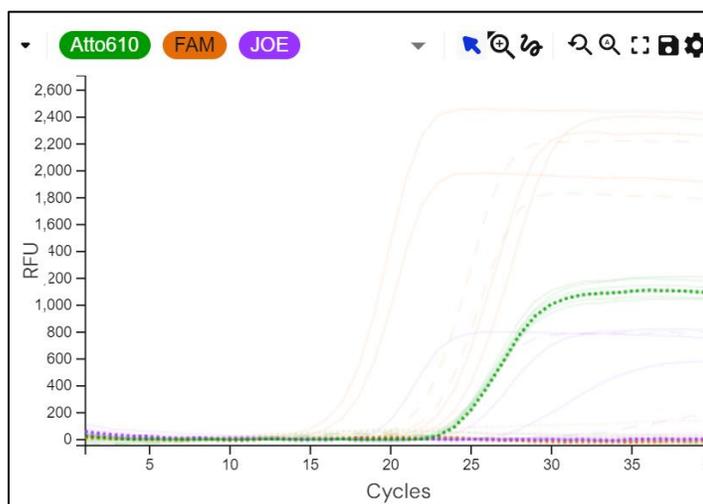
### 23.8 Recupero delle analisi autorizzate

- Tutte le analisi autorizzate sono disponibili selezionando **Archive** (Archivio) > **Sample Results** (Risultati del campione). Selezionare una riga per tornare alla panoramica dei risultati per quella particolare analisi
- Tutti i campioni regolari autorizzati sono archiviati nel menu **Archive** (Archivio) > **Sample Results** (Risultati del campione). Selezionando un campione saranno visualizzate informazioni aggiuntive tra cui il nome dell'analisi e i dettagli del risultato
- I risultati target individuali per tutti i campioni regolari e i controlli autorizzati sono memorizzati nel menu **Archive** (Archivio) > **Target Results** (Risultati target). Selezionando un target questo sarà evidenziato nel grafico della fluorescenza. Selezionando il nome dell'analisi si tornerà alla panoramica dei risultati per quella particolare analisi.

### 23.9 Grafici di esempio del controllo

Gli esempi seguenti mostrano le curve di amplificazione (curve di amplificazione corrette per il basale) e la panoramica dei risultati dal software di analisi **ResistancePlus MG (LC480)** per le tipologie di campione di controllo.

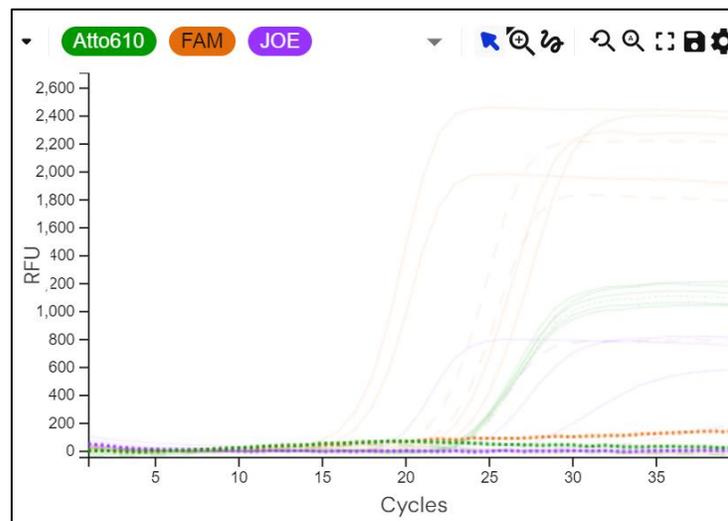
#### 23.9.1 Controllo negativo per *M. genitalium* (Na) (campione negativo)



IC MgPa mutazione di 23S rRNA

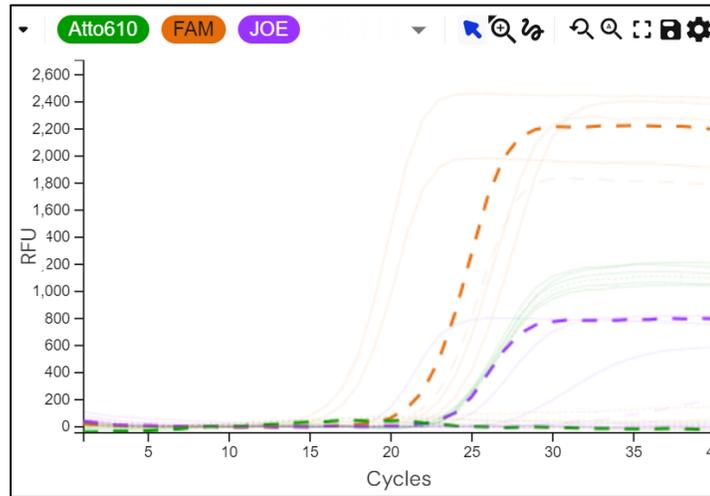
Campione	Dosaggio	Risultato
Na	ResistancePlus MG (LC480)	<b>Valido</b>
<p>M. genitalium  Not detected</p> <p>23S rRNA mutation  Not detected</p>		

### 23.9.2 Controllo senza template (Nb)



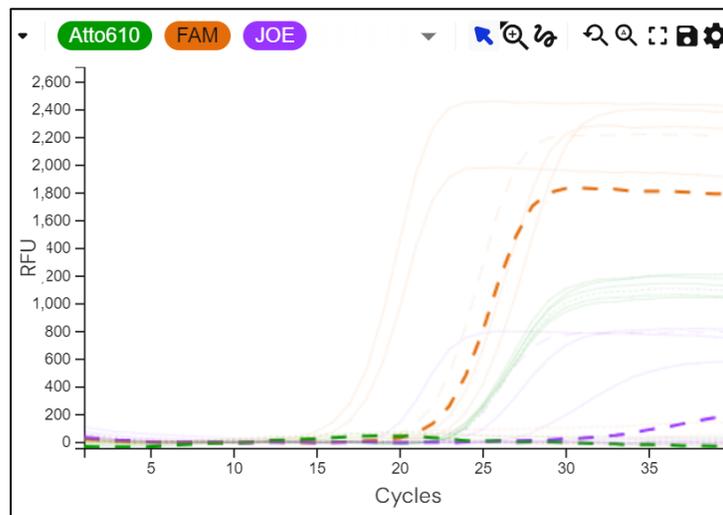
**IC MgPa mutazione di 23S rRNA**

Campione	Dosaggio	Risultato
Nb	ResistancePlus MG (LC480)	<b>Valido</b>
<p>M. genitalium  Not detected</p> <p>23S rRNA mutation  Not detected</p>		

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


IC MgPa mutazione di 23S rRNA

Campione	Dosaggio	Risultato
Pa	ResistancePlus MG (LC480)	<b>Valido</b>
M. genitalium ⊕ Detected  23S rRNA mutation ⊕ Detected		

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


IC MgPa mutazione di 23S rRNA

Campione	Dosaggio	Risultato
Pb	ResistancePlus MG (LC480)	<b>Valido</b>
<p>M. genitalium  Detected</p> <p>23S rRNA mutation  Not detected</p>		

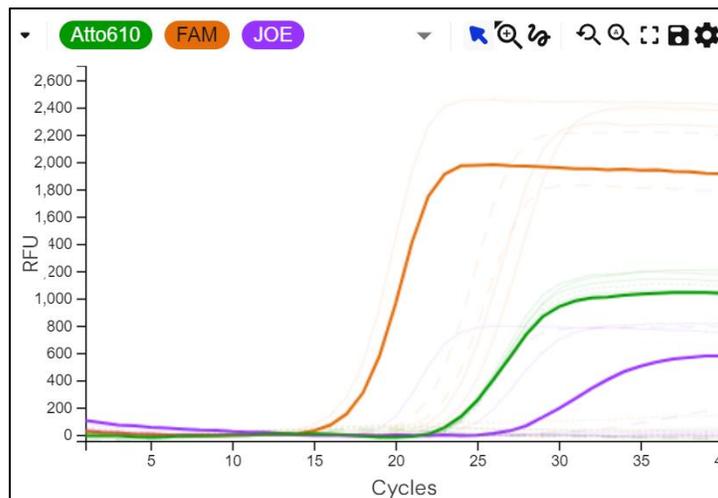
### 23.10 Esempi

I risultati di esempio per il software di analisi **ResistancePlus**® MG sono mostrati nella **Tabella 57**.

Tabella 57. Risultati di esempio per l'interpretazione del software di analisi ResistancePlus® MG			
Campione	Dosaggio	Risultato	
Campione 101	ResistancePlus MG (LC480)	<b>Non rilevato</b>	
Campione 102	ResistancePlus MG (LC480)	<b>Rilevato: M. genitalium</b>	
Campione 103	ResistancePlus MG (LC480)	<b>Rilevato: M. genitalium, mutazione di 23S rRNA</b>	
<sup>1</sup> Campione 104	ResistancePlus MG (LC480)	<b>Non valido: M. genitalium, mutazione di 23S rRNA</b>	

<sup>1</sup> Un campione interpretato come non valido sarà contrassegnato con  Avvertenza: IC non valido. Ripetere l'estrazione e rianalizzare il campione.

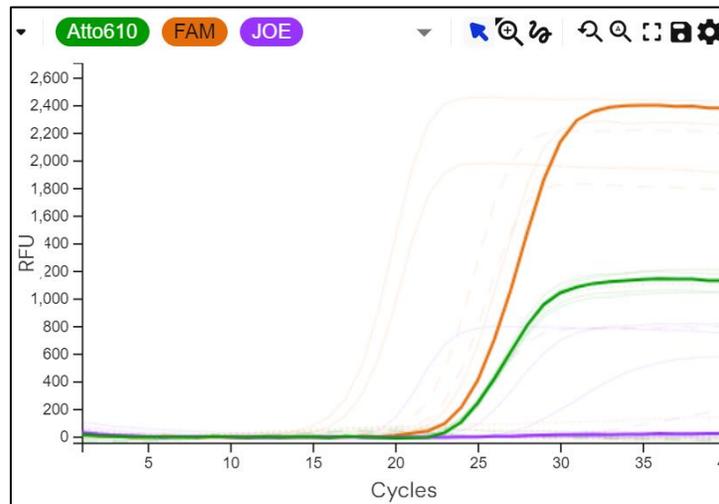
#### 23.10.1 Esempio 1. Alto numero di copie di *M. genitalium*, campione di tipo selvaggio di 23S rRNA



IC MgPa mutazione di 23S rRNA

Campione	Dosaggio	Risultato
Campione 105	ResistancePlus MG (LC480)	<b>Rilevato: M. genitalium</b>
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p><b>Assay results</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>M. genitalium <span style="color: red;">⊕ Detected</span></li> <li>23S rRNA mut... <span style="color: green;">⊖ Not detected</span></li> </ul> </div> <div style="width: 50%;"> <p>MgPa</p> <p>↳ A2 <span style="color: red;">● Detected</span> 17.451</p> <hr/> <p>23S rRNA mutation</p> <p>↳ A2 <span style="color: red;">● Detected</span> 27.229</p> <hr/> <p>IC</p> <p>↳ A2 <span style="color: red;">● Detected</span> 23.307</p> </div> </div>		

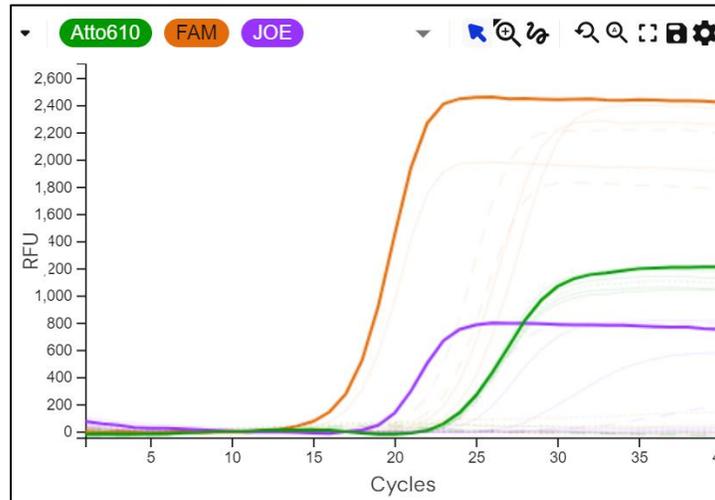
### 23.10.2 Esempio 2. Basso numero di copie di *M. genitalium*, campione di tipo selvaggio di 23S rRNA



IC MgPa mutazione di 23S rRNA

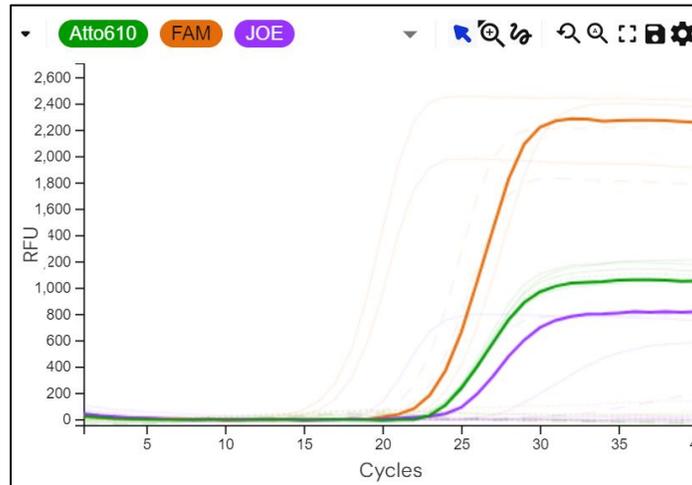
Campione	Dosaggio	Risultato				
Campione 106	ResistancePlus MG (LC480)	Rilevato: <i>M. genitalium</i>				
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p><b>Assay results</b></p> <table border="1"> <tr> <td><i>M. genitalium</i></td> <td>⊕ Detected</td> </tr> <tr> <td>23S rRNA mut...</td> <td>⊖ Not detected</td> </tr> </table> </div> <div style="width: 50%;"> <p>MgPa</p> <p>↳ F2 <span style="color: red;">●</span> Detected <span style="float: right;">24.094</span></p> <hr/> <p>23S rRNA mutation</p> <p>↳ F2 <span style="color: green;">●</span> Not detected</p> <hr/> <p>IC</p> <p>↳ F2 <span style="color: red;">●</span> Detected <span style="float: right;">23.587</span></p> </div> </div>			<i>M. genitalium</i>	⊕ Detected	23S rRNA mut...	⊖ Not detected
<i>M. genitalium</i>	⊕ Detected					
23S rRNA mut...	⊖ Not detected					

### 23.10.3 Esempio 3. Alto numero di copie di *M. genitalium*, campione di mutante di 23S rRNA



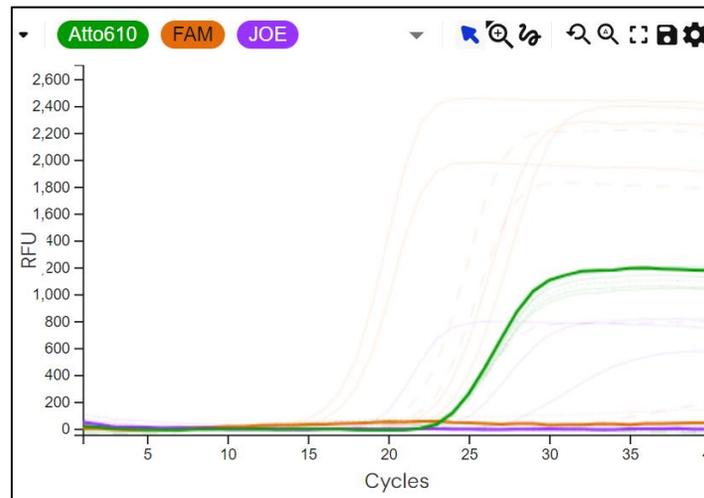
IC MgPa mutazione di 23S rRNA

Campione	Dosaggio	Risultato				
Campione 107	ResistancePlus MG (LC480)	<b>Rilevato:</b> <i>M. genitalium</i> , mutazione di 23S rRNA				
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p><b>Assay results</b></p> <table border="1"> <tr> <td><i>M. genitalium</i></td> <td>⊕ Detected</td> </tr> <tr> <td>23S rRNA mut...</td> <td>⊕ Detected</td> </tr> </table> </div> <div style="width: 50%;"> <p>MgPa</p> <p>↳ D2 <span style="color: red;">●</span> Detected <span style="float: right;">16.767</span></p> <hr/> <p>23S rRNA mutation</p> <p>↳ D2 <span style="color: red;">●</span> Detected <span style="float: right;">19.125</span></p> <hr/> <p>IC</p> <p>↳ D2 <span style="color: red;">●</span> Detected <span style="float: right;">23.421</span></p> </div> </div>			<i>M. genitalium</i>	⊕ Detected	23S rRNA mut...	⊕ Detected
<i>M. genitalium</i>	⊕ Detected					
23S rRNA mut...	⊕ Detected					

23.10.4 Esempio 4. Basso numero di copie di *M. genitalium*, campione di mutante di 23S rRNA


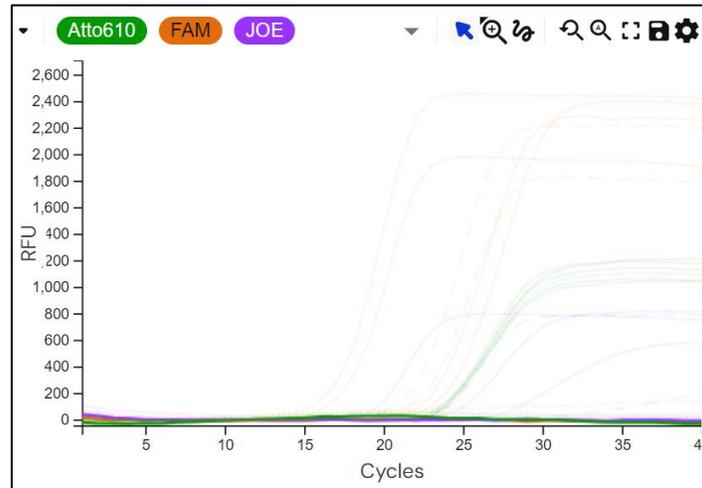
IC MgPa mutazione di 23S rRNA

Campione	Dosaggio	Risultato				
Campione 108	ResistancePlus MG (LC480)	<b>Rilevato:</b> <i>M. genitalium</i> , mutazione di 23S rRNA				
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p><b>Assay results</b></p> <table border="1"> <tr> <td><i>M. genitalium</i></td> <td>⊕ Detected</td> </tr> <tr> <td>23S rRNA mut...</td> <td>⊕ Detected</td> </tr> </table> </div> <div style="width: 50%;"> <p>MgPa</p> <p>↳ C2 <span style="color: red;">● Detected</span> 23.191</p> <hr/> <p>23S rRNA mutation</p> <p>↳ C2 <span style="color: red;">● Detected</span> 24.539</p> <hr/> <p>IC</p> <p>↳ C2 <span style="color: red;">● Detected</span> 23.528</p> </div> </div>			<i>M. genitalium</i>	⊕ Detected	23S rRNA mut...	⊕ Detected
<i>M. genitalium</i>	⊕ Detected					
23S rRNA mut...	⊕ Detected					

23.10.5 Esempio 5. Campione negativo

IC MgPa mutazione di 23S rRNA

Campione	Dosaggio	Risultato
Campione 109	ResistancePlus MG (LC480)	Non rilevato
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p><b>Assay results</b></p> <p>M. genitalium <span style="color: green;">⊖</span> Not detected</p> <p>23S rRNA mut... <span style="color: green;">⊖</span> Not detected</p> </div> <div style="width: 50%;"> <p>MgPa</p> <p>↳ E2 <span style="color: green;">●</span> Not detected</p> <hr/> <p>23S rRNA mutation</p> <p>↳ E2 <span style="color: green;">●</span> Not detected</p> <hr/> <p>IC</p> <p>↳ E2 <span style="color: red;">●</span> Detected <span style="border: 1px solid gray; padding: 2px;">23,583</span></p> </div> </div>		

23.10.6 Esempio 6. Campione non valido

IC MgPa mutazione di 23S rRNA

Campione	Dosaggio	Risultato
Campione 110	ResistancePlus MG (LC480)	<b>Non valido:</b> M. genitalium, mutazione di 23S rRNA

**Assay results**

M. genitalium	<span style="color: orange;">⚠ Invalid</span>	Warning: IC invalid. Re-extract and re-test sample.
23S rRNA mut...	<span style="color: orange;">⚠ Invalid</span>	Warning: IC invalid. Re-extract and re-test sample.

MgPa

↳ B2 ● Not detected ▾

---

23S rRNA mutation

↳ B2 ● Not detected ▾

---

IC

↳ B2 ● Not detected ▾

In questo esempio, IC non è stato amplificato e quindi non è stato rilevato. Per i campioni IC non validi, estrarre nuovamente il campione e ripetere il test.

## 24 Glossario



Conformità europea  
Per uso diagnostico *In Vitro*



Numero di catalogo



Codice del lotto



Rappresentante autorizzato  
Nella Comunità Europea



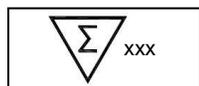
Produttore



Data di produzione



Limitazione di temperatura



Contenuto sufficiente per  
xxx determinazioni



Utilizzare entro il



Importatore Europeo



Marchio Valutazione di  
Conformità del Regno Unito

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

**PlexPCR**<sup>®</sup>, **ResistancePlus**<sup>®</sup>, **PlexPrime**<sup>®</sup> e **PlexZyme**<sup>®</sup> sono marchi di fabbrica appartenenti a SpeedX. Altri marchi di fabbrica e copyright sono di proprietà dei rispettivi titolari.

© Copyright 2025 SpeedX Pty. Ltd.