



## ResistancePlus<sup>®</sup> MG

**Ensayo multiplex de PCR en tiempo real para la identificación del *Mycoplasma genitalium* y la detección de mutaciones asociadas a la resistencia a la azitromicina**



IVDR Certified

Producto	Plataforma	Tamaño (reacciones)	N.º de catálogo
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

### Productos complementarios – Software de análisis

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 La haya  
Los países bajos



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

### SOLO PARA USO PROFESIONAL

No destinado a comercialización en EE. UU.

## Contenido

1	Descripción del producto.....	5
2	Uso previsto.....	5
3	Información sobre el patógeno.....	5
4	Contenido del kit.....	6
5	Envío y almacenamiento.....	7
6	Advertencias y precauciones.....	8
6.1	General.....	8
6.2	Laboratorio.....	8
6.3	Manipulación de las muestras.....	8
6.4	Ensayo.....	8
6.5	Precauciones de seguridad.....	8
6.6	Plugins de ensayo: Advertencias/Precauciones/Limitaciones.....	8
7	Productos asociados y consumibles.....	9
8	Principio de la tecnología.....	11
9	Presentación del procedimiento.....	13
10	Procedimiento detallado.....	14
10.1	Recogida de muestras, transporte y almacenamiento.....	14
10.1.1	Dispositivos de recogida de muestras validados.....	14
10.1.2	Recogida, transporte y almacenamiento de orina limpia.....	14
10.1.3	Recogida de muestras, transporte y almacenamiento de hisopos secos.....	14
10.1.4	Kit de recogida de muestras Multi-Collect (Abbott, n.º de cat. 9K12-01), transporte y almacenamiento.....	14
10.1.5	Recogida, transporte y almacenamiento con el kit de recogida de orina Aptima® (Hologic, n.º de cat. 301040).....	15
10.1.6	Kit de recogida, transporte y almacenamiento de muestras con hisopo Aptima® Multitest (Hologic, n.º de cat. PRD-03546).....	15
10.1.7	Recogida, transporte y almacenamiento con DeltaSwab ViCUM® 2 mL + hisopo flocado estándar (deltalab, n.º de cat. 304278).....	16
10.1.8	Recogida de orina Vacumed® sin conservante (FL medical, n.º de cat. 44950), transporte y almacenamiento.....	16
10.1.9	Recogida, transporte y almacenamiento con Regular FLOQSwab™ en 1 mL de medio UTM™ (Copan n.º de cat. 359C).....	16
10.1.10	Recogida, transporte y almacenamiento en medio cobas® PCR (Roche, n.º de cat. 06466281190).....	16
10.1.11	Extractos de muestras validados.....	17
10.2	Procesamiento de muestras.....	17
10.3	Control interno (CI).....	17
10.3.1	Control interno en el MagNA Pure 96.....	18
10.3.2	Control interno en el MICROLAB STARlet IVD.....	18
10.3.3	Control interno en el QIASymphony® SP.....	18
10.3.4	Control interno en el easyMAG®.....	19
10.4	Preparación de la PCR en tiempo real.....	20
10.4.1	Preparación de la mezcla maestra.....	20
10.4.2	Estabilidad de la Mezcla maestra.....	20
11	Programación y análisis.....	21
12	Interpretación de los resultados.....	21
13	Limitaciones.....	22
14	Control de calidad.....	23

15	Instrucciones de <i>ResistancePlus</i> <sup>®</sup> MG Positive Control.....	23
15.1	Instrucciones de uso .....	23
16	Características de análisis .....	24
16.1	Rendimiento clínico.....	24
16.1.1	Estudio clínico 1 .....	24
16.1.2	Estudio clínico 2 .....	26
16.1.3	Estudio clínico 3 .....	26
16.1.4	Estudio clínico 4 .....	28
16.1.5	Estudio clínico 5 .....	30
16.1.6	Estudio clínico 6 .....	31
16.1.7	Estudio clínico 7 .....	32
16.2	Rendimiento analítico.....	33
16.2.1	Reproducibilidad y repetibilidad .....	33
16.2.2	Sensibilidad analítica .....	36
16.2.3	Especificidad analítica .....	36
16.2.4	Sustancias potencialmente interferentes .....	37
16.2.5	Reactividad cruzada con otras mutaciones del ARNr 23S .....	39
17	Atención al cliente y asistencia técnica .....	39
18	Referencias.....	40
19	Anexo 1: LightCycler <sup>®</sup> 480 Instrumento II .....	41
19.1	Programación del LightCycler <sup>®</sup> 480 Instrumento II (LC480 II) .....	41
19.2	Compensación de color para LightCycler <sup>®</sup> 480 Instrumento II .....	46
19.3	Interpretación de los resultados.....	48
20	Anexo 2: Applied Biosystems <sup>®</sup> 7500 Fast.....	49
20.1	Programación del Applied Biosystems <sup>®</sup> 7500 Fast .....	49
20.2	Interpretación de los resultados.....	52
21	Anexo 3: Applied Biosystems 7500 Fast Dx .....	53
21.1	Programación del Applied Biosystems <sup>®</sup> 7500 Fast Dx .....	53
21.2	Interpretación de los resultados.....	56
22	Anexo 4: Sistema de RCP en tiempo real Bio-Rad CFX96 <sup>™</sup> Dx y CFX96 Touch <sup>™</sup> .....	57
22.1	Programación del CFX96 <sup>™</sup> Dx y CFX96 Touch <sup>™</sup> Real-time PCR System .....	57
22.2	Interpretación de los resultados.....	59
23	Anexo A: Interpretación de resultados.....	60
23.1	Plataforma FastFinder: Requisitos mínimos de TI .....	60
23.2	Plug-in del ensayo (nuevos usuarios) .....	61
23.3	Nombre de la muestra .....	62
23.4	Análisis.....	62
23.5	Resultados .....	64
23.5.1	Pestaña de resumen .....	64
23.5.2	Pestaña de información .....	66
23.6	Curva de referencia.....	67
23.7	Exportación de resultados .....	67
23.8	Recuperación de análisis autorizados .....	67

23.9	Gráficos del ejemplo de control .....	67
23.9.1	Control negativo de <i>M. genitalium</i> (Na) (muestra negativa).....	68
23.9.2	Sin control de plantilla (Nb).....	69
23.9.3	<i>M. genitalium</i> , control mutante de 23S ARNr (Pa).....	70
23.9.4	<i>M. genitalium</i> , control de cepa natural de 23S ARNr (Pb) .....	70
23.10	Ejemplos .....	71
23.10.1	Ejemplo 1. Copia alta de <i>M. genitalium</i> , 23S ARNr de cepa natural .....	71
23.10.2	Ejemplo 2. Copia baja de <i>M. genitalium</i> , 23S ARNr de cepa natural.....	72
23.10.3	Ejemplo 3. Copia alta de <i>M. genitalium</i> , muestra mutante de 23S .....	73
23.10.4	Ejemplo 4. Copia baja de <i>M. genitalium</i> , cepa natural de 23S ARNr.....	74
23.10.5	Ejemplo 5. Muestra negativa .....	75
23.10.6	Ejemplo 6. Muestra no válida.....	76
24	Glosario .....	77

## 1 Descripción del producto

El kit **ResistancePlus**<sup>®</sup> MG detecta simultáneamente *M. genitalium* y 4 mutaciones en las posiciones 2058 y 2059 del gen ARN 23S (numeración de *E. coli*) que están asociadas con resistencia a la azitromicina (antibiótico de tipo macrólido). El kit **ResistancePlus**<sup>®</sup> MG es una PCR multiplexada en tiempo real en un único pocillo que consiste en 3 lecturas. La Lectura 1 indica la presencia o ausencia de *M. genitalium* mediante la detección del gen MgPa; la Lectura 2 indica la presencia de una mutación A2058G, A2059G A2058T o A2058C en el gen ARN 23S; y la Lectura 3 es un control interno para supervisar la eficiencia de extracción y la inhibición de qPCR. El kit **ResistancePlus**<sup>®</sup> MG utiliza **PlexZyme**<sup>®</sup> y **PlexPrime**<sup>®</sup> para conseguir una especificidad y capacidad de multiplexación superiores. El ensayo se ha validado en muestras extraídas utilizando los equipos MagNA Pure 96 System (Roche), MICROLAB STARlet IVD (Hamilton), QIASymphony<sup>®</sup> SP (QIAGEN), NUCLISENS<sup>®</sup> easyMAG<sup>®</sup> (Biomérieux) y la detección en tiempo real en los equipos Roche LightCycler<sup>®</sup> 480 Instrument II (LC480 II), Applied Biosystems<sup>®</sup> 7500 Fast (7500 Fast), Applied Biosystems<sup>®</sup> 7500 Fast Dx (7500 Fast Dx) y Bio-Rad CFX96<sup>™</sup> Dx (CFX96 Dx) y CFX96 Touch<sup>™</sup> (CFX96 Touch) Real-time PCR Detection Systems.

## 2 Uso previsto

El kit **ResistancePlus**<sup>®</sup> MG es una prueba de PCR cualitativa multiplexada para el diagnóstico *in vitro* en tiempo real destinada a la identificación de *M. genitalium* y la detección de 4 mutaciones en el gen ARN 23S (A2058G, A2059G, A2058T y A2058C, numeración de *Escherichia coli*) que están asociadas con la resistencia a la azitromicina (antibiótico macrólido). Su uso previsto es ayudar en el diagnóstico de *M. genitalium* y detectar mutaciones asociadas con la resistencia a la azitromicina en *M. genitalium*. Se debe usar junto con datos clínicos y otra información de laboratorio.

El kit **ResistancePlus**<sup>®</sup> MG se puede utilizar con los siguientes tipos de muestras: orina masculina y femenina e hisopados vaginales, de pacientes sintomáticos y asintomáticos.

Los resultados negativos no excluyen infecciones por *M. genitalium* y no proporcionan confirmación de la susceptibilidad a azitromicina, ya que puede haber otros mecanismos para el fracaso del tratamiento.

El kit **ResistancePlus**<sup>®</sup> MG está diseñado para utilizarse en entornos profesionales como hospitales o laboratorios tanto de referencia como estatales. No está diseñado para utilizarse en autopruebas, uso doméstico ni en el punto de atención sanitaria.

## 3 Información sobre el patógeno

*M. genitalium* es una pequeña bacteria que se encuentra en el tracto urogenital humano. Se ha asociado con una diversidad de infecciones de transmisión sexual (ITS). En varones, es la segunda causa más frecuente de uretritis no gonocócica (UNG) y también está asociada a la prostatitis, epididimitis y balanopostitis, e inflamación del glande, pene y prepucio <sup>1</sup>. En mujeres, se ha asociado con cervicitis, enfermedad inflamatoria pélvica (EIP), incluida la endometritis (inflamación del revestimiento endometrial) y salpingitis (inflamación de las trompas de Falopio) <sup>1,2,3</sup>.

La azitromicina se usa comúnmente para el tratamiento de *M. genitalium* y para el manejo sintomático de ITS tales como la UNG y la cervicitis. La azitromicina pertenece a la clase de antibióticos macrólidos y actúa uniéndose al ARNr 23S para inhibir la síntesis de proteínas. Algunas mutaciones puntuales en el gen ARN 23S de *M. genitalium*, A2058G, A2059G, A2058T, A2058C y A2059C (numeración de *E. coli*) se han asociado con el fracaso del tratamiento y/o resistencia *in vitro* a azitromicina <sup>4,5</sup>. Las mutaciones más frecuentes son A2058G y A2059G, que suponen un 89 % de las mutaciones de resistencia a los macrólidos, según un estudio reciente <sup>6</sup>.

#### 4 Contenido del kit

Tabla 1. Contenido de los kits <i>ResistancePlus</i> <sup>®</sup> MG				
Color de la tapa	Contenido	Descripción	N.º de cat. 20001L-01 (100 reacciones)	N.º de cat. 2000125 (25 reacciones)
Azul	Mezcla maestra <i>Plex</i> , 2x	Mezcla maestra que contiene los componentes necesarios para la qPCR incluidos los dNTP, MgCl <sub>2</sub> ADN polimerasa y tampón	1 x 1 mL	1 x 250 µL
Marrón	Mezcla MG+23S, 20x	Mezcla que contiene oligonucleótidos <sup>^</sup> para la amplificación y la detección de <i>M. genitalium</i> y las mutaciones en ARNr 23S	1 x 100 µL	1 x 25 µL
Blanco	Mezcla de control 1, 20x	Mezcla que contiene oligonucleótidos <sup>^</sup> para la amplificación y la detección del ensayo de control interno para LC480 II	1 x 100 µL	1 x 25 µL
Rojo	Células de control interno <sup>#</sup>	Células de control interno que contienen un molde de ADN para control interno cuyo fin es supervisar la eficacia de la extracción y amplificación	1 x 500 µL	1 x 100 µL
Neutra	Agua exenta de nucleasa	Agua de calidad PCR	1 x 1 mL	1 x 1 mL

# Guarde los tubos con el molde separados de las mezclas de oligo, es decir, en la sala de manipulaciones de ácido nucleico o moldes

<sup>^</sup> Los oligonucleótidos son parejas de cebadores de la PCR (que incluyen cebadores *PlexPrime*<sup>®</sup>), enzimas *PlexZyme*<sup>®</sup> y una sonda fluorescente

Tabla 2. Contenido de los kits <i>ResistancePlus</i> <sup>®</sup> MG <sub>(550)</sub>				
Color de la tapa	Contenido	Descripción	N.º de cat. 2000201 (100 reacciones)	N.º de cat. 2000225 (25 reacciones)
Azul	Mezcla maestra <i>Plex</i> , 2x	Mezcla maestra que contiene los componentes necesarios para la qPCR incluidos los dNTP, MgCl <sub>2</sub> ADN polimerasa y tampón	1 x 1 mL	1 x 250 µL
Marrón	Mezcla MG+23S, 20x	Mezcla que contiene oligonucleótidos <sup>^</sup> para la amplificación y la detección de <i>M. genitalium</i> y las mutaciones en ARNr 23S	1 x 100 µL	1 x 25 µL
Blanco	Mezcla de control 2, 20x	Mezcla que contiene oligonucleótidos <sup>^</sup> para la amplificación y la detección del ensayo de control interno para 7500 Fast y 7500 Fast Dx	1 x 100 µL	1 x 25 µL
Rojo	Células de control interno <sup>#</sup>	Células de control interno que contienen un molde de ADN para control interno cuyo fin es supervisar la eficacia de la extracción y amplificación	1 x 500 µL	1 x 100 µL
Neutra	Agua exenta de nucleasa	Agua de calidad PCR	1 x 1 mL	1 x 1 mL

# Guarde los tubos con el molde separados de las mezclas de oligo, es decir, en la sala de manipulaciones de ácido nucleico o moldes

<sup>^</sup> Los oligonucleótidos son parejas de cebadores de la PCR (que incluyen cebadores *PlexPrime*<sup>®</sup>), enzimas *PlexZyme*<sup>®</sup> y una sonda fluorescente

Tabla 3. Contenido de los kits <i>ResistancePlus</i> <sup>®</sup> MG <sub>(675)</sub>				
Color de la tapa	Contenido	Descripción	N.º de cat. 2000301 (100 reacciones)	N.º de cat. 2000325 (25 reacciones)
Azul	Mezcla maestra <i>Plex</i> , 2x	Mezcla maestra que contiene los componentes necesarios para la qPCR incluidos los dNTP, MgCl <sub>2</sub> ADN polimerasa y tampón	1 x 1 mL	1 x 250 µL
Marrón	Mezcla MG+23S, 20x	Mezcla que contiene oligonucleótidos <sup>^</sup> para la amplificación y la detección de <i>M. genitalium</i> y las mutaciones en ARNr 23S	1 x 100 µL	1 x 25 µL
Blanco	Mezcla de control 3, 20x	Mezcla que contiene oligonucleótidos <sup>^</sup> para amplificación y detección del ensayo de control interno para CFX96 Dx y CFX96 Touch	1 x 100 µL	1 x 25 µL
Rojo	Células de control interno <sup>#</sup>	Células de control interno que contienen un molde de ADN para control interno cuyo fin es supervisar la eficacia de la extracción y amplificación	1 x 500 µL	1 x 100 µL
Neutra	Agua exenta de nucleasa	Agua de calidad PCR	1 x 1 mL	1 x 1 mL

<sup>#</sup>Guarde los tubos con el molde separados de las mezclas de oligo, es decir, en la sala de manipulaciones de ácido nucleico o moldes

<sup>^</sup>Los oligonucleótidos son parejas de cebadores de la PCR (que incluyen cebadores *PlexPrime*<sup>®</sup>), enzimas *PlexZyme*<sup>®</sup> y una sonda fluorescente

## 5 Envío y almacenamiento

- Los componentes de los kits *ResistancePlus*<sup>®</sup> MG se envían sobre hielo seco o paquetes de gel congelado. Todos los componentes se deben almacenar de -25 °C a -15 °C tras su recepción. Se recomienda que el número máximo de ciclos de congelación/descongelación sea de 15.
- Cuando se almacena en las condiciones recomendadas y se manipula correctamente, la actividad del kit se conserva hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. No se debe utilizar después de la fecha de caducidad.
- Cualquier incidente grave se deberá notificar a SpeedX por correo electrónico a [tech@speedx.com.au](mailto:tech@speedx.com.au)

## 6 Advertencias y precauciones

### 6.1 General

- Exclusivamente para uso diagnóstico *in vitro*.
- Lea detenidamente estas Instrucciones de uso antes de usarlo. Siga en su totalidad los procedimientos descritos para garantizar la fiabilidad de los resultados de las pruebas. Cualquier desviación de estos procedimientos puede alterar el rendimiento de la prueba.
- Los usuarios deben estar adecuadamente formados en el uso del ensayo **ResistancePlus**<sup>®</sup> MG.
- Todos los incidentes graves se deberán notificar tanto al fabricante como a la autoridad competente del Estado miembro donde el usuario y/o el paciente tengan su residencia.

### 6.2 Laboratorio

- Se recomienda realizar la preparación/extracción de muestras, la preparación de la mezcla maestra, la adición de muestras y el termociclado en lugares separados espacialmente. Como mínimo, el instrumento de PCR debería estar idealmente en una sala separada de las áreas donde se preparan las reacciones.
- Se recomienda seguir las precauciones de laboratorio rutinarias. Use equipo de protección personal adecuado, como guantes, gafas de laboratorio y bata de laboratorio al manipular reactivos.
- En las muestras clínicas puede haber presentes organismos patógenos. Trate todas las muestras biológicas como potencialmente infecciosas y siga los procedimientos de seguridad de su centro para manipular productos químicos y muestras biológicas.
- Siga los procedimientos de eliminación de residuos domésticos de su centro para eliminar adecuadamente las muestras, los reactivos y otros materiales potencialmente contaminados.

### 6.3 Manipulación de las muestras

- Las muestras se deben recoger, transportar y almacenar usando técnicas convencionales de laboratorio o siguiendo las instrucciones de recogida incluidas en el kit.

### 6.4 Ensayo

- Las precauciones básicas para prevenir la contaminación de las reacciones de PCR incluyen el uso de puntas de pipeta de filtro estéril, el uso de una punta de pipeta nueva para cada acción de pipeteo y separación de los flujos de trabajo.
- Las pruebas de la PCR son propensas a la contaminación con productos de PCR anteriores. No abra nunca los recipientes de reacción después de finalizar una PCR.
- Los reactivos de ensayo contienen tampón IDTE, que puede causar irritación ocular grave. Se recomienda utilizarlo en una zona bien ventilada y usar equipo de protección personal apropiado como guantes, gafas de laboratorio y bata de laboratorio al manipular reactivos.

### 6.5 Precauciones de seguridad

- Las fichas datos de seguridad (SDS) están disponibles bajo petición. Para obtener más información, póngase en contacto con [tech@speedx.com.au](mailto:tech@speedx.com.au)

### 6.6 Plugins de ensayo: Advertencias/Precauciones/Limitaciones

- El software SpeedX solo puede controlar el análisis de los datos primarios generados a partir del kit de prueba cuando se utiliza con su respectivo instrumento de PCR. No controla la preparación de las muestras, las reacciones, la programación de equipos ni la aplicación de tratamientos.
- Los usuarios deben recibir una formación adecuada sobre el uso del software de análisis **ResistancePlus**<sup>®</sup> MG y el acceso debe estar imitado a cada usuario individual asignado.
- Se recomienda implementar el acceso con autenticación de usuario y controles de ciberseguridad tales como un software antivirus o el uso de un firewall dentro del sistema de TI y la infraestructura que utiliza el software
- En el caso de detectarse un incidente de ciberseguridad tal como un acceso no autorizados y ataques ransomware, póngase en contacto con [tech@speedx.com.au](mailto:tech@speedx.com.au) para obtener ayuda.

## 7 Productos asociados y consumibles

### Material de control positivo

- Kit de control positivo **ResistancePlus**<sup>®</sup> MG (SpeedX, n.º de cat. 95001)

### Consumibles generales de laboratorio

- Guantes y batas de laboratorio limpias
- Mezclador vórtex
- Centrifugadora de sobremesa para tubos de 0,5 µy 1,5 mL
- Micropipeteadores
- Puntas de pipeta estériles resistentes a los aerosoles
- Tubos de 0,5 mL y tubos de 1,5 mL (calidad PCR)
- Tubos de 2,0 mL (para predilución de las células de control interno)

### Para el MagNA Pure 96 Instrument

- 1 Phosphate Buffered Saline (PBS) (Tampón fosfato salino, PBS)
- MagNA Pure 96 Internal Control Tube (Roche, cat. n.º 06374905001)
- MagNA Pure 96 DNA y Viral NA Small Volume Kit (Roche, cat. n.º 06543588001)
- MagNA Pure 96 DNA y Viral NA Large Volume Kit (Roche, cat. n.º 06374891001)
- MagNA Pure 96 System Fluid (externo) (Roche, cat. n.º 06640729001)
- MagNA Pure 96 Processing Cartridge (Roche, cat. n.º 06241603001)
- MagNA Pure 96 Pure tip 1000 µL (Roche, cat. n.º 6241620001)
- MagNA Pure 96 Output Plate (Roche, cat. n.º 06241611001)
- Papel de sellado MagNA Pure Sealing Foil (Roche, cat. n.º 06241638001)

### Para el MICROLAB STARlet Instrument

- 1 Phosphate Buffered Saline (PBS) (Tampón fosfato salino, PBS)
- STARMag 96 X 4 Universal Cartridge kit (384T) kit (Seegene, cat. n.º 744300.4.UC384)
- Tubos de 2,0 mL

### Para el QIASymphony<sup>®</sup> SP instrument

- 1 Phosphate Buffered Saline (PBS) (Tampón fosfato salino, PBS)
- Cartuchos de preparación de muestras de 8 pocillos (Qiagen, cat. n.º 997002)
- Fundas para 8 varillas (Qiagen, cat. n.º 997004)
- Puntas con filtro, 200 µL y 1500 µL (Qiagen, cat. n.º 990332 y 997024)
- Tubos de 2 mL (Sarstedt, cat. n.º 72.639 o 72.694)
- Tubos de poliestireno de 14 mL (Corning, cat. n.º 352051)
- DSP Virus/Pathogen Mini Kit (QIAGEN, cat. n.º 937036)

*Para el NucliSENS® easyMAG® instrument*

- 1 Phosphate Buffered Saline (PBS) (Tampón fosfato salino, PBS)
- Tampón NucliSENS® easyMAG® Lysis Buffer 4X1L (Biomerieux, cat. n.º 280134)
- Tampón NucliSENS® easyMAG® Lysis Buffer 2ML 48T (Biomerieux, cat. n.º 200292)
- Silicio magnético NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica (Biomerieux, cat. n.º 280133)
- Tampón de extracción NucliSENS® easyMAG® Extraction buffer 1 (Biomerieux, cat. n.º 280130)
- Tampón de extracción NucliSENS® easyMAG® 2 (Biomerieux, cat. n.º 280131)
- Tampón de extracción NucliSENS® easyMAG® 3 (Biomerieux, cat. n.º 280132)
- Desechables NucliSENS® easyMAG® Disposables (Biomerieux, cat. n.º 280135)

*Para el LightCycler® 480 Instrument II*

- Kit **PlexPCR®** Colour Compensation (CC) (SpeedX, cat. n.º 90001)
- Placa LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 (Roche, cat. n.º 04729692001)
- Papel de sellado LightCycler® 480 Sealing Foil (Roche, cat. n.º 04729757001)

*Para el Applied Biosystems® 7500 Fast y el 7500 Fast Dx*

- Placas MicroAmp® Optical 96-well reaction plates (ThermoFisher Scientific, cat. n.º 4316813)
- Adhesivo MicroAmp® Optical Adhesive Film (ThermoFisher Scientific, cat. n.º 4360954)

*Para el Bio-Rad CFX96™ Dx y el CFX96 Touch™ Real-time PCR Detection System*

- Placas Multiplate™ 96-well PCR plates (Bio-Rad, cat. n.º MLP9601)
- Papel de sellado Microseal® 'B' PCR Plate Sealing Film, adhesive, optical (Bio-Rad, cat. n.º MSB1001)

*Envases de recolección de muestras*

- Kit de obtención de muestras para múltiples obtenciones (Abbott, n.º de cat. 9K12-01)
- Kit de obtención de orina Aptima® (Hologic, n.º de cat. 301040)
- Kit de obtención de muestras con hisopo Multitest Aptima® (Hologic, n.º de cat. PRD-03546)
- DeltaSwab ViCUM® 2 mL + hisopo de nailon estándar (deltalab, n.º de cat. 304278)
- Vacumed® Urine sin conservante (FL medical, n.º de cat. 44950)
- FLOQSwab™ normal en 1 mL de medio UTM™ (Copan n.º de cat. 359C)
- Medio para PCR cobas® (Roche, n.º de cat. 06466281190)

## 8 Principio de la tecnología

La PCR en tiempo real (qPCR) se puede utilizar para amplificar y detectar ácidos nucleicos diana específicos de patógenos. **PlexPCR<sup>®</sup>** es una tecnología qPCR que utiliza enzimas **PlexZyme<sup>®</sup>** que detectan y notifican el producto amplificado mediante la generación de una señal fluorescente (**Figura 1**). Los cebadores **PlexPrime<sup>®</sup>** para la amplificación específica de secuencias mutantes se acoplan con la detección **PlexZyme<sup>®</sup>** específica de mutantes (**Figura 2**).

Las enzimas **PlexZyme<sup>®</sup>** son complejos de ADN catalíticos compuestos por dos oligos de ADN que se denominan “Enzimas parciales”. Cada enzima parcial tiene una región específica de diana, un núcleo catalítico y una región de unión a la sonda universal. Cuando el producto diana está presente, las dos enzimas parciales se unen de manera adyacente para formar la **PlexZyme<sup>®</sup>** activa, que tiene actividad catalítica para escindir una sonda marcada. La escisión separa el fluoróforo del colorante inactivador, produciendo una señal fluorescente que puede monitorizarse en tiempo real. Las enzimas **PlexZyme<sup>®</sup>** tienen especificidad adicional en comparación con otras tecnologías de detección, ya que dos enzimas parciales deben unirse para efectuar la detección. Las enzimas **PlexZyme<sup>®</sup>** también son enzimas de uso múltiple, y se pueden escindir varias sondas en cada ciclo de la PCR, dando lugar a una señal intensa y sensible. Los ensayos **PlexZyme<sup>®</sup>** son muy sensibles y específicos, y resultan idóneos para la detección multiplexada de patógenos.

Los cebadores **PlexPrime<sup>®</sup>** tienen tres regiones funcionales. La región larga en 5' ancla el cebador a una ubicación en particular, y la región corta en 3' se dirige selectivamente a la extensión desde la base mutante. Entre las regiones 5' y 3' hay una secuencia de inserción que actúa como estructura de puente que inserta una secuencia independiente de la diana dentro del amplicón resultante y aumenta la presión selectiva sobre la región 3'. En la detección multiplexada, cada cebador **PlexPrime<sup>®</sup>** está diseñado para dirigirse a una base mutante específica e incorporará una secuencia de inserción única, produciendo de este modo secuencias de amplicones mutantes diferenciadas. A diferencia de otras tecnologías de detección basadas en sondas, la enzima **PlexZyme<sup>®</sup>** se puede superponer con el cebador **PlexPrime<sup>®</sup>** para dirigirse al amplicón mutante específico que contiene la base mutante y la secuencia de inserción integrada. La combinación única de cebadores **PlexPrime<sup>®</sup>** acoplados a las enzimas **PlexZyme<sup>®</sup>** permite la amplificación específica de secuencias mutantes y una detección sensible y específica de forma multiplexada.

**Figura 1. Representación esquemática de la detección y señalización universal con **PlexZyme<sup>®</sup>****

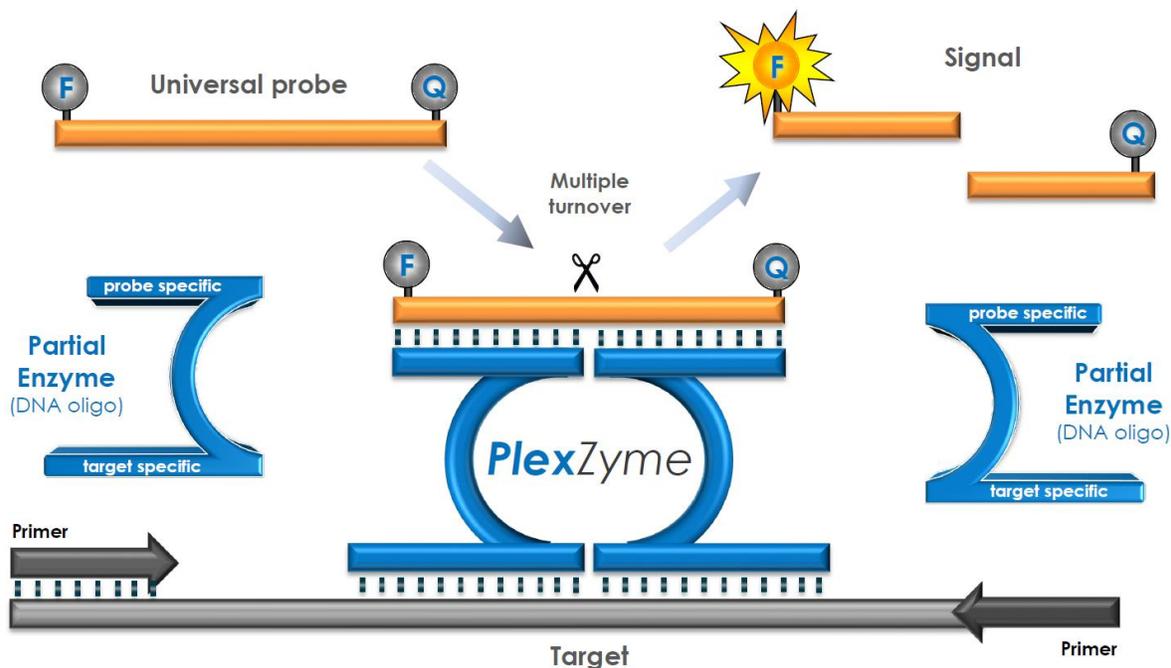
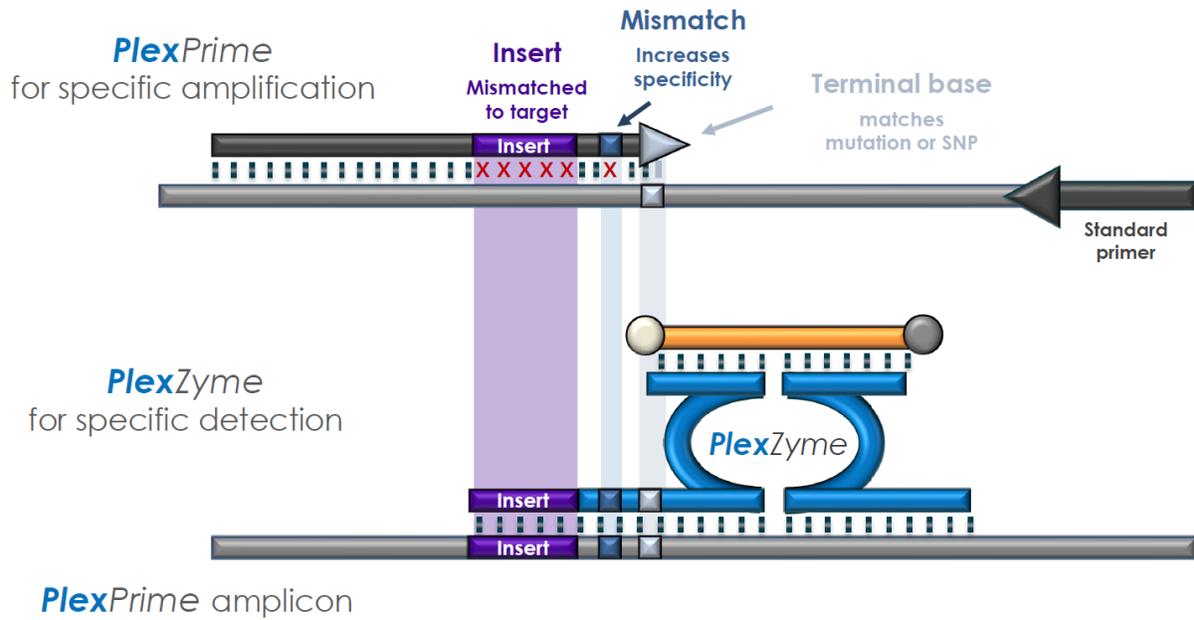
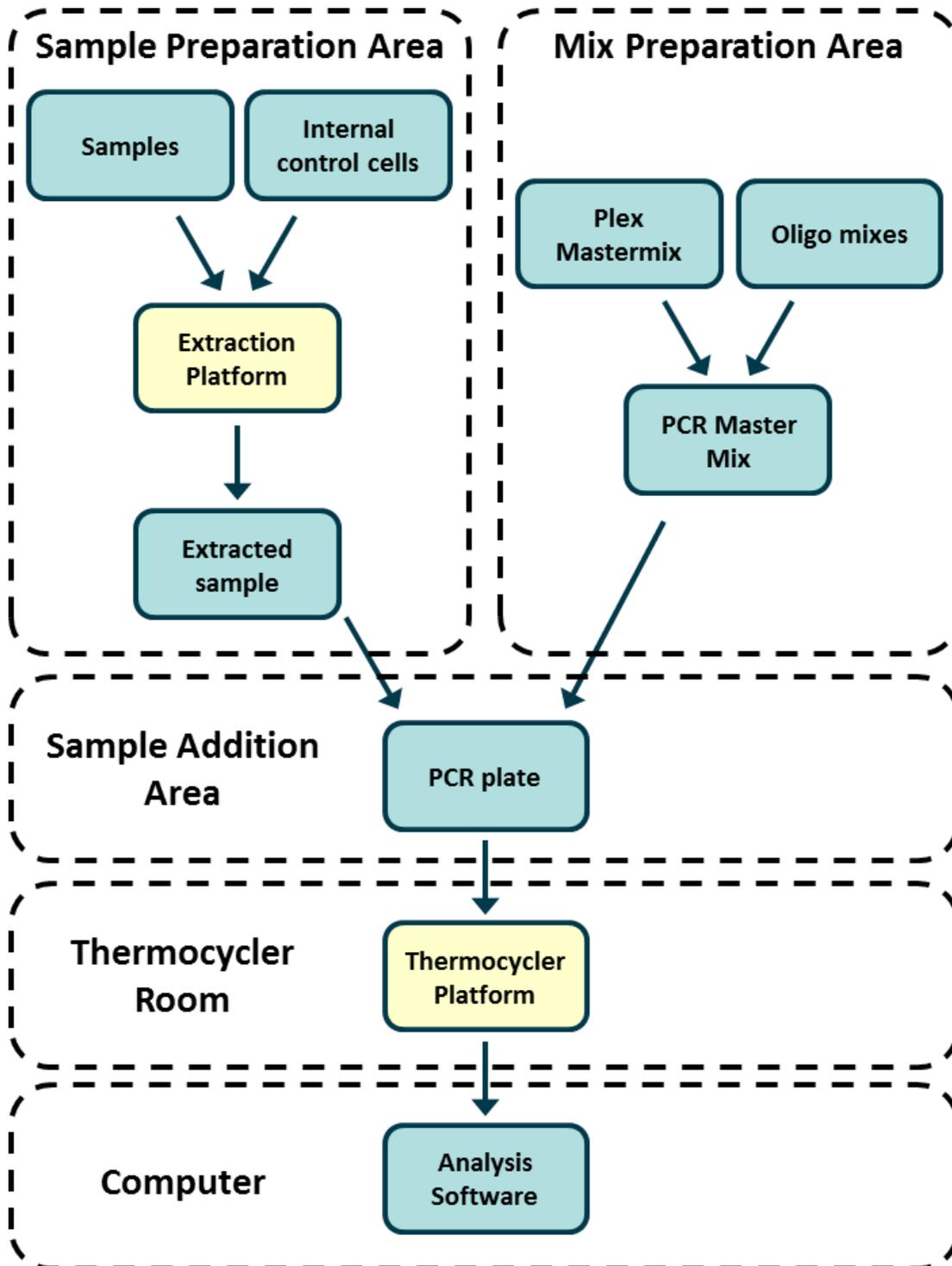


Figura 2. Representación esquemática del cebador *PlexPrime*<sup>®</sup> acoplado a la detección *PlexZyme*<sup>®</sup>. El cebador *PlexPrime*<sup>®</sup> amplifica específicamente la secuencia mutante y las enzimas *PlexZyme*<sup>®</sup> detectan específicamente el amplicón.



## 9 Presentación del procedimiento



## 10 Procedimiento detallado

**Nota:** Los reactivos suministrados se nombran en cursiva y el color del tapón del tubo figura entre paréntesis.

### 10.1 Recogida de muestras, transporte y almacenamiento

La orina masculina, la orina femenina y los hisopados vaginales, de pacientes sintomáticos o asintomáticos se deberán recoger, transportar y almacenar usando técnicas convencionales de laboratorio o siguiendo las instrucciones de recogida incluidas en el kit.

#### 10.1.1 Dispositivos de recogida de muestras validados

Una recogida de las muestras o el almacenamiento y transporte incorrectos o inadecuados probablemente proporcionarán resultados falsos en la prueba. Se recomienda encarecidamente una formación adecuada en recogida de muestras para garantizar la calidad y estabilidad de las mismas.

Los dispositivos de recogida de muestras que se han validado para el kit *ResistancePlus*<sup>®</sup> MG se indican a continuación con una breve orientación relativa a las instrucciones del fabricante del dispositivo para la recogida, manipulación y transporte. Estas instrucciones no pretenden sustituir ni anular cualesquiera instrucciones proporcionadas por el fabricante. Consulte siempre las instrucciones del fabricante del dispositivo de recogida de muestras para conocer los métodos de recogida adecuados.

Antes de cualquier método de recogida, el personal formado debe garantizar la correcta comprensión del dispositivo y su metodología. Como mínimo, revise la descripción de la prueba para comprobar lo siguiente: indicación del tipo de muestra, volumen suficiente, procedimiento(s), materiales de recogida necesarios, la preparación del paciente y las instrucciones para su correcta manipulación y conservación.

#### 10.1.2 Recogida, transporte y almacenamiento de orina limpia

1. Se recomienda utilizar un recipiente estéril transparente para la recogida de orina, exento de cualesquiera conservantes o medio de transporte para la autorrecogida realizada por el paciente.
2. El paciente debe recoger 20-50 mL de orina de la primera micción y volver a tapar bien o enroscar la tapa.
3. Se recomienda embolsar la muestra de orina con dos bolsas con almohadillas absorbentes para su transporte. Las temperaturas de almacenamiento de las muestras de orina dependen del tiempo de procesamiento previsto.

#### 10.1.3 Recogida de muestras, transporte y almacenamiento de hisopos secos

Los hisopos secos se pueden utilizar para muestras de hisopados vaginales recogidas por el médico o por la paciente. Debido a la variabilidad, consulte el prospecto del fabricante para conocer los métodos de recogida adecuados.

#### 10.1.4 Kit de recogida de muestras Multi-Collect (Abbott, n.º de cat. 9K12-01), transporte y almacenamiento

A continuación se resumen las instrucciones para la recogida y el transporte de muestras de orina e hisopados vaginales con el kit de recogida de muestras multi-Collect (Abbott, n.º de cat. 9K12-01)

##### 10.1.4.1 Recogida, transporte y almacenamiento de muestras de orina

1. El paciente no debe haber orinado durante al menos una hora antes de la recogida de la muestra.
2. Deseche el hisopo de recogida de muestras; no es necesario para la recogida de muestras de orina.
3. Si se utiliza un recipiente para la recogida de muestras de orina, el paciente debe recoger los primeros 20 a 30 mL de orina evacuada (la primera parte del chorro).
4. Desenrosque la tapa del tubo de transporte, con cuidado de no derramar el tampón de transporte que se encuentra en el interior.
5. Manipule la tapa y el tubo con cuidado para evitar la contaminación.
6. Utilice la pipeta de transferencia de plástico para transferir la orina del recipiente de recogida al tubo de transporte hasta que el nivel de líquido del tubo esté dentro de la ventana de llenado transparente en la etiqueta del tubo de transporte. De lo contrario, deberá recogerse una muestra nueva. No llene en exceso. Es posible que sea necesario apretar ligeramente el bulbo de la pipeta de transferencia más de una vez para transferir el volumen necesario de muestra de orina.
7. Vuelva a tapar el tubo de transporte con cuidado. Asegúrese de que la tapa cierra herméticamente.
8. Etiquete el tubo de transporte con la información de identificación de la muestra, incluida la fecha de recogida, en una etiqueta adhesiva. Tenga cuidado de no tapar la ventana de llenado del tubo de transporte.
9. Después de la recogida, el tubo de transporte se debe almacenar y transportar a una temperatura entre 2 °C y 30 °C durante un máximo de 14 días. Si se requiere un almacenamiento más prolongado, almacene -10 °C o una temperatura interior durante un máximo de 90 días.

#### 10.1.4.2 Recogida, transporte y almacenamiento de muestras de hisopados vaginales

1. Deseche la pipeta de transferencia desechable; no es necesaria para la recogida de muestras de hisopados vaginales.
2. Saque el hisopo estéril del envoltorio, teniendo cuidado de no tocar la punta ni apoyarla sobre ninguna superficie.
3. Introduzca la punta blanca del hisopo de recogida de muestras aproximadamente 5 cm en la abertura de la vagina.
4. Gire suavemente el hisopo durante 15 a 30 segundos contra los laterales de la vagina.
5. Retire el hisopo con cuidado.
6. Manipule la tapa y el tubo con cuidado para evitar la contaminación.
7. Desenrosque la tapa del tubo de transporte e introduzca inmediatamente el hisopo de recogida de muestras en el tubo de transporte de forma que la punta blanca quede hacia abajo.
8. Rompa con cuidado el hisopo por la línea marcada en el eje; tenga cuidado para evitar que salpique el contenido.
9. Vuelva a tapar el tubo de transporte. Asegúrese de que la tapa cierra herméticamente.
10. Etiquete el tubo de transporte con la información de identificación de la muestra, incluida la fecha de recogida, en una etiqueta adhesiva.
11. Después de la recogida, el tubo de transporte se debe almacenar y transportar a una temperatura entre 2 °C y 30 °C durante un máximo de 14 días. Si se requiere un almacenamiento más prolongado, almacene -10 °C o una temperatura inferior durante un máximo de 90 días.

#### 10.1.5 Recogida, transporte y almacenamiento con el kit de recogida de orina Aptima® (Hologic, n.º de cat. 301040)

A continuación se resumen las instrucciones para la recogida y el transporte de muestras de orina masculina y femenina con el kit de recogida de orina Aptima® (Hologic, n.º de cat. 301040). Tenga en cuenta que las prestaciones clínicas de este dispositivo de recogida se han demostrado exclusivamente con muestras extraídas utilizando el instrumento MagNA Pure 96 y el MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Large Volume Kit. Consulte el **Apartado 10.2** y el **Apartado 16.1.5** para obtener más información.

1. Se recomienda utilizar un recipiente estéril transparente para la recogida de orina, exento de cualesquiera conservantes o medio de transporte para la autorrecogida realizada por el paciente.
2. Se indica al paciente que vierta 20-30 mL de la primera micción en el recipiente de recogida de orina suministrado. Las pacientes femeninas no deben limpiarse la zona de los labios vaginales antes de proporcionar la muestra.
3. Utilice la pipeta y el tubo de transporte incluidos en el kit de recogida de orina Aptima®. Con la pipeta, transfiera 2 mL de orina al tubo de transporte de muestras sin tapa. La línea correcta del volumen de orina debe quedar dentro de las líneas negras de llenado que se muestran en el tubo de transporte de orina. La orina se debe transferir del recipiente transparente estéril al tubo de recogida de muestras de orina Aptima en las 24 horas siguientes a la recogida.
4. Vuelva a tapar bien el tubo de transporte de orina.
5. Después de la recogida, las muestras de orina procesadas en el tubo de transporte de muestras de orina Aptima se deben transportar y almacenar a una temperatura entre 2 °C y 30 °C y almacenarse a 2 °C - 30 °C hasta su análisis. Consulte las instrucciones del fabricante para ver información detallada sobre la optimización del almacenamiento.

#### 10.1.6 Kit de recogida, transporte y almacenamiento de muestras con hisopo Aptima® Multitest (Hologic, n.º de cat. PRD-03546)

A continuación se resumen las instrucciones para la recogida y el transporte de muestras de hisopado vaginal con el kit de recogida de muestras de hisopo Aptima® Multitest (Hologic, n.º de cat. PRD-03546). Tenga en cuenta que las prestaciones clínicas de este dispositivo de recogida se han demostrado exclusivamente con muestras extraídas utilizando el instrumento MagNA Pure 96 y el MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Large Volume Kit. Consulte el **Apartado 10.2** y el **Apartado 16.1.5** para obtener más información.

##### 10.1.6.1 Recogida, transporte y almacenamiento de muestras de hisopados vaginales

1. Abra parcialmente el paquete de hisopos. Retire el hisopo. No toque la punta blanda ni apoye el hisopo sobre una superficie. Si toca la punta blanda, apoya el hisopo sobre una superficie o lo deja caer, utilice un nuevo kit de recogida de muestras con hisopo Aptima Multitest.
2. Sujete el hisopo, entre el pulgar y el índice por el centro del vástago del hisopo tapando la línea ranurada. No sujete el vástago del hisopo por debajo de la línea ranurada.
3. Introduzca con cuidado el hisopo en la vagina aproximadamente 5 cm más allá del orificio vaginal y gírelo suavemente en el sentido de las agujas del reloj durante 10 a 30 segundos. Asegúrese de que el hisopo toca las paredes de la vagina para que absorba la humedad y, a continuación, retírelo sin tocar la piel.
4. Mientras sigue sujetando el hisopo con la misma mano, desenrosque la tapa del tubo. No derrame el contenido del tubo. Si el contenido del tubo se vierte, utilice un nuevo kit de recogida de muestras con hisopo Aptima Multitest.
5. Introduzca inmediatamente el hisopo en el tubo de transporte de forma que la línea ranurada quede en la parte superior del tubo.
6. Rompa con cuidado el vástago del hisopo por la línea ranurada contra el lateral del tubo.
7. Deseche inmediatamente la parte superior del vástago del hisopo.
8. Enrosque firmemente la tapa en el tubo. Después de la recogida, transporte y almacene el hisopo en el tubo de transporte de muestras de hisopado a una temperatura de 2 °C a 30 °C hasta que se realice la prueba.

10.1.7 Recogida, transporte y almacenamiento con DeltaSwab ViCUM® 2 mL + hisopo flocado estándar (deltalab, n.º de cat. 304278)

A continuación se resumen las instrucciones para la recogida y el transporte de muestras de hisopados vaginales con el sistema DeltaSwab ViCUM® 2 mL + hisopo flocado estándar (deltalab, n.º de cat. 304278)

1. Abra el envase despegable con ambas manos tirando de lados opuestos.
2. Agite suavemente el tubo.
3. Abra el envoltorio y recoja la muestra con el hisopo.
4. Abra el tubo con la otra mano e introduzca el hisopo de forma que quede cubierto por el medio.
5. Alinee el punto de rotura del hisopo con la parte superior del tubo presionando ligeramente el hisopo hacia abajo. Rompa el hisopo por el punto de rotura apoyándolo en el borde interior del tubo.
6. Deseche el trozo de hisopo sobrante, enrosque bien la tapa y agite la muestra para eluirlo en el medio.
7. Después de la recogida, transporte y guarde el hisopo en el tubo de transporte de muestras de hisopo a una temperatura de 4 °C a 25 °C hasta que se realice la prueba.

10.1.8 Recogida de orina Vacumed® sin conservante (FL medical, n.º de cat. 44950), transporte y almacenamiento

A continuación se resumen las instrucciones para la recogida y el transporte de orina masculina y femenina con el tubo de recogida sin conservante Vacumed® (FL medical, n.º de cat. 44950).

1. Abra la tapa del recipiente de recogida de orina y colóquelo boca abajo sobre una superficie limpia
2. No toque las superficies internas del envase y del tapón
3. Recoja la muestra de orina. Llene el recipiente hasta  $\frac{3}{4}$  de su capacidad
4. Vuelva a colocar la tapa y gírela fuertemente en el sentido de las agujas del reloj para sellarla
5. Agite suavemente la muestra
6. Levante parcialmente la etiqueta protectora (no la retire del todo)
7. Introduzca el tubo de muestra y presione suavemente Mantenga el tubo conectado hasta que esté lleno (fin de flujo)
8. Retire el tubo de muestra y vuelva a pegar completamente la etiqueta protectora
9. Almacene el tubo de muestra a una temperatura de 4 °C a 25 °C hasta la prueba

10.1.9 Recogida, transporte y almacenamiento con Regular FLOQSwab™ en 1 mL de medio UTM™ (Copan n.º de cat. 359C)

A continuación se resumen las instrucciones para la recogida y el transporte de muestras de hisopado vaginal femenino con el Regular FLOQSwab™ en 1 mL de medio UTM™ (Copan 1 mL cat. 359C)

1. Abra el envase del kit UTM y extraiga el tubo de ensayo con medio y la bolsa interna que contiene el hisopo estéril.
2. Saque el hisopo estéril de su bolsa y recoja la muestra clínica; para evitar el riesgo de contaminación, asegúrese de que la punta del hisopo solamente entra en contacto con el punto de recogida.
3. Después de recoger la muestra, desenrosque y retire la tapa del tubo de ensayo con cuidado de no derramar el medio.
4. Introduzca el hisopo en el tubo de ensayo hasta que el punto de rotura esté al mismo nivel que la abertura del tubo de ensayo.
5. Doble y rompa el hisopo por el punto de rotura manteniendo el tubo de ensayo alejado de la cara y deseche la parte sobrante.
6. Vuelva a enroscar la tapa en el tubo de ensayo y ciérrela herméticamente.
7. Procese la muestra contenida en la UTM en un plazo de 48 horas desde la recogida almacenando el tubo de ensayo a 2-25 °C.
8. Antes de procesar, debe agitar la muestra en un vórtex durante 20 segundos para favorecer la liberación de la muestra del hisopo y homogeneizar el medio.

10.1.10 Recogida, transporte y almacenamiento en medio cobas® PCR (Roche, n.º de cat. 06466281190)

A continuación se resumen las instrucciones para la recogida y el transporte de orina masculina y femenina en medio cobas® PCR (Roche, n.º de cat. 06466281190).

1. Mezcle y transfiera la orina al tubo cobas® PCR Media con una pipeta desechable (no incluida). Nota: la orina puede almacenarse a una temperatura de 2 °C a 30 °C durante un máximo de 24 horas antes de transferirla al tubo cobas® PCR Media
2. Se ha añadido el volumen correcto de orina cuando el nivel de líquido se encuentra entre las dos líneas negras de la etiqueta del tubo
3. Vuelva a tapar herméticamente el tubo cobas® PCR Media
4. Invierta el tubo 5 veces para mezclar La muestra ya está lista para su transporte y análisis
5. Transporte y almacene el tubo cobas® PCR Media que contiene la muestra de orina estabilizada a una temperatura de 2 °C a 30 °C.

### 10.1.11 Extractos de muestras validados

Los extractos de muestra validados para su uso incluyen:

- cobas® x480 (del protocolo CT/NG)

## 10.2 Procesamiento de muestras

El kit **ResistancePlus®** MG se ha validado en los instrumentos de extracción relacionados en la **Tabla 4**.

Consulte el **Apartado 10.3** para ver las instrucciones de uso del control interno.

Tabla 4. Protocolos de extracción validados				
Instrumento	Kit de extracción	Volumen de muestra	Protocolo	Volumen de elución
MagNA Pure 96 <sup>a</sup>	MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit	200 µL	Pathogen Universal 200	50 µL o 100 µL
MagNA Pure 96 <sup>a</sup>	MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Large Volume Kit	1000 µL <sup>^</sup>	Viral NA Universal LV 1000 3.1	100 µL
MICROLAB STARlet IVD <sup>b</sup>	Kit de cartuchos universales STARMag 96 x 4 (Seegene)	200 µL	Adición de 10 µL de células de control interno diluidas a cada muestra Seleccione "Pausa antes de la preparación de la PCR" para realizar solamente la extracción de la muestra	100 µL
QIASymphony SP <sup>c</sup>	DSP Virus/Pathogen Mini Kit	200 µL	Complex200_V6_DSP	110 µL
NucliSENS® easyMAG <sup>d</sup>	Reactivos NucliSENS® easyMAG®	Hisopo de 200 µL	Genérico 2.01; Flujo de trabajo "Integrado"	100 µL
		1000 µL de orina	Genérico 2.01; Flujo de trabajo "no integrado"	100 µL

<sup>a</sup> Consulte el punto 10.3.1 para saber cómo utilizar el control interno con el MagNA Pure 96

<sup>b</sup> Consulte el punto 10.3.2 para saber cómo utilizar el control interno con el STARlet IVD

<sup>c</sup> Consulte el punto 10.3.3 para saber cómo utilizar el control interno con QIASymphony SP

<sup>d</sup> Consulte el punto 10.3.4 para saber cómo utilizar el control interno con el NucliSENS® easyMAG®

<sup>^</sup> Con este protocolo de extracción, solo se demostró el desempeño clínico de las muestras recolectadas con los kits de recolección Aptima®. Consulte la Sección 16.1.5 para obtener más detalles.

## 10.3 Control interno (CI)

El kit incluye un control interno para monitorizar la eficacia de la extracción y la inhibición de la qPCR. El ensayo de control interno se proporciona como una *Mezcla de control (BLANCO)* y *Células de control interno (ROJO)*. La *Mezcla de control* se añade a la PCR Master Mix (**Tabla 11**). Las *Células de control interno* contienen el molde de ADN de control interno. Las *Células de control interno* se diluyen y procesan como se indica a continuación para instrumentos de extracción específicos. Por lo tanto, el molde de ADN de control interno se extrae junto con la muestra y se amplifica simultáneamente durante la reacción.

### 10.3.1 Control interno en el MagNA Pure 96

Diluya las *Células de control interno (RED)* 1 en 200 en 1x PBS (**Tabla 5**). Ajuste el volumen según sea necesario utilizando el mismo factor de dilución (consulte el manual del kit de extracción para conocer el volumen mínimo para el número de muestras necesario). Las células de control interno diluidas se introducen en el tubo de control interno del MagNA Pure 96:

- Para el MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit (protocolo Pathogen Universal 200), se añaden automáticamente 20 l a cada muestra (predeterminado).
- Para el kit MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Large Volume Kit (protocolo Viral NA Universal LV 1000 3.1), el volumen de la muestra se divide y se procesa en dos pocillos separados del cartucho de procesamiento MagNA Pure 96 Processing Cartridge. Se añade automáticamente a cada muestra un total de 40 µL de células de control interno diluidas (20 µL por pocillo del cartucho de procesamiento).

**Nota:** NO almacene las células de control interno diluidas

**Tabla 5. Dilución de las células de control interno para el MagNA Pure 96 (dilución 1 en 200)**

Células de control interno (ROJO) (µL)	1x PBS (µL)	Volumen total (µL)	Volumen añadido a la muestra (µL)
18	3582	3600	20

### 10.3.2 Control interno en el MICROLAB STARlet IVD

Diluya las *Células de control interno (RED)* 1 en 20 en 1x PBS (**Tabla 6**). Ajuste el volumen según sea necesario utilizando el mismo factor de dilución (consulte el manual del kit de extracción para conocer el volumen mínimo para el número de muestras necesario). Las células de control interno diluidas se cargan en un tubo de 2 mL que se coloca en la gradilla de soporte de reactivos, añadiendo 10 µL automáticamente a cada muestra.

**Nota:** NO almacene las células de control interno diluidas

**Tabla 6. Dilución de células de control interno para el MICROLAB STARlet IVD (dilución 1 en 20)**

Células de control interno (ROJO) (µL)	1x PBS (µL)	Volumen total (µL)	Volumen añadido a la muestra (µL)
50	950	1000	10

### 10.3.3 Control interno en el QIA Symphony® SP

Diluya las *Células de control interno (RED)* 1 en 50 en 1x PBS (**Tabla 7**). Ajuste el volumen según sea necesario utilizando el mismo factor de dilución según el número de muestras necesarias.

**Nota:** NO almacene las células de control interno diluidas

**Tabla 7. Dilución de células de control interno para el QIA Symphony® SP (dilución 1 en 50)**

Células de control interno (ROJO) (µL)	1x PBS (µL)	Volumen total (µL)
40	1950	2000

A continuación, las *Células de control interno* diluidas se utilizan para preparar una mezcla de Control interno-ARN portador-Tampón AVE, como se muestra en la **Tabla 8** siguiente. Ajuste el volumen según sea necesario utilizando el mismo factor de dilución para el número de muestras necesario (consulte el manual del kit de extracción para conocer el volumen mínimo para el número de muestras necesario). La mezcla de Control interno-ARN portador-tampón AVE debe prepararse inmediatamente antes de iniciar la prueba.

La mezcla de Control interno-ARN portador-tampón AVE se añade a un tubo, que se coloca en un portatubos y se introduce por la ranura A del cajón de muestras del equipo QIA Symphony® SP. Se añaden 120 µL (predeterminado) de la mezcla a cada muestra.

**Tabla 8. Preparación de la mezcla de control interno-ARN portador-tampón AVE para el QIAsymphony SP**

Tipo de tubo	Número de muestras	Volumen de células CI diluidas (µL)	Solución madre de ARN portador (µL)	Tampón AVE (µL)	Volumen total (µL)
-	1	10	3	107	120
2 mL	1 + volumen de micción <sup>^</sup>	40	12	428	480
14 mL	1 + volumen de micción <sup>#</sup>	60	18	642	720

<sup>^</sup> Un tubo de 2 mL requiere 3 muestras adicionales (360 µL) para tener en cuenta el volumen de micción

<sup>#</sup> Un tubo de 14 mL requiere 5 muestras adicionales (600 µL) para tener en cuenta el volumen de micción

#### 10.3.4 Control interno en el easyMAG<sup>®</sup>

Diluya las *Células de control interno (RED)* 1 en 200 en 1x PBS (**Tabla 9**). Ajuste el volumen según sea necesario utilizando el mismo factor de dilución. Prepare una "premezcla" de células de control interno diluidas y NucliSENS<sup>®</sup> easyMAG<sup>®</sup> Sílice magnética para el número de muestras necesario (**Tabla 10**). Se necesitan 100 µL de premezcla de sílice por muestra.

**Nota:** NO almacene las células de control interno diluidas

**Tabla 9. Dilución de células de control interno para el NucliSENS<sup>®</sup> easyMAG<sup>®</sup> (dilución 1 en 200)**

Células de control interno (ROJO) (µL)	1x PBS (µL)	Volumen total (µL)	Factor de dilución
10	1990	2000	200

**Tabla 10. Pre-mezcla de NucliSENS<sup>®</sup> easyMAG<sup>®</sup> Magnetic Silica y células de control interno diluidas**

Número de muestras	Volumen de células CI diluidas (µL)	Volumen de sílice magnética (µL)	Volumen añadido a la muestra (µL)
1	50	50	100

Se utilizará un flujo de trabajo "integrado" o "no integrado" en función del tipo de muestra. El flujo de trabajo "no integrado" se utiliza para una recuperación óptima del ácido nucleico de las muestras de orina. Consulte el manual del usuario de NucliSENS<sup>®</sup> easyMAG<sup>®</sup> para obtener más información.

#### Flujo de trabajo "integrado" (hisopos)

Transfiera las muestras al recipiente de muestras.

Introduzca los recipientes de muestras en el easyMAG.

Programa las siguientes Solicitudes de extracción:

Protocolo: Generic 2.0.1 (para la versión de software 2.0)

Matriz: Otro

Volumen (mL): 0,200

Eluido (µL): 100 µL

Tipo: Primario

Después de la lisis integrada, se añaden 100 µL de premezcla de sílice a cada muestra.

Se continúa con el proceso de extracción.

### Flujo de trabajo “no integrado” (orina)

Centrifugue brevemente el tubo de tampón de lisis NucliSENS y añada 1000 µL de orina. Tubo de vórtex.

Deje reposar la mezcla a temperatura ambiente durante 10 minutos.

Después de la lisis, transfiera el lisado a los recipientes de muestra e introdúzcalos en el easyMAG.

Se añaden 100 µL de premezcla de sílice a cada muestra.

Programa las siguientes Solicitudes de extracción:

Protocolo: Generic 2.0.1 (para la versión de software 2.0)

Matriz: Otro

Volumen (mL): 1,000

Eluido (µL): 100 µL

Tipo: Lisado

Se continúa con el proceso de extracción.

### 10.4 Preparación de la PCR en tiempo real

**Nota:** Antes de utilizar los reactivos, descongele completamente y mezcle bien con una vortización corta

Consulte **Tabla 1 – Tabla 3** para ver la descripción del contenido del kit.

#### 10.4.1 Preparación de la mezcla maestra

Prepare la mezcla maestra como se indica en la **Tabla 11**.

Para un volumen de reacción de 20 µL, se requieren 15 µL de Mezcla maestra y 5 µL de muestra. Pipetee la Mezcla maestra en la placa de PCR y, a continuación, añada la muestra extraída a la reacción.

Se debe incluir un control sin molde (NTC) en cada análisis. Para la reacción NTC, añada *agua exenta de nucleasa (NEUTRA)* en lugar de la muestra.

Selle la placa, centrifugue y transfiera al termociclador.

Tabla 11. Mezcla maestra		
Reactivo	Concentración	Volumen por reacción de 20 µL (µL)
Agua exenta de nucleasa ( <b>NEUTRA</b> )	N/D	3,0
Mezcla maestra <b>Plex (AZUL)</b>	2x	10,0
Mezcla MG+23S ( <b>MARRÓN</b> )	20x	1,0
Mezcla de control * ( <b>BLANCO</b> )	20x	1,0
Volumen total (µl)		15,0
Añada 5 µL de muestra para un volumen final de 20 µL		

\* La Mezcla de control incluida en cada kit es específica del instrumento de PCR utilizado; consulte **Tabla 1 – Tabla 3** para elegir la Mezcla de control correcta

#### 10.4.2 Estabilidad de la Mezcla maestra

La Mezcla maestra se puede preparar en gran cantidad y almacenarse a -20 ° C durante un máximo de 4 semanas o almacenarse a 4 ° C durante un máximo de 1 semana.

## 11 Programación y análisis

Los detalles de programación y análisis se describen en el 19 – 22.

El kit **ResistancePlus®** MG dispone de tres canales para la detección de *M. genitalium*, las mutaciones en ARNr 23S y el control interno (Tabla 12).

Tabla 12. Canales para dianas de <i>ResistancePlus®</i> MG			
Instrumento	Canal A	Canal B	Canal C
	Detección de <i>M. genitalium</i> (MgPa)	Mutación en ARNr 23S	Control interno
LC480 II	465-510	533-580	533-640
7500 Fast y 7500 Fast Dx	FAM	JOE	TAMRA
CFX96 Dx y CFX Touch	FAM	HEX	Quasar 705

## 12 Interpretación de los resultados

La interpretación de los datos requiere el software de análisis **ResistancePlus®** MG. Aunque los cebadores **PlexPrime®** ofrecen una mayor especificidad que otros cebadores específicos de alelo, se puede observar algo de amplificación inespecífica del ensayo de mutante de ARNr 23S en muestras que contienen altas concentraciones de ARNr 23S no modificado de *M. genitalium*. El software de análisis **ResistancePlus®** MG automatiza la interpretación de los datos de los resultados de amplificación y agiliza el flujo de trabajo. Las instrucciones para utilizar el software de análisis se describen en el 23.

Consulte **Tabla 13**, para saber el software de análisis adecuado para cada instrumento de PCR en tiempo real. El software de análisis puede suministrarse bajo pedido. Para obtener más información, póngase en contacto con [tech@speedx.com.au](mailto:tech@speedx.com.au)

Tabla 13. Software de análisis <i>ResistancePlus®</i> MG		
N.º de cat.	Software de análisis*	Instrumento de PCR en tiempo real
99003	<b>ResistancePlus®</b> MG (LC480)	LC480 II
99002	<b>ResistancePlus®</b> MG (7500)	7500 Fast y 7500 Fast Dx
99008	<b>ResistancePlus®</b> MG (CFX)	CFX96 Dx y CFX96 Touch

\* Consulte el sitio web <https://plexpcr.com/products/sexually-transmitted-infections/resistanceplus-mg/#resources> para asegurarse de que utiliza la versión más actualizada del software de análisis

### 13 Limitaciones

- El ensayo **ResistancePlus**<sup>®</sup> MG se dirige al gen *MgPa* de *M. genitalium* y las mutaciones en las posiciones 2058 y 2059 del gen del ARNr 23S (A2058G, A2059G, A2058T y A2058C, numeración basada en *E. coli*) que están asociadas con resistencia a la azitromicina (antibiótico macrólido).
- Se ha demostrado que el ensayo **ResistancePlus**<sup>®</sup> MG presenta reacción cruzada con secuencias mutantes A2059C de *M. genitalium* en ARNr 23S.
- Los estudios de rendimiento clínico del **ResistancePlus**<sup>®</sup> MG que resumimos en el **Apartado 16.1** incluyen pruebas con orina masculina, orina femenina e hisopados vaginales. También se han analizado otros tipos de muestras, como hisopados rectales, cervicales, endocervicales, uretrales, penianos, del meato peniano y faríngeos, sin embargo, en la actualidad existen pocos datos que respalden el uso de estos tipos de muestras.
- El ensayo **ResistancePlus**<sup>®</sup> MG debe ser realizado exclusivamente por personal formado en el procedimiento y llevarse a cabo de acuerdo con estas instrucciones de uso.
- La obtención de resultados fiables depende del transporte, almacenamiento y procesamiento adecuado de las muestras. El incumplimiento de los procedimientos adecuados en cualquiera de estos pasos puede producir resultados incorrectos.
- El ensayo **ResistancePlus**<sup>®</sup> MG es un ensayo cualitativo y no proporciona valores cuantitativos ni información sobre la carga de organismos.
- Los resultados de la prueba se deben correlacionar con la anamnesis, datos epidemiológicos, datos de laboratorio y cualquier otro dato de que disponga el especialista clínico.
- La prevalencia de *M. genitalium* y la resistencia a los macrólidos afectarán a los valores predictivos positivo y negativo de la prueba.
- Es posible que la detección de marcadores de resistencia a los antibióticos no se correlacione con la expresión génica fenotípica.
- El fracaso o éxito terapéutico no se puede determinar basándose en los resultados del ensayo, ya que el ácido nucleico puede persistir tras una terapia antimicrobiana adecuada.
- Los resultados negativos no excluyen la posibilidad de infección debida a una recogida incorrecta de la muestra, error técnico, presencia de inhibidores, confusión de muestras o bajo recuento de organismos en la muestra clínica.
- Los resultados negativos para los marcadores de resistencia no indican susceptibilidad de los microorganismos detectados, ya que pueden estar presentes marcadores de resistencia no medidos por el ensayo u otros mecanismos potenciales de resistencia a los antibióticos.
- Se pueden producir positivos falsos por contaminación cruzada de organismos diana, ácidos nucleicos o producto amplificado de los mismos.

## 14 Control de calidad

El kit **ResistancePlus**<sup>®</sup> MG incluye un control interno para monitorizar la eficacia de la extracción y la inhibición de la qPCR (**Apartado 10.3**).

Se recomienda el kit **ResistancePlus**<sup>®</sup> MG Positive Control (n.º de cat. 95001) y el material de control positivo para la amplificación del ácido nucleico. Consulte el **Apartado 15** para obtener las instrucciones de uso de los controles positivos **ResistancePlus**<sup>®</sup> MG. Se recomienda utilizar una muestra negativa conocida como control negativo.

## 15 Instrucciones de **ResistancePlus**<sup>®</sup> MG Positive Control

El kit **ResistancePlus**<sup>®</sup> MG Positive Control contiene material de control positivo para los mutantes de ARNr 23S de *M. genitalium* y una cepa de ARNr 23S de *M. genitalium* no modificado (**Tabla 14**).

Tabla 14. El contenido del kit <b>ResistancePlus</b> <sup>®</sup> MG Positive Control (n.º de cat. 95001)			
Color de la tapa	Contenido	Descripción	Cantidad (10 reacciones)
Neutra	MG, ARNr 23S no modificado	Molde de control positivo para la detección de <i>M. genitalium</i> , ARNr 23S no modificado	1 x 50 µL
Verde	MG, ARNr 23S de A2058G	Molde de control positivo para la detección de <i>M. genitalium</i> , ARNr 23S de la mutación A2058G	1 x 50 µL
Rojo	MG, ARNr 23S de A2059G	Molde de control positivo para la detección de <i>M. genitalium</i> , ARNr 23S de la mutación A2059G	1 x 50 µL
Azul	MG, ARNr 23S de A2058T	Molde de control positivo para la detección de <i>M. genitalium</i> , ARNr 23S de la mutación A2058T	1 x 50 µL
Amarillo	MG, ARNr 23S de A2058C	Molde de control positivo para la detección de <i>M. genitalium</i> , ARNr 23S de la mutación A2058C	1 x 50 µL

### 15.1 Instrucciones de uso

Prepare las reacciones qPCR como se describe en el **Apartado 10.4** utilizando el control positivo como muestra.

La interpretación de los datos requiere el software de análisis **ResistancePlus**<sup>®</sup> MG. consulte el **23.9** para ver ejemplos de resultados.

## 16 Características de análisis

### 16.1 Rendimiento clínico

#### 16.1.1 Estudio clínico 1

Se realizó un estudio clínico prospectivo-retrospectivo en el Royal Women's Hospital (RWH), Melbourne, Australia. Las muestras se recogieron entre mayo de 2016 y junio de 2016 y, basándose en los resultados del laboratorio clínico se seleccionaron 144 muestras para su inclusión en el estudio. Las 144 muestras consistían en 84 orinas masculinas, 33 orinas femeninas, 14 hisopados vaginales y 13 hisopados de la parte superior de la vagina. Para determinar el rendimiento del kit **ResistancePlus**<sup>®</sup> MG, La detección de *M. genitalium* se comparó con los resultados de laboratorio clínico de una qPCR de ARNr 16S bien establecida y utilizada para diagnóstico rutinario en el RWH<sup>2</sup>, mientras que la detección de mutantes de ARNr 23S se comparó con la secuenciación de Sanger<sup>3</sup>. El kit **ResistancePlus**<sup>®</sup> MG se realizó en un LC480 II, después de extracción de la muestra en el instrumento MagNA Pure 96 con el MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit utilizando el protocolo Universal Pathogen 200. Para la detección de *M. genitalium*, se utilizó una referencia compuesta para las muestras discordantes mediante una tercera reacción qPCR dirigida al gen MgPa<sup>3</sup>. Para la detección de mutantes del ARNr 23S, la secuenciación de Sanger se tomó como el resultado verdadero. Los resultados resueltos y la sensibilidad y especificidad del kit **ResistancePlus**<sup>®</sup> MG para la detección de *M. genitalium* y la detección de mutantes del ARNr 23S se muestran en **Tabla 15**. Se excluyeron dos muestras porque el resultado del control interno no era válido (1 orina femenina y 1 orina masculina). El análisis de la detección de mutaciones del ARNr 23S solamente incluye las muestras para las que se pudo determinar el estado de la mutación. El análisis de los resultados de acuerdo con el tipo de muestra se muestra en la **Tabla 16**. El análisis de mutaciones en ARNr 23S se muestra en la **Tabla 17**.

Tabla 15. Evaluación clínica del kit <b>ResistancePlus</b> <sup>®</sup> MG kit (Estudio clínico 1)						
		Detección de <i>M. genitalium</i> qPCR de ARNr 16S		Detección de mutantes de ARNr 23S Secuenciación		
		Positivo	Negativo	Mutante detectado	Mutante no detectado	No modificado
<b>ResistancePlus</b> <sup>®</sup> MG	Positivo	83	0	Mutante detectado	52	2
	Negativo	1	58 <sup>^</sup>	Mutante no detectado	2	21
<b>Sensibilidad</b>		98,8 % (IC del 95 % 93,5-100,0 %)		<b>Sensibilidad</b>		
<b>Especificidad</b>		100,0 % (IC del 95 % 93,8-100,0 %)		<b>Especificidad</b>		
				96,3 % (IC del 95 % 87,3-99,6 %)		
				91,3 % (IC del 95 % 72,0-98,9 %)		

IC del 95 %: Intervalo de confianza del 95 %; Mutante - Mutación del ARNr 23S en las posiciones A2058G, A2059G, A2058T y A2058C (numeración de *E. coli*); No modificado: ausencia de mutación en estas posiciones

<sup>^</sup> El kit **ResistancePlus**<sup>®</sup> MG detectó un resultado de *M. genitalium* negativo verdadero usando la referencia compuesta, la tabla representa los resultados resueltos

**Tabla 16. Análisis de los resultados clínicos de acuerdo con la muestra <sup>^</sup> (Estudio clínico 1)**

Muestra	<i>M. genitalium</i> negativo esperado	ARNr 23S de <i>M. genitalium</i> no modificado esperado	ARNr 23S de <i>M. genitalium</i> mutante esperado
Orina masculina	28/28	8/10 <sup>1</sup>	41/42 <sup>1</sup>
Orina femenina	12/13	11/11	4/6 <sup>2</sup>
Hisopado vaginal	8/8	1/1	2/2 <sup>3</sup>
Hisopado de la parte superior de la vagina	9/9	1/1	4/4 <sup>4</sup>

Mutante - Mutación del ARNr 23S en las posiciones A2058G, A2059G, A2058T y A2058C (numeración de *E. coli*); No modificado: ausencia de mutación en estas posiciones

<sup>^</sup> 2 orinas femeninas, 3 orinas masculinas, 1 hisopado vaginal excluidos ya que se produjo un error en la secuenciación y no se pudo determinar el estado de la mutación

<sup>1</sup> Orina masculina: 2 *M. genitalium* no modificado clasificados erróneamente como *M. genitalium* mutante detectados, 18 A2058G, 20 A2059G, 3 A2058T correctamente detectados; 1 A2058G clasificados erróneamente como *M. genitalium* no detectado

<sup>2</sup> Orina femenina: 1 A2058G, 3 A2059G correctamente detectados; 2 A2059G clasificados erróneamente como *M. genitalium* detectados, mutante no detectado

<sup>3</sup> Hisopado vaginal: 2 A2059G correctamente detectados

<sup>4</sup> Hisopado de la parte superior de la vagina: 3 A2058G, 1 A2059G correctamente detectados

**Tabla 17. Análisis de mutaciones en el ARNr 23S de *M. genitalium* (Estudio clínico 1)**

Resultado de referencia <sup>^</sup>	Resultado de <i>ResistancePlus</i> <sup>®</sup> MG
No modificado	21/33 <sup>1</sup>
A2058G	22/23 <sup>2</sup>
A2059G	26/28 <sup>3</sup>
A2058T	3/3

<sup>^</sup> Exclusivamente para muestras positivas para *M. genitalium*

<sup>1</sup> No modificado: 2 Orinas masculinas clasificadas erróneamente como *M. genitalium* mutante detectado

<sup>2</sup> A2058G: 1 Orina masculina clasificada erróneamente como *M. genitalium* no detectado

<sup>3</sup> A2059G: 2 Orinas femeninas clasificadas erróneamente como *M. genitalium* mutante no detectado

### 16.1.2 Estudio clínico 2

Un subconjunto de las muestras extraídas del estudio 1 se analizaron en un ABI 7500 Fast. Los resultados se compararon con los resultados clínicos obtenidos a partir de la qPCR de ARNr 16S (Twin 2011) y secuenciación de Sanger (Twin 2012). Las muestras discordantes para la detección de *M. genitalium* se volvieron a analizar en la qPCR de ARNr 16S (Twin 2011) debido a sospechas de degradación de la muestra. Los resultados resueltos y la sensibilidad y especificidad del kit **ResistancePlus<sup>®</sup> MG** para la detección de *M. genitalium* y la detección de mutantes del ARNr 23S se muestran en **Tabla 18**. El análisis de la detección de mutaciones del ARNr 23S solamente incluye las muestras para las que se pudo determinar el estado de la mutación.

Tabla 18. Evaluación clínica del kit <b>ResistancePlus<sup>®</sup> MG</b> (Estudio clínico 2)							
		Detección de <i>M. genitalium</i> qPCR de ARNr 16S		Detección de mutantes de ARNr 23S Secuenciación			
		Positivo	Negativo		Mutante	No modificado	
<b>ResistancePlus<sup>®</sup> MG</b>	Positivo	79	0 <sup>^</sup>	Mutante detectado	47	1	
	Negativo	2	43 <sup>#</sup>	Mutante no detectado	4	19	
Sensibilidad		97,5 % (IC del 95 % 91,4-99,7 %)		Sensibilidad			92,2 % (IC del 95 % 81,1-97,8 %)
Especificidad		100,0 % (IC del 95 % 91,8-100,0 %)		Especificidad			95,0 % (IC del 95 % 75,1-99,9 %)

IC del 95 %: Intervalo de confianza del 95 %; Mutante - Mutación del ARNr 23S en las posiciones A2058G, A2059G, A2058T y A2058C (numeración de *E. coli*); No modificado: ausencia de mutación en estas posiciones

<sup>^</sup> El kit **ResistancePlus<sup>®</sup> MG** (550) detectó 1 positivo verdadero de *M. genitalium* usando la prueba de referencia, la tabla representa los resultados resueltos

<sup>#</sup> El kit **ResistancePlus<sup>®</sup> MG** (550) detectó 10 muestras negativas verdaderas para *M. genitalium* usando la prueba de referencia, la tabla representa los resultados resueltos

### 16.1.3 Estudio clínico 3

Se realizó un estudio clínico retrospectivo en Canterbury Health Laboratories (CHL), Christchurch, Nueva Zelanda, sobre muestras caracterizadas y archivadas de 2010-2016, recogidas con el multi-Collect Specimen Collection Kit (Abbott). Las 137 muestras consistían en 110 orinas masculinas, 11 orinas femeninas, 15 hisopados vaginales, 1 hisopado uretral/vaginal y 1 hisopado vaginal/cervical. Para determinar el rendimiento del kit **ResistancePlus<sup>®</sup> MG**, la detección de *M. genitalium* se comparó con el resultado de laboratorio clínico de una qPCR de MgPa bien establecida, que también se utiliza para diagnóstico rutinario en el CHL (Jensen 2004), y la detección de mutantes ARNr 23S se comparó con la secuenciación Sanger (Jensen 2008). El kit **ResistancePlus<sup>®</sup> MG** se realizó en un LC480 II, después de la extracción de la muestra en el instrumento MagNA Pure 96 con el MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit utilizando el protocolo Universal Pathogen 200. Para la detección de *M. genitalium*, se repitió la prueba rutinaria de MgPa para las muestras discordantes. Para la detección de mutantes del ARNr 23S, la secuenciación de Sanger se tomó como el resultado verdadero. La sensibilidad y especificidad del kit **ResistancePlus<sup>®</sup> MG** para la detección de *M. genitalium* y la detección de mutantes del ARNr 23S se muestran en **Tabla 19**. Se excluyó una muestra porque el resultado del control interno no fue válido. El análisis de la detección de mutaciones del ARNr 23S solamente incluye las muestras para las que se pudo determinar el estado de la mutación. El análisis de los resultados de acuerdo con el tipo de muestra se muestra en **Tabla 20**. El análisis de mutaciones en ARNr 23S se muestra en **Tabla 21**.

Tabla 19. Evaluación clínica del kit *ResistancePlus*<sup>®</sup> MG (Estudio clínico 3)

		Detección de <i>M. genitalium</i> qPCR de ARNr 16S		Detección de mutantes de ARNr 23S Secuenciación		
		Positivo	Negativo	Mutante	No modificado	
<i>ResistancePlus</i> <sup>®</sup> MG	Positivo	76	0	Mutante detectado	52	1
	Negativo	3	57 <sup>^</sup>	Mutante no detectado	5	19
<b>Sensibilidad</b>		96,2 % (IC del 95 % 89,3-99,2 %)		<b>Sensibilidad</b>		91,2 % (IC del 95 % 80,7-97,1 %)
<b>Especificidad</b>		100,0 % (IC del 95 % 93,7-100,0 %)		<b>Especificidad</b>		95,0 % (IC del 95 % 75,1-99,9 %)

IC del 95 %: Intervalo de confianza del 95 %; Mutante - Mutación del ARNr 23S en las posiciones A2058G, A2059G, A2058T y A2058C (numeración de *E. coli*); No modificado: ausencia de mutación en estas posiciones

<sup>^</sup> La tabla representa los resultados resueltos

Tabla 20. Análisis de los resultados clínicos de acuerdo con la muestra (Estudio clínico 3)

Muestra	<i>M. genitalium</i> negativo esperado	<i>M. genitalium</i> no modificado esperado	ARNr 23S de <i>M. genitalium</i> mutante esperado
Orina masculina	45/45	17/18 <sup>1</sup>	38/45 <sup>1</sup>
Orina femenina	4/4	1/1	6/6 <sup>2</sup>
Hisopado vaginal	6/6	1/1	8/8 <sup>3</sup>
Hisopado uretral/vaginal	1/1	0/0	0/0
Hisopado vaginal/cervical	1/1	0/0	0/0

Mutante - Mutación del ARNr 23S en las posiciones A2058G, A2059G, A2058T y A2058C (numeración de *E. coli*); No modificado: ausencia de mutación en estas posiciones

<sup>1</sup> Orina masculina: 1 *M. genitalium* no modificado clasificado erróneamente como *M. genitalium* mutante detectado, 4 A2058G, 32 A2059G, 1 A2058T, 1 A2058C correctamente detectados; 1 A2058G y 1 A2059G clasificados erróneamente como *M. genitalium* no detectado, 3 A2058G y 2 A2059G clasificados erróneamente como *M. genitalium* mutante no detectados

<sup>2</sup> Orinas femeninas: 2 A2058G, 4 A2059G correctamente detectados

<sup>3</sup> Hisopado vaginal: 1 A2058G, 7 A2059G correctamente detectados

**Tabla 21. Análisis de mutaciones en el ARNr 23S de *M. genitalium* Estudio clínico 3)**

Resultado de referencia <sup>^</sup>	Resultado de <i>ResistancePlus</i> <sup>®</sup> MG
No modificado	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> Exclusivamente para muestras positivas para *M. genitalium*

<sup>1</sup> No modificado: 1 Orinas masculinas clasificadas erróneamente como *M. genitalium* mutante detectado

<sup>2</sup> A2058G: 3 Orinas masculinas clasificadas erróneamente como *M. genitalium* mutante no detectado

<sup>3</sup> A2059G: 2 Orinas masculinas clasificadas erróneamente como *M. genitalium* mutante no detectado

#### 16.1.4 Estudio clínico 4

Se llevó a cabo un estudio clínico retrospectivo en el Hospital Universitario Vall d'Hebron (HUVH), Barcelona, España, para evaluar el rendimiento del kit *ResistancePlus*<sup>®</sup> MG<sub>(675)</sub> en la detección de *M. genitalium* y las mutaciones asociadas con la resistencia a azitromicina en muestras retrospectivas recogidas entre diciembre de 2017 y abril de 2018. Las muestras se recogieron usando el DeltaSwab ViCUM<sup>®</sup> (Deltalab, España) para los hisopados o el Vacumed<sup>®</sup> Urine (FL medical, Italia) para la orina. Las 86 muestras consistieron en 46 orinas y 40 hisopados vaginales. Las muestras se extrajeron con un STARlet IVD (Hamilton) y se analizaron en el instrumento CFX96 Dx (Bio-Rad). Para evaluar el rendimiento, la detección de *M. genitalium* se comparó con la proporcionada por un Allplex<sup>™</sup> STI Essential (Seegene) y también con el kit *ResistancePlus*<sup>®</sup> MG (SpeedX) en un LC480 II tanto para detección de *M. genitalium* como para determinar el estado de ARNr 23S. La sensibilidad y la especificidad del kit *ResistancePlus*<sup>®</sup> MG<sub>(675)</sub> para la detección de *M. genitalium* se comparó con la proporcionada por un Allplex<sup>™</sup> STI Essential (Seegene) como se muestra en la **Tabla 22**. La sensibilidad y la especificidad del *ResistancePlus*<sup>®</sup> MG<sub>(675)</sub> comparadas con la de *ResistancePlus*<sup>®</sup> MG es como se muestra en **Tabla 23**. El análisis de los resultado de acuerdo con el tipo de muestra se muestra en **Tabla 24**.

**Tabla 22. Comparación entre el kit *ResistancePlus*<sup>®</sup> MG<sub>(675)</sub> y Allplex<sup>™</sup> STI essential (Estudio clínico 4)**

		Detección de <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
<b>Sensibilidad</b>		100,0 % (IC del 95 % 91,2-100,0 %)	
<b>Especificidad</b>		100,0 % (IC del 95 % 92,3-100,0 %)	

**Tabla 23. Evaluación clínica del kit *ResistancePlus*<sup>®</sup> MG<sub>(675)</sub> (Estudio clínico 4)**

		Detección de <i>M. genitalium</i> <i>ResistancePlus</i> <sup>®</sup> MG (LC480 II)		Detección de mutantes de ARNr 23S <sup>#</sup> <i>ResistancePlus</i> <sup>®</sup> MG (LC480 II)	
		Positivo	Negativo	Mutante detectado	Mutante no detectado
<i>ResistancePlus</i> <sup>®</sup> MG <sub>(675)</sub>	Positivo	40	0	Mutante detectado	20
	Negativo	0	46	Mutante no detectado	1
<b>Sensibilidad</b>		100,0 % (IC del 95 % 91,2-100,0 %)		<b>Sensibilidad</b>	
<b>Especificidad</b>		100,0 % (IC del 95 % 92,3-100,0 %)		<b>Especificidad</b>	
				100,0 % (IC del 95 % 83,2-100,0 %)	
				100,0 % (IC del 95 % 83,2-100,0 %)	

IC del 95 %: Intervalo de confianza del 95 %; Mutante - Mutación del ARNr 23S en las posiciones A2058G, A2059G, A2058T y A2058C (numeración de *E. coli*); No modificado: ausencia de mutación en estas posiciones

<sup>#</sup> 1 muestra excluida del análisis ya que se secuenció como mezcla de no modificado y mutante

**Tabla 24. Análisis de los resultados clínicos de acuerdo con la muestra (Estudio clínico 4)**

Muestra	<i>M. genitalium</i> negativo esperado	ARNr 23S de <i>M. genitalium</i> no modificado esperado	ARNr 23S de <i>M. genitalium</i> mutante esperado
Orina masculina	26/26	5/5	15/15
Hisopado vaginal femenino	20/20	15/15	5/5

## 16.1.5 Estudio clínico 5

Se realizó un estudio clínico retrospectivo en el Royal Women's Hospital (RWH), Melbourne, Australia utilizando orina e hisopados recogidos con el sistema Aptima® desde junio de 2017 hasta noviembre de 2017. Las muestras de pacientes emparejados se recogieron como orina pura (muestra rutinaria) o con el kit de recogida de muestras de orina Aptima® (Hologic), o como hisopo seco (muestra rutinaria) o con el kit de recogida de muestras de hisopo unisex Aptima® (Hologic). Las 147 muestras consistieron en 122 orinas y 25 hisopados vaginales. Para determinar el rendimiento de las muestras recogidas mediante Aptima® con el kit **ResistancePlus®** MG, la detección de *M. genitalium* y la detección de mutantes de ARNr 23S se comparó con los resultados de diagnóstico clínico obtenidos mediante el kit **ResistancePlus®** MG (SpeedX) usando las muestras rutinarias. Las pruebas de las muestras recogidas mediante Aptima® se analizaron en un LC480 II, después de extracción de la muestra en el instrumento MagNA Pure 96 con el MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit utilizando el protocolo Viral NA Universal LV 1000. Los resultados del diagnóstico clínico obtenidos en RWH a partir de una muestra de diagnóstico emparejada analizada con el kit **ResistancePlus®** MG (SpeedX), se tomó como resultado verdadero para *M. genitalium*. Para la detección de mutantes del ARNr 23S, el resultado se comparó con el resultado del diagnóstico y la secuenciación de Sanger.

La sensibilidad y especificidad del kit **ResistancePlus®** MG para la detección de *M. genitalium* y la detección de mutantes del ARNr 23S se muestran en la **Tabla 25**. El análisis de la detección de mutaciones del ARNr 23S solamente incluye las muestras para las que se pudo determinar el estado de la mutación. El análisis de los resultados de acuerdo con el tipo de muestra se muestra en **Tabla 26**.

		Detección de <i>M. genitalium</i> <b>ResistancePlus®</b> MG (muestra rutinaria)		Detección de mutantes de ARNr 23S <b>ResistancePlus®</b> MG (muestra rutinaria)		
		Positivo	Negativo	Mutante	No modificado	
<b>ResistancePlus®</b> MG (con 1 mL de muestra Aptima)	Positivo	77	3	Mutante detectado	51	0
	Negativo	3	64	Mutante no detectado	2	24
Sensibilidad		96,3 % (IC del 95 % 89,4-99,2 %)		Sensibilidad		96,2 % (IC del 95 % 87,0-99,5 %)
Especificidad		95,5 % (IC del 95 % 87,5-99,1 %)		Especificidad		100,0 % (IC del 95 % 86,0-100,0 %)

Muestra	<i>M. genitalium</i> negativo esperado	<i>M. genitalium</i> no modificado esperado	ARNr 23S de <i>M. genitalium</i> mutante esperado
Orina	50/52 <sup>1</sup>	21/22 <sup>1</sup>	45/48 <sup>1</sup>
Hisopado vaginal	14/15 <sup>2</sup>	3/4 <sup>2</sup>	6/6

Mutante - Mutación del ARNr 23S en las posiciones A2058G, A2059G, A2058T y A2058C (numeración de *E.coli*); No modificado: ausencia de mutación en estas posiciones

<sup>1</sup> Orina: 2 *M. genitalium* negativos clasificados erróneamente como *M. genitalium* no modificado y mutante, respectivamente; 1 *M. genitalium* no modificado clasificado erróneamente como *M. genitalium* negativo; 2 *M. genitalium* mutantes clasificados erróneamente como *M. genitalium* no modificado, 1 *M. genitalium* mutante clasificado erróneamente como *M. genitalium* negativo

<sup>2</sup> Hisopado vaginal: 1 *M. genitalium* negativo clasificado erróneamente como *M. genitalium* no modificado; 1 *M. genitalium* no modificado clasificado erróneamente como *M. genitalium* negativo

16.1.6 Estudio clínico 6

Se realizó un estudio retrospectivo en la University of Queensland Centre for Clinical Research (UQCCR), Australia, usando extractos de cobas® x480 procedentes de muestras de orina e hisopados recogidos entre febrero de 2017 y febrero de 2019. Las muestras se recogieron como orina pura o usando el kit de recogida de medios cobas® PCR (Roche) y se extrajo en el instrumento cobas® x480 (cobas® 4800, Roche) usando el protocolo "Full Workflow" y "CT/NG", sin adición de células de control interno SpeedX. Los 109 extractos consistieron en 10 hisopados vaginales, 5 hisopados de la parte superior de la vagina, así como muestras de orina, 84 masculinas y 10 femeninas.

Para determinar el rendimiento de los extractos de cobas® con el kit **ResistancePlus®** MG<sub>(550)</sub>, la detección de *M. genitalium* se comparó con el resultado del diagnóstico rutinario (ensayo MgPa PCR (Trembizki *et al.*, 2017)) y la detección de mutantes de ARNr 23S se comparó con la secuenciación de Sanger. El kit **ResistancePlus®** MG<sub>(550)</sub> se utilizó en un ABI 7500 Fast Dx. La sensibilidad y especificidad del kit **ResistancePlus®** MG<sub>(550)</sub> para la detección de *M. genitalium* y la detección de mutantes del ARNr 23S se muestran en **Tabla 27**. El análisis de la detección de mutaciones del ARNr 23S solamente incluye las muestras para las que se pudo determinar el estado de la mutación. El análisis de los resultados de acuerdo con el tipo de muestra se muestra en **Tabla 28**. El análisis de mutaciones en ARNr 23S se muestra en **Tabla 29**.

Tabla 27. Evaluación clínica del kit <b>ResistancePlus®</b> MG <sub>(550)</sub> (Estudio clínico 6)						
		Detección de <i>M. genitalium</i> MgPa qPCR		Detección de mutantes de ARNr 23S Secuenciación de Sanger		
		Positivo	Negativo	Mutante	No modificado	
<b>ResistancePlus®</b> MG <sub>(550)</sub>	Positivo	54	0	Mutante detectado	37 <sup>^</sup>	0
	Negativo	1	51	Mutante no detectado	0	17
Sensibilidad		98,2 % (IC del 95 % 90,3-100,0 %)		Sensibilidad		100,0 % (IC del 95 % 90,5-100,0 %)
Especificidad		100,0 % (IC del 95 % 93,0-100,0 %)		Especificidad		100,0 % (IC del 95 % 80,5-100,0 %)

<sup>^</sup> 1 muestra vaginal devolvió un resultado de secuenciación no modificado/A2059G mixto que se identificó correctamente como mutante mediante el ensayo **ResistancePlus®** MG<sub>(550)</sub>

Tabla 28. Análisis de los resultados clínicos de acuerdo con la muestra (Estudio clínico 6) <sup>#</sup>			
Muestra	<i>M. genitalium</i> negativo esperado	ARNr 23S de <i>M. genitalium</i> no modificado esperado	ARNr 23S de <i>M. genitalium</i> mutante esperado
Orina masculina	42/42	13/13	26/27 <sup>1</sup>
Orina femenina	6/6	1/1	3/3 <sup>2</sup>
Hisopado vaginal	1/1	1/1	7/7 <sup>3^</sup>
Hisopado de la parte superior de la vagina	2/2	2/2	1/1 <sup>4</sup>

<sup>#</sup> 3 muestras fueron excluidas ya que se produjo un error en la secuenciación y no se pudo determinar el estado auténtico de 23S, incluidas: 2 muestras de orina y 1 muestra vaginal

<sup>1</sup> Orina masculina: 8 A2058G, 3 A2058T y 15 A2059G identificados correctamente; 1 A2058T fue incorrectamente identificado como *M. genitalium* no detectado

<sup>2</sup> Orinas femeninas: 2 A2058G y 1 A2059G identificados correctamente

<sup>3</sup> Hisopado vaginal: 3 A2058G, 2 A2058T y 1 A2059G identificados correctamente; <sup>^</sup> 1 hisopado vaginal se identificó como una mezcla no modificado/A2059G

<sup>4</sup> Hisopado de la parte superior de la vagina: 1 A2059G correctamente identificado

Tabla 29. Análisis de mutaciones en el ARNr 23S de <i>M. genitalium</i> (Estudio clínico 6)	
Resultado de referencia <sup>^</sup>	Resultado de <i>ResistancePlus</i> <sup>®</sup> MG
No modificado	17/17
A2058G	13/13
A2059G	19/19 <sup>1</sup>
A2058T	5/5
A2058C	-

<sup>^</sup>Exclusivamente para muestras positivas para *M. genitalium*

<sup>1</sup> A2059G: 1 hisopado vaginal mixto no modificado/A2059G correctamente identificado como *M. genitalium*, mutación 23S detectada

#### 16.1.7 Estudio clínico 7

Se realizó un estudio clínico retrospectivo en la Unidad de Diagnóstico Microbiológico de la Unidad de Salud Pública (MDU), Victoria, Australia, utilizando hisopos secos y orina limpia recogida entre octubre de 2018 y enero de 2019. Las muestras consistieron en 19 hisopados vaginales, 2 hisopados de la parte superior de la vagina y 44 muestras de orina.

El kit *ResistancePlus*<sup>®</sup> MG se realizó en un LC480 II, tras la extracción de la muestra en el instrumento QIASymphony SP (QIAGEN) utilizando el kit DSP Virus/Pathogen Mini y el protocolo Complex200\_V6\_DSP. Los resultados se compararon con los resultados de diagnóstico de rutina obtenidos con el kit *ResistancePlus*<sup>®</sup> MG (SpeedX) utilizando muestras extraídas en el instrumento MagNA Pure 96 (MP96). Para los resultados discordantes, se realizó una prueba qPCR del ARNr 16S (Twin 2011) para la detección de *M. genitalium* y una secuenciación de Sanger (Twin 2012) para la detección de mutantes de ARNr 23S. La sensibilidad y especificidad del kit *ResistancePlus*<sup>®</sup> MG para la detección de *M. genitalium* y la detección de mutantes del ARNr 23S se muestran en **Tabla 30**. El análisis de la detección de mutaciones del ARNr 23S solamente incluye las muestras para las que se pudo determinar el estado de la mutación. El análisis de los resultado de acuerdo con el tipo de muestra se muestra en **Tabla 31**.

Tabla 30. Evaluación clínica del kit <i>ResistancePlus</i> <sup>®</sup> MG (Estudio clínico 7)						
		Detección de <i>M. genitalium</i> <i>ResistancePlus</i> <sup>®</sup> MG (MP96)		Detección de mutantes de ARNr 23S <i>ResistancePlus</i> <sup>®</sup> MG (MP96)		
		Positivo	Negativo	Mutante	No modificado	
<i>ResistancePlus</i> <sup>®</sup> MG (QIASymphony SP)	Positivo	36	0	Mutante detectado	16	1
	Negativo	1	27	Mutante no detectado	1	18
Sensibilidad		97,3 % (IC del 95 % 85,8-99,9 %)		Sensibilidad		94,1 % (IC del 95 % 71,3-99,9 %)
Especificidad		100,0 % (IC del 95 % 87,2-100,0 %)		Especificidad		94,7 % (IC del 95 % 74,0-99,9 %)

**Tabla 31. Análisis de los resultados clínicos de acuerdo con la muestra (Estudio clínico 7)<sup>#</sup>**

Muestra	<i>M. genitalium</i> negativo esperado	ARNr 23S de <i>M. genitalium</i> no modificado esperado	ARNr 23S de <i>M. genitalium</i> mutante esperado
Orina masculina	17/17	9/9	12/14 <sup>1</sup>
Orina femenina	1/1	1/2 <sup>2</sup>	1/1
Hisopado vaginal	8/8 <sup>#</sup>	7/7	3/3
Hisopado de la parte superior de la vagina	1/1	1/1	-

<sup>#</sup> 1 hisopado vaginal fue excluido ya que se había producido un resultado inválido con el kit **ResistancePlus®** MG

<sup>1</sup> Orina masculina: 1 *M. genitalium* ARNr 23S mutante se identificó incorrectamente como *M. genitalium* no detectado; 1 *M. genitalium* ARNr 23S mutante se identificó incorrectamente como *M. genitalium* detectado, mutación 23S no detectada

<sup>2</sup> Orinas femeninas: 1 incorrectamente identificado como *M. genitalium* detectado, mutación ARNr 23S detectado

## 16.2 Rendimiento analítico

### 16.2.1 Reproducibilidad y repetibilidad

La reproducibilidad y repetibilidad del kit **ResistancePlus®** MG en el LC480 II se evaluó utilizando un molde sintético cuantificado para las dianas MgPa y ARNr 23S de *M. genitalium* (A2058G, A2059G, A2058T y A2058C) a 10.000 y 3x copias LOD por reacción utilizando 6 réplicas (a menos que se especifique lo contrario). Los experimentos se realizaron en el LC480 II.

Para determinar la variabilidad entre lotes, se analizaron dos lotes, en la misma máquina realizados por el mismo operador (**Tabla 32**). Los dos lotes mostraron una buena reproducibilidad con un coeficiente de variación (% CV) de 0,35-2,37% para todas las dianas.

Tabla 32. Variabilidad entre lotes				
	Cq medio	STDEV	% CV	N.º de muestras
<b>MgPa 10.000 copias</b>	16,9	0,15	0,89	12/12
<b>MgPa 30 copias</b>	25,5	0,52	2,05	12/12
<b>A2058G 10.000 copias</b>	20,4	0,48	2,37	12/12
<b>A2058G 36 copias</b>	27,8	0,43	1,54	12/12
<b>A2059G 10.000 copias</b>	18,0	0,06	0,35	12/12
<b>A2059G 30 copias</b>	25,6	0,50	1,94	12/12
<b>A2058T 10.000 copias</b>	18,7	0,09	0,46	12/12
<b>A2058T 30 copias</b>	26,2	0,30	1,14	12/12
<b>A2058C 10.000 copias</b>	17,7	0,13	0,75	12/12
<b>A2058C 30 copias</b>	25,4	0,29	1,15	12/12

Para determinar la variabilidad diaria, las pruebas fueron realizadas durante tres días por el mismo operario en la misma máquina (**Tabla 33**). Las tres series mostraron una buena reproducibilidad entre distintos días, con un coeficiente de variación de 0,88-y 2,31% para todas las dianas.

Tabla 33. Variabilidad diaria				
	Cq medio	STDEV	% CV	N.º de muestras
MgPa 10.000 copias	17,0	0,18	1,09	18/18
MgPa 30 copias	25,6	0,59	2,31	18/18
A2058G 10.000 copias	20,2	0,37	1,83	18/18
A2058G 36 copias	27,9	0,51	1,84	18/18
A2059G 10.000 copias	18,1	0,24	1,34	18/18
A2059G 30 copias	25,7	0,32	1,23	18/18
A2058T 10.000 copias	18,7	0,23	1,22	18/18
A2058T 30 copias	26,3	0,31	1,17	18/18
A2058C 10.000 copias	17,8	0,16	0,88	18/18
A2058C 30 copias	25,5	0,31	1,22	18/18

Para determinar la variabilidad entre análisis, se compararon tres análisis de qPCR, realizados el mismo día por el mismo operador (Tabla 34). Los tres ciclos mostraron una buena reproducibilidad con un coeficiente de variación de 0,40-3,20% para todas las dianas.

Tabla 34. Variabilidad entre análisis				
	Cq medio	STDEV	% CV	N.º de muestras
MgPa 10.000 copias	17,0	0,07	0,40	18/18
MgPa 30 copias	25,7	0,47	1,83	18/18
A2058G 10.000 copias	19,8	0,63	3,20	18/18
A2058G 36 copias	27,5	0,51	1,85	18/18
A2059G 10.000 copias	18,4	0,11	0,61	18/18
A2059G 30 copias	25,7	0,39	1,52	18/18
A2058T 10.000 copias	18,7	0,22	1,18	18/18
A2058T 30 copias	26,4	0,42	1,59	18/18
A2058C 10.000 copias	17,8	0,08	0,46	18/18
A2058C 30 copias	25,5	0,31	1,22	18/18

Para determinar la variabilidad del operador, se compararon dos análisis realizados por dos operadores (Tabla 35). Los dos ciclos realizados por diferentes operadores mostraron una buena reproducibilidad con un coeficiente de variación de 0,54-1,62% para todas las dianas.

Tabla 35. Variabilidad del operador				
	Cq medio	STDEV	% CV	N.º de muestras
MgPa 10.000 copias	16,8	0,12	0,73	12/12
MgPa 30 copias	25,3	0,41	1,61	12/12
A2058G 10.000 copias	20,2	0,24	1,21	12/12
A2058G 36 copias	27,9	0,45	1,62	12/12
A2059G 10.000 copias	17,9	0,10	0,58	12/12
A2059G 30 copias	25,5	0,39	1,53	12/12
A2058T 10.000 copias	18,6	0,10	0,54	12/12
A2058T 30 copias	26,1	0,31	1,20	12/12
A2058C 10.000 copias	17,7	0,13	0,71	12/12
A2058C 30 copias	25,2	0,27	1,06	12/12

Para determinar la variabilidad de los instrumentos, se compararon dos análisis realizados en dos máquinas, por el mismo operador (**Tabla 36**). Los ciclos realizados por diferentes instrumentos mostraron una buena reproducibilidad con un coeficiente de variación de 0,30-2,62% para todas las dianas.

Tabla 36. Variabilidad del instrumento				
	Cq medio	STDEV	% CV	N.º de muestras
MgPa 10.000 copias	16,7	0,10	0,60	12/12
MgPa 30 copias	25,4	0,67	2,62	12/12
A2058G 10.000 copias	20,0	0,07	0,33	12/12
A2058G 36 copias	27,8	0,51	1,82	12/12
A2059G 10.000 copias	17,8	0,05	0,30	12/12
A2059G 30 copias	25,3	0,36	1,41	12/12
A2058T 10.000 copias	18,5	0,09	0,50	12/12
A2058T 30 copias	25,9	0,30	1,16	12/12
A2058C 10.000 copias	17,6	0,13	0,75	12/12
A2058C 30 copias	25,3	0,36	1,44	12/12

Para determinar la variabilidad dentro de un mismo ciclo, se compararon los tres experimentos, establecidos por separado por el mismo operador analizando cada diana en la misma placa (**Tabla 37**). Los tres experimentos mostraron una buena reproducibilidad con un coeficiente de variación de 0,57-3,12% para todas las dianas.

Tabla 37. Variabilidad dentro del ciclo				
	Cq medio	STDEV	% CV	N.º de muestras
MgPa 10.000 copias	17,3	0,36	2,09	18/18
MgPa 30 copias	25,9	0,81	3,12	18/18
A2058G 10.000 copias	20,2	0,11	0,57	18/18
A2058G 36 copias	28,0	0,65	2,31	18/18
A2059G 10.000 copias	17,9	0,15	0,83	18/18
A2059G 30 copias	25,8	0,38	1,46	18/18
A2058T 10.000 copias	18,8	0,12	0,66	18/18
A2058T 30 copias	26,8	0,38	1,41	18/18
A2058C 10.000 copias	17,8	0,15	0,83	18/18
A2058C 30 copias	25,5	0,36	1,41	18/18

#### 16.2.2 Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica del kit **ResistancePlus®** MG en un LC480 II se determinó realizando series de dilución limitadas, utilizando un molde sintético cuantificado para las dianas MgPa y ARNr 23S de *M. genitalium* (A2058G, A2059G, A2058T y A2058C). La sensibilidad para cada diana se determinó como el número de copias por reacción con  $\geq 95$  % de detección mostrado en **Tabla 38**.

Tabla 38. Sensibilidad analítica	
	Sensibilidad analítica (copias/reacción)
MgPa	10
A2058G	12
A2059G	10
A2058T	10
A2058C	10

#### 16.2.3 Especificidad analítica

Este estudio se realizó para evaluar el kit **ResistancePlus®** MG cuando hay organismos no diana presentes en altas concentraciones. Se evaluó un panel de 65 microorganismos (4 virus, 2 protozoos, 4 hongos y 55 bacterias) que representan patógenos o flora comúnmente presentes en el sistema urogenital o estrechamente relacionados con *M. genitalium*. Cada cepa bacteriana se analizó a  $1 \times 10^6$  genomas/ml, salvo que se indique lo contrario. Las cepas virales se analizaron a  $1 \times 10^5$  genomas/ml, salvo que se indique lo contrario. El resto de organismos se analizó a las concentraciones indicadas. Todos los organismos se cuantificaron mediante qPCR, salvo los cuantificados como unidades formadoras de colonias (UFC) o unidades formadoras de placas (UFP) (**Tabla 39**). Todos los microorganismos se analizaron por triplicado. Todos los microorganismos analizados se diluyeron en una matriz clínica negativa (orina o hisopo vaginal).

Los resultados indicaron que ninguno de estos organismos produjo resultados falsos positivos en las matrices negativas de *M. genitalium* (**Tabla 39**).

También se realizó un análisis informático para evaluar si los oligonucleótidos del ensayo **ResistancePlus®** MG podían amplificar y detectar secuencias de ácidos nucleicos de organismos no diana disponibles en BLAST. No se detectaron interacciones significativas.

Tabla 39. Microorganismos sometidos a ensayo de especificidad analítica

Organismo	Concentración (genomas/ml)	Organismo	Concentración (genomas/ml)	Organismo	Concentración (genomas/ml)
<i>Actinomyces israelii</i>	1 x 10 <sup>6</sup>	VIH-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>	VPH tipo 18 (células 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 primum</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>
Virus de herpes simple I	1 x 10 <sup>6</sup>	<i>Mycoplasma orale</i>	1 x 10 <sup>6</sup>		
Virus del herpes simple II	1 x 10 <sup>6</sup>	<i>Mycoplasma penetrans</i>	1 x 10 <sup>6</sup>		

\* el número entre paréntesis indica el número de cepas analizadas

<sup>^</sup> cuantificado como UFP/ml

<sup>#</sup> cuantificado como UFC/ml

#### 16.2.4 Sustancias potencialmente interferentes

Se llevó a cabo un estudio de sustancias interferentes para examinar si las sustancias o condiciones que pueden estar presentes en las muestras de orina o hisopos vaginales podrían afectar al rendimiento del ensayo **ResistancePlus**<sup>®</sup> MG. El panel estaba compuesto por sustancias endógenas como sangre, mucina, leucocitos y medicamentos (con o sin receta) que podrían utilizarse para tratar afecciones urogenitales. Todas las sustancias se evaluaron según el rendimiento del control interno, que monitoriza la extracción y la inhibición de la qPCR. Todas las muestras se analizaron por triplicado. Las sustancias se diluyeron en una matriz clínica negativa (orina o hisopado vaginal), según sea adecuado.

Los resultados indicaron que ninguna de las sustancias y condiciones interfería con la detección del control interno ni producía falsos positivos.

Los resultados se resumen en la **Tabla 40** y en la **Tabla 41**.

**Tabla 40. Sustancias potencialmente interferentes en las muestras de orina**

Clase/Sustancia	Nombre del producto	Concentración de prueba
Sangre total	--	1 % v/v
Semen	--	5,0 % v/v
Moco	Mucina	0,8 % p/v
Antibióticos	Azitromicina	1,8 mg/mL
	Doxiciclina	3,6 mg/mL
Analgésicos	Aspirina	40 mg/mL
	Paracetamol	3,2 mg/ml
Hormonas intravaginales	--	7 mg/mL Progesterona + 0,07 mg/mL Beta Estradiol
Leucocitos	--	10 <sup>5</sup> células/mL
Albúmina	Albúmina de suero bovino	10 mg/mL
Glucosa	--	10 mg/mL
Orina ácida (pH 4,0)	Orina + N-acetil-L-cisteína	pH 4,0
Orina alcalina (pH 9,0)	Orina + Citrato de amonio	pH 9,0
Bilirrubina	--	1 mg/ml

**Tabla 41. Sustancias potencialmente interferentes en muestras de hisopo vaginal**

Clase/Sustancia	Nombre del producto	Concentración de prueba
Sangre	--	60 % v/v
Líquido seminal	--	5,0 % v/v
Moco	Mucina	0,8 % p/v
Productos vaginales y anticonceptivos de venta sin receta	Vagisil Anti-Itch Crème (1,0 oz)	0,25 % p/v
	K-Y Jelly (4,0 oz)	0,25 % p/v
	Options Gynol II Vaginal Contraceptive Gel	0,25 % p/v
	Walgreens Clotrimazole Vaginal Cream (1,5 oz)	0,25 % p/v
	Vagisil Sensitive Skin Formula Maximum Strength Anti-Itch Creme with Oatmeal (1,0 oz)	0,25 % p/v
	Vagisil ProHydrate Natural Feel Internal Moisturizing Gel (0,2 oz x 8 pack)	0,25 % p/v
	Vagisil Daily Intimate Deodorant Powder (8,0 oz)	0,25 % p/v
	Summer's Eve Medicated Douche	0,25 % v/v
Desodorantes y polvos	Summer's Eve Deodorant spray (2,0 oz)	0,25 % v/v
Crema hemorroidal	Preparation H Hemorrhoidal Cream (0,9 oz)	0,25 % p/v
Medicamentos sujetos a prescripción médica	Gel vaginal con metronidazol 0,75 %	0,25 % p/v
	Estrace® (crema vaginal con estradiol, USP 0,01 %)	0,25 % p/v
Leucocitos	--	10 <sup>5</sup> células/mL
Hormonas intravaginales	--	7 mg/mL Progesterona + 0,07 mg/mL Beta Estradiol

#### 16.2.5 Reactividad cruzada con otras mutaciones del ARNr 23S

La reactividad cruzada del kit **ResistancePlus**® MG se evaluó utilizando un molde sintético cuantificado para las dianas MgPa y 23S rRNA de *M. genitalium* (A2059C) a 10.000 y 45 copias por reacción. Los resultados demostraron que la prueba **ResistancePlus**® MG produce una reacción cruzada con la diana de ARNr 23S A2059C de *M. genitalium* con un índice de aciertos del 100 %.

## 17 Atención al cliente y asistencia técnica

Póngase en contacto con la asistencia técnica si tiene alguna pregunta sobre la preparación de las reacciones, las condiciones del ciclado u otras consultas.

Tel.: +61 2 9209 4169; correo electrónico: [tech@speedx.com.au](mailto:tech@speedx.com.au)

## 18 Referencias

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. Capítulo 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 Anexo 1: LightCycler® 480 Instrumento II

La información a continuación se basa en el software LightCycler® 480 (versión 1.5).

El kit **ResistancePlus®** MG contiene tintes para LightCycler® 480 Instrumento II. El kit de Compensación de color **PlexPCR®** (Cat. n.º 90001) se debe ejecutar y aplicar al análisis LC480 II (consulte la **Sección 19.2**). Este kit puede suministrarse a solicitud.

### 19.1 Programación del LightCycler® 480 Instrumento II (LC480 II)

#### Formato de detección

Cree un **Formato de detección** personalizado

**Open Tools** (Abrir herramientas) > **Detection Formats** (Formatos de detección)

Cree un Formato de detección nuevo, y nómbrelo de la siguiente manera: **“SpeedX PlexPCR”** (es posible que se haya creado durante la generación del archivo de Compensación del color de SpeedX Colour) (Consulte la **Figura 3**).

Para la tarea de **Filter Combination Selection** (Selección de combinación de filtros), seleccione lo siguiente (Excitación-Emisión), tal como se muestra en la **Tabla 42**.

Tabla 42. Combinaciones de filtros*						
LC480 II	440-488	465-510	533-580	533-610	533-640	618-660

\* Estas Combinaciones de filtros son los nombres predeterminados de los canales

Establezca la **Selected Filter Combination List** (Lista de combinaciones de filtros seleccionadas) para todos los canales como:

Factor de fusión: 1

Factor de cuantificación: 10

Tiempo máximo de integración (seg): 1

**Figura 3. Formato de detección personalizada SpeedX**

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

#### Configuración del instrumento

Cree un **Formato de detección** personalizado

**Open Tools** (Abrir herramientas) > **Instruments** (Instrumentos)

Para **Instrument Settings** (Configuración del instrumento) > seleccione **Barcode Enabled** (Código de barras habilitado)

### **Configuración del experimento**

Seleccione **New Experiment** (Experimento nuevo)

En la pestaña **Run Protocol** (Ejecutar protocolo)

Para **Detection Format** (Formato de detección) seleccione la opción personalizada: **“SpeedX PlexPCR”** (Figura 4)

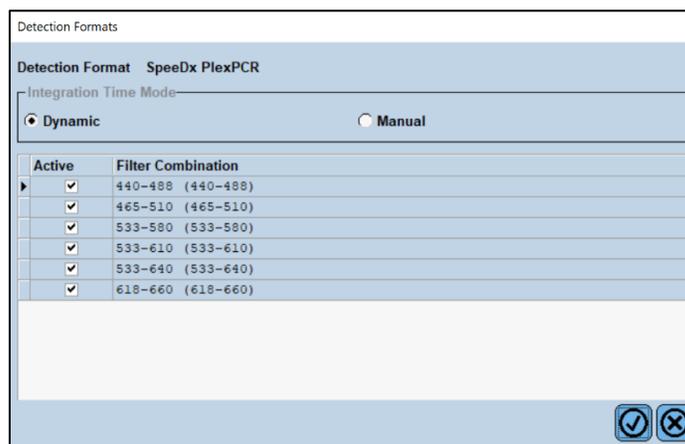
Seleccione **Customize** (Personalizar) >

Seleccione **Integration Time Mode** (Modo de integración temporal) > **Dynamic** (Dinámica)

Seleccione todas las Active **Filter Combinations** (Combinaciones de filtros activas), como se muestra en la

**Figura 4.**

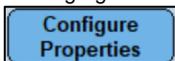
**Figura 4. Formato de detección personalizada**



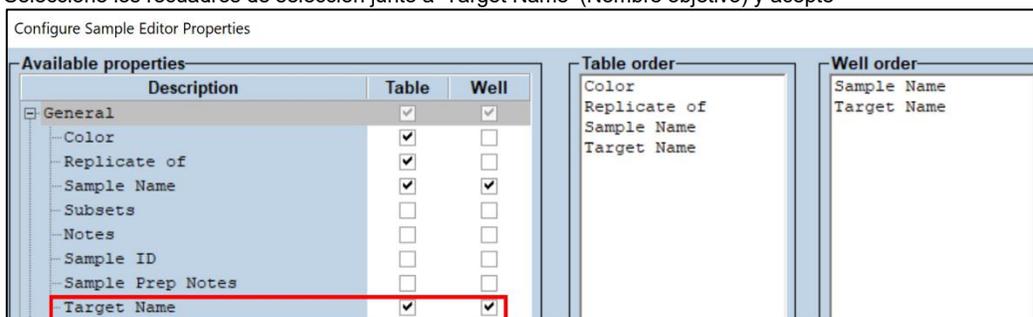
Para habilitar la detección de muestras automatizada en el software de análisis, asigne etiquetas de identificación a los pozos de la placa

Abra el módulo del **Sample Editor** (Editor de muestras)

Para agregar los nombres objetivo, seleccione **Configure Properties** (Propiedades de configuración)



Seleccione los recuadros de selección junto a 'Target Name' (Nombre objetivo) y acepte



Edite el **Target Name** (Nombre objetivo) de cada canal para que coincida con la referencia del instrumento de destino definido en el menú Lab Configuration (Configuración de laboratorio) > Assays (Ensayos) del software de análisis y tal como se muestra en la **Tabla 43**.

**Tabla 43. Canales para los objetivos de *ResistancePlus*® MG**

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

Para asignar etiquetas de identificación, seleccione el pozo

Edite el **Sample Name** (Nombre de la muestra) para que coincida con la etiqueta de identificación definida en el menú Lab Configuration (Configuración de laboratorio) > Assays (Ensayos) del software de análisis (consulte la **Sección 23.3**)

Las muestras deben etiquetarse con la etiqueta de identificación como Prefijo. Se suministran etiquetas de identificación predeterminadas para las reacciones de control (tal como es muestra en la **Tabla 44** y la **Figura 5**). Pueden definirse etiquetas de identificación adicionales tanto para las muestras habituales como para las muestras de control dentro del software de análisis.

**Nota:** Las etiquetas de identificación para muestras reconocen mayúsculas y minúsculas. La etiqueta de identificación debe coincidir de forma exacta con la asignación indicada en el archivo de ejecución.

**Tabla 44. Etiquetas de identificación de muestras para software de análisis**

Tipo de muestra	Prefijo predeterminado (en el software de análisis)
Muestra habitual	Sin opción predeterminada: definido por el usuario
Control negativo	NC
Sin control de plantilla	NTC
Control positivo (MG, 23S ARNr tipo mutante) (Pa)	Pa
Control positivo (MG, 23S ARNr cepa natural) (Pb)	Pb

**Figura 5. Editor de muestras: asignación de etiquetas de identificación a pozos**

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

Establezca el **Reaction Volume** (Volumen de reacción) > 20 µL

Cree el siguiente Programa en la **Tabla 45** (se muestra en más detalle en la **Figura 6 – Figura 9**):

**Tabla 45. Thermocycling Program (Programa de termociclado)**

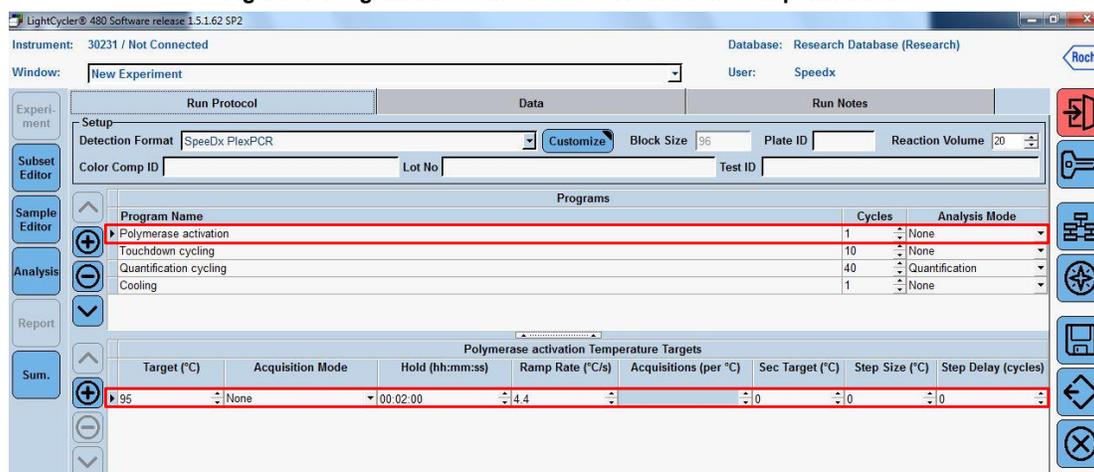
Program name (Nombre del programa)	Cycles (Ciclos)	Target °C (Diana °C)	Hold (Suspensión)	Ramp rate (Tasa de rampa) (°C/s) <sup>*</sup>
Polymerase activation (Activación de polimerasa)	1	95 °C	2 min	4,4
Touch down cycling (Ciclado de toque) <sup>o</sup> : Step down (Disminución) de -0,5 °C/ciclo	10	95 °C	5 s	4,4
		61 °C – 56,5 °C <sup>o</sup>	30 s	2,2
Quantification cycling (Ciclado de cuantificación) <sup>+</sup> : Acquisition/Detection (Adquisición/detección)	40	95 °C	5 s	4,4
		52 °C <sup>+</sup>	40 s	2,2
Cooling (Refrigeración)	1	40 °C	30 s	2,2

<sup>\*</sup> Tasa de rampa predeterminada (placa de 96 pocillos)

<sup>o</sup> **Step size** (Magnitud de disminución): -0,5 °C/Ciclo, **Sec Target** (Diana sec.):56 °C

<sup>+</sup> **Analysis mode** (Modo de análisis): Quantification (cuantificación), **Acquisition mode** (Modo de adquisición): Single (único)

**Figura 6. Programa de termociclado – Activación de la polimerasa**



**Figura 7. Programa de termociclado – Ciclado de toque**

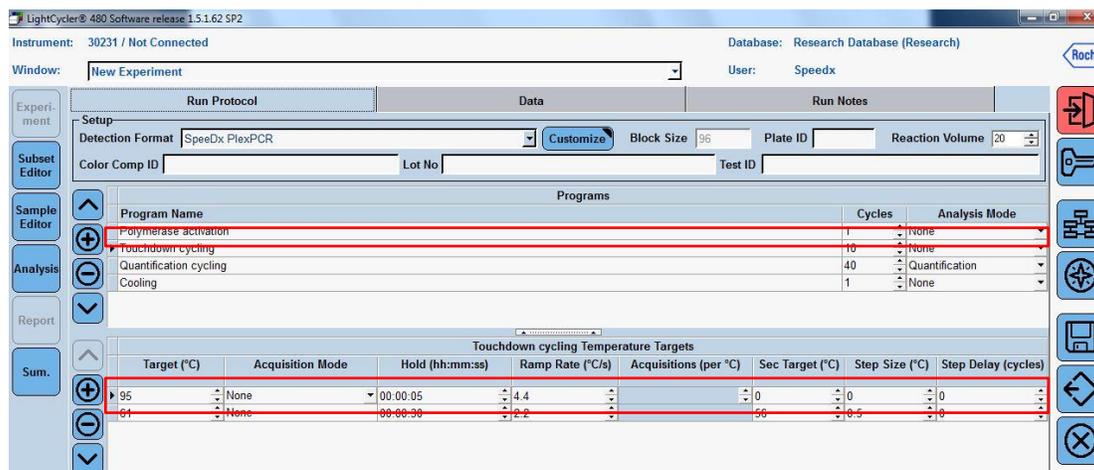


Figura 8. Programa de termociclado – Ciclado de cuantificación

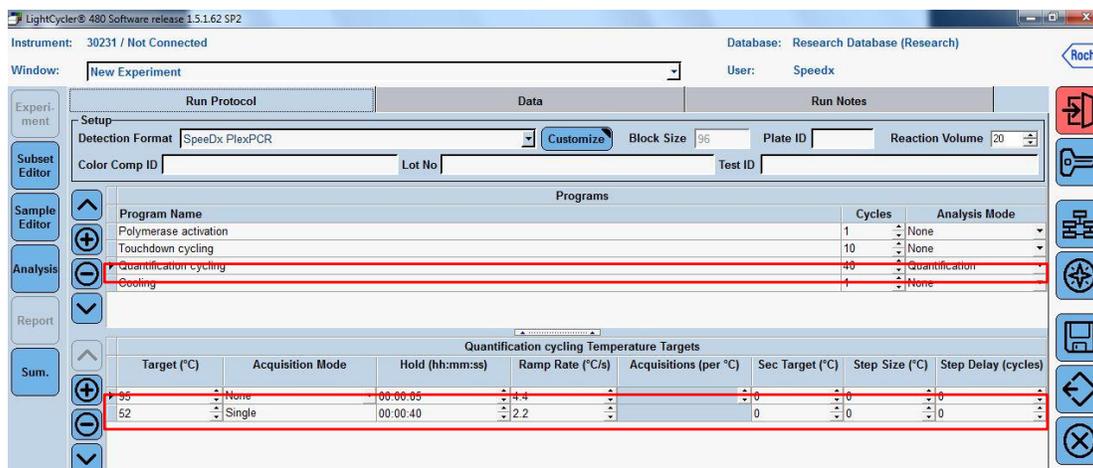
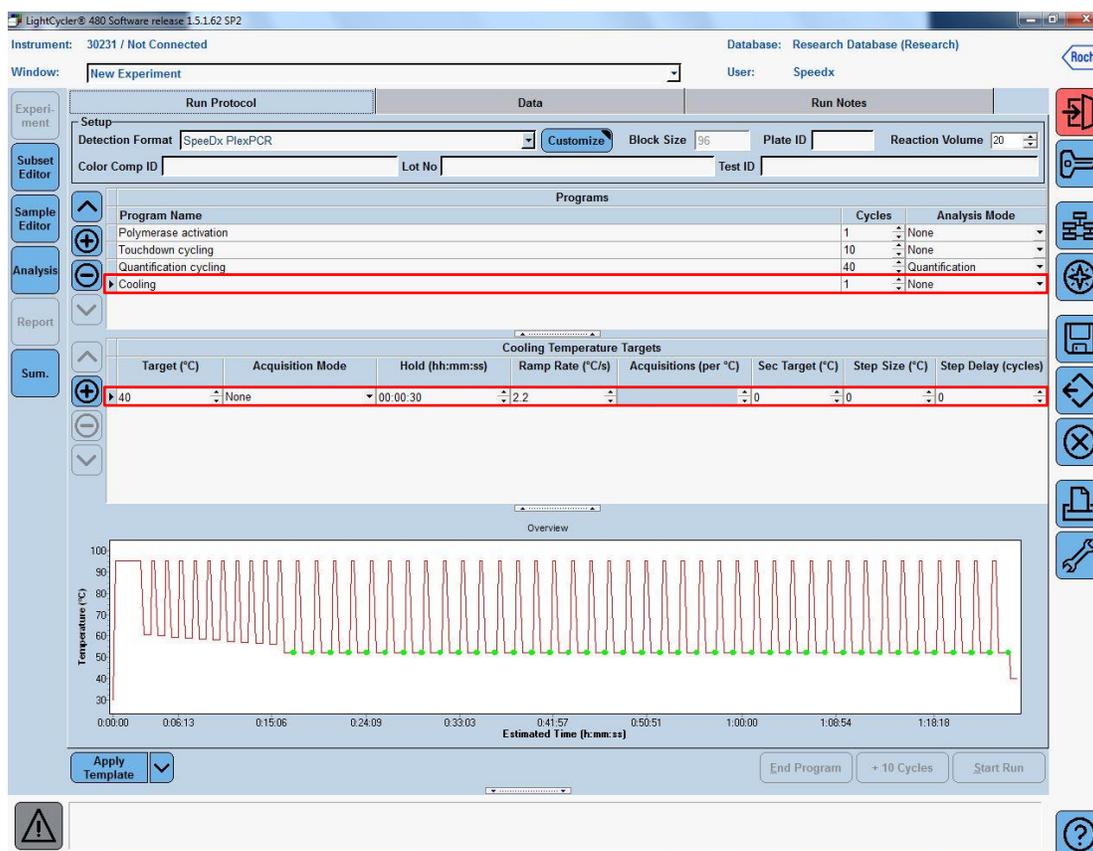


Figura 9. Programa de termociclado: refrigeración



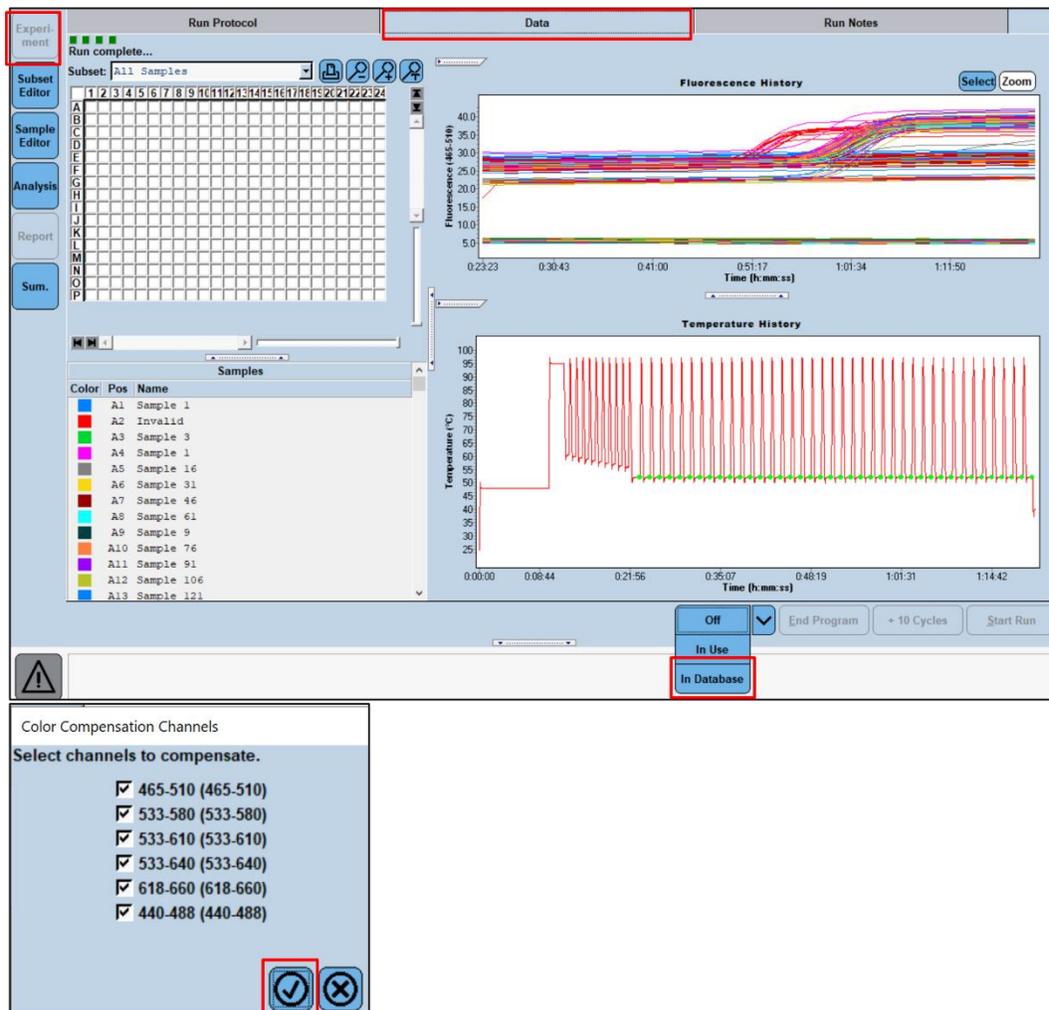
> **Start Run** (Iniciar análisis)

Cuando el programa de ciclado haya terminado, adjunte el objeto CC al archivo de ejecución, tal como se muestra en la (Figura 10) y expórtelo como un archivo.IXO para su análisis en el software de análisis **ResistancePlus**® MG. Consulte la **Sección 19.2** para obtener instrucciones sobre cómo crear el objeto CC y almacenarlo dentro de la base de datos del software LightCycler 480.

Seleccione **Experiment** (Experimento) > **Data** (Datos)

Haga clic en la flecha desplegable junto a **Colour Comp (Off)** (Comp. de color [Desactivada]) y seleccione **In Database** (En la base de datos)

Figura 10. Cómo adjuntar el objeto CC al archivo de ejecución



Seleccione el objeto CC adecuado, asegúrese de que todos los canales estén seleccionados y seleccione el ícono de **selección**



Seleccione el ícono **Save** (Guardar)



Seleccione el ícono **Export** (Exportar)



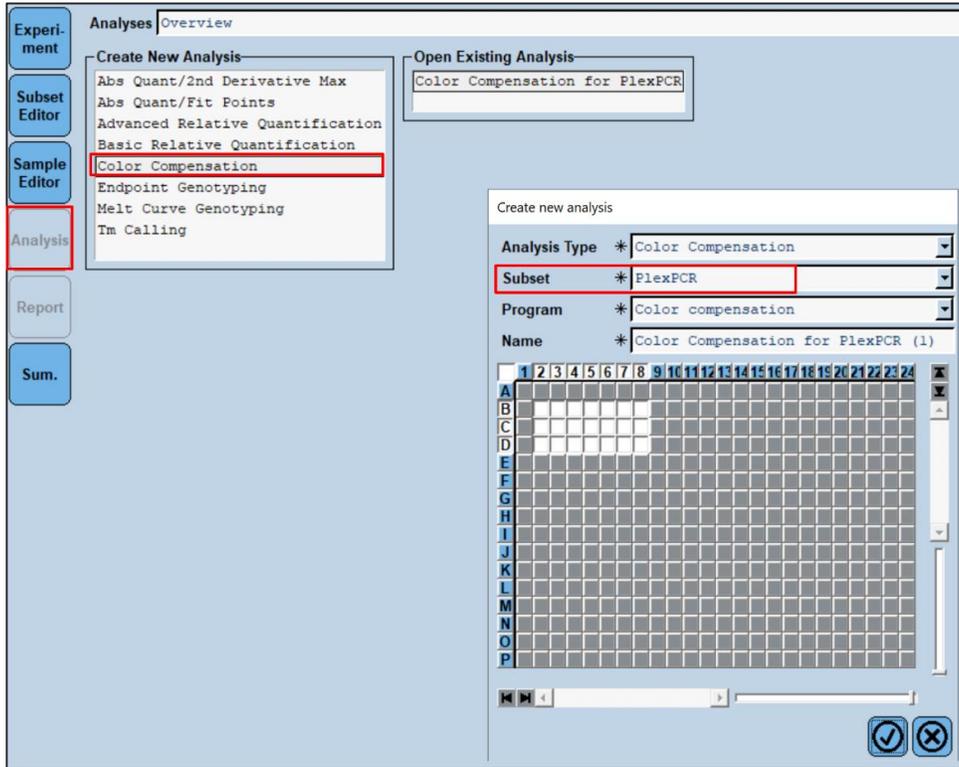
Guarde en una ubicación fácil de identificar

## 19.2 Compensación de color para LightCycler® 480 Instrumento II

**NOTA:** El kit de Compensación de color **PlexPCR®** (Cat. n.º 90001) se debe ejecutar y aplicar al análisis LC480 II. Este kit puede suministrarse a solicitud.

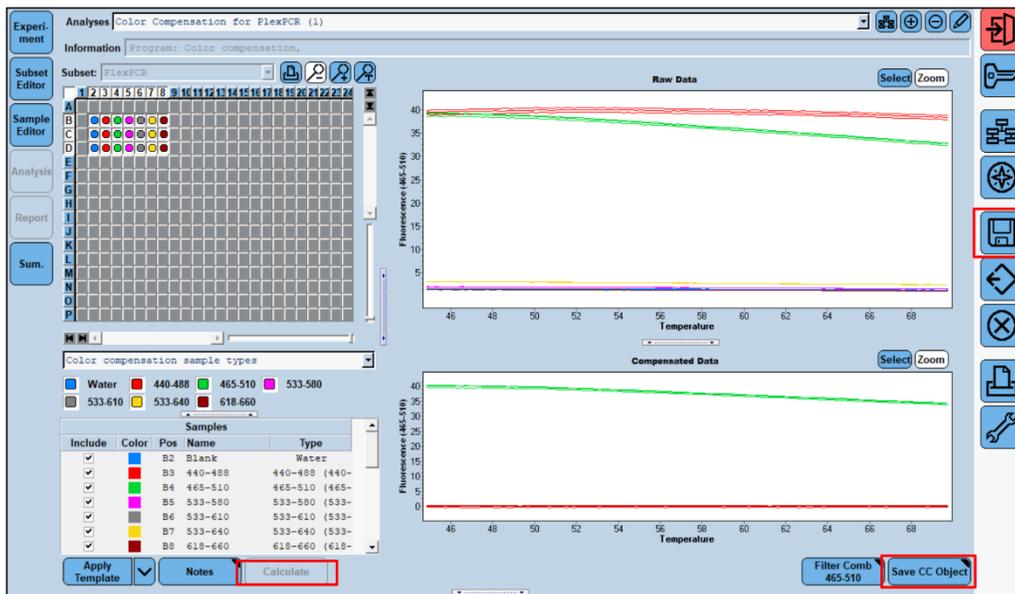
Analice el archivo de Compensación de color a través de **Analysis** (Análisis) > **Colour Compensation** (Compensación de color) y seleccione el subconjunto correcto, tal como se muestra en la (Figura 11).

Figura 11. Análisis: compensación del color



Seleccione **Calculate** (Calcular) (Figura 12).

Figura 12. Calcular y guardar el objeto CC



Consulte las Instrucciones de uso de la compensación del color de PlexPCR (IF-IV0001) para obtener más detalles para garantizar que el archivo de compensación del color se haya creado correctamente.

Seleccione **Save** (Guardar)



### 19.3 Interpretación de los resultados

La interpretación de los datos precisa el software de análisis **ResistancePlus**<sup>®</sup> MG (LC480). El software de análisis se puede proporcionar si se solicita. Contacte con [tech@speedx.com.au](mailto:tech@speedx.com.au) para obtener más información.

Consulte la **Sección 23** para obtener instrucciones para usar el software de análisis **ResistancePlus**<sup>®</sup> MG (LC480).

## 20 Anexo 2: Applied Biosystems® 7500 Fast

La información siguiente se basa en el 7500 Software v2.3.

El kit **ResistancePlus®** MG<sub>(550)</sub> contiene colorantes para el Applied Biosystems® (ABI) 7500 Fast. Se utilizan calibraciones de colorantes predeterminadas para todos los canales. No se requiere una calibración personalizada.

### 20.1 Programación del Applied Biosystems® 7500 Fast

Seleccione **Advanced Setup** (Configuración avanzada)

En **Setup** (Configuración) > abra **Experiment Properties** (Propiedades del experimento) y seleccione lo siguiente

Dé un nombre al experimento

**Instrument** (Instrumento) > 7500 Fast (96 pocillos)

**Type of experiment** (Tipo de experimento) > Quantitation – Standard Curve (Cuantificación - Curva estándar)

**Reagents** (Reactivos) > Other (Otros)

**Ramp Speed** (Velocidad de rampa) > Standard (**Estándar**)

En **Setup** (Configuración) > abra **Plate Setup** (Configuración de la placa)

En la pestaña **Define Targets and Samples** (Definir objetivos y muestras) >

**Define Targets** (Definir objetivos) como se muestra a continuación en la **Tabla 46** y en la **Figura 13** definir colores según necesidad)

Tabla 46. Definir objetivos		
Nombre del objetivo	Notificador	Atenuador
MgPa	FAM	Ninguno
23S rRNA mutation	JOE	Ninguno
IC	TAMRA	Ninguno

Figura 13. Definir objetivos y muestras

Define Targets		
<a href="#">Add New Target</a>	<a href="#">Add Saved Target</a>	<a href="#">Save Target</a> <a href="#">Delete Target</a>
Target Name	Reporter	Quencher
MgPa	FAM	None
23S rRNA Mutation	JOE	None
IC	TAMRA	None

**Definir muestras** (defina los colores según necesidad)

Para permitir la detección de muestras automatizada en el software de análisis, asegúrese de que el Nombre objetivo (como se muestra en la **Tabla 46**) coincida con la referencia del instrumento de destino tal como se definió en el menú **Lab Configuration** (Configuración de laboratorio) > **Assays** (Ensayos) del software de análisis

Además, también deberán asignarse etiquetas de identificación de muestras a los pozos de la placa

En **Setup** (Configuración) > abra **Plate Setup** (Configuración de la placa)

En la pestaña **Define Targets and Samples** (Definir objetivos y muestras) >

#### Definir muestras

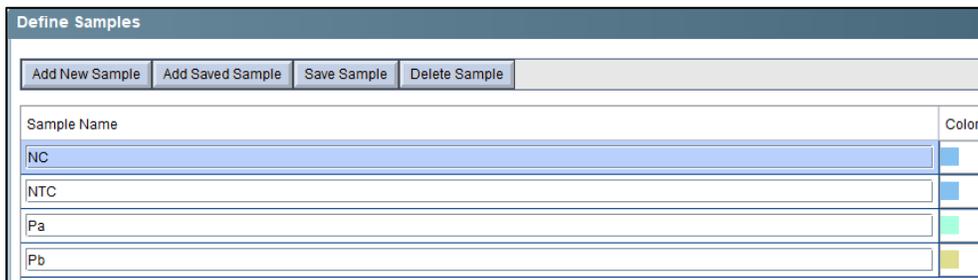
Edite el **Sample Name** (Nombre de la muestra) para que coincida con la etiqueta de identificación definida en el menú **Lab Configuration** (Configuración de laboratorio) > **Assays** (Ensayos) del software de análisis (**Sección 23.3**)

Las muestras deben etiquetarse con la etiqueta de identificación como Prefijo. Se suministran etiquetas de identificación predeterminadas para las reacciones de control (tal como es muestra en la **Tabla 47** y la **Figura 14**). Pueden definirse etiquetas de identificación adicionales tanto para las muestras habituales como para las muestras de control dentro del software de análisis.

**Nota:** Las etiquetas de identificación para muestras reconocen mayúsculas y minúsculas. La etiqueta de identificación debe coincidir de forma exacta con la asignación indicada en el archivo de ejecución.

Tabla 47. Etiquetas de identificación de muestras para software de análisis	
Tipo de muestra	Prefijo predeterminado (en el software de análisis)
Muestra habitual	Sin opción predeterminada: definido por el usuario
Control negativo	NC
Sin control de plantilla	NTC
Control positivo (MG, 23S ARNr tipo mutante) (Pa)	Pa
Control positivo (MG, 23S ARNr cepa natural) (Pb)	Pb

**Figura 14. Editor de muestras: asignación de etiquetas de identificación a pozos**



En la pestaña **Assign Targets and Samples** (Asignar objetivos y muestras) >

Seleccione los pozos y asigne los objetivos y las muestras a los pozos seleccionados

Seleccione **Passive reference** (Referencia pasiva) > None (Ninguna)

En **Setup** (Configuración) > abra **Run Method** (Ejecutar método)

Establezca el **Reaction Volume Per Well** (Volumen de reacción por pozo) > 20 µL

Cree el siguiente programa en la **Tabla 48** (que se muestra en mayor detalle en Vista gráfica (**Figura 15** y **Figura 16**) y en la Vista tabular (**Figura 17**).

Tabla 48. Thermocycling Program (Programa de termociclado)				
Program name (Nombre del programa)	Cycles (Ciclos)	Target °C (Diana °C)	Hold (Suspensión)	Ramp (Rampa)*
Polymerase activation (Activación de polimerasa)	1	95 °C	2 min	100 %
Touch down cycling (Ciclado de toque): Step down (Disminución) de -0,5 °C/ciclo <sup>δ</sup>	10	95 °C	5 s	100 %
		61 °C – 56,5 °C <sup>δ</sup>	30 s	100 %
Quantification cycling (Ciclado de cuantificación)*: Acquisition/Detection (Adquisición/detección)	40	95 °C	5 s	100 %
		52 °C <sup>+</sup>	40 s	100 %

\* ≠ Tasa de rampa predeterminada

δ Enable AutoDelta (Activar AutoDelta): -0,5 °C/ciclo

+ Collect data on hold (Recogida de datos en suspensión)

Figura 15. Run method (Método de análisis) - Graphical View (Vista gráfica)

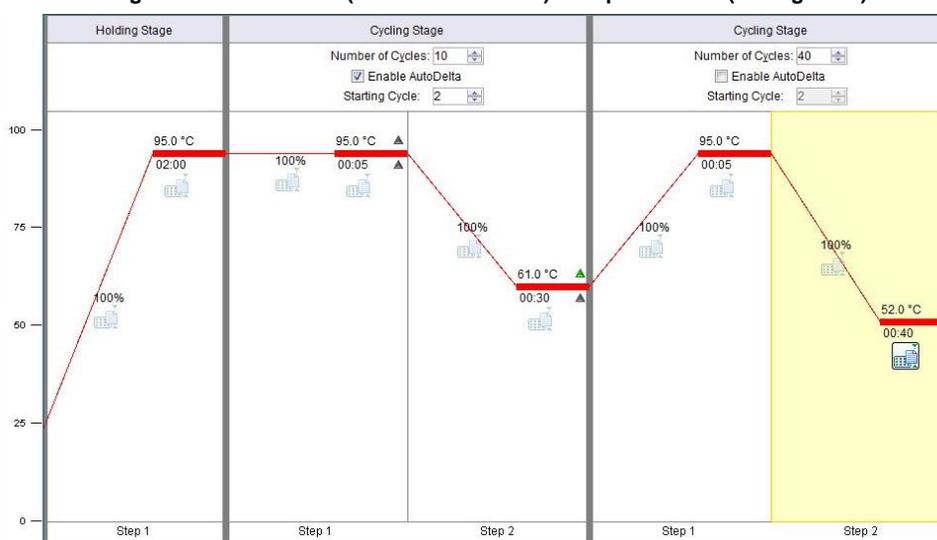


Figura 16. Run method (Método de análisis) – Graphical View – Enable AutoDelta (Vista gráfica - Activar AutoDelta)



**Figura 17. Run method (Método de análisis) – Tabular View (Vista tabular)**

	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

En **Setup** (Configuración) > abra **Run Method** (Método de análisis)

Seleccione **Start Run** (Iniciar análisis)

### 20.2 Interpretación de los resultados

La interpretación de los datos precisa el software de análisis **ResistancePlus**® MG (7500). El software de análisis se puede proporcionar si se solicita. Contacte con [tech@speedx.com.au](mailto:tech@speedx.com.au) para obtener más información.

Consulte la **Sección 23** para obtener instrucciones para usar el software de análisis **ResistancePlus**® MG (7500).

## 21 Anexo 3: Applied Biosystems 7500 Fast Dx

La información siguiente se basa en el SDS Software v1.4.1 para el 7500 Fast Dx.

El kit **ResistancePlus**<sup>®</sup> MG<sub>(550)</sub> contiene colorantes para el Applied Biosystems<sup>®</sup> (ABI) 7500 Fast Dx. Se utilizan calibraciones de colorantes predeterminadas para todos los canales. No se requiere una calibración personalizada.

### 21.1 Programación del Applied Biosystems<sup>®</sup> 7500 Fast Dx

Seleccione Create New Document (Crear nuevo documento)

En **New Document Wizard** (Asistente para documentos nuevos), seleccione lo siguiente (**Figura 18**)

**Assay** (Ensayo) > Standard Curve (Absolute Quantification) (Curva estándar) (Cuantificación absoluta)

**Container** (Recipiente) > 96-Well Clear (96 pocillos, transparente)

**Template** (Patrón) > Blank document (Documento en blanco)

**Run mode** (Modo de análisis) > Standard 7500

**Operator** (Operador) > Escriba el nombre del operador

**Comments** (Observaciones) > Escriba las observaciones o notas adicionales para el archivo de análisis

**Plate Name** (Nombre de placa) > Asigne un nombre único para el archivo de análisis

Seleccione **Next** (Siguiente)

**Figura 18. Ventana del asistente para nuevos documentos**

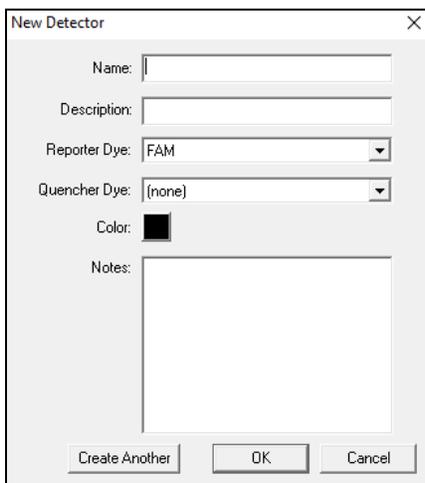
En **Select Detectors** (Seleccionar detectores) > seleccione **New Detector** (Nuevo detector)

Defina los detectores según se muestra a continuación (defina los colores necesarios) (**Tabla 49** y **Figura 19**)

Tabla 49. Definir detectores			
Detectors (Detectores)	Detector name (Nombre del detector)	Reporter dye (Color del indicador)	Quencher (Extintor)
Detector 1	MgPa	FAM	None (Ninguno)
Detector 2	23S rRNA mutation	JOE	None (Ninguno)
Detector 3	IC	TAMRA	None (Ninguno)

Seleccione **OK** (Aceptar)

**Figura 19. Ventana del nuevo detector**

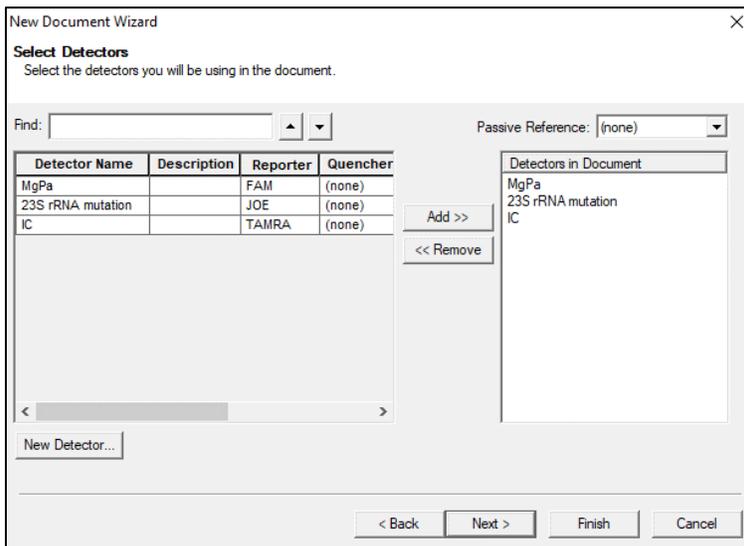


**Seleccione Detectors (Detectores) (Figura 20)**

Seleccione los detectores y **agréguelos** al documento

Seleccione **Passive reference** (Referencia pasiva) > **None** (Ninguna)

**Figura 20. Ventana para seleccionar detectores**



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

Detectors in Document
MgPa
23S rRNA mutation
IC

En **Set Up sample plate** (Configurar placa de muestras) >

Seleccione los pocillos y asigne 3 detectores a los pocillos seleccionados

- MgPa
- 23S rRNA mutation
- IC

Seleccione **Next** (Siguiente)

Para permitir la detección de muestras automatizada en el software de análisis, asegúrese de que el Nombre del detector (como se muestra en la **Tabla 49**) coincida con la referencia del instrumento de destino tal como se definió en el menú **Lab Configuration** (Configuración de laboratorio) > **Assays** (Ensayos) del software de análisis

Además, también deberán asignarse etiquetas de identificación de muestras a los pozos de la placa

En **Setup** (Configuración) > abra **Plate Setup** (Configuración de la placa)

Edite el **Sample Name** (Nombre de la muestra) para que coincida con la etiqueta de identificación definida en el menú **Lab Configuration** (Configuración de laboratorio) > **Assays** (Ensayos) del software de análisis (consulte la **Sección 23.3**)

Las muestras deben etiquetarse con la etiqueta de identificación como Prefijo. Se suministran etiquetas de identificación predeterminadas para las reacciones de control (tal como es muestra en la **Tabla 50**). Pueden definirse etiquetas de identificación adicionales tanto para las muestras habituales como para las muestras de control dentro del software de análisis.

**Nota:** Las etiquetas de identificación para muestras reconocen mayúsculas y minúsculas. La etiqueta de identificación debe coincidir de forma exacta con la asignación indicada en el archivo de ejecución.

Tabla 50. Etiquetas de identificación de muestras para software de análisis	
Tipo de muestra	Prefijo predeterminado_ (en el software de análisis)
Muestra habitual	Sin opción predeterminada: definido por el usuario
Control negativo	NC
Sin control de plantilla	NTC
Control positivo (MG, 23S ARNr tipo mutante) (Pa)	Pa
Control positivo (MG, 23S ARNr cepa natural) (Pb)	Pb

Seleccione **Next** (Siguiente)

En la pestaña **Instrument** (Instrumento)

En la casilla **Settings** (Configuración)

Para **Sample Volume** (volumen de muestra) ( $\mu\text{L}$ ), introduzca 20  $\mu\text{L}$

Cree el siguiente protocolo para el termociclador (**Tabla 51** y **Figura 21** y **Figura 22**)

Tabla 51. Protocolo para el termociclador				
Program name (Nombre del programa)	Cycles (Ciclos)	Target °C (Diana °C)	Hold (Suspensión)	Ramp (Rampa) <sup>‡</sup>
Polymerase activation (Activación de polimerasa)	1	95 °C	2 min	100 %
Touch down cycling (Ciclado de toque): Step down (Disminución) de -0,5 °C/ciclo <sup>◊</sup>	10	95 °C	5 s	100 %
		61 °C – 56,5 °C <sup>◊</sup>	30 s	100 %
Quantification cycling (Ciclado de cuantificación)*: Acquisition/Detection (Adquisición/detección)	40	95 °C	5 s	100 %
		52 °C <sup>+</sup>	40 s	100 %

<sup>‡</sup> Tasa de rampa predeterminada

<sup>◊</sup> Enable AutoDelta (Activar AutoDelta): -0,5 °C/ciclo

<sup>+</sup> Collect data on hold (Recogida de datos en suspensión)

Figura 21. Protocolo para el termociclador – Perfil térmico

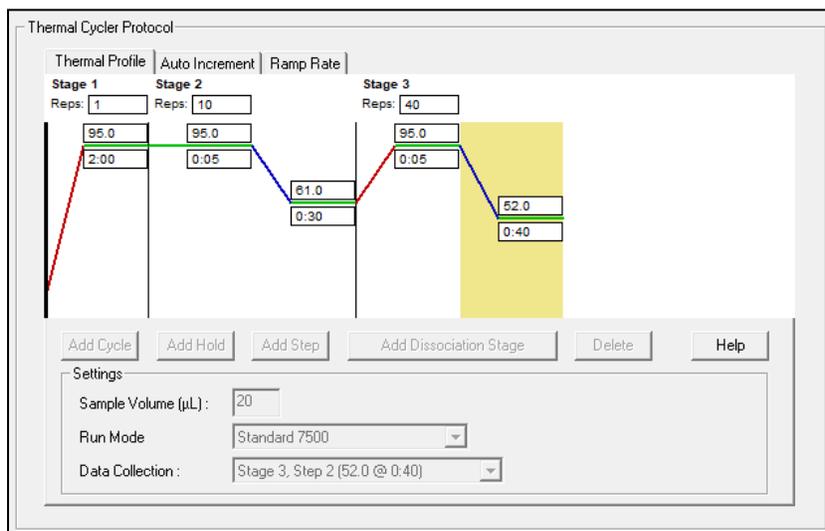
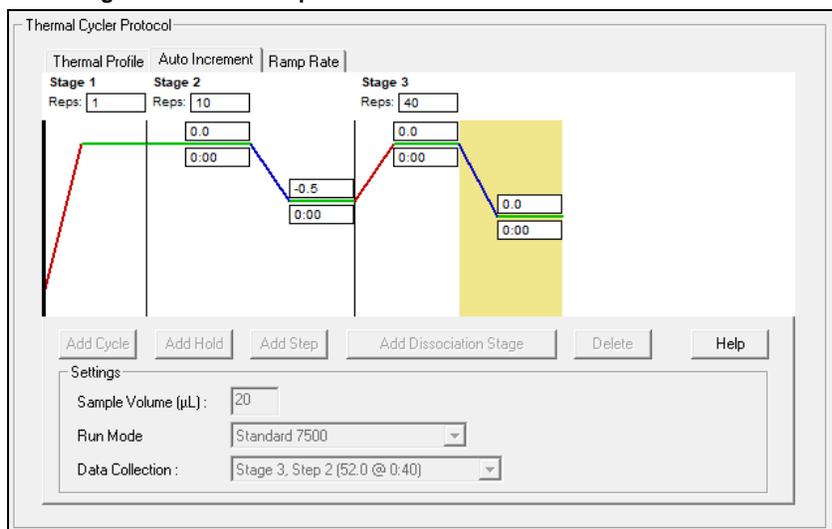


Figura 22. Protocolo para el termociclador – Incremento automático



## 21.2 Interpretación de los resultados

La interpretación de los datos precisa el software de análisis **ResistancePlus®** MG (7500). El software de análisis se puede proporcionar si se solicita. Contacte con [tech@speedx.com.au](mailto:tech@speedx.com.au) para obtener más información.

Consulte la **Sección 23** para obtener instrucciones para usar el software de análisis **ResistancePlus®** MG (7500).

**22 Anexo 4: Sistema de RCP en tiempo real Bio-Rad CFX96™ Dx y CFX96 Touch™**

La información siguiente se basa en el Bio-Rad CFX Manager v3.1.

El kit **ResistancePlus®** MG<sub>(675)</sub> contiene colorantes para el CFX96 Real-Time PCR System. Se utilizan calibraciones de colorantes predeterminadas para todos los canales. No se requiere una calibración personalizada.

**22.1 Programación del CFX96™ Dx y CFX96 Touch™ Real-time PCR System**

Seleccione **View** (Ver) > Abra **Run Setup** (Configuración de análisis)

En la pestaña **Run Setup** (Configuración de análisis) > **Protocol** (Protocolo) > Seleccione **Create New** (Crear nuevo)

En el **Protocol Editor** (Editor de protocolos) (consulte la **Figura 23**)

Ajuste **Sample Volume** (Volumen de muestra) > 20 µL

Cree el siguiente programa de termociclado (**Tabla 52**) y guárdelo como «**SpeedX PCR**». Este protocolo puede seleccionarse para futuros análisis.

Para el ciclado de toque, seleccione el paso 3 y seleccione **Step options** (Opciones de paso) > Increment (Incremento): -0,5 °C/ciclo (se muestra en más detalle en la **Figura 24**).

Tabla 52. Thermocycling Program (Programa de termociclado)			
Program name (Nombre del programa)	Cycles (Ciclos)	Target °C (Diana °C)	Hold (Suspensión)
Polymerase activation (Activación de polimerasa)	1	95 °C	2 min
Touch down cycling (Ciclado de toque) <sup>δ</sup> :	10	95 °C	5 s
Step down (Disminución) de -0,5 °C/ciclo		61 °C – 56,5 °C <sup>δ</sup>	30 s
Quantification cycling (Ciclado de cuantificación) <sup>+</sup> : Acquisition/Detection (Adquisición/detección)	40	95 °C	5 s
		52 °C <sup>+</sup>	40 s

<sup>δ</sup> **Step options** (Opciones de paso) > Increment (Incremento): -0,5 °C/ciclo

<sup>+</sup> **Add Plate Read to Step** (Añadir lectura de placa al paso)

**Figura 23. Thermocycling Protocol – Graphical view (Protocolo de termociclado - Vista gráfica)**

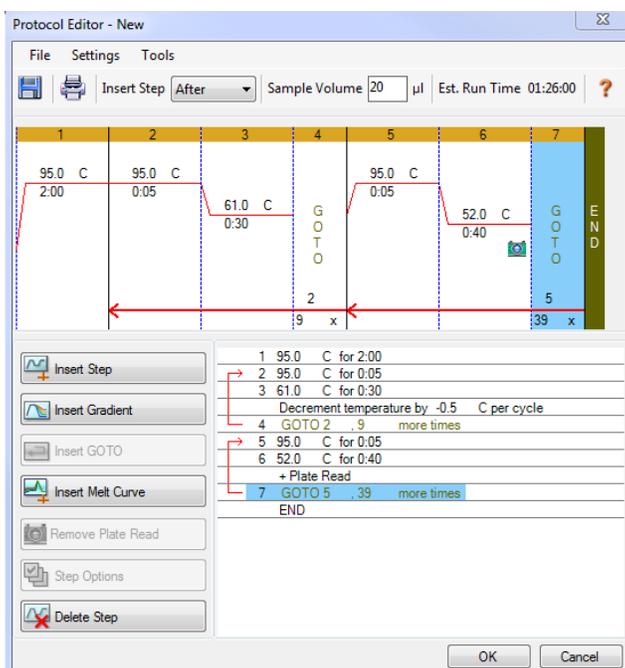
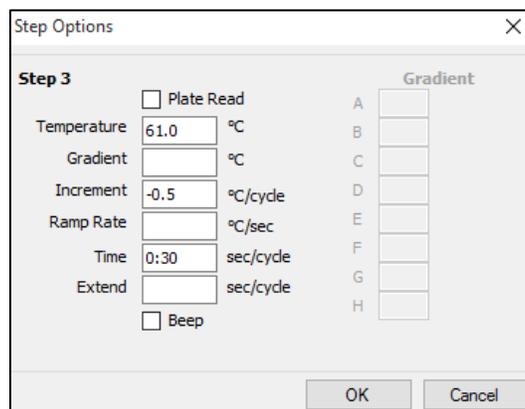


Figura 24. Step Options (Opciones de paso)



En la pestaña **Run Setup** (Configuración de análisis) > **Plate** (Placa)

Seleccione **Create New** (Crear nueva)

Seleccione **Settings** (Configuración) > **Plate Type** (Tipo de placa) > Seleccione **BR Clear** (BR transparente)

Ajuste **Scan mode** (Modo de escaneo) > **All channels** (Todos los canales)

**Select Fluorophores** (Seleccione fluoróforos) > FAM, HEX, Quasar 705 (véase la **Tabla 53**)

Seleccione los pocillos que contengan muestras, asigne el **Sample Type** (Tipo de muestra) y marque **Load** (Cargar) para los fluoróforos (FAM, HEX, Quasar 705).

Guarde la placa

Tabla 53. Canales para las dianas de <i>ResistancePlus</i> <sup>®</sup> MG <sub>(675)</sub>		
MgPa)	23S	IC
FAM	HEX	Quasar 705

En la pestaña **Run Setup** (Configuración de análisis) > **Start Run** (Iniciar análisis)

Seleccione bloque

**Start Run** (Iniciar análisis)

Para permitir la detección de muestras automatizada en el software de análisis, asegúrese de que el Nombre objetivo y el canal (como se muestran en la **Tabla 53** coincida la referencia del instrumento de destino tal como se definió en el menú **Lab Configuration** (Configuración de laboratorio) > **Assays** (Ensayos) del software de análisis

Además, también deberán asignarse etiquetas de identificación de muestras a los pozos de la placa

Abra el módulo **Plate Setup** (Configuración de la placa)

Seleccione el pozo

Edite el **Sample Name** (Nombre de la muestra) para que coincida con la etiqueta de identificación definida en el módulo **Lab Configuration** (Configuración de laboratorio) > **Assays** (Ensayos) del software de análisis (consulte la **Sección 23.3**).

Las muestras deben etiquetarse con la etiqueta de identificación como Prefijo. Se suministran etiquetas de identificación predeterminadas para las reacciones de control (tal como es muestra en la **Tabla 54** y la **Figura 25**). Pueden definirse etiquetas de identificación adicionales tanto para las muestras habituales como para las muestras de control dentro del software de análisis.

**NOTA:** Las etiquetas de identificación para muestras reconocen mayúsculas y minúsculas. La etiqueta de identificación debe coincidir de forma exacta con la asignación indicada en el archivo de ejecución.

Tabla 54. Etiquetas de identificación de muestras para software de análisis	
Tipo de muestra	Prefijo predeterminado_ (en el software de análisis)
Muestra habitual	Sin opción predeterminada: definido por el usuario
Control negativo	NC
Sin control de plantilla	NTC
Control positivo (MG, 23S ARNr tipo mutante) (Pa)	Pa
Control positivo (MG, 23S ARNr cepa natural) (Pb)	Pb

Figura 25. Editor de muestras: asignación de etiquetas de identificación a pozos

	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 Interpretación de los resultados

La interpretación de los datos precisa el software de análisis **ResistancePlus®** MG (CFX). El software de análisis se puede proporcionar si se solicita. Contacte con [tech@speedx.com.au](mailto:tech@speedx.com.au) para obtener más información.

Consulte la **Sección 23** para obtener instrucciones sobre el uso del software de análisis **ResistancePlus®** MG (CFX).

## 23 Anexo A: Interpretación de resultados

Para la interpretación de los datos se precisa el software de análisis **ResistancePlus**<sup>®</sup> MG. Mientras que los cebadores **PlexPrime**<sup>®</sup> ofrecen una mayor especificidad que otros cebadores especiales para el alelo, se puede ver una amplificación no específica procedente del ensayo **ResistancePlus**<sup>®</sup> GC en muestras que contengan una gran concentración del tipo natural del 23S rRNA del *M. genitalium*. El software de análisis **ResistancePlus**<sup>®</sup> MG automatiza la interpretación de la información sobre los resultados de la amplificación y optimiza el flujo de trabajo.

Consulte la **Tabla 55** para ver el software de análisis adecuado para cada uno de los instrumentos de PCR en tiempo real. El software de análisis se puede proporcionar si se solicita. Contacte con [tech@speedx.com.au](mailto:tech@speedx.com.au) para obtener más información.

Tabla 55. Software de análisis <b>ResistancePlus</b> <sup>®</sup> MG		
N.º de cat.	Software de análisis*	Instrumento de PCR en tiempo real
99003	<b>ResistancePlus</b> <sup>®</sup> MG (LC480)	LC480 II
99002	<b>ResistancePlus</b> <sup>®</sup> MG (7500)	7500 Fast y 7500 Fast Dx
99008	<b>ResistancePlus</b> <sup>®</sup> MG (CFX)	CFX96 Dx y CFX96 Touch

\* Consulte el sitio web <https://plexpcr.com/products/sexually-transmitted-infections/resistanceplus-mg/#resources> para asegurarse de que está utilizando la versión más reciente del software de análisis.

**NOTA:** Siga las prácticas habituales de laboratorio para transferir, comunicar y almacenar los resultados con el fin de evitar la pérdida de información de las muestras.

### 23.1 Plataforma FastFinder: Requisitos mínimos de TI

El software de análisis está disponible dentro de la plataforma FastFinder (<https://www.ugentec.com/fastfinder/analysis>). Se recomienda que los clientes accedan a la plataforma de software desde una red y un ordenador seguros y de confianza. Los requisitos de TI mínimos para acceder a la plataforma FastFinder y utilizarla se enumeran a continuación.

#### Requisitos de hardware

Conexión a Internet Cable o DSL

Resolución de pantalla mín.: 1366 x 768 píxeles, óptima: 1920 x 1080 píxeles o superior

#### Navegadores compatibles

- Microsoft Edge 88 o superior
- Firefox 83 o superior
- Google Chrome 88 o superior

#### Requisitos de firewall

Se debe permitir la conexión con los siguientes hosts por HTTPS (puerto 443):

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

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

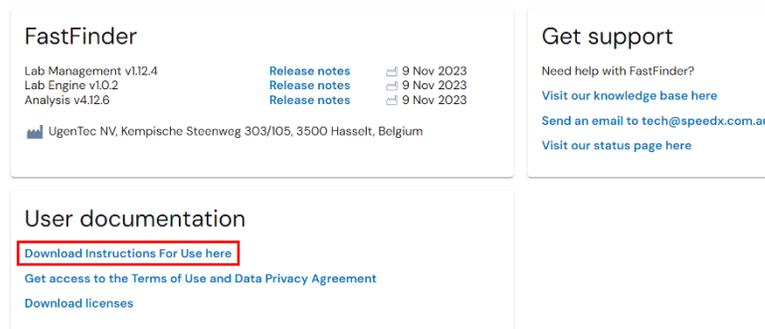
En caso de ser necesario, deberán configurarse las excepciones del firewall para estos hosts. Para poder acceder a todo el contenido de las guías del usuario en la aplicación, también se debe poder acceder al host \*.player.vimeo.com.

Para obtener instrucciones más detalladas sobre la plataforma **FastFinder**, consulte las **Instrucciones de uso de FastFinder**, desde el menú de **Asistencia**.

Para acceder al menú de Asistencia

- Seleccione Asistencia desde la lista de opciones del menú en el panel lateral izquierdo
- Seleccione **Download Instructions For Use here** (Descargar Instrucciones de uso aquí) en la sección de **User Documentation** (Documentación del usuario)

## Support



**FastFinder**

Lab Management v1.12.4 [Release notes](#) 9 Nov 2023  
 Lab Engine v1.0.2 [Release notes](#) 9 Nov 2023  
 Analysis v4.12.6 [Release notes](#) 9 Nov 2023

UgenTec NV, Kempische Steenweg 303/105, 3500 Hasselt, Belgium

**Get support**

Need help with FastFinder?  
[Visit our knowledge base here](#)  
[Send an email to tech@speedx.com.au](mailto:tech@speedx.com.au)  
[Visit our status page here](#)

**User documentation**

[Download Instructions For Use here](#)  
[Get access to the Terms of Use and Data Privacy Agreement](#)  
[Download licenses](#)

### 23.2 Plug-in del ensayo (nuevos usuarios)

Consulte las **Instrucciones de uso de FastFinder** para obtener indicaciones detalladas para configurar los ensayos. Puede acceder a estas desde el menú de **Asistencia**

Puede acceder a FastFinder directamente a través de un navegador web, iniciando sesión con su nombre de usuario y contraseña únicos en <https://customer.fastfinder.app>.

- Seleccione **Lab Configuration** (Configuración de laboratorio) > **Assays** (Ensayos) desde el menú a la izquierda
- Seleccione **Add New Assay** (Añadir ensayo nuevo)
  - > Para el LC480 II > Seleccione **ResistancePlus MG (LC480)** en la lista
  - > Para el 7500 Fast y el 7500 Fast Dx > Seleccione **ResistancePlus MG (7500)** en la lista
  - > Para el CFX96 Dx y el CFX96 Touch > Seleccione **ResistancePlus MG (CFX)** en la lista
- Seleccione **Import Selected** (Importar selección)

Para activar o desactivar las versiones del plug-in del ensayo

- > En la pestaña **General** (General)
- > Navegue a Status (Estado)
- > Seleccione  **Active** para activar o desactivar la versión del ensayo

### 23.3 Nombre de la muestra

Se pueden asignar etiquetas de identificación de muestras a un plug-in del ensayo para automatizar la detección de pozos y los tipos de muestra para análisis.

Seleccione **Lab Configuration** (Configuración de laboratorio) > **Assays** (Ensayos) desde el menú a la izquierda

- En la pestaña **General** (General), navegue a las etiquetas de identificación de la tabla **Sample types** (Tipos de muestras, prefijo), seleccione  para añadir una etiqueta de identificación nueva
  - > Añada la palabra, el acrónimo o la letra que desee a la casilla de texto
  - > Se proporcionan etiquetas de identificación predeterminadas para los controles. Estas etiquetas se pueden eliminar al seleccionar la opción  junto a la etiqueta de identificación
  
- En el software del instrumento (antes o después de que se complete la ejecución) asigne la misma etiqueta de identificación a los pozos correspondientes
  - > Para **LC480 II**, consulte la **Sección 19** obtener instrucciones sobre las etiquetas de identificación de muestras de programación en el archivo de ejecución
  - > Para **7500 Fast**, consulte la **Sección 20** para obtener instrucciones sobre las etiquetas de identificación de muestras de programación en el archivo de ejecución
  - > Para **7500 Fast Dx**, consulte la **Sección 21** para obtener instrucciones sobre las etiquetas de identificación de muestras de programación en el archivo de ejecución
  - > Para **CFX96 Dx** y **CFX96 Touch**, consulte la **Sección 22** para obtener instrucciones sobre las etiquetas de identificación de muestras de programación en el archivo de ejecución

**NOTA:** Las etiquetas de identificación para muestras reconocen mayúsculas y minúsculas. La etiqueta de identificación debe coincidir de forma exacta con la asignación indicada en el archivo de ejecución.

### 23.4 Análisis

Seleccione **Analyses** (Análisis) en el menú a la izquierda para iniciar un análisis nuevo

Seleccione **+ Create New Analysis** (+ Crear análisis nuevo) en la parte superior derecha de la pantalla

Busque el archivo que desea cargar para analizar en un directorio específico

- Seleccione el archivo de ejecución (datos) de la carpeta correspondiente
  - > Seleccione **Open** (Abrir)

El análisis aparecerá en la **Pestaña abierta** como una fila nueva de la tabla

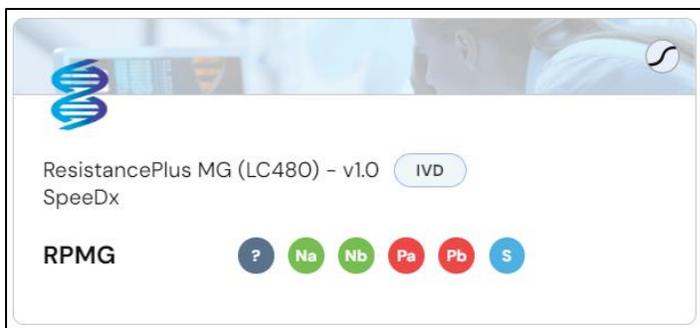
- Si todas las etiquetas de identificación se aplicaron y se leyeron correctamente, el estado aparecerá como **Ready for review** (Listo para revisión)
- Si es necesario que la información del ensayo se asigne manualmente a los pozos, el estado aparecerá como **Manual PCR setup required** (Configuración de RCP manual requerida)

Asigne la información del ensayo a la placa de manera manual si la identificación de la muestra no se configuró en el menú **Lab Configuration** (Configuración de laboratorio) > **Assays** (Ensayos) o si los nombres/objetivos de las muestras no se aplicaron en el software del instrumento

Seleccione el archivo de ejecución en la **Pestaña abierta** del menú **Analyses** (Análisis)

La configuración de la placa se mostrará dentro de la **pestaña de configuración de la RCP** para el análisis abierto

- Para el **LC480 II** > Seleccione **ResistancePlus MG (LC480)**



- Para el **7500 Fast** y el **7500 Fast Dx** > Seleccione **ResistancePlus MG (7500)**



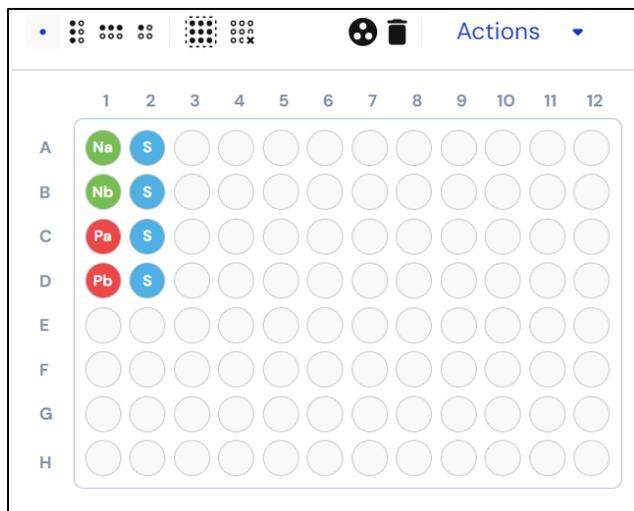
- Para el **CFX96 Dx** y el **CFX96 Touch** > Seleccione **ResistancePlus MG (CFX)**



- Seleccione los pozos y asigne de la siguiente manera:
  - > Muestra habitual (S)
  - > Control negativo (Na)
  - > Control sin plantilla (Nb)
  - > Control positivo (MG 23S ARNr mutante) (Pa)
  - > Control positivo (MG 23S ARNr cepa natural) (Pb)

Para asignar los pozos en la placa, elija una de las siguientes opciones:

- Haga clic y arrastre los símbolos de colores para colocarlos sobre la placa
- Seleccione un pozo o varios (use las teclas Ctrl y Mayús) y luego haga clic en los símbolos de colores relevantes para asignarlos a la selección.



- Seleccione **Analyze** (Analizar)

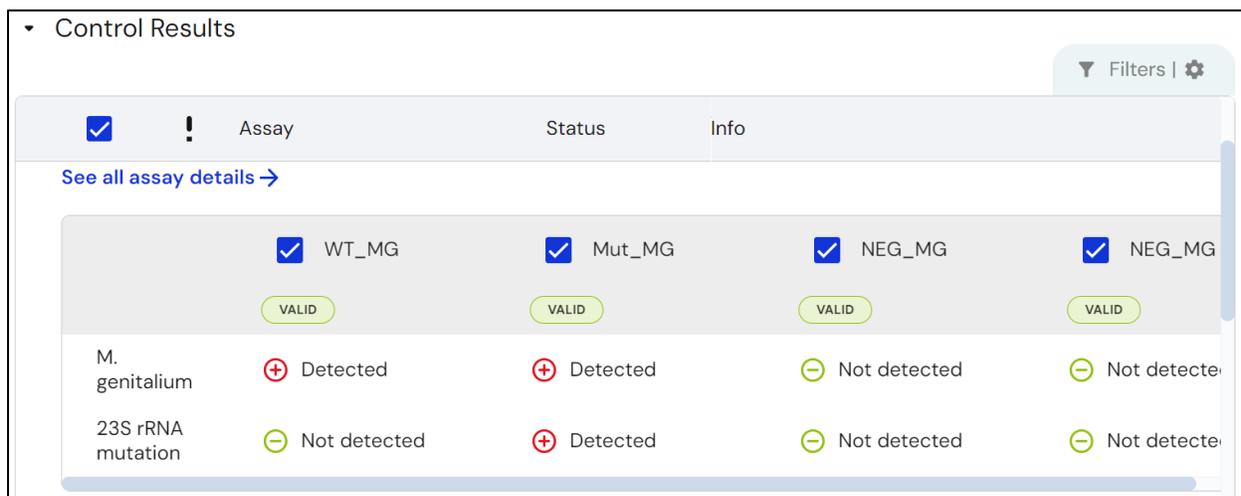
### 23.5 Resultados

Consulte la **Tabla 57** para obtener un resumen de los posibles resultados informados de las muestras.

**NOTA:** Se recomienda ampliamente que se confirmen las curvas de amplificación para todas las muestras positivas.

#### 23.5.1 Pestaña de resumen

Los resultados de control de cada ensayo se muestran en la esquina superior izquierda de la pestaña de resumen, lo que permite la evaluación del control de validez de la ejecución. Puede obtener más detalles ampliando este bloque, lo que permitirá que muestre los detalles por control.



Si un control no es válido, todas las muestras podrán marcarse como erróneas al seleccionar **Fail all samples for this assay** (Error para todas las muestras de este ensayo)

Fail all samples for this assay  


---

Failure reason ▼

Se puede elegir un motivo para el error en el menú desplegable

Los resultados de la muestra se muestran en la esquina inferior izquierda de la pestaña de resumen. Junto al encabezado, los íconos adicionales pueden ofrecer un alto nivel de resumen de los resultados del análisis, como también indicar la cantidad total de muestras que le corresponden a un ícono en particular.

	• 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

Cada muestra se visualiza como una fila dentro de la tabla de resultados de la muestra.

▼ Sample Results  1  4  1  1

 Filters | 

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

El menú desplegable ofrece más detalles sobre cada resultado objetivo y valor Cq por muestra (consulte los ejemplos que se muestran en la **Sección 23.10**).

Las muestras individuales pueden marcarse como error si así se desea (p. ej., si la muestra no es válida) seleccionando **Fail this sample for this assay** (Error en esta muestra para este ensayo)

Fail this sample for this assay

Failure reason 

Se puede elegir un motivo para el error en el menú desplegable

Los gráficos de fluorescencia se pueden observar en la esquina superior derecha de la pestaña de resumen

Los gráficos de fluorescencia se pueden observar en la esquina inferior derecha de la pestaña de resumen

La información a manera de ejemplo y las notificaciones de advertencia se resumen a continuación en la **Tabla 56**.

Tabla 56. Información a manera de ejemplo y notificaciones de advertencia para el software de análisis* ResistancePlus® MG		
Tipo de muestra	Error	Notificación
<b>Notificaciones objetivo del ensayo</b>		
Muestra habitual	No válida, error de CI	Advertencia: CI no válido. Volver a extraer y volver a analizar la muestra.
	Válido pero con control no válido: advertencia de control no válido en muestra habitual con control válido	Advertencia: Control no válido presente. Volver a extraer y volver a analizar la muestra.
Control negativo	No válido: contaminación	Advertencia: Posible contaminación detectada.
Sin control de plantilla		
<b>Notificaciones objetivo genético</b>		
Muestra habitual	Cq objetivo fuera del valor de corte	Información: Cq fuera del valor de corte
Control positivo	No válido: objetivo no detectado	Advertencia: La reacción esperada no ocurrió en el control.
Control negativo	No válido: contaminación	Advertencia: Posible contaminación
	No válido: CI no detectado	Advertencia: CI no detectado
	No válido: CI Cq fuera del valor de corte	Advertencia: Cq fuera del valor de corte
Sin control de plantilla	No válido: contaminación	Advertencia: Posible contaminación
Muestra habitual o control	Señal de fluorescencia incierta	Advertencia: Señal de fluorescencia incierta. Revisión requerida.
	Cq detectado con fluorescencia baja	Fluorescencia del extremo de la dRn por debajo del valor de corte

\*Es posible que no todos los ejemplos que se enumeran en el presente puedan aplicarse a todos los plug-ins del ensayo. Consulte las Instrucciones de uso de FastFinder para obtener todas las notificaciones posibles. Puede acceder a estas desde el menú de Asistencia

### 23.5.2 Pestaña de información

Todos los objetivos se muestran para cada muestra como filas separadas dentro de la tabla en el lado izquierdo. Seleccionar una o más filas hará que se muestren las curvas de fluorescencia correspondientes en el gráfico en la parte superior derecha y también destacará los pozos dentro del diseño de la placa, tal como se muestra en la parte inferior derecha.

Seleccione **Filters** (Filtros) para mostrar los resultados de acuerdo con los parámetros como el nombre del ensayo, el tipo de muestra, el objetivo y el resultado.

Para finalizar el análisis y evitar más ediciones de los usuarios

- > Seleccione **Authorize** (Autorizar)
- > Vuelva a seleccionar **Authorize** (Autorizar) para confirmar
- Para asignar una segunda revisión
  - > Seleccione **Actions** (Acciones), **Assign label** (Asignar etiqueta) y **Second Review** (Segunda revisión)
- Para asignar el análisis a un usuario diferente
  - > Seleccione **Actions** (Acciones) y **Assign User** (Asignar usuario)
  - > Seleccione el usuario correspondiente en la lista desplegable
- Para rechazar el análisis
  - > Seleccione **Actions** (Acciones) y **Discard Analysis** (Desechar análisis)
  - > Añada un comentario y seleccione **Discard** (Desechar) para confirmar

### 23.6 Curva de referencia

Se puede guardar una curva de referencia con el fin de utilizarla para comparar las muestras en la misma placa o en placas diferentes

- Seleccione la muestra de interés, ya sea en la pestaña de **Resumen** o **Información**
- Desde el menú del gráfico de amplificación > Seleccione 
  - > Seleccione la casilla de verificación de la curva de interés y luego seleccione **Mark as reference** (Marcar como referencia)

Esta curva de referencia ahora aparecerá vinculada al ensayo en el menú **Lab Configuration** (Configuración de laboratorio) > **Assays** (Ensayos) dentro de la pestaña **PCR**, y podrá desactivarse en cualquier momento.

### 23.7 Exportación de resultados

- Para exportar los resultados de una ejecución autorizada individual, ya sea como archivo CSV o PDF:
  - > Seleccione **Actions** (Acciones) > **Downloads** (Descargas) en la esquina superior derecha
  - > Seleccione uno de los siguientes tipos de informe: **Análisis (CSV)** o **Análisis (PDF)**
- Para exportar los resultados de varias ejecuciones autorizadas previamente en un único archivo:
  - > Navegue al menú **Archive** (Archivo) > **Sample Results** (Resultados de la muestra)
  - > Use los filtros de la parte superior de la página para mostrar los resultados de interés (el archivo CSV tiene un límite máximo de 10 000 resultados)
  - > Seleccione **Export CSV** (Exportar CSV) en la esquina superior derecha

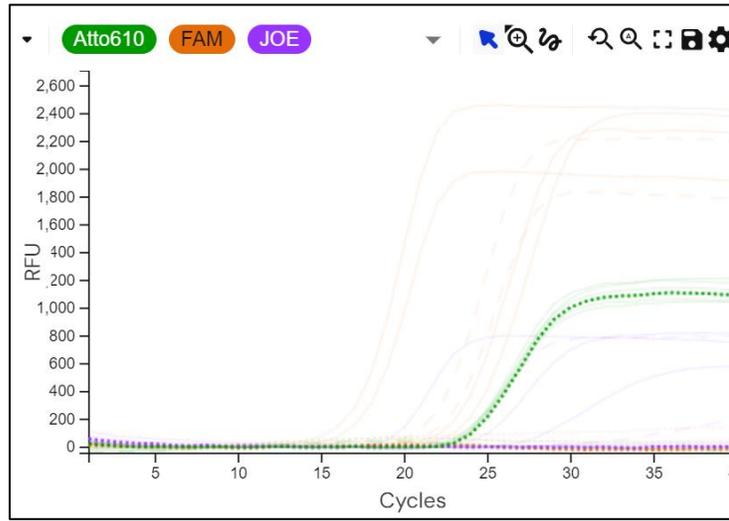
### 23.8 Recuperación de análisis autorizados

- Todos los análisis autorizados están disponibles al seleccionar **Archive** (Archivo) > **Analysis Results** (Resultados del análisis). Seleccione una fila para regresar al resumen de resultados para ese análisis en particular
- Todas las muestras habituales autorizadas se almacenan dentro del menú **Archive** (Archivo) > **Sample Results** (Resultados de las muestras). Seleccione una muestra mostrará información adicional, como el nombre del análisis y los detalles del resultado
- Los resultados objetivo individuales para todas las muestras habituales autorizadas y sus controles se almacenan dentro del menú **Archive** (Archivo) > **Target Results** (Resultados objetivo). Seleccione un objetivo destacará esto en el gráfico de fluorescencia. Seleccione el nombre del análisis hará que regrese al resumen de resultados para ese análisis en particular.

### 23.9 Gráficos del ejemplo de control

Los siguientes ejemplos muestran las curvas de amplificación (curvas de amplificación corregidas por el valor de referencia) y el resumen de resultados del software de análisis **ResistancePlus MG (LC480)** para los tipos de muestras de control.

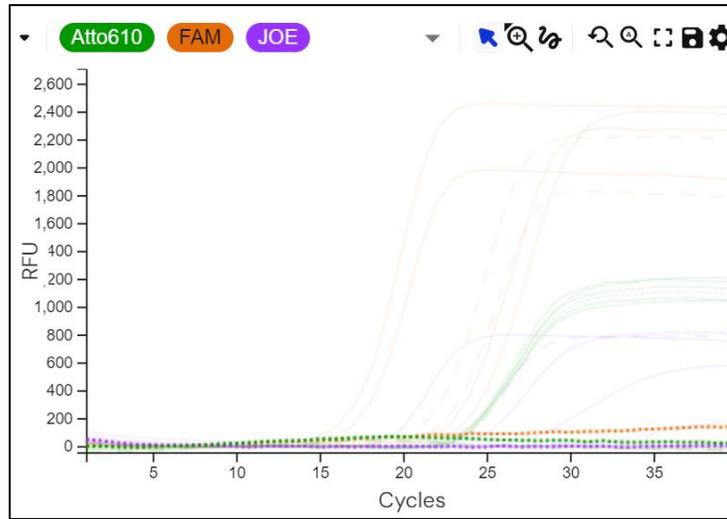
23.9.1 Control negativo de *M. genitalium* (Na) (muestra negativa)



IC MgPa Mutación de 23S ARNr

Muestra	Ensayo	Resultado
Na	ResistancePlus MG (LC480)	Válido
<p>M. genitalium ⊖ Not detected</p> <p>23S rRNA mutation ⊖ Not detected</p>		

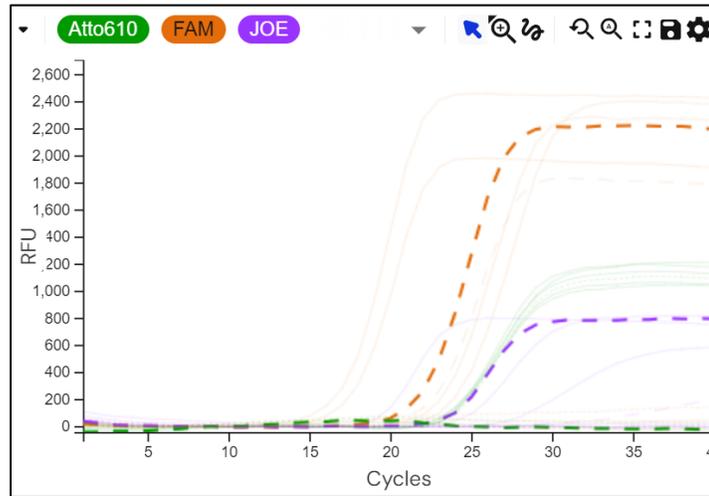
23.9.2 Sin control de plantilla (Nb)



IC MgPa Mutación de 23S ARNr

Muestra	Ensayo	Resultado
Nb	ResistancePlus MG (LC480)	Válido
	M. genitalium	⊖ Not detected
	23S rRNA mutation	⊖ Not detected

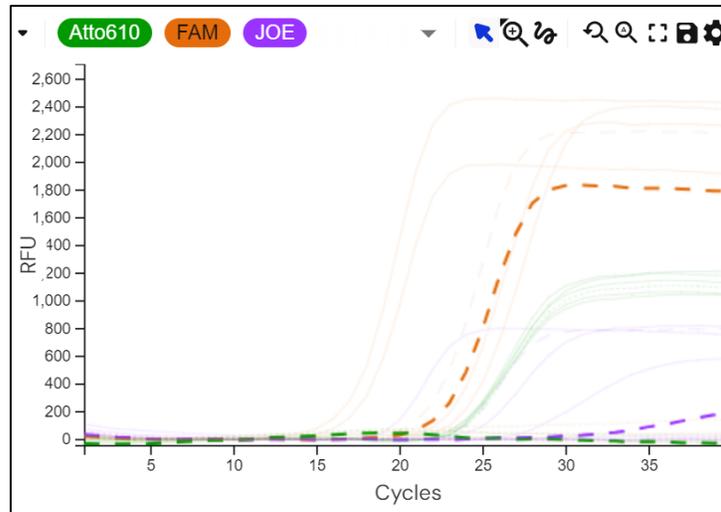
23.9.3 *M. genitalium*, control mutante de 23S ARNr (Pa)



IC MgPa Mutación de 23S ARNr

Muestra	Ensayo	Resultado
Pa	ResistancePlus MG (LC480)	Válido
	M. genitalium	⊕ Detected
	23S rRNA mutation	⊕ Detected

23.9.4 *M. genitalium*, control de cepa natural de 23S ARNr (Pb)



IC MgPa Mutación de 23S ARNr

Muestra	Ensayo	Resultado
Pb	ResistancePlus MG (LC480)	<b>Válido</b>
	M. genitalium	⊕ Detected
	23S rRNA mutation	⊖ Not detected

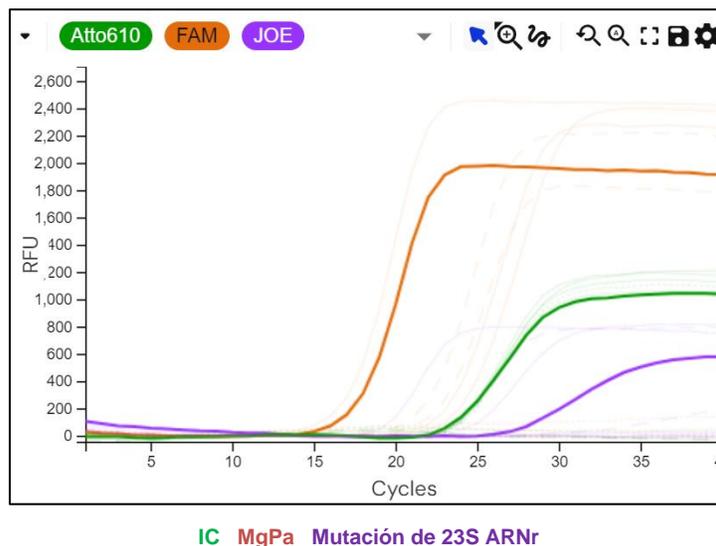
### 23.10 Ejemplos

Los resultados de los ejemplos para el software de análisis **ResistancePlus<sup>®</sup> MG** se muestran en la **Tabla 57**.

Tabla 57. Resultados de ejemplo para la interpretación del software de análisis ResistancePlus <sup>®</sup> MG			
	Muestra	Ensayo	Resultado
	Muestra 101	ResistancePlus MG (LC480)	<b>No detectado</b>
	Muestra 102	ResistancePlus MG (LC480)	<b>Detectado:</b> M. genitalium
	Muestra 103	ResistancePlus MG (LC480)	<b>Detectado:</b> M. genitalium, mutación de 23S ARNr
<sup>1</sup>	Muestra 104	ResistancePlus MG (LC480)	<b>No válido:</b> M. genitalium, mutación de 23S ARNr

<sup>1</sup> Una muestra interpretada como No válida se marcará con Advertencia: CI no válido. Volver a extraer y volver a analizar la muestra.

#### 23.10.1 Ejemplo 1. Copia alta de *M. genitalium*, 23S ARNr de cepa natural

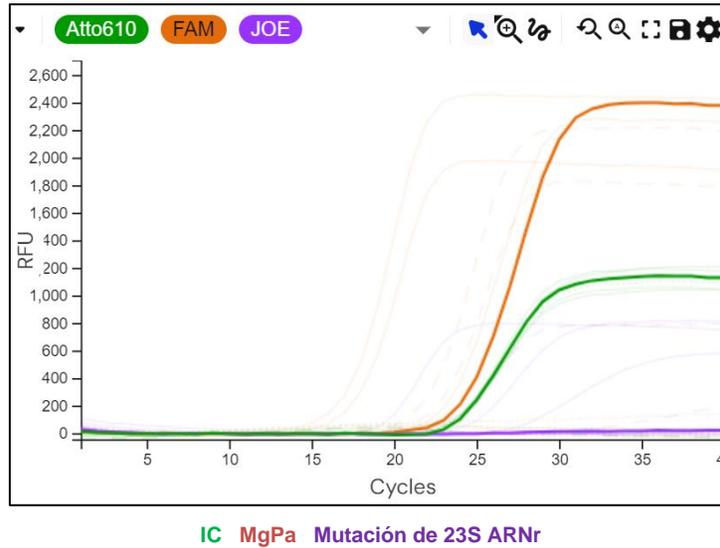


Muestra	Ensayo	Resultado
Muestra 105	ResistancePlus MG (LC480)	<b>Detectado: M. genitalium</b>

<b>Assay results</b> M. genitalium <span style="color: red;">⊕ Detected</span> 23S rRNA mut... <span style="color: green;">⊖ Not detected</span>	MgPa	A2	• Detected	17.451
	23S rRNA mutation	A2	• Detected	27.229
	IC	A2	• Detected	23.307

23.10.2 Ejemplo 2. Copia baja de *M. genitalium*, 23S ARNr de cepa natural

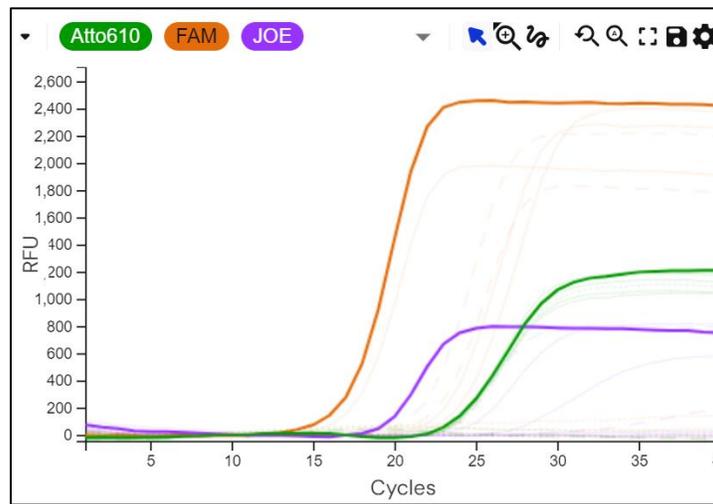


Muestra	Ensayo	Resultado
Muestra 106	ResistancePlus MG (LC480)	<b>Detectado: M. genitalium</b>

<b>Assay results</b> M. genitalium <span style="color: red;">⊕ Detected</span> 23S rRNA mut... <span style="color: green;">⊖ Not detected</span>		MgPa ↳ F2 <span style="color: red;">● Detected</span> 24.094 <hr/> 23S rRNA mutation ↳ F2 <span style="color: green;">● Not detected</span> <hr/> IC ↳ F2 <span style="color: red;">● Detected</span> 23.587
--	--	---

23.10.3 Ejemplo 3. Copia alta de *M. genitalium*, muestra mutante de 23S



IC MgPa Mutación de 23S ARNr

Muestra	Ensayo	Resultado
Muestra 107	ResistancePlus MG (LC480)	<b>Detectado:</b> M. genitalium, mutación de 23S ARNr

**Assay results**

M. genitalium	⊕ Detected
23S rRNA mut...	⊕ Detected

MgPa

↳ D2 ● Detected 16.767

---

23S rRNA mutation

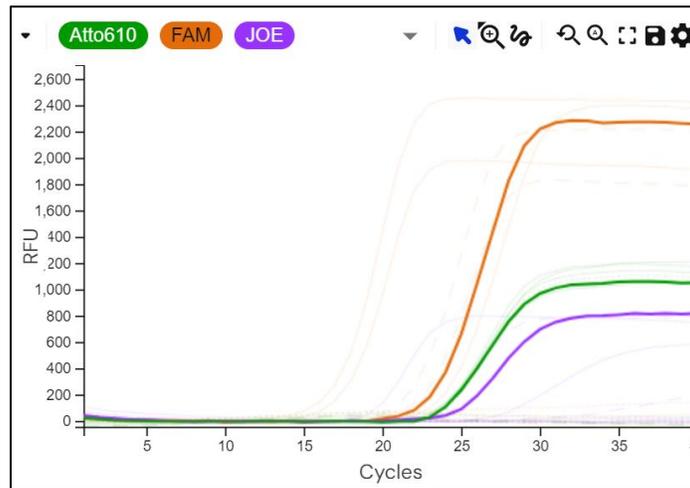
↳ D2 ● Detected 19.125

---

IC

↳ D2 ● Detected 23.421

23.10.4 Ejemplo 4. Copia baja de *M. genitalium*, cepa natural de 23S ARNr



IC MgPa Mutación de 23S ARNr

Muestra	Ensayo	Resultado
Muestra 108	ResistancePlus MG (LC480)	<b>Detectado:</b> M. genitalium, mutación de 23S ARNr

**Assay results**

M. genitalium	⊕ Detected
23S rRNA mut...	⊕ Detected

MgPa

↳ C2 ● Detected 23.191

---

23S rRNA mutation

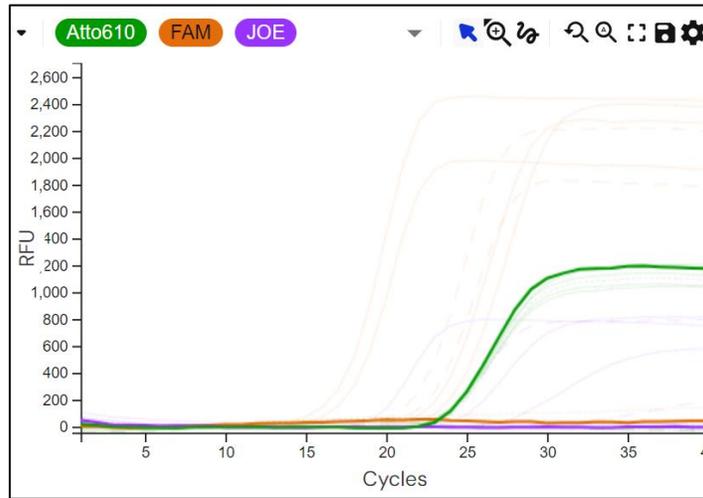
↳ C2 ● Detected 24.539

---

IC

↳ C2 ● Detected 23.528

23.10.5 Ejemplo 5. Muestra negativa



IC MgPa Mutación de 23S ARNr

Muestra	Ensayo	Resultado
Muestra 109	ResistancePlus MG (LC480)	No detectado

**Assay results**

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

MgPa

↳ E2 ● Not detected

---

23S rRNA mutation

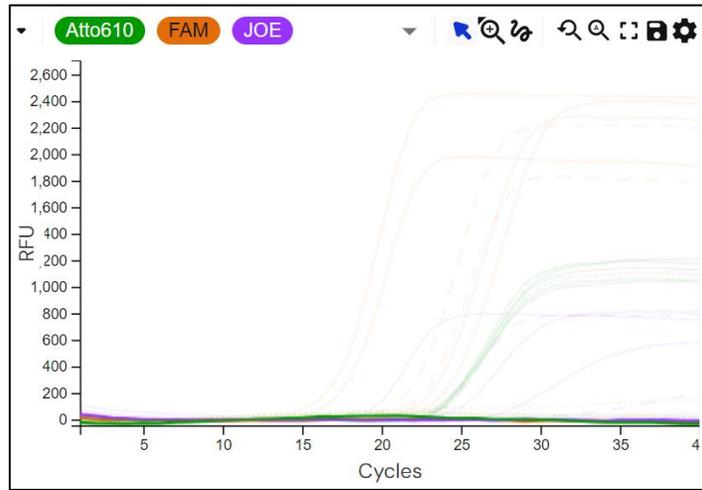
↳ E2 ● Not detected

---

IC

↳ E2 ● Detected 23.583

23.10.6 Ejemplo 6. Muestra no válida



IC MgPa Mutación de 23S ARNr

Muestra	Ensayo	Resultado
Muestra 110	ResistancePlus MG (LC480)	No válido: M. genitalium, mutación de 23S ARNr

**Assay results**

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

MgPa

↳ B2 ● Not detected ▼

---

23S rRNA mutation

↳ B2 ● Not detected ▼

---

IC

↳ B2 ● Not detected ▼

En este ejemplo, el CI no se amplificó, por lo tanto, no se realizó la detección. En el caso de las muestras con CI no válido, se debe volver a extraer la muestra y luego repetir la prueba.

## 24 Glosario



Conformidad europea  
para uso diagnóstico *in vitro*



Número de catálogo



Código de lote



Representante autorizado  
en la Comunidad Europea



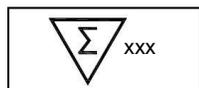
Fabricante



Fecha de fabricación



Limitación de la temperatura



Contiene cantidad suficiente  
para xxx determinaciones



Fecha de caducidad



Importador europeo  
conformidad del Reino Unido



Marca de evaluación de

Los productos SpeedX pueden estar cubiertos por una o más patentes locales o extranjeras. Consulte [www.plexpcr.com/patents](http://www.plexpcr.com/patents) para obtener información detallada de las patentes.

**PlexPCR**<sup>®</sup>, **ResistancePlus**<sup>®</sup>, **PlexPrime**<sup>®</sup> y **PlexZyme**<sup>®</sup> son marcas comerciales propiedad de SpeedX. Los demás copyrights y marcas comerciales son propiedad de sus respectivos propietarios.

© Copyright 2025 SpeedX Pty. Ltd.