

Real Time PCR Detection Kit

Mycoplasma genitalium with Macrolide Resistance
Assay for BD MAX™ System
Instrucciones de uso

CE IVD
2797

Estas instrucciones de uso aplican para las siguientes referencias:

PRODUCTO	REFERENCIA
VIASURE <i>Mycoplasma genitalium</i> with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System	444224

Tabla A 1. Referencia del producto para ser utilizado con el Sistema BD MAX™.

EN To download IFUs in other languages, please visit certest.es/viasure/labeling. Once there, please follow the instructions to access the language required. If you need additional information, please contact: viasure@certest.es.

BG За да изтеглите инструкциите за употреба (IFU) на други езици, моля, отидете на certest.es/viasure/labeling. След това следвайте инструкциите, за да получите достъп до необходимия Ви език. Ако имате нужда от допълнителна информация, моля, свържете се с: viasure@certest.es.

CS Chcete-li si stáhnout návody k použití (IFU) v jiných jazycích, přejděte na stránku certest.es/viasure/labeling. Jakmile se tam dostanete, postupujte podle pokynů pro přístup k požadovanému jazyku. Pokud potřebujete další informace, kontaktujte prosím: viasure@certest.es.

DA Hvis du vil downloade brugsanvisninger på andre sprog, kan du gå til certest.es/viasure/labeling. Når du er der, bedes du følge instruktionerne for at få adgang til det sprog, du har brug for. Hvis du har brug for yderligere oplysninger, kan du kontakte: viasure@certest.es.

DE Um die IFUs in anderen Sprachen herunterzuladen, gehen Sie bitte zu certest.es/viasure/labeling. Wenn Sie dort sind, folgen Sie den Anweisungen, um auf die gewünschte Sprache zuzugreifen. Wenn Sie weitere Informationen benötigen, wenden Sie sich an: viasure@certest.es.

EL Για λήψη των Οδηγίες χρήσης (IFUs) σε άλλες γλώσσες, μεταβείτε στη διεύθυνση certest.es/viasure/labeling. Μόλις φτάσετε εκεί, ακολουθήστε τις οδηγίες για να αποκτήσετε πρόσβαση στη γλώσσα που χρειάζεστε. Εάν χρειάζεστε πρόσθετες πληροφορίες, επικοινωνήστε με τη διεύθυνση: viasure@certest.es.

ES Para descargar las Instrucciones de Uso (IFU) en otros idiomas, por favor, entre en certest.es/viasure/labeling. Una vez esté allí, siga las instrucciones para acceder al idioma que necesite. Si necesita información adicional, contacte: viasure@certest.es.

FR Pour télécharger la notice d'utilisation (IFU) dans d'autres langues, consultez certest.es/viasure/labeling. Une fois sur le site, suivez les instructions pour accéder à la langue de votre choix. Si vous avez besoin d'informations supplémentaires, contactez: viasure@certest.es.

HR Za preuzimanje IFUs-a s drugih jezika unesite certest.es/viasure/labeling. Kada ste tamo, slijedite upute za pristup jeziku koji vam je potreban. Ako trebate dodatne informacije, obratite se na: viasure@certest.es.

HU A használati utasítások (IFU-k) más nyelveken történő letöltéséhez kérjük, látogasson el a certest.es/viasure/labeling weboldalra. Ha ott van, kövesse az utasításokat a kívánt nyelv eléréséhez. Ha további információra van szüksége, kérjük, forduljon a következő címre: viasure@certest.es.

IT Per scaricare le istruzioni per l'uso (IFU) in altre lingue, vai su **certest.es/viasure/labeling**. Una volta che sei lì, segui le indicazioni per accedere alla lingua di cui hai bisogno. Se hai bisogno di ulteriori informazioni, contatta: viasure@certest.es.

LT Norėdami atsisiųsti naudojimo instrukciją kitomis kalbomis, apsilankykite adresu **certest.es/viasure/labeling**. Atidarę šį tinklalapį vykdykite rodomas instrukcijas, kol rasite reikiamą kalbą. Jei reikia daugiau informacijos, kreipkitės adresu: viasure@certest.es.

LV Lai lejupielādētu lietošanas pamācību citās valodās, lūdzu, apmeklējiet vietni **certest.es/viasure/labeling**. Pēc vietnes lapas atvēršanas izpildiet norādījumus, lai piekļūtu vajadzīgajai valodai. Ja nepieciešama papildu informācija, lūdzu, sazinieties ar: viasure@certest.es.

NB Hvis du vil laste ned en bruksanvisning (IFU) på et annet språk, kan du gå inn på **certest.es/viasure/labeling**. Følg instruksjonene på nettsiden for å få tilgang til det språket du ønsker. Hvis du trenger ytterligere informasjon, kan du sende en e-post til: viasure@certest.es.

PT Para transferir instruções de utilização (IFU) noutros idiomas europeus, aceda a **certest.es/viasure/labeling**. Uma vez lá, siga as instruções para acessar ao idioma que pretende. Se necessitar de informações adicionais, entre em contacto conosco através do: viasure@certest.es.

RO Pentru a descărca instrucțiunile IFU în alte limbi, vă rugăm să accesați **certest.es/viasure/labeling**. După ce ați accesat site-ul, urmați instrucțiunile pentru a selecta limba necesară. Pentru informații suplimentare, contactați: viasure@certest.es.

SV För att ladda ner bruksanvisningen på andra språk, gå in på **certest.es/viasure/labeling** och följ instruktionerna. Om du behöver ytterligare information, kontakta: viasure@certest.es.

SK Ak si chcete stiahnuť návody na použitie v iných jazykoch, prejdite na stránku **certest.es/viasure/labeling**. Po otvorení stránky postupujte podľa pokynov na prístup k požadovanému jazyku. Ak potrebujete ďalšie informácie, obráťte sa na: viasure@certest.es.

FI Lataa suomenkielinen turvallisuusopas osoitteesta **certest.es/viasure/labeling**. Seuraa annettuja ohjeita. Mikäli tarvitset lisätietoja, ota yhteyttä: viasure@certest.es.

Consulte **certest.es/viasure/labeling** si su idioma no está en la lista. Contacte con viasure@certest.es si su idioma no está en la página web.

Nota: El usuario debe notificar al fabricante y a la autoridad competente del Estado miembro en el que esté establecido como usuario y/o paciente cualquier incidencia grave relacionada con el producto.

Contenido

1.	Finalidad prevista	6
2.	Introducción y explicación	6
3.	Procedimiento	8
4.	Reactivos suministrados	9
5.	Reactivos y equipos a suministrar por el usuario	9
6.	Condiciones de transporte, almacenamiento y uso.....	10
7.	Precauciones para el usuario	10
8.	Procedimiento del test	12
8.1.	Recogida, transporte y almacenamiento de muestras.....	12
8.2.	Preparación de la muestra y extracción de DNA	13
8.3.	Protocolo PCR	14
8.3.1.	Programación del test VIASURE <i>Mycoplasma genitalium</i> with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System	14
8.3.2.	Preparación de la gradilla del sistema BD MAX™	18
8.3.3.	Configuración del instrumento BD MAX™	19
8.3.4.	Informe BD MAX™	20
9.	Interpretación de resultados	20
10.	Limitaciones del test	25
11.	Control de calidad.....	27
12.	Características analíticas del funcionamiento del test.....	27
12.1.	Linealidad analítica	27
12.2.	Sensibilidad analítica. Límite de Detección (LoD).....	29
12.3.	Rango de medición.....	30
12.4.	Exactitud.....	31
12.4.1.	Veracidad (Sesgo)	31
12.4.2.	Precisión	32
12.5.	Especificidad y reactividad analítica	38
12.5.1.	Especificidad analítica	38

12.5.2. Reactividad analítica	44
12.6. Trazabilidad metrológica	45
13. Características del funcionamiento clínico.....	46
14. Resumen sobre Seguridad y Funcionamiento	46
Bibliografía.....	47
Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico <i>in vitro</i>	47
Marca registrada	47

ESPAÑOL

1. Finalidad prevista

VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System es una prueba de qPCR automatizada diseñada para la detección cualitativa de DNA de *Mycoplasma genitalium* y mutaciones puntuales específicas (conferidas por sustituciones de bases en el *rRNA 23S*) implicadas en la resistencia a macrólidos en frotis vaginales y muestras de orina masculina y femenina de pacientes con sospecha de infección por *M. genitalium* por su profesional de la salud (PS). El uso previsto del test es ayudar en el diagnóstico de la infección por *M. genitalium* y la detección de posible resistencia a macrólidos en combinación con los signos y síntomas clínicos de los pacientes y/o los factores de riesgo epidemiológicos. Los resultados positivos indican la presencia de ácidos nucleicos (NA) diana, pero no excluyen la presencia de NA de otros patógenos no detectados por la prueba. Los resultados negativos no excluyen la presencia de los NA diana y no deben utilizarse como única base para el tratamiento u otras decisiones de gestión del paciente. Este test utiliza el sistema BD MAX™ para llevar a cabo la extracción automatizada del DNA y posterior qPCR utilizando los reactivos suministrados junto con los reactivos universales y desechables del sistema BD MAX™. El DNA es extraído de las muestras, amplificado mediante qPCR y detectado utilizando sondas marcadas con una molécula fluorescente específica para *M. genitalium* y las mutaciones en el gen *rRNA 23S* asociadas a la resistencia a macrólidos.

El producto está destinado a ser utilizado por personal de laboratorio clínico cualificado y formado específicamente en las técnicas de PCR en tiempo real y procedimientos de diagnóstico in vitro (incluida la formación sobre el instrumento de PCR en tiempo real (termociclador) y el sistema de extracción de ácidos nucleicos).

2. Introducción y explicación

Las Enfermedades de Transmisión Sexual (ETS) suponen un gran problema de salud a nivel mundial, ya que afecta a la calidad de vida y causa una grave morbilidad y mortalidad.

Mycoplasma genitalium (MG) es una causa común de uretritis no gonococal (NGU de sus siglas en inglés) y de uretritis no causadas por clamidia en hombres, así como de cervicitis en mujeres, del que se ha reportado su relación con la enfermedad inflamatoria pélvica, infertilidad, y parto prematuro (Baumann et al., 2018; Jensen et al., 2022; van der Schalk et al., 2020). MG es un organismo con forma de frasco, con un orgánulo terminal ligeramente curvado, capaz de causar inflamación en el tracto genitourinario mediante la adhesión a las células epiteliales hospedadoras, desencadenando señales inflamatorias a través de sensores de inmunidad innata altamente expresados (Gnanadurai & Fifer, 2020). Este microorganismo es un organismo de crecimiento lento, conocido por ser el procarionta más pequeño capaz de replicarse de forma

independiente, y el cual ha surgido en los últimos años como un patógeno de transmisión sexual por su capacidad de colonizar el tracto reproductivo de hombres y mujeres (Gnanadurai & Fifer, 2020; Jensen et al., 2022). La infección por MG durante el embarazo se ha asociado con el parto prematuro y podría estar implicada en la pérdida temprana del embarazo y en infecciones neonatales (Heavey, 2017). Puede presentarse simultáneamente con *Chlamydia trachomatis* y otras infecciones de transmisión sexual, lo que dificulta evaluar sus efectos independientes (Heavey, 2017).

Los macrólidos son un tipo de fármacos empleados en el manejo y tratamiento de varias infecciones bacterianas, tales como la neumonía, sinusitis, faringitis, amigdalitis, infecciones cutáneas no complicadas, otitis media o infección por *Helicobacter pylori*, pero son también comúnmente empleados para tratar infecciones por transmisión sexual, como las infecciones gonococales y por clamidia (Patel & Hashmi, 2023). El mecanismo de acción de estos fármacos consiste en su unión a la subunidad ribosomal 50S bacteriana (cerca del sitio peptidil transferasa (región V)), o a los residuos A2058 y A2059 del 23S rRNA (numeración *Escherichia coli*), causando el cese de la síntesis de proteínas bacterianas (van der Schalk et al., 2020).

La resistencia a los macrólidos es un problema emergente preocupante, con tasas de resistencia estimadas entre el 30% y el 100% a nivel mundial (Gnanadurai & Fifer, 2020). Las bacterias adquieren resistencia a los macrólidos principalmente a través de dos mecanismos: polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) y metilación del ARNr. Sin embargo, dado que MG no posee las enzimas necesarias para la metilación, solo puede desarrollar resistencia mediante modificaciones en el objetivo a través de SNPs (van der Schalk et al., 2020). La resistencia suele originarse por una mutación puntual en la posición A2058 o A2059 (según la numeración de *Escherichia coli*) del ARNr 23S, lo que tiene un impacto mínimo en la viabilidad bacteriana y permite su transmisión continua (Gnanadurai & Fifer, 2020). La azitromicina es el macrólido más comúnmente empleado para tratar las infecciones por *M. genitalium*, aunque la josamicina y la pristinamicina son ahora también recomendados (Gnanadurai & Fifer, 2020; Jensen et al., 2022; van der Schalk et al., 2020).

El cultivo de MG es complicado, ya que su crecimiento puede tardar semanas o incluso meses, lo que hace que las pruebas convencionales de susceptibilidad no sean viables. Aunque se ha demostrado que las pruebas de susceptibilidad utilizando cepas de MG cultivadas en células Vero, con diluciones de antibióticos para evaluar la inhibición del crecimiento, son comparables a los métodos de dilución en caldo, esta técnica no es práctica para laboratorios de diagnóstico primario ni para la mayoría de los laboratorios de referencia (Gnanadurai & Fifer, 2020).

Debido a la ausencia de una pared celular, MG no puede visualizarse en la tinción de Gram de secreciones genitales. Además, las pruebas serológicas basadas en anticuerpos presentan limitaciones debido a la reactividad cruzada con otros micoplasmas, incluido *Mycoplasma pneumoniae* (Gnanadurai & Fifer, 2020). No obstante, las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (NAATs), como la reacción en cadena de la polimerasa y la amplificación mediada por transcripción, permiten una detección precisa de MG (Baumann et al., 2018; Heavey, 2017; Jensen et al., 2022). Las NAATs pueden realizarse empleando varios tipos de

muestras genitales, pero las muestras de hisopos vaginales de mujeres y las muestras de la primera orina en hombres parecen ofrecer los mejores resultados cuando se testa para la infección por MG (Heavey, 2017). Dado el alto nivel de resistencia a los antimicrobianos, se recomienda realizar pruebas simultáneas para detectar resistencia genotípica y así orientar el tratamiento adecuado (Gnanadurai & Fifer, 2020).

3. Procedimiento

VIASURE *Mycoplasma genitalium* with *Macrolide Resistance Assay* for BD MAX™ System está diseñado para la detección cualitativa y diferenciación simultánea de DNA de *Mycoplasma genitalium* y marcadores genéticos específicos asociados a la resistencia y sensibilidad a macrólidos en frotis vaginales y muestras de orina masculina y femenina. Tras el aislamiento del DNA, la identificación de estas especies de *M. genitalium* y marcadores genéticos específicos asociados a la resistencia y sensibilidad a macrólidos se realiza mediante la amplificación de una región específica del gen *adhesina MgPa* de *M. genitalium*, y el gen *23S rRNA*, cuyas mutaciones puntuales específicas están implicadas en la resistencia y sensibilidad a macrólidos, usando cebadores específicos y sondas marcadas con fluorescencia. La población destinataria de la prueba incluye a personas con signos o sospecha de ITS, parejas sexuales de personas diagnosticadas con infección por *M. genitalium* y poblaciones de alto riesgo, como hombres que tienen relaciones sexuales con hombres (HSH), personas con VIH y pacientes que acuden a clínicas de salud sexual.

VIASURE *Mycoplasma genitalium* with *Macrolide Resistance Assay* for BD MAX™ System utiliza la actividad 5' exonucleasa de la DNA-polimerasa. Durante la amplificación del DNA, esta enzima hidroliza la sonda unida a la secuencia de DNA complementaria, separando el fluoróforo del *quencher*. Esta reacción genera un aumento en la señal fluorescente proporcional a la cantidad de DNA diana. Esta fluorescencia se puede monitorizar en el equipo BD MAX™.

VIASURE *Mycoplasma genitalium* with *Macrolide Resistance Assay* for BD MAX™ System contiene en cada tubo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPs, tampón, polimerasa) en formato estabilizado¹, así como un control interno endógeno (CIE) (el gen *RNAse P* humano) para controlar la integridad de la muestra, el proceso de extracción y/o descartar la inhibición de la actividad polimerasa. Los genes humanos *housekeeping* están involucrados en el mantenimiento celular básico y, por lo tanto, se espera que estén presentes en todas las células humanas nucleadas y mantengan niveles de expresión relativamente constantes.

¹ Tenga en cuenta que los términos "estabilizado" y "liofilizado" se utilizan de manera indistinguible y como sinónimos en todo el documento.

Diana	Canal	Gen
Resistencia a macrólidos	475/520 (FAM)	<i>rRNA 23S</i>
Sensibilidad a macrólidos	530/565 (HEX)	<i>rRNA 23S</i>
<i>Mycoplasma genitalium</i>	585/630 (ROX)	<i>Adhesina MgPa</i>
Control Interno Endógeno (CIE)	680/715 (Cy5.5)	<i>RNAse P</i>

Tabla 1. Diana, canal y genes.

4. Reactivos suministrados

VIASURE *Mycoplasma genitalium with Macrolide Resistance Assay* for BD MAX™ System incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en la Tabla 2:

Reactivo/Material	Descripción	Rango de concentración	Código	Cantidad
<i>Mycoplasma genitalium with Macrolide Resistance</i> reaction tube	Lioprotectores y estabilizadores	±6 g/100 mL*	Sellado 1F	2 sobres de 12 tubos transparentes
	Trifosfato de nucleótido (dNTPs)	±1 mM*		
	Primers y sondas	0.2-1 nMol/μL*		
	Enzimas	10-100 U/rxn*		
Rehydration Buffer tube	Mezcla de solución salina	±13 mM	Sellado 11	1 sobre de 24 tubos transparentes
	Tampon (TRIS, pH)	±67 mM		

Tabla 2. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Mycoplasma genitalium with Macrolide Resistance Assay* for BD MAX™ System con Cat. N°. 444224.

* Para el componente en formato estabilizado, el rango de concentración se refiere a después de la rehidratación.

5. Reactivos y equipos a suministrar por el usuario

La siguiente lista incluye los materiales que se requieren para el uso pero que no se incluyen en VIASURE *Mycoplasma genitalium with Macrolide Resistance Assay* for BD MAX™ System.

- Equipo de PCR a tiempo real: BD MAX™ System (Ref: 441916).
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref: 442827 o 442828).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519).
- Vórtex.
- Micropipetas (entre 2 y 1000 μL).
- Agua libre de nucleasas.
- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.

Opcional:

- Materiales de control externo pueden utilizarse como parte del procedimiento de control de calidad del rendimiento del ensayo. Como control positivo externo (CPE) o control negativo externo (CNE) se puede utilizar material de control disponible en el mercado y/o muestras previamente caracterizadas como

positivas o negativas, respectivamente. La selección y validación de los controles CPE y CNE debe realizarse de acuerdo con la normativa local, estatal y/o federal aplicable y los procedimientos estándar de Control de Calidad del laboratorio. Además, cuando se utilice material de control disponible en el mercado, el usuario deberá seguir las instrucciones de uso correspondientes.

6. Condiciones de transporte, almacenamiento y uso

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-30°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del kit.
- Evitar vibraciones durante el transporte para evitar la fuga de líquidos.
- El kit puede usarse hasta 28 días a 2-30°C después de abrir las bolsas de aluminio que contienen los tubos de reacción. Mantener el vial alejado de la luz.

La siguiente tabla resume las condiciones de transporte, almacenamiento y uso tanto para el kit completo como para cada componente:

Componente	Condiciones de transporte	Condiciones de almacenamiento	Condiciones "en-uso"
Kit completo VIASURE <i>Mycoplasma genitalium</i> with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System	2-30°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit.	Antes del uso: 2-30°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit.	* Ver condiciones "en uso" de cada componente.
<i>Mycoplasma genitalium</i> with Macrolide Resistance reaction tube (sellado 1F)		Antes del uso: 2-30°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit. En un sobre abierto con el gel de sílice: 2-30°C hasta 28 días.	Temperatura ambiente.
Rehydration buffer tube		Antes del uso: 2-30°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit. En un sobre abierto con el gel de sílice: 2-30°C hasta 28 días.	Temperatura ambiente.

Tabla 3. Resumen de las condiciones de transporte, almacenamiento y uso para el producto VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System y cada uno de sus componentes.

7. Precauciones para el usuario

- El producto está destinado a ser utilizado por personal de laboratorio clínico cualificado y entrenado específicamente en las técnicas de PCR en tiempo real y en los procedimientos de diagnóstico in vitro.
- Para diagnóstico *in vitro*.
- Las instrucciones de uso del producto VIASURE y el manual de usuario del sistema BD MAX™ se deben leer cuidadosamente antes de utilizar VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System. No llevar a cabo el ensayo PCR hasta haber entendido la información sobre procedimientos, precauciones de seguridad y limitaciones descritas en ellas.
- No se recomienda usar reactivos y/o materiales caducados.
- No utilizar el kit si la etiqueta de control de la caja exterior está rota o dañada.

- No utilizar los reactivos si el estuche exterior está abierto o dañado en el momento que se recibe.
- No utilizar los reactivos si los sobres de aluminio que protegen los tubos están abiertos o dañados en el momento que se reciben.
- No utilizar los reactivos si el material desecante que se incluye en cada sobre de aluminio no está o está dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio que contienen los reactivos.
- No utilizar los reactivos si el aluminio protector está roto o dañado.
- No mezclar reactivos de diferentes sobres y/o kits y/o lotes.
- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los reactivos con el cierre zip inmediatamente después de cada uso para proteger la mezcla de reacción de la luz. Antes de cerrar los sobres eliminar cualquier exceso de aire.
- Proteger los reactivos de la humedad. Una exposición prolongada a la humedad puede afectar al rendimiento del producto.
- Para evitar el deterioro de la etiqueta, no usar el producto cerca de disolventes.
- Un aspecto de la mezcla de reacción en formato estabilizado, que normalmente se encuentra en el fondo del tubo, diferente al habitual (sin forma cónica, no homogénea, de menor/mayor tamaño y/o color diferente al blanquecino) no altera la funcionalidad de la prueba.
- Asegurarse de que el tubo de reacción y el tubo de tampón de rehidratación están bien encajados en su sitio durante la preparación de la gradilla del sistema BD MAX™.
- En el caso de que otros ensayos de PCR se estén llevando a cabo dentro de la misma área del laboratorio, asegurarse que el test VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System, el kit de extracción BD MAX™ ExK™ TNA-3, o cualquier otro reactivo adicional que se necesite para realizar el ensayo y el sistema BD MAX™ no estén contaminados. Evite en todo momento la contaminación microbológica o con ribonucleasas (RNasa)/ desoxirribonucleasas (DNasa) de los reactivos. Se recomienda el uso de puntas de pipeta estériles, desechables, libres de RNasa/DNasa, y de barrera para aerosoles o de desplazamiento positivo. Use una nueva punta para cada muestra. Es necesario cambiarse los guantes antes de la manipulación de los reactivos y las tarjetas de PCR (BD MAX™ PCR Cartridge).
- Para evitar la contaminación del medio ambiente por amplicones, no rompa las tarjetas de PCR (BD MAX™ PCR Cartridge) después de usarlo. Los sellos de las tarjetas de PCR (BD MAX™ PCR Cartridge) están diseñados para evitar la contaminación.
- Diseñar un flujo de trabajo unidireccional. Se debe comenzar en el área de extracción y después pasar al área de amplificación y de detección. No poner en contacto las muestras, equipos y reactivos utilizados en un área con la zona en la que se realizó el paso anterior.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber, fumar o aplicar productos cosméticos en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos. Evitar la contaminación y el contacto con piel, ojos y ropa.

- Las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas y/o biopeligrosas, así como los reactivos que han estado en contacto con las muestras, y deben ser gestionadas según la legislación sobre residuos sanitarios nacional. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, el transporte, almacenamiento, manipulación y eliminación de muestras.
- Las muestras y los reactivos deben ser manejados en una cabina de seguridad biológica. Utilice equipo de protección personal (PPE) de acuerdo con las directrices actuales para la manipulación de muestras potencialmente infecciosas. Deseche los residuos de acuerdo con las regulaciones locales y estatales.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.
- De conformidad con el Reglamento (CE) nº 1907/2006 (REACH), VIASURE Assays for BD MAX™ System no requieren ficha de datos de seguridad, debido a que se clasifican como no peligrosos para la salud y el medio ambiente por no contener sustancias y/o mezclas que reúnan los criterios de clasificación de peligrosidad dispuestos en el Reglamento (CE) nº 1272/2008 (CLP), o que se encuentren en una concentración superior al valor establecido en dicho reglamento para su declaración. Se puede solicitar a Certest Biotec S.L. una declaración en la que se afirme el no requerimiento de la ficha de datos de seguridad.
- Asegurarse de que la programación de la prueba PCR en el sistema BD MAX™ se realiza siguiendo las instrucciones de la sección 'Protocolo PCR' (Parámetros de extracción de muestras, códigos de barras personalizados, configuración PCR, etc.).
- Consultar el manual de usuario del sistema BD MAX™ para obtener información sobre advertencias, precauciones y procedimientos adicionales.
- El certificado de análisis no se incluye con este producto, sin embargo, se puede descargar de la web de Certest Biotec S.L. (www.certest.es) en caso de necesidad.

8. Procedimiento del test

8.1. Recogida, transporte y almacenamiento de muestras

VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System ha sido testado en muestras de frotis vaginal recogidas por personal clínico utilizando Copan eSwab® (Copan's Liquid Amies Elution Swab) y muestras de orina masculina y femenina, recogidas por la propia persona en un vaso de recogida de muestras estéril y sin conservantes. Otros tipos de muestras deben ser validadas por el usuario.

Para la recogida, el almacenaje y el transporte de las muestras deben seguirse las condiciones validadas por el usuario. En general, las muestras clínicas se deben recoger y etiquetar adecuadamente en contenedores limpios con o sin medio de transporte (dependiendo del tipo de muestra). Después de la recolección, las muestras deben colocarse en una bolsa de riesgo biológico y deben transportarse y procesarse lo antes posible para garantizar la calidad de la prueba. Las muestras destinadas a pruebas moleculares deben

almacenarse en condiciones controladas para que los ácidos nucleicos no se degraden durante el almacenamiento. Deben evitarse ciclos de congelación-descongelación para prevenir la degradación de la muestra y los ácidos nucleicos.

Las muestras clínicas deben ser recogidas, transportadas y almacenadas de acuerdo con las guías de laboratorio apropiadas y/o con los manuales de políticas de laboratorio.

Se llevó a cabo un estudio interno para evaluar la estabilidad de las muestras con VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System, empleando matriz negativa vaginal recogida en Copan eSwab® y matriz negativa de orina masculina y femenina contaminadas con la cepa de referencia de sensibilidad a macrólidos (Amplirun® Total Macrolide Resistant MGE Control) a una concentración de 3xLoD. La estabilidad se analizó mediante dos ensayos diferentes: estabilidad primaria (25°C: 4 horas y 2 días; 4°C: 1 y 2 días; -20°C: 12 meses) y estabilidad anidada. Para el ensayo de estabilidad anidada, las muestras incubadas a 25°C durante 4 horas y las muestras incubadas a 4°C durante 1 día, fueron analizadas 3 días después de añadirles al tubo de tampón de muestra (Sample Buffer Tube, SBT); las muestras incubadas a 25°C durante 2 días y las muestras incubadas a 4°C durante 2 días, fueron analizadas 7 días después de añadirles al SBT. Además, las muestras se analizaron tras pasar por cinco ciclos de congelación (a -80°C) y descongelación (a 25°C). Los resultados demostraron un buen rendimiento de las muestras almacenadas en todas las condiciones probadas, lo que cumple con los criterios de aceptación inicialmente establecidos.

8.2. Preparación de la muestra y extracción de DNA

Realizar la preparación de la muestra según las recomendaciones del fabricante, detalladas en el instructivo del kit de extracción BD MAX™ ExK™ TNA-3.

1. Pipetear 400 µL de frotis vaginal o 750 µL de muestra de orina en un tubo de tampón de muestras del sistema BD MAX™ (BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube) y cerrar el tubo con el tapón perforable. Asegurar que se mezcla completamente agitando la muestra en vórtex a alta velocidad durante 1 minuto. Proceder con BD MAX™ System Operation.

Nota: Asegúrese de agitar en vórtex unos minutos antes de iniciar el ensayo. Si se utiliza el mismo tubo BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube para repetir la prueba, se recomienda agitar manualmente el tubo unos minutos antes de iniciar la prueba para garantizar la correcta homogeneización de la muestra.

Nota: La aplicación de procedimientos de extracción específicos debe ser desarrollada y validada por el usuario y otro tipo de muestras pueden requerir una etapa de tratamiento previo.

8.3. Protocolo PCR

Nota: Por favor, consultar el manual de usuario del sistema BD MAX™ para obtener instrucciones más detalladas.

8.3.1. Programación del test VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System

Nota: Si ya ha creado el test para VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System, puede omitir el paso 8.3.1 e ir directamente al 8.3.2.

- 1) En la pantalla “Run” (Correr) del Sistema BD MAX™, seleccionar la pestaña “Test Editor” (Editor del test).
- 2) Hacer click en el botón “Create” (Crear).

En la pestaña “Basic information” (Información básica):

- 3) En el campo “Test Name” (Nombre del test), escribir el nombre del test: ej. VIASURE MGM.
 Note: El nombre del test debe ser único y tener un máximo de veinte caracteres.
- 4) En el menú desplegable “Extraction Type” (Tipo de extracción), seleccionar “ExK TNA-3”.
- 5) En el menú desplegable “Master Mix Format” (Formato master mix), elegir “Type 5: Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer” (Tipo 5: MM liofilizada concentrada con tampón de rehidratación).
- 6) En el campo “Sample extraction parameters” (Parámetros de extracción de muestra) seleccionar “User defined” (Definido por usuario) y ajustar los siguientes valores de los parámetros (tabla 4).

<i>Sample Extraction Parameters</i> (Parámetros de extracción de muestra)	<i>Value (units)</i> [Valor (unidades)]
<i>Lysis Heat Time</i> (Tiempo de lisis por calor)	15 (min)
<i>Lysis Temperature</i> (Temperatura de lisis)	55 (°C)
<i>Sample Tip Height</i> (Altura de la punta de la muestra)	1600 (steps)
<i>Sample Volume</i> (Volumen de muestra)	500 (µL) (protocolo para muestras de orina) 425 (µL) (protocolo para muestras de frotis vaginal)
<i>Wash Volume</i> (Volumen de lavado)	500 (µL)
<i>Neutralization Volume</i> (Volumen de neutralización)	N/A
<i>DNase Heat Time</i> (Temperatura de calentamiento de DNasa)	N/A

Tabla 4. Parámetros de la extracción de muestras realizada con BD MAX™ ExK™ TNA-3. N/A = no aplicable.

- 7) En el campo “Ct Calculation” (Cálculo Ct) seleccionar “Call Ct at Threshold Crossing” (Análisis de Ct con cruce del umbral) (seleccionado por defecto).
- 8) Si se está ejecutando la versión de software 5.00 o superior y se tienen tubos con sellado con código de barras, en el campo “Custom Barcodes” (Códigos de barras personalizados) seleccionar la siguiente configuración:
- “Snap-In 2 Barcode”: 1F (en relación a *Mycoplasma genitalium with Macrolide Resistance* reaction tube)
 - “Snap-In 3 Barcode”: 11 (en relación a Rehydration Buffer tube).

En la pestaña “PCR Settings” (Configuración PCR):

- 9) En el campo “PCR Settings” (Configuración PCR) introducir los siguientes parámetros descritos en la tabla 5: “Alias” (hasta siete caracteres alfanuméricos), “PCR Gain” (Ganancia) y “Threshold” (Umbral), “Ct Min” (Ct mínimo) y “Ct Max” (Ct máximo).

Channel (Canal)	Alias (Alias)	Gain (Ganancia)	Threshold (Umbral)	Ct Min (Ct Min)	Ct Max (Ct Max)
475/520 (FAM)	Res	40	200	0	40
530/565 (HEX)	Sen	40	200	0	40
585/630 (ROX)	Mg	40	200	0	40
630/665 (Cy5)	-	-	-	-	-
680/715 (Cy5.5)	CIE	60	200	0	35/40*

Tabla 5. PCR settings (Configuración PCR).

Nota: Se recomienda establecer como valor mínimo de partida de *threshold* los indicados anteriormente para cada canal. Sin embargo, el usuario final debe ajustar los valores de *threshold* finales durante la interpretación del resultado para garantizar que el *threshold* se sitúe dentro de la fase exponencial de las curvas de amplificación y por encima de cualquier señal de ruido de fondo. El valor de *threshold* puede variar entre distintos instrumentos debido a las diferentes intensidades de señal.

*Debido a la variabilidad en el número de células humanas contenidas en las muestras de orina, el valor de corte para la diana de control interno endógeno (EIC) se establece en 35 para las muestras de frotis vaginal y en 40 para las muestras de orina femenina y masculina para garantizar una recogida de muestras adecuada.

- 10) En el campo “Color compensation” (Compensación de color) introducir los siguientes parámetros (Tabla 6).

		False Receiving Channel (Canal de falsa recepción)					
		Channel (Canal)	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Canal de excitación)	475/520	-	3.0	0.0	0.0	0.0	
	530/565	3.0	-	0.0	0.0	0.0	
	585/630	0.0	0.0	-	-	0.0	
	630/665	0.0	0.0	0.0	0.0	-	
	680/715	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	

Tabla 6. Parámetros “Color compensation” (Compensación de color).

En la pestaña "Melt Settings" (Configuración Melt) no es necesaria ninguna acción, no aplica a este producto.

En la pestaña "Test Steps" (Etapas del test):

- 11) Para definir cada etapa del protocolo de PCR, introducir el nombre de la etapa (hasta veinte caracteres) y configurar los siguientes parámetros: "Profile Type" (Tipo de perfil), "Cycles" (Ciclos), "Time" (Tiempo) and "Temperature" (Temperatura) y seleccionar el campo "Detect" (Detectar) para definir la etapa en la que se realiza la detección (Tabla 7). Hacer clic en el botón "Añadir" para añadir una nueva etapa y repetir el proceso hasta definir todas las etapas necesarias.

Nota: el campo "Type" (Tipo) debe estar vacío.

<i>Step</i> (Etapa)	<i>Step name</i> (Nombre de la etapa)	<i>Profile Type</i> (Tipo de perfil)	<i>Cycles</i> (Ciclos)	<i>Time (s)</i> (Tiempo (s))	<i>Temperature</i> (Temperatura)	<i>Detect</i> (Detección)
Initial denaturation (Desnaturalización inicial)	IN-denaturation	Hold (Choque térmico)	1	120	95°C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Desnaturalización y alineamiento/extensión (recogida de datos))	Annealing/Extension	2-temperatures (2-Temperaturas)	45	10	95°C	-
				58	60°C	✓

Tabla 7. Protocolo PCR.

En la pestaña "Results logic" (Resultado lógico):

- 12) En el campo "Target" (Diana) introducir el nombre de la diana: ej. Res (hasta siete caracteres). Repetir los pasos 12-15 para cada diana (ej. Sen o Mg) siguiendo las tablas específicas para la diana que se va a definir.
- 13) Hacer clic en la casilla de verificación "Analyze" (Analizar) para incluir las longitudes de onda (canales PCR) deseadas en el análisis de resultados de la diana (Tablas 8-10).

<i>Wavelength</i> (Longitud de onda)	<i>Alias</i> (Alias)	<i>Type</i> (Tipo)	<i>Analyze</i> (Analizar)
475/520	Res	PCR	✓
680/715	CIE	PCR	✓

Tabla 8. Selección de los canales de PCR en la pestaña "Result logic" (Resultado lógico) para la diana Res (Resistencia a macrólidos).

<i>Wavelength</i> (Longitud de onda)	<i>Alias</i> (Alias)	<i>Type</i> (Tipo)	<i>Analyze</i> (Analizar)
530/565	Sen	PCR	✓
680/715	CIE	PCR	✓

Tabla 9. Selección de los canales de PCR en la pestaña "Result logic" (Resultado lógico) para la diana Sen (Sensibilidad a macrólidos).

<i>Wavelength</i> (Longitud de onda)	<i>Alias</i> (Alias)	<i>Type</i> (Tipo)	<i>Analyze</i> (Analizar)
585/630	Mg	PCR	✓
680/715	CIE	PCR	✓

Tabla 10. Selección de los canales de PCR en la pestaña "Result logic" (Resultado lógico) para la diana Mg (*Mycoplasma genitalium*).

14) Hacer clic en el botón “Edit Logic” (Editar lógica).

15) En la ventana “Edit logic” (Editar lógica) aparecen todas las combinaciones de resultados. Para cada fila, en el menú desplegable “Result” (Resultado), seleccionar el resultado llamado cuando se cumplen las condiciones de esa fila, siguiendo las tablas 11-13 para muestras de frotis vaginal y las tablas 14-16 para muestras de orina.

Muestras de frotis vaginal

<i>Result</i> (Resultado)	Res (475/520)	CIE (680/715)
POS	Valid	Valid
UNR	Valid	Invalid
NEG	Invalid	Valid
UNR	Invalid	Invalid

Tabla 11. Lista de combinaciones de resultados y resultado lógico para la diana Res (Resistencia a macrólidos) en muestras de frotis vaginal. Los resultados disponibles son POS (Positivo), NEG (negativo) y UNR (no resuelto).

<i>Result</i> (Resultado)	Sen (530/565)	CIE (680/715)
POS	Valid	Valid
UNR	Valid	Invalid
NEG	Invalid	Valid
UNR	Invalid	Invalid

Tabla 12. Lista de combinaciones de resultados y resultado lógico para la diana Sen (Sensibilidad a macrólidos) en muestras de frotis vaginal. Los resultados disponibles son POS (Positivo), NEG (negativo) y UNR (no resuelto).

<i>Result</i> (Resultado)	Mg (585/630)	CIE (680/715)
POS	Valid	Valid
UNR	Valid	Invalid
NEG	Invalid	Valid
UNR	Invalid	Invalid

Tabla 13. Lista de combinaciones de resultados y resultado lógico para la diana Mg (*Mycoplasma genitalium*) en muestras de frotis vaginal. Los resultados disponibles son POS (Positivo), NEG (negativo) y UNR (no resuelto).

Muestras de orina

<i>Result</i> (Resultado)	Res (475/520)	CIE (680/715)
POS	Valid	Valid
POS	Valid	Invalid
NEG	Invalid	Valid
UNR	Invalid	Invalid

Tabla 14. Lista de combinaciones de resultados y resultado lógico para la diana Res (Resistencia a macrólidos) en muestras de orina. Los resultados disponibles son POS (Positivo), NEG (negativo) y UNR (no resuelto).

<i>Result</i> (Resultado)	Sen (530/565)	CIE (680/715)
POS	Valid	Valid
POS	Valid	Invalid
NEG	Invalid	Valid
UNR	Invalid	Invalid

Tabla 15. Lista de combinaciones de resultados y resultado lógico para la diana Sen (Sensibilidad a macrólidos) en muestras de orina. Los resultados disponibles son POS (Positivo), NEG (negativo) y UNR (no resuelto).

<i>Result</i> (Resultado)	<i>Mg</i> (585/630)	<i>CIE</i> (680/715)
POS	Valid	Valid
POS	Valid	Invalid
NEG	Invalid	Valid
UNR	Invalid	Invalid

Tabla 16. Lista de combinaciones de resultados y resultado lógico para la diana Mg (*Mycoplasma genitalium*) en muestras de orina. Los resultados disponibles son POS (Positivo), NEG (negativo) y UNR (no resuelto).

Nota: Según el Ct Max definido previamente (Tabla 5):

- i. El resultado de los canales Res (475/520), Sen (530/565) o Mg (585/630) se considera "Valid" (Valido) si el valor de Ct obtenido es ≤ 40 ; e "Invalid" (Invalido) si el valor de Ct obtenido es > 40 .
- ii. El resultado del canal CI (680/715) se considera "Valid" (Valido) si el valor de Ct obtenido es ≤ 35 para muestras de frotis vaginal y ≤ 40 para muestras de orina; e "Invalid" (Invalido) si el valor de Ct obtenido es > 35 y > 40 , respectivamente.

* Aunque el Cut-off para la diana EIC en muestras de orina es 40, es posible no observar curva de amplificación en el EIC en el caso de señal positiva tanto en la diana Res o Sen como en la diana Mg. En este caso, la lógica del Resultado es POS (Positivo). Consulte la Sección 9. Interpretación de resultados.

16) Hacer click en el botón "Save Test" (Guardar test).

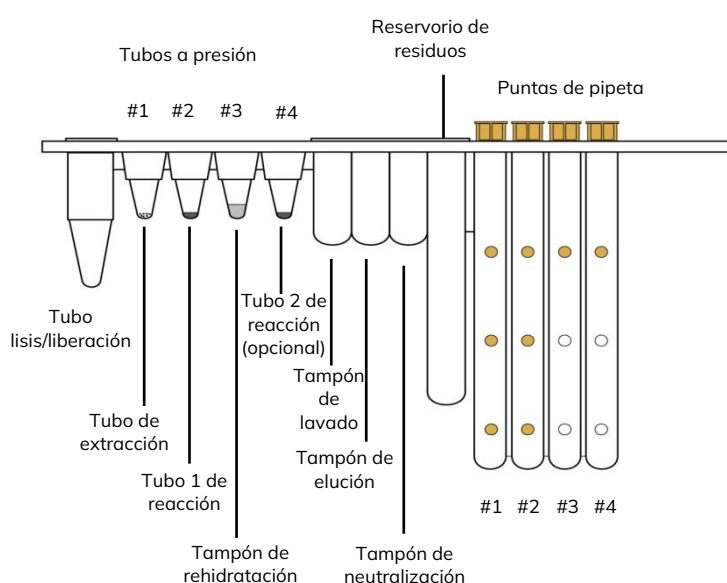
8.3.2. Preparación de la gradilla del sistema BD MAX™

- 1) Para cada muestra, coger una tira de reactivos individual del kit de extracción BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit. Golpear suavemente cada tira sobre una superficie dura para asegurarse de que todos los líquidos queden en el fondo de los tubos y colocar la tira de reactivos en la gradilla del sistema BD MAX™.
- 2) Determinar y separar el número de tubos de reactivo de extracción necesarios (BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (B4) (sello blanco)) de su bolsa protectora. Colocar (presionar hasta escuchar un click) el tubo de reactivo de extracción (sello blanco) en su posición correspondiente dentro de la tira de reactivos TNA (Posición 1. Código de color blanco en la gradilla. Ver Figura 1). Eliminar el exceso de aire, y cerrar las bolsas protectoras con el zip.
- 3) Calcular y separar el número adecuado de *Mycoplasma genitalium with Macrolide Resistance* reaction tube (sello 1F) y colocarlos (presionar hasta escuchar un click) en su posición correspondiente de la tira (Posición 2. Código de color verde en la gradilla. Ver Figura 1).
 - a. Eliminar el exceso de aire, y cerrar los sobres de aluminio con el zip.
 - b. Para llevar a cabo una rehidratación correcta, asegurarse que el producto liofilizado esté en la parte inferior del tubo y que no esté adherido al área superior del tubo o del sellado del

tubo. Golpear suavemente cada tubo sobre una superficie dura para asegurarse de que todo el producto quede en el fondo del tubo.

- 4) Coger el número necesario de Rehydration Buffer tubes (sello 11) y colocarlos en su posición correspondiente dentro de la tira (Posición 3. Sin código de color en la gradilla. Ver Figura 1).
 - a. Eliminar el exceso de aire, y cerrar los sobres con el zip.
 - b. Para llevar a cabo una transferencia correcta, asegúrese de que el líquido esté en la parte inferior del tubo y que no esté adherido a la parte superior del tubo o al sello del mismo. Golpear suavemente cada tubo sobre una superficie dura para asegurarse de que todo el producto quede en el fondo del tubo.

Figura 1. Tira de reactivos individuales BD MAX™ TNA Reagent (TNA) del kit de extracción BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit.



8.3.3. Configuración del instrumento BD MAX™

- 1) Seleccionar la pestaña “Work List” (Lista de trabajo) en la pantalla “Run” (Correr) utilizando el software v4.50A o uno superior del sistema BD MAX™.
- 2) En el menú desplegable “Test” (Test), seleccionar VIASURE MGM (si todavía no está creado, consultar la sección 8.3.1).
- 3) Seleccionar en el menú desplegable “Kit Lot Number” (Numero de lote del kit) el número de lote del kit de extracción empleado (situado en el estuche exterior). Este paso es opcional.

Nota: Los números de lote deben definirse en la pantalla “Inventory” (Inventario) antes de poder seleccionarlos aquí.

- 4) Introducir el número de identificación/el código de barras del “Sample Buffer Tube” (Tubo de tampón de muestra) en el campo de “Sample tube” (Tubo de muestra), ya sea escaneando el código de barras con el lector o mediante entrada manual.

- 5) Introducir "Specimen/Patient ID" (identificación de la muestra/paciente) y/o "Accession" (Acceso) y pulsar la tecla "Tab" o "Enter". Continuar hasta que se introduzcan todos los tubos de tampón de muestra. Asegurar que la identificación muestra/paciente y los tubos de tampón de muestra están correctamente colocados.
- 6) Colocar el tampón de muestra preparado en la(s) gradilla(s) del sistema BD MAX™.
- 7) Colocar la(s) gradilla(s) en el sistema BD MAX™ (la gradilla A se encuentra en el lado izquierdo del sistema BD MAX™ y la gradilla B en el lado derecho).
- 8) Colocar el número necesario de BD MAX™ PCR Cartridges en el sistema BD MAX™.
- 9) Cerrar la puerta del sistema BD MAX™.
- 10) Presionar "Start" (Empezar) para comenzar con el procedimiento.

8.3.4. Informe BD MAX™

- 1) En el menú principal, hacer clic en el botón "Results" (Resultados).
- 2) Hacer doble clic en la prueba incluida en la lista de ensayos o seleccionar la prueba y presionar el botón "view" (Ver).
- 3) Se activarán los botones "Print" (Imprimir) y "Export" (Exportar) en la parte inferior de la pantalla.

Para imprimir los resultados:

1. Hacer clic en el botón "Print".
2. En la ventana de vista previa de impresión del informe de resultados seleccionar: "Run Details, Test Details and Plot..." (Detalles de ejecución, detalles de prueba y gráfica ...).
3. Hacer clic en "Print" para imprimir el informe o en "Export" para exportar el informe en PDF a un USB.

Para exportar los resultados:

1. Hacer clic en el botón "Export" para transferir el informe (archivo PDF y CSV) a un USB.
2. Una vez finalizada la exportación, aparecerá un icono de correcto/incorrecto en la ventana "Results Export" (Exportación de resultados).

9. Interpretación de resultados

Para una descripción detallada de cómo analizar los datos, consultar el manual de usuario del sistema BD MAX™.

El análisis de los datos se realiza con el software del sistema BD MAX™ de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. El software del sistema BD MAX™ proporciona los valores de Ct y muestra las curvas de amplificación para cada uno de los canales de detección de cada muestra que se analiza de la siguiente manera:

- Un valor de Ct de 0 indica que el software no ha calculado ningún valor de Ct con el umbral especificado (ver Tabla 5). Si la curva de amplificación muestra un "0" como valor de Ct, es necesario analizarla manualmente.
- Un valor de Ct de -1 indica que no ha habido proceso de amplificación, que el software no ha calculado ningún valor de Ct o que el valor de Ct calculado está por debajo del umbral especificado o por encima por encima del Ct Max (Cut-off) establecido.
- Cualquier otro valor de Ct debería de ser interpretado en correlación con la curva de amplificación y según el resultado lógico definido, siguiendo las pautas de interpretación descritas en las Tablas 17-18.

Comprobar la emisión de la señal del control interno endógeno (CIE) para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación. Además, comprobar que no hay ningún fallo del sistema BD MAX™. Tenga en cuenta que, de acuerdo con el resultado lógico definido, es posible no observar curva de amplificación en el CIE en muestras de orina en caso de señal positiva tanto en la diana Mg como en la diana Res o la diana Sen. Lea atentamente la interpretación para las muestras de orina individuales del paciente (Tabla 18).

Los resultados deben leerse y analizarse utilizando la siguiente tabla:

Interpretación de resultados para muestras de frotis vaginal

Resistencia a macrólidos (Nombre de la diana: Res)	Sensibilidad a macrólidos (Nombre de la diana: Sen)	<i>M. genitalium</i> (Nombre de la diana: Mg)	Interpretación de muestras individuales de pacientes
NEG	POS	POS	DNA de sensibilidad a macrólidos y <i>M. genitalium</i> , detectado, DNA de resistencia a macrólidos no Detectado
POS	NEG	POS	DNA de resistencia a macrólidos y <i>M. genitalium</i> , detectado, DNA de sensibilidad a macrólidos no Detectado
POS	POS	POS	DNA de resistencia a macrólidos, sensibilidad a macrólidos y <i>M. genitalium</i> , Detectado RESULTADO NO CONCLUYENTE ¹
POS	POS	NEG	DNA de resistencia a macrólidos y sensibilidad a macrólidos detectado, DNA de <i>M. genitalium</i> , No Detectado RESULTADO NO CONCLUYENTE ¹
POS	NEG	NEG	DNA de resistencia a macrólidos detectado, DNA de sensibilidad a macrólidos y <i>M. genitalium</i> , No Detectado RESULTADO NO CONCLUYENTE ¹
NEG	POS	NEG	DNA de sensibilidad a macrólidos detectado, DNA de resistencia a macrólidos y <i>M. genitalium</i> , No Detectado RESULTADO NO CONCLUYENTE ¹

NEG	NEG	POS	DNA de <i>M. genitalium</i> detectado, DNA de resistencia a macrólidos y sensibilidad a macrólidos No Detectado RESULTADO NO CONCLUYENTE ^{1,2}
NEG	NEG	NEG	DNA de resistencia a macrólidos, sensibilidad a macrólidos y <i>M. genitalium</i> , No Detectado
UNR	UNR	UNR	Resultado no resuelto (UNR) debido a la presencia de inhibidores en la reacción de PCR, muestras por debajo del límite de detección o a un problema general (no informado por un código de error) durante el procesamiento de la muestra y/o la etapa de amplificación. ³
IND	IND	IND	Resultado indeterminado (IND) debido a un fallo en el sistema BD MAX™. Este resultado se muestra en caso de un fallo del instrumento vinculado a un código de error. ⁴
INC	INC	INC	Resultado de ensayo incompleto (INC) debido a un fallo en el sistema BD MAX™. Este resultado se muestra en caso de que no se complete la prueba. ⁴

Tabla 17. Interpretación de muestras de frotis vaginal.

1 Es necesario repetir la prueba. Se recomienda repetir el ensayo a partir del mismo tubo Sample Buffer Tube (SBT) o de la muestra primaria preparando de nuevo el SBT. En caso de que el resultado siga sin ser concluyente, obtenga una nueva muestra (más concentrada si es posible) y vuelva a realizar la prueba.

NOTA: Las muestras de frotis vaginal pueden conservarse sin transferir al SBT hasta 2 días si se almacenan a 25°C o 4°C. En caso de repetir el análisis desde el mismo SBT, se recomienda agitar manualmente el tubo para garantizar la correcta homogeneización de la muestra. Las muestras de frotis vaginal pueden conservarse en el SBT hasta 7 días a 25°C o 4°C (si se han almacenado previamente a 25°C o 4°C hasta un máximo de 2 días).

2 El kit detecta las siguientes mutaciones asociadas a la resistencia a macrólidos: gen *23S rRNA* (A2058T, A2058C, A2058G, A2059C, A2059G). En caso de presencia de otra mutación, el kit no está validado para su detección, por lo que se observará amplificación en el canal ROX (detección de *M. genitalium*) y no en los canales FAM y HEX (detección de resistencia a macrólidos y sensibilidad a macrólidos, respectivamente).

3 El control interno endógeno (CIE) debe mostrar una señal de amplificación con valor de Ct ≤ 35. Si no hay señal de amplificación o el valor de Ct es > 35, el resultado se considera No resuelto (UNR) y es necesario repetir la prueba. Compruebe el informe de resultados y los valores Ct de la diana y tome las medidas oportunas teniendo en cuenta lo siguiente:

- I. Si el resultado de los genes diana es inválido (Ct > 40), es necesario repetir la prueba a partir del mismo SBT o de la muestra primaria preparando de nuevo el SBT. Si se vuelve a obtener un resultado UNR, deben considerarse dos escenarios. Por un lado, la concentración de la muestra puede estar por debajo del LoD, por lo que se recomendaría obtener una muestra más concentrada. Por otro lado, debe considerarse la posible presencia de inhibidores en la reacción de PCR y se recomendaría diluir estas muestras 1/10. Seguir las directrices del laboratorio y/o manuales de política de laboratorio de microbiología.
- II. Si el resultado de los genes diana de sensibilidad a macrólidos, resistencia a macrólidos y/o *M. genitalium*, es posible no ver señal de amplificación del CIE o ver una señal con un valor Ct > 35 cuando se analizan muestras de elevada concentración, debido a una amplificación preferencial de los ácidos nucleicos específicos de la diana. Si se considera

necesario, realizar una dilución 1/10 de estas muestras, preparar de nuevo el tubo Sample Buffer Tube (SBT) y repetir la prueba. Seguir las directrices del laboratorio y/o manuales de política de laboratorio de microbiología.

4 Pueden obtenerse resultados indeterminados (IND) o incompletos (INC) debido a un fallo del sistema y es necesario volver a realizar la prueba. Consulte el Manual del usuario del sistema BD MAX™ para la interpretación de los códigos de advertencia y error.

Interpretación de resultados para muestras de orina

Resistencia a macrólidos (Nombre de la diana: Res)	Sensibilidad a macrólidos (Nombre de la diana: Sen)	<i>M. genitalium</i> (Nombre de la diana: Mg)	Interpretación de muestras individuales de pacientes
NEG	POS	POS	DNA de sensibilidad a macrólidos y <i>M. genitalium</i> , detectado, DNA de resistencia a macrólidos no Detectado
POS	NEG	POS	DNA de resistencia a macrólidos y <i>M. genitalium</i> , detectado, DNA de sensibilidad a macrólidos no Detectado
POS	POS	POS	DNA de resistencia a macrólidos, sensibilidad a macrólidos y <i>M. genitalium</i> , Detectado RESULTADO NO CONCLUYENTE ¹
POS	POS	NEG	DNA de resistencia a macrólidos y sensibilidad a macrólidos detectado, DNA de <i>M. genitalium</i> , No Detectado RESULTADO NO CONCLUYENTE ¹
POS	NEG	NEG	DNA de resistencia a macrólidos detectado, DNA de sensibilidad a macrólidos y <i>M. genitalium</i> , No Detectado RESULTADO NO CONCLUYENTE ¹
NEG	POS	NEG	DNA de sensibilidad a macrólidos detectado, DNA de resistencia a macrólidos y <i>M. genitalium</i> , No Detectado RESULTADO NO CONCLUYENTE ¹
NEG	NEG	POS	DNA de <i>M. genitalium</i> detectado, DNA de resistencia a macrólidos y sensibilidad a macrólidos No Detectado RESULTADO NO CONCLUYENTE ^{1,2}
NEG	NEG	NEG	DNA de resistencia a macrólidos, sensibilidad a macrólidos y <i>M. genitalium</i> , No Detectado
UNR	POS	POS	DNA de sensibilidad a macrólidos y <i>M. genitalium</i> detectado, DNA de resistencia a macrólidos No Detectado ³
POS	UNR	POS	DNA de resistencia a macrólidos y <i>M. genitalium</i> detectado, DNA de sensibilidad a macrólidos No Detectado ³
UNR	UNR	UNR	Resultado no resuelto (UNR) debido a la presencia de inhibidores en la reacción de PCR o a un problema general (no informado por un código de error) durante el procesamiento de la muestra y/o la etapa de amplificación. ³
POS	POS	UNR	Resultado no resuelto (UNR) – Repetir la prueba ¹

POS	UNR	UNR	Resultado no resuelto (UNR) – Repetir la prueba ¹
UNR	POS	UNR	Resultado no resuelto (UNR) – Repetir la prueba ¹
UNR	UNR	POS	Resultado no resuelto (UNR) – Repetir la prueba ¹
IND	IND	IND	Resultado indeterminado (IND) debido a un fallo en el sistema BD MAX™. Este resultado se muestra en caso de un fallo del instrumento vinculado a un código de error. ⁴
INC	INC	INC	Resultado de ensayo incompleto (INC) debido a un fallo en el sistema BD MAX™. Este resultado se muestra en caso de que no se complete la prueba. ⁴

Tabla 18. Interpretación de muestras de orina.

1 Es necesario repetir la prueba. Se recomienda repetir el ensayo a partir del mismo tubo Sample Buffer Tube (SBT) o a partir de la muestra primaria preparando un nuevo SBT. En caso de que el resultado siga sin ser concluyente, obtenga una nueva muestra (más concentrada si es posible) y vuelva a realizar la prueba.

NOTA: Las muestras de orina pueden conservarse sin transferir a la SBT hasta 4 horas si se almacenan a 25°C o hasta 1 día si se almacenan a 4°C. En caso de repetir el análisis desde el mismo SBT, se recomienda agitar manualmente el tubo para garantizar la correcta homogeneización de la muestra. Las muestras de orina pueden conservarse en el SBT hasta 3 días a 25°C (si se han almacenado previamente a 25°C hasta un máximo de 4 horas) o hasta 3 días a 4°C (si se han almacenado previamente a 4°C hasta un máximo de 1 día).

2 El kit detecta las siguientes mutaciones asociadas a la resistencia a macrólidos: gen *23S rRNA* (A2058T, A2058C, A2058G, A2059C, A2059G). En caso de presencia de otra mutación, el kit no está validado para su detección, por lo que se observará amplificación en el canal ROX (detección de *M. genitalium*) y no en los canales FAM y HEX (detección de resistencia a macrólidos y sensibilidad a macrólidos, respectivamente).

3 Aunque el punto de corte para el Control Interno Endógeno (CIE) en muestras de orina se establece en un valor de 40, debido al bajo número de células humanas en la orina se permite no observar curva de amplificación en el EIC en el caso de señal positiva tanto en la diana de resistencia a macrólidos (canal FAM) o sensibilidad (canal HEX) como en la diana *Mycoplasma genitalium* (canal ROX). En este caso, no hay riesgo de notificar un resultado falso positivo porque la amplificación debe observarse simultáneamente en dos canales diferentes.

4 El CIE debe mostrar una señal de amplificación con valor $Ct \leq 40$ para ser considerado. Si hay ausencia de señal para CIE o valor $Ct > 40$, el resultado se considera No Resuelto (UNR) y se requiere repetir el ensayo. Se recomienda repetir el ensayo a partir del mismo SBT o de la muestra primaria preparando de nuevo el SBT, u obtener una muestra más concentrada. También puede ocurrir que el resultado No Resuelto (UNR) se deba a la presencia de inhibidores en la reacción de PCR, en estos casos se recomienda diluir estas muestras 1/10. Seguir las directrices del laboratorio y/o manuales de política de laboratorio de microbiología.

5 Pueden obtenerse resultados indeterminados (IND) o incompletos (INC) debido a un fallo del sistema y es necesario volver a realizar la prueba. Consulte el Manual del usuario del sistema BD MAX™ para la interpretación de los códigos de advertencia y error.

Nota: Cuando se utilicen controles externos, estos deben mostrar los siguientes resultados esperados; negativo para ENC y positivo para EPC (se espera que las muestras positivas conocidas sean positivas solo

para el microorganismo o microorganismos presentes en la muestra). Cuando se produce un fallo del control externo es necesario repetir la prueba.

En caso de un resultado ambiguo continuo, se recomienda revisar las instrucciones de uso, el proceso de extracción utilizado por el usuario; verificar el correcto rendimiento de cada etapa de la PCR y revisar los parámetros; y verificar la forma sigmoidea de la curva y la intensidad de la fluorescencia.

El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.

10. Limitaciones del test

- El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.
- VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System sólo ha sido validado con muestras de frotis vaginal y muestras de orina masculina y femenina.
- Para obtener un buen rendimiento de la prueba, el producto liofilizado debe encontrarse en la parte inferior del tubo y no adherido a la parte superior del tubo o al sello de aluminio. Golpear suavemente cada tubo sobre una superficie dura para asegurarse de que todo el producto quede en el fondo del tubo.
- Es posible observar fenómenos “crosstalk” en canales vacíos del sistema BD MAX™ si no hay diana que detectar, por lo que es necesario seleccionar solo los canales donde éstas amplifiquen cuando se lleve a cabo la interpretación de resultados. Para cualquier consulta contacte con viasuresupport@certest.es.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el ácido nucleico deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas.
- Esta prueba es un ensayo cualitativo y no proporciona valores cuantitativos ni indica el número de organismos presentes. No es posible correlacionar los valores Ct obtenidos en la PCR con la concentración de la muestra, ya que éstos dependen del termociclador utilizado y de la propia ejecución.
- Se puede detectar un bajo número de copias molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Tenga en cuenta el rango de medición previsto del ensayo, ya que las muestras con concentraciones por encima o por debajo de este rango pueden dar resultados erróneos.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con muestras sospechosas de *M. genitalium* resistente a macrólidos y/o *M. genitalium* sensible a macrólidos, ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de DNA molde diana, o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.
- Varios factores y sus combinaciones pueden dar lugar a Falsos Negativos, incluyendo:

- Métodos inadecuados de recolección, transporte, almacenamiento y/o manipulación de muestras.
- Procedimientos de procesamiento incorrectos (incluyendo la extracción de DNA).
- Degradación del DNA durante el envío/almacenamiento y/o procesamiento de la muestra.
- Mutaciones o polimorfismos en regiones de unión de cebadores o sondas que pueden afectar la detección de cepas nuevas o desconocidas de *M. genitalium* o marcadores genéticos de resistencia y sensibilidad a macrólidos.
- Una carga bacteriana en la muestra por debajo del límite de detección del ensayo.
- La presencia de inhibidores de qPCR u otros tipos de sustancias interferentes. No se ha evaluado el impacto de las vacunas, de algunas terapias antivirales, antibióticos, quimioterapéuticos, fármacos inmunosupresores o antifúngicos utilizados para prevenir la infección o durante el tratamiento de esta.
- El efecto de sustancias interferentes solo se ha evaluado para aquellas indicadas en la sección 12.5.1 (estudio de sustancias interferentes) de estas instrucciones de uso. Por favor, consulte dicha sección para comprobar las sustancias exógenas y endógenas más comunes que inducen una interferencia total o parcial de la reacción qPCR. Otras sustancias no indicadas en este apartado pueden dar lugar a resultados erróneos.
 - No seguir las instrucciones de uso y el procedimiento de ensayo.
- El kit detecta las siguientes mutaciones asociadas a la resistencia a macrólidos: gen *23S rRNA* (A2058T, A2058C, A2058G, A2059C, A2059G). La cepa de *M. genitalium* resistente a macrólidos que contiene la mutación A2059T, cuya prevalencia es menor, no puede ser detectada por el dispositivo. Sólo en este caso, es posible observar amplificación en el canal ROX (detección de *M. genitalium*) y no en los canales FAM y HEX (detección de resistencia a macrólidos y sensibilidad a macrólidos, respectivamente).
- Un resultado positivo no indica necesariamente la presencia de microorganismos viables y no implica que estos microorganismos sean infecciosos o que sean los agentes causantes de los síntomas clínicos. Sin embargo, un resultado positivo puede ser indicativo de la presencia de las secuencias diana de *M. genitalium* resistente o sensible a macrólidos.
- Resultados negativos no excluyen la presencia de DNA de *M. genitalium* resistente o sensible a macrólidos en una muestra clínica y no deben usarse como la única base para el tratamiento u otras decisiones de manejo del paciente. No se han determinado los tipos de muestras óptimos y el momento en el que se alcanzan los máximos niveles de carga microbiana durante las infecciones causadas por *M. genitalium*. La recogida de múltiples muestras (tipos de muestras y en varios puntos a lo largo del tiempo) del mismo paciente puede ser necesaria para detectar el patógeno.
- Si las pruebas de diagnóstico para otras enfermedades de transmisión sexual (ETS) y/o de resistencia antimicrobiana son negativas y la presentación clínica del paciente y la información epidemiológica sugieren una posible infección por *M. genitalium*, entonces se debe considerar el resultado como un falso negativo y se debe discutir realizar nuevas pruebas al paciente.

- Los valores de fluorescencia pueden variar debido a múltiples factores como: equipo de PCR utilizado (incluso siendo el mismo modelo), sistema de extracción, tipo de muestra, tratamiento previo de la muestra etc.... entre otros.
- Los valores predictivos positivo y negativo dependen en gran medida de la prevalencia en todas las pruebas de diagnóstico in vitro. El rendimiento de VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System puede variar en función de la prevalencia y de la población analizada.
- En el caso de obtener con VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System resultados no resueltos, indeterminados o incompletos, se requiere volver a testar de nuevo. Los resultados no resueltos pueden deberse a la presencia de inhibidores en la muestra o debido a una rehidratación incorrecta del tubo de mezcla de reacción liofilizada. Si hay un fallo en el instrumento, se podrán obtener resultados indeterminados o incompletos.

11. Control de calidad

VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System contiene un Control Interno (CI) en cada tubo de reacción que confirma el correcto funcionamiento de la técnica. Además, la utilización de controles externos (EPC y ENC) permite confirmar el rendimiento del ensayo. El sistema BD MAX™ no utiliza los controles externos para la interpretación de resultados sino que los considera como una muestra. El Control Positivo Externo (EPC) está destinado a controlar un posible fallo de los reactivos del ensayo, mientras que el Control Negativo Externo (ENC) está destinado a detectar la contaminación ambiental o de los reactivos por los ácidos nucleicos diana.

12. Características analíticas del funcionamiento del test

12.1. Linealidad analítica

La linealidad del ensayo se determinó y confirmó analizando diluciones seriadas 1:10 de matriz vaginal, muestras de orina masculina y femenina con una concentración conocida de DNA específico y sintético de *M. genitalium* sensible o resistente a macrólidos (en el rango de $2E+07$ a $2E+00$ copias/ μ L). Se calcularon la media aritmética, la desviación estándar y el coeficiente de variación de los valores Ct, así como la eficiencia y el coeficiente de regresión de la reacción PCR, y a continuación se incluyen ejemplos de la gráfica de amplificación resultante de un ensayo en una de las matrices evaluadas:

Figura 2. Diluciones seriadas de *M. genitalium* sensible a macrólidos (gen *23S rRNA* (tipo natural) + gen *adhesina MgPA*) DNA sintético ($2E+07$ a $2E+00$ copias/ μ L). Experimento realizado en el equipo BD MAX™ System (canal 530/565 (HEX))

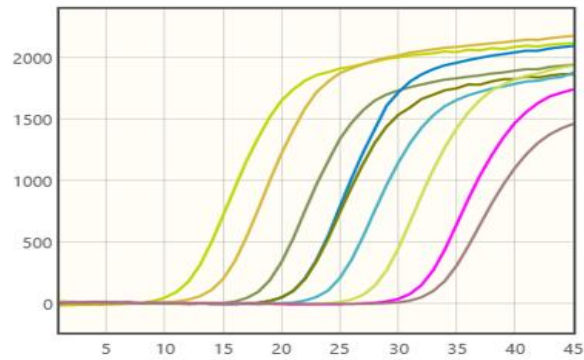


Figura 3. Diluciones seriadas de *M. genitalium* resistente a macrólidos (gen *23S rRNA* (mutación A2058C) + gen *adhesina MgPA*) DNA sintético ($2E+07$ a $2E+00$ copias/ μ L). Experimento realizado en el equipo BD MAX™ System (canal 475/520 (FAM)).

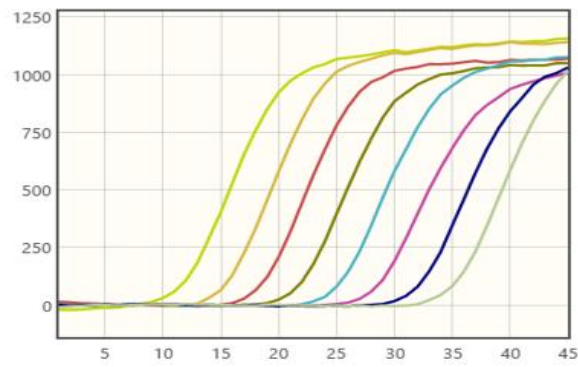


Figura 4. Diluciones seriadas de *M. genitalium* resistente a macrólidos (gen *23S rRNA* (mutación A2058G) + gen *adhesina MgPA*) DNA sintético ($2E+07$ a $2E+00$ copias/ μ L). Experimento realizado en el equipo BD MAX™ System (canal 475/520 (FAM)).

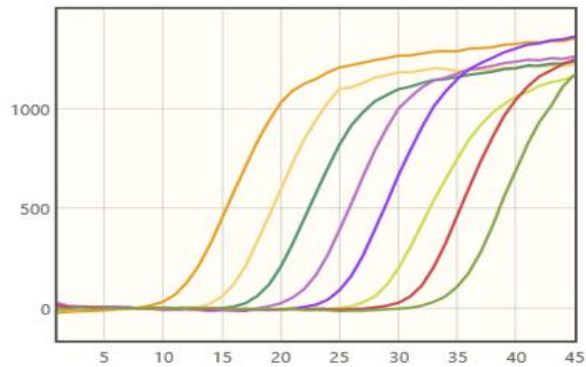


Figura 5. Diluciones seriadas de *M. genitalium* resistente a macrólidos (gen *23S rRNA* (mutación A2058T) + gen *adhesina MgPA*) DNA sintético ($2E+07$ a $2E+00$ copias/ μ L). Experimento realizado en el equipo BD MAX™ System (canal 475/520 (FAM)).

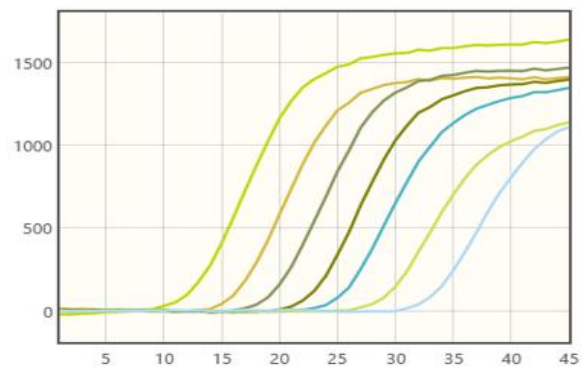


Figura 6. Diluciones seriadas de *M. genitalium* resistente a macrólidos (gen *23S rRNA* (mutación A2059C) + gen *adhesina MgPA*) DNA sintético ($2E+07$ a $2E+00$ copias/ μ L). Experimento realizado en el equipo BD MAX™ System (canal 475/520 (FAM)).

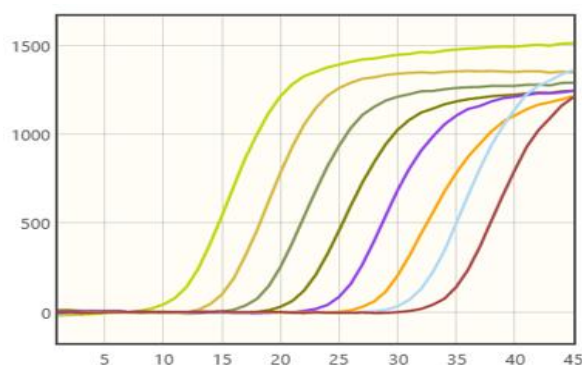
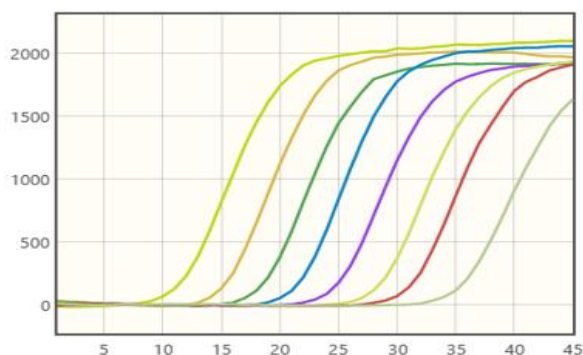


Figura 7. Diluciones seriadas de *M. genitalium* resistente a macrólidos (gen *23S rRNA* (mutación A2059G) + gen *adhesina MgPA*) DNA sintético ($2E+07$ a $2E+00$ copias/ μ L). Experimento realizado en el equipo BD MAX™ System (canal 475/520 (FAM)).



12.2. Sensibilidad analítica. Límite de Detección (LoD)

La sensibilidad analítica o límite de detección (LoD) de VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System ha sido analizada con tres lotes utilizando muestras de matriz vaginal, muestras de orina masculina y femenina. Las cepas de referencia o DNA sintético (en caso de cepa no disponible) utilizadas se detallan en la siguiente tabla:

Diana	Cepa/ DNA sintético	Referencia externa	
Sensibilidad a macrólidos + <i>Mycoplasma genitalium</i>	Gen <i>23S rRNA</i> (tipo natural) + gen <i>adhesina MgPA</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> cepa M30	49895™
Resistencia a macrólidos + <i>Mycoplasma genitalium</i>	Gen <i>23S rRNA</i> (mutación A2058C) + gen <i>adhesina MgPA</i>	DNA sintético (MGRXPC)	N/A
	Gen <i>23S rRNA</i> (mutación A2058G) + gen <i>adhesina MgPA</i>	AMPLIRUN® TOTAL MACROLIDE RESISTANT MGE CONTROL	MBTC029
	Gen <i>23S rRNA</i> (mutación A2058T) + gen <i>adhesina MgPA</i>	DNA sintético (MGRXPC)	N/A
	Gen <i>23S rRNA</i> (mutación A2059C) + gen <i>adhesina MgPA</i>	DNA sintético (MGRXPC)	N/A
	Gen <i>23S rRNA</i> (mutación A2059G) + gen <i>adhesina MgPA</i>	AMPLIRUN® TOTAL MACROLIDE RESISTANT MGE CONTROL	MBTC029

Tabla 19. Cepas de referencia y DNA sintético utilizado en el ensayo de límite de detección.

VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System mostró el límite de detección indicado en la tabla siguiente, con una tasa de positividad del $\geq 95\%$:

Límite de detección (LoD) (copias/ μ l)						
Matriz	<i>M. genitalium</i> sensible a macrólidos	<i>M. genitalium</i> resistente a macrólidos (A2059G)	<i>M. genitalium</i> resistente a macrólidos (A2058G)	<i>M. genitalium</i> resistente a macrólidos (A2058C)	<i>M. genitalium</i> resistente a macrólidos (A2058T)	<i>M. genitalium</i> resistente a macrólidos (A2059C)
Orina femenina	3,33E-02	3,00E+00	9,99E-01	6,00E+00	6,00E+00	2,00E+00
Orina masculina	1,00E-01	9,00E-01	3,00E-01	2,00E+00	2,00E+00	2,00E+00
Vaginal	1,00E-01	2,70E+00	3,33E-01	2,00E+00	6,00E+00	2,00E+00

Tabla 20. Límite de detección de VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System.

Por lo tanto, los resultados obtenidos demuestran que la sensibilidad del dispositivo VIASURE es coherente y fiable en todos los lotes de producción.

12.3. Rango de medición

El rango de medición del ensayo se determinó probando una serie de diluciones 1:10 que contenían una concentración conocida de DNA sintético y específico perteneciente a *M. genitalium* sensible o resistente a macrólidos. Los resultados permitieron confirmar la correcta detección de las dianas en el rango de medición indicados en la siguiente tabla:

Target	Rango de medición (copias/ μ l)					
	Female urine matrix		Male urine matrix		Vaginal matrix	
Macrolide-sensitive <i>M. genitalium</i>	2E+07	2E+01	2E+07	2E+00	2E+07	2E+00
Macrolide-resistant <i>M. genitalium</i> (A2059G)	2E+07	2E+00	2E+07	2E+00	2E+07	2E+00
Macrolide-resistant <i>M. genitalium</i> (A2058G)	2E+07	2E+01	2E+07	2E+01	2E+07	2E+00
Macrolide-resistant <i>M. genitalium</i> (A2058C)	2E+07	2E+01	2E+07	2E+00	2E+07	2E+00
Macrolide-resistant <i>M. genitalium</i> (A2058T)	2E+07	2E+00	2E+07	2E+01	2E+07	2E+01
Macrolide-resistant <i>M. genitalium</i> (A2059C)	2E+07	2E+01	2E+07	2E+01	2E+07	2E+00

Tabla 21. Rango de medición de VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System.

En conclusión, el rango de medida de VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System fue determinado satisfactoriamente según los criterios de aceptación para la validación inicialmente establecidos, asegurando la fiabilidad, exactitud y reproducibilidad de los resultados en un amplio espectro de cargas bacterianas, y afirmando su utilidad en varios escenarios de diagnóstico clínico.

12.4. Exactitud

12.4.1. Veracidad (Sesgo)

La veracidad de VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System fue evaluada frente al material de referencia listado a continuación.

1. Fragmentos de cDNA sintéticos

- Fragmento de cDNA sintético para los genes *23S rRNA* (tipo natural) y *adhesina MgPA* de *M. genitalium* sensible a macrólidos: MGRXPC, canales HEX y ROX.
- Fragmento de cDNA sintético para los genes *23S rRNA* (mutación A2058C) y *adhesina MgPA* de *M. genitalium* resistente a macrólidos: MGRXPC, canales FAM y ROX.
- Fragmento de cDNA sintético para los genes *23S rRNA* (mutación A2058G) y *adhesina MgPA* de *M. genitalium* resistente a macrólidos: MGRXPC, canales FAM y ROX.
- Fragmento de cDNA sintético para los genes *23S rRNA* (mutación A2058T) y *adhesina MgPA* de *M. genitalium* resistente a macrólidos: MGRXPC, canales FAM y ROX.
- Fragmento de cDNA sintético para los genes *23S rRNA* (mutación A2059C) y *adhesina MgPA* de *M. genitalium* resistente a macrólidos: MGRXPC, canales FAM y ROX.
- Fragmento de cDNA sintético para los genes *23S rRNA* (mutación A2059G) y *adhesina MgPA* de *M. genitalium* resistente a macrólidos: MGRXPC, canales FAM y ROX.

2. La Colección Americana de Cultivos Tipo ("ATCC®")

Referencia externa	Microorganismo	Nombre del producto	Variedad
49895	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> Tully et al.	Cepa M30
33530	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> Tully et al.	Cepa G37
49898	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> Tully et al.	Cepa TW48-5G
49123	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> Tully et al.	Cepa TW10-5G
49899	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> Tully et al.	Cepa UMTB-10G
49896	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> Tully et al.	Cepa TW10-6G
49897	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> Tully et al.	Cepa R32G [R32]

Tabla 22. Material de referencia de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC).

3. Controles

Referencia externa	Microorganismo	Nombre del producto	Variedad
MBTC029	<i>Mycoplasma genitalium</i>	AMPLIRUN® TOTAL MACROLIDE RESISTANT MGE CONTROL	- Cepa sensible tipo - Mutación A2059G en gen <i>23 rRNA</i> - Mutación A2058G en gen <i>23 rRNA</i>

Tabla 23. Material de control de Vircell S.L.

4. Programas EQA

Referencia externa	Procedencia	Microorganismo	Nombre del producto	Variedad
MG23S-03	QCMD	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> G37 (WT)	Cepa G37
MG23S-06	QCMD	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> M6303	23S rDNA mutación A2059G, resistencia a macrólidos
MG23S-07	QCMD	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> M6593	23S rDNA mutación A2059G, resistencia a macrólidos
MG101S-04	QCMD	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> M6303	resistencia a macrólidos
MG101S-06	QCMD	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> M6593	resistencia a macrólidos

Tabla 24. Material de referencia procedente de programas EQA.

12.4.2. Precisión

Para determinar la precisión de VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System, se realizaron intra-ensayos (repetibilidad), inter-ensayo, inter-lote y ensayos inter-termociclador (reproducibilidad) utilizando matriz vaginal, muestras de orina masculina y femenina con una concentración conocida de las cepas de referencia: *Mycoplasma genitalium* cepa M30 (Ref: 49895™) para *M. genitalium* sensible a macrólidos y AMPLIRUN® TOTAL MACROLIDE RESISTANT MGE CONTROL (Ref: MBTC029) para *M. genitalium* resistente a macrólidos.

Intra-ensayo

El intra-ensayo se probó analizando seis réplicas de las diferentes muestras en la misma carrera utilizando VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System. Un resumen de los resultados se muestra en la siguiente tabla.

<i>M. genitalium</i> cepa sensible a macrólidos						
Matriz	Diana	Muestra	Canal	Ct (\bar{x})	σ	CV %
Orina masculina	Sensibilidad a macrólidos	3xLoD	530/565 (HEX)	32,02	0,27	0,85
		5xLoD	530/565 (HEX)	30,98	0,32	1,03
		Negative control	530/565 (HEX)	Neg	n.a.	n.a.
	<i>M. genitalium</i>	3xLoD	585/630 (ROX)	31,57	0,34	1,09
		5xLoD	585/630 (ROX)	30,72	0,26	0,86
		Negative control	585/630 (ROX)	Neg	n.a.	n.a.
	CIE	3xLoD	680/715 (CY5.5)	34,38	0,80	2,32
		5xLoD	680/715 (CY5.5)	34,05	0,53	1,55
		Negative control	680/715 (CY5.5)	35,23	1,20	3,41
Orina femenina	Sensibilidad a macrólidos	3xLoD	530/565 (HEX)	34,02	0,83	2,44
		5xLoD	530/565 (HEX)	33,50	0,67	2,01
		Negative control	530/565 (HEX)	Neg	n.a.	n.a.
	<i>M. genitalium</i>	3xLoD	585/630 (ROX)	33,65	0,28	0,84
		5xLoD	585/630 (ROX)	33,05	0,54	1,64
		Negative control	585/630 (ROX)	Neg	n.a.	n.a.

Vaginal	CIE	3xLoD	680/715 (CY5.5)	32,75	0,50	1,53
		5xLoD	680/715 (CY5.5)	33,22	0,37	1,12
		Negative control	680/715 (CY5.5)	32,97	0,23	0,71
	Sensibilidad a macrólidos	3xLoD	530/565 (HEX)	32,48	0,29	0,88
		5xLoD	530/565 (HEX)	30,90	0,71	2,30
		Negative control	530/565 (HEX)	Neg	n.a.	n.a.
	<i>M. genitalium</i>	3xLoD	585/630 (ROX)	31,32	0,44	1,41
		5xLoD	585/630 (ROX)	30,10	0,66	2,19
		Negative control	585/630 (ROX)	Neg	n.a.	n.a.
CIE	3xLoD	680/715 (CY5.5)	31,12	0,47	1,50	
	5xLoD	680/715 (CY5.5)	31,20	0,61	1,97	
	Negative control	680/715 (CY5.5)	31,23	0,25	0,80	

Tabla 25. Resultados de intra-ensayo de VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System con la cepa *M. genitalium* sensible a macrólidos. (Ct) = ciclo umbral. (\bar{x}) = media aritmética del Ct, (σ) = desviación estándar, (CV %) = coeficiente de variación, Neg = negativo, n.a.= no aplica.

<i>M. genitalium</i> cepa resistente a macrólidos						
Matriz	Diana	Muestra	Canal	Ct (\bar{x})	σ	CV %
Orina masculina	Resistencia a macrólidos	3xLoD	475/520 (FAM)	36,17	0,62	1,70
		5xLoD	475/520 (FAM)	35,05	0,63	1,81
		Negative control	475/520 (FAM)	Neg	n.a.	n.a.
	<i>M. genitalium</i>	3xLoD	585/630 (ROX)	35,00	0,99	2,84
		5xLoD	585/630 (ROX)	34,08	0,50	1,48
		Negative control	585/630 (ROX)	Neg	n.a.	n.a.
	CIE	3xLoD	680/715 (CY5.5)	32,58	1,24	3,80
		5xLoD	680/715 (CY5.5)	32,12	0,39	1,22
		Negative control	680/715 (CY5.5)	33,28	0,66	1,99
Orina femenina	Resistencia a macrólidos	3xLoD	475/520 (FAM)	33,72	0,51	1,52
		5xLoD	475/520 (FAM)	33,30	0,37	1,12
		Negative control	475/520 (FAM)	Neg	n.a.	n.a.
	<i>M. genitalium</i>	3xLoD	585/630 (ROX)	32,67	0,48	1,48
		5xLoD	585/630 (ROX)	31,62	0,27	0,86
		Negative control	585/630 (ROX)	Neg	n.a.	n.a.
	CIE	3xLoD	680/715 (CY5.5)	31,45	0,29	0,92
		5xLoD	680/715 (CY5.5)	30,73	0,56	1,83
		Negative control	680/715 (CY5.5)	34,45	0,44	1,27
Vaginal	Resistencia a macrólidos	3xLoD	475/520 (FAM)	34,33	1,34	3,90
		5xLoD	475/520 (FAM)	33,75	0,27	0,79
		Negative control	475/520 (FAM)	Neg	n.a.	n.a.
	<i>M. genitalium</i>	3xLoD	585/630 (ROX)	32,55	1,15	3,52
		5xLoD	585/630 (ROX)	32,02	0,34	1,07
		Negative control	585/630 (ROX)	Neg	n.a.	n.a.
	CIE	3xLoD	680/715 (CY5.5)	32,13	0,73	2,28
		5xLoD	680/715 (CY5.5)	31,20	0,72	2,29
		Negative control	680/715 (CY5.5)	34,15	0,50	1,46

Tabla 26. Resultados de intra-ensayo de VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System con la cepa *M. genitalium* resistente a macrólidos. (Ct) = ciclo umbral. (\bar{x}) = media aritmética del Ct, (σ) = desviación estándar, (CV %) = coeficiente de variación, Neg = negativo, n.a.= no aplica.

Inter-ensayo

El inter-ensayo se probó analizando cuatro réplicas de las diferentes muestras en tres días diferentes por tres operadores distintos con VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System. Un resumen de los resultados se muestra en la siguiente tabla.

<i>M. genitalium</i> cepa sensible a macrólidos						
Matriz	Diana	Muestra	Canal	Ct (\bar{x})	σ	CV %
Orina masculina	Sensibilidad a macrólidos	3xLoD	530/565 (HEX)	34,48	0,85	2,46
		5xLoD	530/565 (HEX)	33,66	0,75	2,22
		Negative control	530/565 (HEX)	Neg	n.a.	n.a.
	<i>M. genitalium</i>	3xLoD	585/630 (ROX)	34,05	0,60	1,75
		5xLoD	585/630 (ROX)	33,38	0,56	1,68
		Negative control	585/630 (ROX)	Neg	n.a.	n.a.
	CIE	3xLoD	680/715 (CY5.5)	34,06	1,65	4,85
		5xLoD	680/715 (CY5.5)	34,04	1,85	5,44
		Negative control	680/715 (CY5.5)	34,10	1,74	5,09
Orina femenina	Sensibilidad a macrólidos	3xLoD	530/565 (HEX)	34,36	1,80	5,24
		5xLoD	530/565 (HEX)	34,01	1,84	5,42
		Negative control	530/565 (HEX)	Neg	n.a.	n.a.
	<i>M. genitalium</i>	3xLoD	585/630 (ROX)	34,56	1,84	5,33
		5xLoD	585/630 (ROX)	33,78	1,33	3,94
		Negative control	585/630 (ROX)	Neg	n.a.	n.a.
	CIE	3xLoD	680/715 (CY5.5)	33,81	1,75	5,18
		5xLoD	680/715 (CY5.5)	33,29	0,98	2,94
		Negative control	680/715 (CY5.5)	34,04	1,39	4,10
Vaginal	Sensibilidad a macrólidos	3xLoD	530/565 (HEX)	33,06	0,90	2,73
		5xLoD	530/565 (HEX)	31,90	0,68	2,13
		Negative control	530/565 (HEX)	Neg	n.a.	n.a.
	<i>M. genitalium</i>	3xLoD	585/630 (ROX)	32,04	0,89	2,77
		5xLoD	585/630 (ROX)	30,98	0,69	2,24
		Negative control	585/630 (ROX)	Neg	n.a.	n.a.
	CIE	3xLoD	680/715 (CY5.5)	31,21	0,51	1,62
		5xLoD	680/715 (CY5.5)	31,03	0,55	1,76
		Negative control	680/715 (CY5.5)	30,84	0,77	2,49

Tabla 27. Resultados de inter-ensayo de VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System con la cepa *M. genitalium* sensible a macrólidos. (Ct) = ciclo umbral. (\bar{x}) = media aritmética del Ct, (σ) = desviación estándar, (CV %) = coeficiente de variación, Neg = negativo, n.a.= no aplica.

<i>M. genitalium</i> cepa resistente a macrólidos						
Matriz	Diana	Muestra	Canal	Ct (\bar{x})	σ	CV %
Orina masculina	Resistencia a macrólidos	3xLoD	475/520 (FAM)	35,98	1,00	2,78
		5xLoD	475/520 (FAM)	35,31	0,90	2,56
		Negative control	475/520 (FAM)	Neg	n.a.	n.a.
	<i>M. genitalium</i>	3xLoD	585/630 (ROX)	34,61	1,08	3,12
		5xLoD	585/630 (ROX)	33,52	0,59	1,76
		Negative control	585/630 (ROX)	Neg	n.a.	n.a.
	CIE	3xLoD	680/715 (CY5.5)	33,10	0,76	2,30
		5xLoD	680/715 (CY5.5)	32,54	0,74	2,27
		Negative control	680/715 (CY5.5)	34,65	1,30	3,74
Orina femenina	Resistencia a macrólidos	3xLoD	475/520 (FAM)	33,08	1,28	3,87
		5xLoD	475/520 (FAM)	31,98	0,79	2,48
		Negative control	475/520 (FAM)	Neg	n.a.	n.a.
	<i>M. genitalium</i>	3xLoD	585/630 (ROX)	31,92	1,01	3,15
		5xLoD	585/630 (ROX)	30,91	0,70	2,27
		Negative control	585/630 (ROX)	Neg	n.a.	n.a.
	CIE	3xLoD	680/715 (CY5.5)	31,15	0,43	1,40
		5xLoD	680/715 (CY5.5)	30,14	0,54	1,78
		Negative control	680/715 (CY5.5)	33,54	1,09	3,25

Vaginal	Resistencia a macrólidos	3xLoD	475/520 (FAM)	34,72	1,34	3,87
		5xLoD	475/520 (FAM)	34,22	1,27	3,71
		Negative control	475/520 (FAM)	Neg	n.a.	n.a.
	<i>M. genitalium</i>	3xLoD	585/630 (ROX)	32,52	1,16	3,57
		5xLoD	585/630 (ROX)	32,36	1,33	4,11
		Negative control	585/630 (ROX)	Neg	n.a.	n.a.
	CIE	3xLoD	680/715 (CY5.5)	30,61	0,44	1,42
		5xLoD	680/715 (CY5.5)	30,59	0,64	2,08
		Negative control	680/715 (CY5.5)	30,98	0,55	1,78

Tabla 28. Resultados de inter-ensayo de VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System con la cepa *M. genitalium* resistente a macrólidos. (Ct) = ciclo umbral. (\bar{x}) = media aritmética del Ct, (σ) = desviación estándar, (CV %) = coeficiente de variación, Neg = negativo, n.a.= no aplica.

Inter-lote

Los valores de inter-lote se determinaron analizando seis réplicas de las diferentes muestras mediante el uso de tres lotes de VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System. Un resumen de los resultados se muestra en la siguiente tabla.

<i>M. genitalium</i> cepa sensible a macrólidos						
Matriz	Diana	Muestra	Canal	Ct (\bar{x})	σ	CV %
Orina masculina	Sensibilidad a macrólidos	3xLoD	530/565 (HEX)	32,77	0,89	2,71
		5xLoD	530/565 (HEX)	31,46	0,57	1,81
		Negative control	530/565 (HEX)	Neg	n.a.	n.a.
	<i>M. genitalium</i>	3xLoD	585/630 (ROX)	31,70	0,47	1,48
		5xLoD	585/630 (ROX)	30,52	0,50	1,64
		Negative control	585/630 (ROX)	Neg	n.a.	n.a.
	CIE	3xLoD	680/715 (CY5.5)	34,74	0,67	1,92
		5xLoD	680/715 (CY5.5)	34,96	1,48	4,22
		Negative control	680/715 (CY5.5)	35,44	1,01	2,85
Orina femenina	Sensibilidad a macrólidos	3xLoD	530/565 (HEX)	34,72	0,81	2,34
		5xLoD	530/565 (HEX)	33,39	0,77	2,39
		Negative control	530/565 (HEX)	Neg	n.a.	n.a.
	<i>M. genitalium</i>	3xLoD	585/630 (ROX)	34,24	1,19	3,46
		5xLoD	585/630 (ROX)	32,96	0,77	2,32
		Negative control	585/630 (ROX)	Neg	n.a.	n.a.
	CIE	3xLoD	680/715 (CY5.5)	35,46	1,79	5,08
		5xLoD	680/715 (CY5.5)	34,58	1,15	3,32
		Negative control	680/715 (CY5.5)	33,53	0,58	1,74
Vaginal	Sensibilidad a macrólidos	3xLoD	530/565 (HEX)	31,62	0,98	3,11
		5xLoD	530/565 (HEX)	30,88	0,83	2,67
		Negative control	530/565 (HEX)	Neg	n.a.	n.a.
	<i>M. genitalium</i>	3xLoD	585/630 (ROX)	31,02	0,94	3,03
		5xLoD	585/630 (ROX)	30,37	0,73	2,40
		Negative control	585/630 (ROX)	Neg	n.a.	n.a.
	CIE	3xLoD	680/715 (CY5.5)	31,29	0,46	1,47
		5xLoD	680/715 (CY5.5)	31,26	0,38	1,23
		Negative control	680/715 (CY5.5)	31,06	0,39	1,27

Tabla 29. Resultados de inter-lote de VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System con la cepa *M. genitalium* sensible a macrólidos. (Ct) = ciclo umbral. (\bar{x}) = media aritmética del Ct, (σ) = desviación estándar, (CV %) = coeficiente de variación, Neg = negativo, n.a.= no aplica.

<i>M. genitalium</i> cepa resistente a macrólidos						
Matriz	Diana	Muestra	Canal	Ct (\bar{x})	σ	CV %
Orina masculina	Resistencia a macrólidos	3xLoD	475/520 (FAM)	36,46	1	2,73
		5xLoD	475/520 (FAM)	35,47	0,76	2,14
		Negative control	475/520 (FAM)	Neg	n.a.	n.a.
	<i>M. genitalium</i>	3xLoD	585/630 (ROX)	34,68	0,76	2,20
		5xLoD	585/630 (ROX)	33,85	0,63	1,86
		Negative control	585/630 (ROX)	Neg	n.a.	n.a.
	CIE	3xLoD	680/715 (CY5.5)	33,57	1,25	3,73
		5xLoD	680/715 (CY5.5)	32,55	0,61	1,88
		Negative control	680/715 (CY5.5)	32,49	0,73	2,24
Orina femenina	Resistencia a macrólidos	3xLoD	475/520 (FAM)	32,81	0,96	2,93
		5xLoD	475/520 (FAM)	32,38	0,84	2,59
		Negative control	475/520 (FAM)	Neg	n.a.	n.a.
	<i>M. genitalium</i>	3xLoD	585/630 (ROX)	31,27	1,15	3,68
		5xLoD	585/630 (ROX)	30,57	0,92	3,02
		Negative control	585/630 (ROX)	Neg	n.a.	n.a.
	CIE	3xLoD	680/715 (CY5.5)	30,25	0,91	3,02
		5xLoD	680/715 (CY5.5)	30,13	0,58	1,92
		Negative control	680/715 (CY5.5)	33,51	1,02	3,06
Vaginal	Resistencia a macrólidos	3xLoD	475/520 (FAM)	34,34	1,39	4,05
		5xLoD	475/520 (FAM)	33,96	0,62	1,82
		Negative control	475/520 (FAM)	Neg	n.a.	n.a.
	<i>M. genitalium</i>	3xLoD	585/630 (ROX)	32,66	1,26	3,85
		5xLoD	585/630 (ROX)	32,23	0,51	1,60
		Negative control	585/630 (ROX)	Neg	n.a.	n.a.
	CIE	3xLoD	680/715 (CY5.5)	31,43	0,75	2,40
		5xLoD	680/715 (CY5.5)	30,76	0,58	1,87
		Negative control	680/715 (CY5.5)	32,24	1,44	4,46

Tabla 30. Resultados de inter-lote de VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System con la cepa *M. genitalium* resistente a macrólidos. (Ct) = ciclo umbral. (\bar{x}) = media aritmética del Ct, (σ) = desviación estándar, (CV %) = coeficiente de variación, Neg = negativo, n.a.= no aplica.

Inter-termociclador.

Los valores de inter-termociclador fueron determinados con seis réplicas de las mismas muestras utilizadas para el intra-ensayo, inter-ensayo y ensayo inter-lote, utilizando VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System. Los ensayos se realizaron en tres laboratorios con tres sistemas BD MAX™ diferentes. Un resumen de los resultados se muestra en la siguiente tabla.

<i>M. genitalium</i> cepa sensible a macrólidos						
Matriz	Diana	Muestra	Canal	Ct (\bar{x})	σ	CV %
Orina masculina	Sensibilidad a macrólidos	3xLoD	530/565 (HEX)	31,96	0,43	1,35
		5xLoD	530/565 (HEX)	31,00	0,40	1,30
		Negative control	530/565 (HEX)	Neg	n.a.	n.a.
	<i>M. genitalium</i>	3xLoD	585/630 (ROX)	31,78	0,56	1,75
		5xLoD	585/630 (ROX)	30,88	0,9	0,94
		Negative control	585/630 (ROX)	Neg	n.a.	n.a.
	CIE	3xLoD	680/715 (CY5.5)	34,48	0,87	2,53
		5xLoD	680/715 (CY5.5)	34,51	0,87	2,51
		Negative control	680/715 (CY5.5)	32,46	0,62	1,92
		3xLoD	530/565 (HEX)	34,31	0,97	2,81

Orina femenina	Sensibilidad a macrólidos	5xLoD	530/565 (HEX)	33,72	0,52	1,54
		Negative control	530/565 (HEX)	Neg	n.a.	n.a.
		3xLoD	585/630 (ROX)	33,85	0,80	2,35
	<i>M. genitalium</i>	5xLoD	585/630 (ROX)	33,38	0,63	1,88
		Negative control	585/630 (ROX)	Neg	n.a.	n.a.
		3xLoD	680/715 (CY5.5)	33,16	0,56	1,69
	CIE	5xLoD	680/715 (CY5.5)	33,06	0,44	1,32
		Negative control	680/715 (CY5.5)	33,08	0,62	1,87
		3xLoD	530/565 (HEX)	32,55	0,81	2,48
Vaginal	Sensibilidad a macrólidos	5xLoD	530/565 (HEX)	32,57	0,52	1,60
		Negative control	530/565 (HEX)	Neg	n.a.	n.a.
		3xLoD	585/630 (ROX)	31,42	0,88	2,81
	<i>M. genitalium</i>	5xLoD	585/630 (ROX)	31,54	0,44	1,40
		Negative control	585/630 (ROX)	Neg	n.a.	n.a.
		3xLoD	680/715 (CY5.5)	31,12	0,33	1,07
	CIE	5xLoD	680/715 (CY5.5)	33,58	0,56	1,68
		Negative control	680/715 (CY5.5)	30,84	0,50	1,61
		3xLoD	530/565 (HEX)	32,55	0,81	2,48

Tabla 31. Resultados de ensayo inter-termociclador de VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System con la cepa *M. genitalium* sensible a macrólidos. (Ct) = ciclo umbral. (\bar{x}) = media aritmética del Ct, (σ) = desviación estándar, (CV %) = coeficiente de variación, Neg = negativo, n.a.= no aplica.

<i>M. genitalium</i> cepa resistente a macrólidos						
Matriz	Diana	Muestra	Canal	Ct (\bar{x})	σ	CV %
Orina masculina	Resistencia a macrólidos	3xLoD	475/520 (FAM)	36,58	1,31	3,58
		5xLoD	475/520 (FAM)	35,13	0,53	1,51
		Negative control	475/520 (FAM)	Neg	n.a.	n.a.
	<i>M. genitalium</i>	3xLoD	585/630 (ROX)	34,81	0,86	2,46
		5xLoD	585/630 (ROX)	34,00	0,44	1,30
		Negative control	585/630 (ROX)	Neg	n.a.	n.a.
	CIE	3xLoD	680/715 (CY5.5)	32,29	0,90	2,79
		5xLoD	680/715 (CY5.5)	31,88	0,67	2,11
		Negative control	680/715 (CY5.5)	32,89	0,77	2,34
Orina femenina	Resistencia a macrólidos	3xLoD	475/520 (FAM)	33,67	0,43	1,28
		5xLoD	475/520 (FAM)	32,85	0,64	1,96
		Negative control	475/520 (FAM)	Neg	n.a.	n.a.
	<i>M. genitalium</i>	3xLoD	585/630 (ROX)	32,46	0,44	1,35
		5xLoD	585/630 (ROX)	31,44	0,42	1,34
		Negative control	585/630 (ROX)	Neg	n.a.	n.a.
	CIE	3xLoD	680/715 (CY5.5)	31,40	0,26	0,82
		5xLoD	680/715 (CY5.5)	30,66	0,43	1,41
		Negative control	680/715 (CY5.5)	34,59	0,65	1,87
Vaginal	Resistencia a macrólidos	3xLoD	475/520 (FAM)	34,47	0,89	2,59
		5xLoD	475/520 (FAM)	33,46	0,61	1,84
		Negative control	475/520 (FAM)	Neg	n.a.	n.a.
	<i>M. genitalium</i>	3xLoD	585/630 (ROX)	32,75	0,77	2,35
		5xLoD	585/630 (ROX)	31,77	0,63	1,97
		Negative control	585/630 (ROX)	Neg	n.a.	n.a.
	CIE	3xLoD	680/715 (CY5.5)	31,87	0,57	1,78
		5xLoD	680/715 (CY5.5)	31,27	0,59	1,88
		Negative control	680/715 (CY5.5)	33,72	0,54	1,61

Tabla 32. Resultados de ensayo inter-termociclador de VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System con la cepa *M. genitalium* sensible a macrólidos. (Ct) = ciclo umbral. (\bar{x}) = media aritmética del Ct, (σ) = desviación estándar, (CV %) = coeficiente de variación, Neg = negativo, n.a.= no aplica.

En conclusión, el estudio de precisión confirma el funcionamiento fiable y la consistencia en todas las matrices testadas, cumpliendo así con los criterios de aceptación para la validación inicialmente establecidos.

12.5. Especificidad y reactividad analítica

La especificidad y reactividad analítica se evaluaron para el producto VIASURE *Mycoplasma genitalium* with *Macrolide Resistance Assay* for BD MAX™ System *in silico* y experimentalmente, empleando diferentes materiales de partida como cepas de referencia certificadas, RNA/DNAs de referencia certificados, así como material procedente de programas EQA.

12.5.1. Especificidad analítica

La especificidad analítica es la habilidad del ensayo para detectar la diana prevista. Hay dos componentes a tener en cuenta para la especificidad analítica: la reactividad cruzada y la interferencia. La reactividad cruzada puede ocurrir cuando las secuencias/genes relacionados genéticamente están presentes en un espécimen de paciente, mientras que la interferencia puede ocurrir si la presencia de sustancias específicas potencialmente presentes en las matrices de las muestras afecta al rendimiento de la qPCR.

Reactividad cruzada: ensayo *in silico*

La reactividad cruzada se evaluó utilizando secuencias de referencia de diferentes patógenos del NCBI Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) y/o buscadores o herramientas de alineación como BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y un software propio de análisis bioinformático. Se llevó a cabo tanto un análisis BLAST para cada primer y sonda sobre la Base de Datos de Nucleótidos NCBI GenBank, como un análisis bioinformático interno. Las secuencias alineadas con un porcentaje de alineación inferior al 80% de homología se consideraron improbables de detectar. Los resultados obtenidos son los siguientes:

Mycoplasma genitalium (MgPA adhesin gene)

Todas las secuencias analizadas mostraron una homología inferior al 80% con los conjuntos de primers y sondas de *Mycoplasma genitalium* (MgPA adhesin gene).

Por lo tanto, los diseños de la diana VIASURE *Mycoplasma genitalium* no deberían causar falsos positivos en la detección de *Mycoplasma genitalium* cuando hay otros organismos presentes.

Mycoplasma genitalium (23S rRNA gene)

El análisis BLAST filtrado por el gen *23S rRNA* de *M. genitalium* (excluyendo *M. genitalium*) muestra una alta homología entre los primers y las sondas y varias secuencias de "Uncultured *Mycoplasma sp.* (taxonomía ID: 167967)" y una secuencia de "Synthetic *Mycoplasma genitalium* JCVI-1.0 (taxonomía ID: 488339)".

Las secuencias "Uncultured *Mycoplasma sp.* (taxonomy ID: 167967)" se detectan con los primers y sondas de *M. genitalium* resistente y sensible a macrólidos, por lo que no existe riesgo de reactividad cruzada en el producto, ya que para dar una muestra como positiva es necesaria la detección en el canal del microorganismo (*M. genitalium*) y en el canal del resistencia o sensibilidad a macrólidos.

«*Mycoplasma genitalium* sintético JCVI-1.0 (taxonomía ID: 488339)» se detecta con los primers y la sonda de sensibilidad a los macrólidos. Se trata de una secuencia correspondiente al microorganismo diana y debe detectarse. Esta secuencia aparece en la reactividad cruzada ya que tiene un ID de taxonomía diferente a la utilizada en la exclusión.

Por lo tanto, ninguna de las secuencias analizadas, incluyendo aquellas que muestran una homología mayor del 80%, podrían afectar en la correcta detección de *Mycoplasma genitalium* (gen *23S rRNA*).

Especificidad analítica: ensayo experimental

Reactividad cruzada: ensayo experimental

La reactividad cruzada de VIASURE *Mycoplasma genitalium with Macrolide Resistance* Assay for BD MAX™ System fue confirmada probando un panel de diferentes microorganismos asociados con síntomas de infecciones de transmisión sexual o con el medio ambiente, y microorganismos filogenéticamente relevantes. Cuando fue posible y se disponía de datos de concentración, se evaluaron los microorganismos interferentes a niveles médicamente relevantes (normalmente 1E+05 - 1E+06 ufc (unidad formadora de colonias)/ml para bacterias y 1E+04 - 1E+05 ufp (unidad formadora de placas)/ml para virus). No se detectaron reacciones cruzadas con ninguno de los siguientes microorganismos testados, excepto con los microorganismos diana que detecta el ensayo:

Pruebas de reactividad cruzada					
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	<i>Haemophilus ducreyi</i>	-	<i>Mycoplasma genitalium</i> strain TW48-5G	-/+
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i>	-	<i>Mycoplasma genitalium</i> strain UMTB-10G	-/+
<i>Atopobium vaginae</i>	-	Herpes simplex virus 2	-	<i>Mycoplasma genitalium</i> Tully et al. strain TW10-5G	-/+
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	Human Herpesvirus 1, Strain HF	-	<i>Mycoplasma hominis</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	Human papillomavirus 16	-	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	-
<i>Candida dubliniensis</i>	-	Human papillomavirus 18	-	<i>Neisseria meningitidis</i>	-
<i>Candida glabrata</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Proteus mirabilis</i>	-
<i>Candida krusei</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Candida parapsilosis</i>	-	<i>Listeria innocua</i>	-	<i>Serratia marcescens</i>	-
<i>Candida tropicalis</i>	-	<i>Listeria ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Chlamydia trachomatis</i> Serovars Panel	-	<i>Listeria monocytogenes</i>	-	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Listeria monocytogenes</i>	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Mycoplasma genitalium</i> strain G37	-/+	<i>Treponema pallidum</i>	-
<i>Enterococcus faecium</i>	-	<i>Mycoplasma genitalium</i> strain R32G [R32]	-/+	<i>Trichomonas vaginalis</i>	-
<i>Escherichia coli</i>	-	<i>Mycoplasma genitalium</i> strain TW10-6G	-/+	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	-
<i>Gardnerella vaginalis</i>	-				

Tabla 33. Microorganismos de referencia incluidos en el estudio de reactividad cruzada. El resultado +/- se refiere al resultado positivo o negativo obtenido en los diferentes canales en función de la diana detectada. En caso de que un microorganismo analizado sea una de las dianas detectadas por el dispositivo, se obtiene un resultado positivo en su canal correspondiente, pero un resultado negativo en los demás canales.

En conclusión, los resultados de los ensayos de reactividad cruzada cumplen con los criterios de aceptación de la validación, e indican una alta especificidad de VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System para la detección de las dianas *M. genitalium* sensible y resistente a macrólidos, minimizando así el riesgo de falsos positivos. Puesto que no se observan amplificaciones inespecíficas con otros microorganismos relacionados, esto sugiere que el dispositivo es capaz de distinguir con exactitud las dianas.

Estudio de agentes microbianos interferentes

Se realiza un estudio de agentes microbianos interferentes para analizar los posibles agentes microbianos interferentes para VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System. Se analizó un panel de diferentes microorganismos relevantes desde el punto de vista clínico, medioambiental y filogenético en presencia de las cepas de referencia: *Mycoplasma genitalium* cepa M30 (Ref: 49895™) para *M. genitalium* sensible a macrólidos y AMPLIRUN® TOTAL MACROLIDE RESISTANT MGE CONTROL (Ref: MBTC029) para *M. genitalium* resistente a macrólidos. Cuando fue posible y se disponía de datos de concentración, se evaluaron los microorganismos interferentes a niveles médicamente relevantes (normalmente 1E+05 - 1E+06 ufc (unidad formadora de colonias)/ml para bacterias y 1E+04 - 1E+05 ufp (unidad formadora de placas)/ml para virus). Cada análisis puntual se realizó una vez por muestra.

Un control de matriz positiva (Positive Matrix Control, PMC) y un control de matriz negativa (Negative Matrix Control, NMC) se incluyeron como controles de la prueba. PMC corresponde a la matriz vaginal, orina masculina y femenina enriquecidas con las cepas específicas de *M. genitalium* sensible y resistente a macrólidos sin ningún agente microbiano interferente, mientras que NMC corresponde a las matrices negativas sin ningún agente microbiano interferente.

Nombre del microorganismo	Concentración evaluada	Resultado
PMC	-	n.a.
NMC	-	n.a.
<i>Acinetobacter baumannii</i>	8,10E+05 cfu/mL	N.I
<i>Gardnerella vaginalis</i>	4,40E+01 cfu/ul	N.I
<i>Haemophilus influenzae</i>	5,20E+02cfu/ul	N.I
Virus Herpes simplex 1	1,60E+05 TCID50/mL	N.I
<i>Listeria monocytogenes</i>	5,80E+06 ufc/ml	N.I
<i>Mycoplasma hominis</i>	4,70E+06 cfu/ml	N.I
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4,09E+05 cfu/ml	N.I
<i>Staphylococcus aureus</i>	4,60E+05 cfu/ml	N.I
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1,80E+01 cfu/ul	N.I
<i>Treponema pallidum</i>	3,40E+04 cells/ml	N.I
<i>Klebsiella oxytoca</i>	7,60E+03 cop/ul	N.I
<i>Escherichia coli</i>	n.a.	N.I

<i>Aspergillus fumigatus</i>	n.a.	N.I
<i>Atopobium vaginae</i>	4,52E+03 cfu/ul	N.I
<i>Candida albicans</i>	4,18E+04 cfu/ul	N.I
<i>Candida glabrata</i>	2,46E+03 cfu/ul	N.I
<i>Candida tropicalis</i>	2,88E+03 cfu/ul	N.I
<i>Chlamydia trachomatis</i> Serovar E	6,40E+05 IFU/ml	N.I
<i>Enterobacter cloacae</i>	1,28E+03 cfu/ul	N.I
<i>Enterococcus faecalis</i>	5,00E+04 cfu/ml	N.I
<i>Enterococcus faecium</i>	3,50E+04 cfu/ml	N.I
Virus Herpes simplex 2	7,24E+03 TCID50/mL	N.I
Virus papiloma humano 16	1,00E+02 IU/ul	N.I
Virus papiloma humano 18	1,00E+02 IU/ul	N.I
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3,65E+03 cfu/ul	N.I
<i>Listeria monocytogenes</i>	n.a.	N.I
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	6,20E+03 cfu/ul	N.I
<i>Neisseria meningitidis</i>	5,70E+04 cfu/ul	N.I
<i>Proteus mirabilis</i>	2,55E+03 cfu/ul	N.I
<i>Serratia marcescens</i>	n.a.	N.I
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	9,20E+03 cfu/ul	N.I
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	2,00E+04 cfu/ul	N.I

Tabla 34. Estudio de agentes microbianos interferentes. N.I. = Interferencias no notificables, n.a. = no aplicable.

En conclusión, no se observaron interferencias en la detección de RNA de *M. genitalium* sensible a macrólidos y/o resistente a macrólidos en matriz vaginal, orina femenina y masculina con ninguno de los microorganismos ensayados.

Estudio de sustancias interferentes

Se realiza un estudio de sustancias interferentes para probar el posible efecto de interferencia de sustancias endógenas y exógenas en VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System. Se añadieron un total de 17, 25 y 28 sustancias potencialmente interferentes a la matriz negativa vaginal, orina masculina y orina femenina, respectivamente, enriquecida con las cepas de referencia: *Mycoplasma genitalium* cepa M30 (Ref: 49895™) para *M. genitalium* sensible a macrólidos y AMPLIRUN® TOTAL MACROLIDE RESISTANT MGE CONTROL (Ref: MBTC029) para *M. genitalium* resistente a macrólidos y se evaluaron con seis réplicas.

Un control de matriz positiva (Positive Matrix Control, PMC) y un control de matriz negativa (Negative Matrix Control, NMC) se incluyeron como controles de la prueba. PMC corresponde a la matriz vaginal, orina masculina y femenina enriquecidas con las cepas específicas de *M. genitalium* sensible y resistente a macrólidos sin sustancias interferentes, mientras que NMC corresponde a las matrices negativas sin sustancias interferentes potenciales ni microorganismos/material de referencia añadidos. Se obtuvieron los siguientes resultados:

Matriz vaginal		
Nombre de la sustancia	Concentración evaluada	Resultado
PMC	-	n.a.
NMC	-	n.a.
Aciclovir	6,60E-02 mg/ml	N.I.
Metronidazol	1,23E-01 mg/ml	N.I.
Clotrimazol	2,50E+00 mg/ml	N.I.
Miconazol Nitrato	2,50E+00 mg/ml	N.I.
Conceptrol Gel anticonceptivo (Nonoxinol-9)	2,50E+00 mg/ml	N.I.
Tioconazol	2,50E+00 mg/ml	N.I.
Leucocitos/monocitos	2,00E+06 cell/ml	N.I.
Premeno Duo (Ácido hialurónico y ácido láctico)	2,50E+00 mg/ml	N.I.
Desodorante femenino en aerosol	5,00E+01 µl/ml	N.I.
Lubricante vaginal líquido- base acuosa	5,00E+01 µl/ml	N.I.
Lubricante vaginal – base oleosa	5,00E+01 µl/ml	N.I.
DermoVagisil crema vaginal	2,50E+00 mg/ml	N.I.
Preparación H hemorroidal Gel HEMOAL	2,50E+00 mg/ml	N.I.
Estradiol	7,50E-03 ng/ml	N.I.
Progesterona	6,00E+00 ng/ml	N.I.
Semen	5%	N.I.
Sangre completa	1%	N.I.

Tabla 35. Sustancias potencialmente interferentes en matriz vaginal. N.I: Interferencias no notificables / I: Interferencia, n.a. = no aplicable.

Orina masculina		
Nombre de la sustancia	Concentración evaluada	Resultado
PMC	-	n.a.
NMC	-	n.a.
Ibuprofeno	2,19E-01 mg/ml	N.I.
Naproxeno	3,60E-01 mg/ml	N.I.
Amoxicilina	5,40E-02 mg/ml	N.I.
Azitromicina	1,10E-02 mg/ml	N.I.
Ceftriaxona	8,40E+01 mg/dl	N.I.
Eritromicina	1,38E-01 mg/ml	N.I.
Metronidazol	1,23E-01 mg/ml	N.I.
Sulfametoxazol	1,12E+00 mg/ml	N.I.
Clorhidrato de tetraciclina	2,40E-02 µg/ml	N.I.
Timetoprima	4,20E-02 µg/ml	N.I.
Albumina	1,00E+01 mg/ml	N.I.

Bilirubina	4,00E-01 mg/ml	N.I.
Glucosa (Dextrosa)	1,00E+01 mg/ml	N.I.
Leucocitos/monocitos	2,00E+06 cell/ml	N.I.
pH bajo (HCl)	N/A	N.I.
pH alto (NaOH)	N/A	N.I.
Semen	5%	N.I.
Urea	1,20E+00 mg/ml	N.I.
Ácido úrico	2,35E-01 mg/ml	N.I.
Sangre completa	1%	I.*
	0,25%	N.I.
	0,125%	N.I.
Antocianina (cranberry vaccinium macrocarpon)	1,09E-01 mg/ml	N.I.
Talquistina	2,64E+00 ml Talq/ml dvte	N.I.
4-Acetamidofenol	1,56E-01 mg/ml	N.I.
Clorhidrato de fenazopiridina	1,60E-01 mg/ml	N.I.
Ácido salicílico	1,50E-01 mg/ml	N.I.

Tabla 36. Sustancias potencialmente interferentes en orina masculina. N.I: Interferencias no notificables / I: Interferencia, n.a. = no aplicable.

* Inhibición observada solo para la diana de resistencia a macrólidos.

Orina femenina		
Nombre de la sustancia	Concentración evaluada	Resultado
PMC	-	n.a.
NMC	-	n.a.
Ibuprofeno	2,19E-01 mg/ml	N.I.
Naproxeno	3,60E-01 mg/ml	N.I.
Amoxicilina	5,40E-02 mg/ml	N.I.
Azitromicina	1,10E-02 mg/ml	N.I.
Ceftriaxona	8,40E+01 mg/dl	N.I.
Eritromicina	1,38E-01 mg/ml	N.I.
Metronidazol	1,23E-01 mg/ml	N.I.
Sulfametoxazol	1,12E+00 mg/ml	N.I.
Clorhidrato de tetraciclina	2,40E-02 µg/ml	N.I.
Timetoprima	4,20E-02 µg/ml	N.I.
Albumina	1,00E+01 mg/ml	N.I.
Bilirubina	4,00E-01 mg/ml	N.I.
Glucosa (Dextrosa)	1,00E+01 mg/ml	N.I.
Leucocitos/monocitos	2,00E+06 cell/ml	N.I.
pH bajo (HCl) 4	N/A	I.*
pH bajo (HCl) 5	N/A	I.*

pH bajo (HCl) 6	N/A	N.I.
pH alto (NaOH)	N/A	N.I.
Semen	5%	N.I.
Urea	1,20E+00 mg/ml	N.I.
Ácido úrico	2,35E-01 mg/ml	N.I.
Sangre completa	1%	N.I.
Antocianina (cranberry vaccinium macrocarpon)	1,09E-01 mg/ml	N.I.
Talquistina	2,64E+00 ml Talq/ml dvte	N.I.
4-Acetamidofenol	1,56E-01 mg/ml	I.*
	3,90E-02 mg/ml	N.I.
	9,75E-03 mg/ml	N.I.
Clorhidrato de fenazopiridina	1,60E-01 mg/ml	N.I.
Ácido salicílico	1,50E-01 mg/ml	N.I.
17- α etinilestradiol	7,50E-03 ng/ml	N.I.
Norethindrone	1,60E+01 ng/ml	N.I.
Desodorante femenino en aerosol	5,00E+01 μ l/ml	N.I.

Tabla 37. Sustancias potencialmente interferentes en orina femenina. N.I.: Interferencias no notificables / I: Interferencia, n.a. = no aplicable.

* Inhibición observada solo para la diana de sensibilidad a macrólidos.

En conclusión, diferentes sustancias potencialmente interferentes, tanto endógenas como exógenas, han sido evaluadas con VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System. Los resultados obtenidos permiten concluir que, a las concentraciones testadas no se observan interferencias para ninguna de las sustancias evaluadas.

12.5.2. Reactividad analítica

La reactividad analítica puede definirse como el porcentaje de cepas microbianas diana o muestras de DNA/RNA que dan un lugar a resultados positivos correctos. La reactividad analítica se estudió mediante análisis in silico y experimentales.

Reactividad analítica: evaluación in silico

La reactividad analítica de VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System se evaluó utilizando bases de datos de secuencias de nucleótidos disponibles públicamente como NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) y un programa interno de análisis bioinformático, para demostrar que los genes diana pueden detectarse correctamente con el dispositivo. El análisis in silico del diseño de los cebadores y las sondas se realizó mediante alineamiento frente a un total de 2.399 secuencias analizadas (secuencias descargadas de la base de datos con duplicados eliminados). Los resultados obtenidos tras el análisis de las secuencias incluidas se muestran en la siguiente tabla:

<i>Mycoplasma genitalium</i>					
Gen	Aligned sequences: 486				
	Sin desajustes ("mismatches")	Con desajustes ("mismatches")	Secuencias con detección confirmada	Secuencias sin detección	Secuencias con detección desconocida
<i>MgPA adhesin</i>	74,07%	25,93%	74,07%	0%	25,93%*
<i>Mycoplasma genitalium</i>					
Gen	Aligned sequences: 17				
	Sin desajustes ("mismatches")	Con desajustes ("mismatches")	Secuencias con detección confirmada	Secuencias with no detection	Secuencias con detección desconocida
<i>23S RNA</i>	82,35%	17,65%	100%	0%	0%

Tabla 38. Análisis *in silico* de la reactividad analítica. "Secuencias alineadas" = número de secuencias alineadas sin o con desajustes del total de secuencias analizadas, "Secuencias con detección confirmada" = secuencias sin desajustes o analizadas experimentalmente cuya detección está garantizada, "Secuencias sin detección" = secuencias previamente analizadas *in silico* cuya detección experimental no puede garantizarse debido a pruebas experimentales negativas previas, "Secuencias con detección desconocida" = secuencias previamente analizadas *in silico* cuya detección experimental no puede garantizarse debido a la falta de pruebas experimentales.

* Debe considerarse que el 20,78% del total de secuencias alineadas (101/486) presentaron desajustes ("mismatches") no críticos que se consideran detectados.

En resumen, el análisis de inclusividad mostró una detección correcta de los genes *MgPA adhesin* y *23S rRNA* de *M. genitalium* con VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System.

Reactividad analítica: evaluación experimental

La reactividad analítica de VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System para *Mycoplasma genitalium* se evaluó frente al DNA de las siguientes cepas, mostrando resultados positivos:

- *Mycoplasma genitalium* cepa G37 (código ATCC: 33530)
- *Mycoplasma genitalium* cepa TW48-5G (código ATCC: 49898)
- *Mycoplasma genitalium* cepa TW10-5G (código ATCC: 49123)
- *Mycoplasma genitalium* cepa UMTB-10G (código ATCC: 49899)
- *Mycoplasma genitalium* cepa TW10-6G (código ATCC: 49896)
- *Mycoplasma genitalium* cepa R32G [R32] (código ATCC: 49897)

12.6. Trazabilidad metrológica

Este dispositivo no está diseñado para fines de medición.

13. Características del funcionamiento clínico

El funcionamiento clínico de VIASURE *Mycoplasma genitalium* with *Macrolide Resistance* Assay for BD MAX™ System fue evaluado utilizando muestras vaginales y de orina. Los resultados fueron los siguientes:

	Lugar	Tipo de muestra	Flujo de trabajo	Diana
1	Certest Biotec S.L. En colaboración con Hospital Universitario Miguel Servet (Zaragoza, España)	Hisopos vaginales	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	<i>Mycoplasma genitalium</i> Sensible a macrólidos
				<i>Mycoplasma genitalium</i> resistente a macrólidos
2	Certest Biotec S.L. (Zaragoza, España) utilizando muestras de Cerba Xpert	Orina	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	<i>Mycoplasma genitalium</i> Sensible a macrólidos
				<i>Mycoplasma genitalium</i> resistente a macrólidos

Tabla 39. Lugar, tipo de muestras, flujo de trabajo y diana.

Los verdaderos valores positivos y negativos, los valores de falsos positivos y negativos, la sensibilidad, especificidad, los valores predictivos positivos (PPV) y valores predictivos negativos (NPV) y cociente de verosimilitud (LR) para VIASURE *Mycoplasma genitalium* with *Macrolide Resistance* Assay for BD MAX™ System fueron calculados en relación con cada ensayo de comparación como se muestra en la siguiente tabla:

Centro	Ensayo comparador	Diana	TP	TN	FP	FN	Sensibilidad	Especificidad	PPV	NPV	LR+	LR-
1	Allplex™ MG & AziR Assay (Seegene)	MG resistente a macrólidos	43	96	0	2	0,96 (0,85-0,99)	1,00 (0,96-1,00)	1,00 (0,91-1,00)	0,98 (0,93-1,00)	183,46 (11,55-2914)	0,055 (0,016-0,182)
		MG sensible a macrólidos	50	86	3	2	0,96 (0,87-0,99)	0,97 (0,91-0,99)	0,94 (0,85-0,99)	0,98 (0,92-1,00)	28,53 (9,37-86,88)	0,040 (0,010-0,155)
2	Allplex™ MG & AziR Assay (Seegene)	MG resistente a macrólidos	44	107	0	0	1,00 (0,92-1)	1,00 (0,97-1)	1,00 (0,92-1)	1,00 (0,97-1)	213,6 (13,4-3394)	0,011 (0,001-0,176)
		MG sensible a macrólidos	54	95	0	2	0,96 (0,88-0,99)	1,00 (0,96-1)	1,00 (0,93-1)	0,98 (0,93-0,99)	183,6 (11,6-2916)	0,044 (0,013-0,148)

Tabla 40. Valores de verdadero positivo (TP) y negativo (TN), valores de falso positivo (FP) y falso negativo (FN), sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos (PPV), valores predictivos negativos (NPV) y cociente de verosimilitud (LR) para VIASURE *Mycoplasma genitalium* with *Macrolide Resistance* Assay for BD MAX™ System.

En conclusión, estos resultados muestran un alto nivel de concordancia para detectar *M. genitalium* sensible y resistente a macrólidos utilizando VIASURE *Mycoplasma genitalium* with *Macrolide Resistance* Assay for BD MAX™ System.

14. Resumen sobre Seguridad y Funcionamiento

El Resumen sobre Seguridad y Funcionamiento de VIASURE *Mycoplasma genitalium* with *Macrolide Resistance* Assay for BD MAX™ System puede descargarse de la página web: certest.es/viasure/labeling. Este resumen también se encontrará en el sitio web de EUDAMED (<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>).

Bibliografía

Baumann, L., Cina, M., Egli-Gany, D., Goutaki, M., Halbeisen, F. S., Lohrer, G.-R., Ali, H., Scott, P., & Low, N. (2018). Prevalence of *Mycoplasma genitalium* in different population groups: systematic review and meta-analysis. *Sex Transm Infect*, *94*, 254–261. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2017-053384>

Gnanadurai, R., & Fifer, H. (2020). *Mycoplasma genitalium*: A review. *Microbiology*, *166*, 21–29. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000830>













Heavey, E. (2017). *Mycoplasma genitalium*. *Nursing*, *47*(7), 61–62. <https://doi.org/10.1097/01.NURSE.0000520524.30192.07>

Jensen, J. S., Cusini, M., Gomberg, M., Moi, H., Wilson, J., & Unemo, M. (2022). 2021 European guideline on the management of *Mycoplasma genitalium* infections. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, *36*, 641–650. <https://doi.org/10.1111/jdv.17972>

Patel, P. H., & Hashmi, M. F. (2023). Macrolides. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551495/>

van der Schalk, T. E., Braam, J. F., & Kusters, J. G. (2020). Molecular basis of antimicrobial resistance in *Mycoplasma genitalium*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *55*, 105911. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105911>

Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico *in vitro*

 IVD	Producto para diagnóstico <i>in vitro</i>		Almacenar en lugar seco		Fecha de caducidad		Fabricante	 LOT	Número de lote
	Consultar las instrucciones de uso		Limitación de temperatura		Contiene <n> test	 UDI	Identificación única de dispositivo	 REF	Número de referencia
	Marcado CE		Mantener fuera de la luz del sol						

Marca registrada

BD MAX™ es una marca registrada de Becton, Dickinson and Company.

Derechos de modificación reservados. Todos los derechos reservados. © Certest Biotec, S.L.

Todas las marcas comerciales que puedan aparecer en este prospecto pertenecen a sus respectivos propietarios.



Certest Biotec, S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1, 50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)

Tel. (+34) 976 520 354 | viasure@certest.es | www.certest.es

Información distribuidor en Australia: Becton Dickinson Pty Ltd., 66 Waterloo Road.
Macquarie Park NSW 2113, Australia

Información distribuidor en Nueva Zelanda: Becton Dickinson Limited, 14B George Bourke Drive.
Mt. Wellington Auckland 1060, New Zealand

Control de Cambios		
Versión nº	Cambios	Fecha
00	Versión original. Esta versión es una traducción del documento en inglés: IUo-444224en1125.00	18/02/2026

Tabla A 2. Tabla de control de cambios.

Revisión: 18 febrero 2026

VIASURE

by **certest**



 **Certest Biotec, S.L.**
Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J, N°1 50840,
San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)

 **(+34) 976 520 354**

 **viasure@certest.es**

 **www.certest.es**

certest
F-566 rev.03

Modification rights reserved. All rights reserved. © Certest Biotec, S.L.
The products, services and data set out in this document may suffer changes
and/or variations on the texts and pictures shown.