

Real Time PCR Detection Kit

Mycoplasma genitalium with Macrolide Resistance
Assay for BD MAX™ System
Upute za uporabu

CE IVD
2797

Ove upute za uporabu odnose se na sljedeću referencu:

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

Tablica A1. Referenca za proizvod koji će se koristiti sa sustavom BD MAX™ System.

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**. Atidare 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.

Ako vašeg jezika nema na popisu, pogledajte **certest.es/viasure/labeling** . Ako vašeg jezika nema na web-mjestu, obratite se na viasure@certest.es.

Napomena: Korisnik treba obavijestiti proizvođača i nadležno tijelo države članice u kojoj ima sjedište kao korisnik i/ili pacijent o svakom ozbiljnom incidentu povezanom s proizvodom.

Sadržaj

1.	Namjena	6
2.	Sažetak i objašnjenje	6
3.	Načelo postupka	8
4.	Reagensi koji se isporučuju.....	9
5.	Reagensi i oprema koju mora pribaviti korisnik.....	9
6.	Uvjeti transporta, skladištenja i korištenja.....	10
7.	Mjere opreza za korisnike.....	10
8.	Testni postupak.....	12
8.1.	Prikupljanje, transport i pohrana uzoraka.....	12
8.2.	Priprema uzoraka i ekstrakcija DNA.....	13
8.3.	Protokol za PCR.....	13
8.3.1.	Kreiranje programa za test PCR-a za VIASURE <i>Mycoplasma genitalium with Macrolide Resistance</i> Assay for BD MAX™ System	13
8.3.2.	Postavljanje BD MAX™ stalka.....	18
8.3.3.	Postavljanje BD MAX™ instrumenta	19
8.3.4.	Izvješće o rezultatima BD MAX™	20
9.	Tumačenje rezultata.....	20
10.	Ograničenja testa	24
11.	Kontrola kvalitete.....	26
12.	Značajke analitičke učinkovitosti	27
12.1.	Analitička linearnost.....	27
12.2.	Analitička osjetljivost. Granica osjetljivosti testa (LOD).....	28
12.3.	Mjerni raspon.....	29
12.4.	Točnost.....	30
12.4.1.	Istinitost.....	30
12.4.2.	Preciznost.....	31
12.5.	Analitička specifičnost i reaktivnost.....	38
12.5.1.	Analitička specifičnost.....	38

12.5.2. Analitička reaktivnost	45
12.6. Metrološka sljedivost.....	46
13. Značajke kliničke učinkovitosti.....	46
14. Sažetak sigurnosti i učinkovitosti	47
Literatura	48
Simboli za IVD komponente i reagense	48
Robni žigovi	48

HRVATSKI

1. Namjena

VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System je automatizirani test qPCR osmišljen za kvalitativnu detekciju DNA iz bakterije *Mycoplasma genitalium* i specifičnih točkastih mutacija (uzrokovanih zamjenama baza u *23S rRNA*) povezanih s rezistencijom na makrolide u uzorcima vaginalnih briseva i uzorcima urina muškaraca i žena kod pacijenata kod kojih zdravstveni djelatnik sumnja na infekciju bakterijom *M. genitalium*. Predviđeno je da se ovaj test koristi kao pomoć u dijagnosticiranju infekcije bakterijom *M. genitalium* i detekciji potencijalne rezistencije na makrolide u kombinaciji s kliničkim znakovima i simptomima pacijenta i/ili s epidemiološkim faktorima rizika. Pozitivni rezultati ukazuju na prisutnost ciljane nukleinske kiseline (NA), ali ne isključuju prisutnost drugih NA patogena koje test ne detektira. Negativni rezultati ne isključuju prisutnost ciljanih NA i ne smiju se koristiti kao jedini temelj za odlučivanje o liječenju ili pružanju druge zdravstvene skrbi bolesniku. Test koristi sustav BD MAX™ System za automatiziranu ekstrakciju DNA i naknadni qPCR, s priloženim reagensima u kombinaciji s univerzalnim reagensima i jednokratnim materijalom za sustav BD MAX™ System. DNA se ekstrahira iz uzoraka, amplificira primjenom qPCR-a i detektira pomoću specifičnih početnica i fluorescentnih sonda s reporterskom bojom za *M. genitalium* i mutacije gena *23S rRNA* povezane s rezistencijom na makrolide.

Proizvod je namijenjen korištenju od strane kvalificiranog i obučenog kliničkog laboratorijskog osoblja koje je posebno upućeno i educirano o tehnikama PCR-a u stvarnom vremenu i *in vitro* dijagnostičkih postupaka (uključujući edukaciju o instrumentu za PCR u stvarnom vremenu (termocikler) i sustavu za ekstrakciju nukleinske kiseline).

2. Sažetak i objašnjenje

Spolno prenosive bolesti (SPB) velik su javnozdravstveni problem diljem svijeta, utječu na kvalitetu života i uzrokuju teški morbiditet i mortalitet.

Bakterija *Mycoplasma genitalium* (MG) čest je uzrok negonokoknog uretritisa (NGU) i neklamidijskog uretritisa u muškaraca te cervicitisa u žena, a prema izvješćima povezana je s upalnom bolesti zdjelice, neplodnošću i prijevremenim porođajem (Baumann et al., 2018; Jensen et al., 2022; van der Schalk et al., 2020). MG je organizam u obliku tikvice s blago zakrivljenom terminalnom organelom, koji može izazvati upalu urogenitalnog trakta prijanjanjem na epitelne stanice domaćina, izazivanjem akutnih upalnih signala putem visoko izraženih senzora urođenog imuniteta (Gnanadurai & Fifer, 2020). Taj je mikroorganizam spororastući organizam za koji se zna da je najmanji prokariotski organizam sposoban za neovisnu replikaciju, koji se tijekom posljednjih nekoliko desetljeća pojavio kao spolno prenosiv patogen zbog svoje sposobnosti koloniziranja reproduktivnog trakta muškaraca i žena (Gnanadurai & Fifer, 2020; Jensen et al.,

2022). Infekcija bakterijom MG tijekom trudnoće povezana je s prijevremenim porođajem i može igrati ulogu u ranom gubitku trudnoće i neonatalnim infekcijama (Heavey, 2017). Može koegzistirati s bakterijom *Chlamydia trachomatis* i drugim spolno prenosivim infekcijama, što otežava određivanje njezinih neovisnih učinaka (Heavey, 2017).

Makrolidi su klasa lijekova koji se koriste u liječenju i zbrinjavanju raznih bakterijskih infekcija, kao što su pneumonija, sinusitis, faringitis, tonzilitis, nekomplicirane infekcije kože i upala srednjeg uha te infekcija bakterijom *Helicobacter pylori*, ali se također često koriste za liječenje spolno prenosivih bolesti kao što su gonokokne i klamidijske infekcije (Patel & Hashmi, 2023). Mehanizam djelovanja sastoji se od vezanja na bakterijsku 50S ribosomsku podjedinicu (blizu mjesta peptidil-transferaze (V regija)) ili na ostatke A2058 i A2059 (*Escherichia coli* numeriranje) 23S rRNA, uzrokujući prestanak sinteze bakterijskih proteina (van der Schalk et al., 2020).

Rastući problem rezistencije na makrolide ozbiljan je problem, s globalnim stopama rezistencije u rasponu od 30 % do 100 % (Gnanadurai & Fifer, 2020). Bakterije prvenstveno razvijaju rezistenciju na makrolide putem dvaju mehanizama: polimorfizama jednog nukleotida (SNP) i metilacije rRNA. Međutim, budući da MG nema potrebne enzime za metilaciju, može razviti rezistenciju samo putem modifikacije cilja putem SNP (van der Schalk et al., 2020). Rezistencija često proizlazi iz mutacije pojedinačne baze na položaju A2058 ili A2059 (na temelju numeriranja *Escherichia coli*) u 23S rRNA, s minimalnim utjecajem na bakterijsku vitalnost, omogućujući nastavak prijenosa (Gnanadurai & Fifer, 2020). Azitromicin je najčešće korišteni makrolid za liječenje infekcija bakterijom MG, iako se sada također preporučuju josamicin i pristinamicin (Gnanadurai & Fifer, 2020; Jensen et al., 2022; van der Schalk et al., 2020).

Bakteriju MG je teško uzgojiti u kulturi jer za rast zahtijeva tjedne do mjesec, što standardno testiranje osjetljivosti čini nepraktičnim. Iako je testiranje osjetljivosti na antibiotike korištenjem sojeva MG uzgojenih u Vero staničnim kulturama dalo rezultate slične tradicionalnim metodama razrjeđivanja u tekućem hranjivom mediju, taj pristup nije izvediv u primarnoj dijagnostici niti u većini referentnih laboratorija (Gnanadurai & Fifer, 2020).

Zbog odsutnosti stanične stijenke, MG nije vidljiv Gramovim bojanjem genitalnih sekreta. Osim toga, serološki testovi temeljeni na antitijelima nepouzdana su zbog unakrsne reaktivnosti s drugim mikoplazmama, uključujući bakteriju *Mycoplasma pneumoniae* (Gnanadurai & Fifer, 2020). Međutim, testovi amplifikacije nukleinske kiseline (NAAT), kao što su lančana reakcija polimeraze i amplifikacija posredovana transkripcijom, omogućuju točno otkrivanje MG (Baumann et al., 2018; Heavey, 2017; Jensen et al., 2022). NAAT se može provoditi na nekoliko vrsta genitalnih uzoraka, ali čini se da vaginalni brisevi za žene i uzorci prve jutarnje mokraće za muškarce omogućuju najbolje rezultate pri testiranju na MG (Heavey, 2017). Zbog visoke stope rezistencije na antimikrobne lijekove preporučuje se provođenje istodobnog testiranja na genotipsku rezistenciju kako bi se odredilo odgovarajuće liječenje (Gnanadurai & Fifer, 2020).

3. Načelo postupka

VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System osmišljen je za istodobnu kvalitativnu detekciju i diferencijaciju DNA iz bakterije *Mycoplasma genitalium* i specifičnih genetskih markera povezanih s rezistencijom i osjetljivošću na makrolide u uzorcima vaginalnih briseva i uzorcima urina muškaraca i žena. Nakon izolacije DNA, identifikacija *M. genitalium* i genetskih markera rezistencije i osjetljivosti na makrolide provodi se amplifikacijom specifične regije gena *adhezina MgPa* bakterije *M. genitalium* i gena *23S rRNA*, čije su specifične točkaste mutacije povezane s rezistencijom i osjetljivošću na makrolide, korištenjem specifičnih početnica i fluorescentnih sonda. Predviđena populacija za test obuhvaća osobe sa znakovima ili sumnjom na spolno prenosivu bolest, spolne partnere osoba s dijagnosticiranom infekcijom bakterijom *M. genitalium* i populacije visokog rizika kao što su muškarci koji imaju spolne odnose s muškarcima (MSM), osobe s HIV-om i pacijenti koji posjećuju klinike za spolno zdravlje.

VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System temelji se na aktivnosti 5' egzonukleaze DNA polimeraze. Tijekom amplifikacije DNA taj enzim rascjepljuje sondu vezanu za sekvencu komplementarne DNA, čime se razdvaja supresorsku boju od reportera. Ta reakcija dovodi do povećanja fluorescencijskog signala srazmjernog količini ciljnog predloška. Ta fluorescencija mjeri se na sustavu BD MAX™ System.

VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System sadrži u svakoj epruveti sve potrebne komponente za test PCR u stvarnom vremenu (specifične početnice/sonde, dNTP-ove, pufer i polimerazu) u stabiliziranom¹ formatu, kao i endogenu unutarnju kontrolu (EIC) (gen *humane RNase P*) za praćenje integriteta uzorka, praćenje procesa ekstrakcije i/ili isključivanje inhibicije aktivnosti polimeraze. Ljudski domaćinski geni uključeni su u osnovno održavanje stanice te se stoga očekuje da će biti prisutni u svim ljudskim stanicama s jezgrom te održavati relativno stalne razine ekspresije.

Cilj	Kanal	Gen
Rezistencija na makrolide	475/520 (FAM)	<i>23S rRNA</i>
Osjetljivost na makrolide	530/565 (HEX)	<i>23S rRNA</i>
<i>Mycoplasma genitalium</i>	585/630 (ROX)	<i>Adhezin MgPa</i>
Endogena unutarnja kontrola (EIC)	680/715 (Cy5.5)	<i>RNase P</i>

Tablica 1. Cilj, kanal i geni.

¹ Imajte na umu da se pojmovi „stabiliziran“ i „liofiliziran“ koriste jednako i kao sinonimi u cijelom dokumentu.

4. Reagensi koji se isporučuju

VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System uključuje sljedeće materijale i reagensne detaljno opisane u Tablici 2:

Reagens/materijal	Opis	Raspon koncentracije	Šifra	Količina
<i>Mycoplasma genitalium</i> with Macrolide Resistance reaction tube	Lioprotektori i stabilizatori	±6 g/100 mL*	1F folija	2 vrećice sa 12 prozirnih epruveta
	Nukleotidni trifosfat (dNTPs)	±1 mM*		
	Početak i sonde	0,2 – 1 nMol/μL*		
	Enzimi	10 – 100 U/rxn*		
Rehydration Buffer tube	Mješavina fiziološke otopine	±13 mM	11 folija	1 vrećica sa 24 prozirne epruvete
	Pufer (TRIS, pH)	±67 mM		

Tablica 2. Reagensi i materijali koji se nalaze u VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System s kat. br. 444224.

* Za komponentu u stabiliziranom formatu, raspon koncentracije znači nakon rehidracije.

5. Reagensi i oprema koju mora pribaviti korisnik

Sljedeći popis uključuje materijale koji su potrebni za korištenje, ali nisu uključeni u VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System.

- Instrument za PCR u stvarnom vremenu: BD MAX™ System (Ref: 441916).
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref:442827 ili 442828).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519).
- Vortex.
- Mikropipete (precizne u rasponu od 2 do 1000 μL).
- Voda koja ne sadrži nukleazu.
- Nastavci za filter.
- Nenaprašene jednokratne rukavice.

Neobavezno:

- Vanjski kontrolni materijali mogu se koristiti kao dio postupka kontrole kvalitete rada testa. Komercijalno dostupni kontrolni materijal i/ili uzorci prethodno okarakterizirani kao pozitivni ili negativni mogu se koristiti kao vanjska pozitivna kontrola (EPC) ili vanjska negativna kontrola (ENC). Odabir i validiranje EPC-a i ENC-a mora se obaviti u skladu s primjenjivim lokalnim, državnim i/ili saveznim propisima i standardnim postupcima kontrole kvalitete laboratorija. Osim toga, prilikom korištenja komercijalno dostupnog kontrolnog materijala, korisnik mora slijediti odgovarajuće upute za uporabu.

6. Uvjeti transporta, skladištenja i korištenja

- Kompleti se mogu transportirati i čuvati na temperaturi od 2 do 30°C do isteka roka valjanosti navedenog na naljepnici kompleta.
- Izbjegavajte vibracije tijekom transporta kako ne bi došlo do curenja tekućine.
- Nakon otvaranja aluminijskih vrećica koje sadrže reakcijske epruvete, proizvod se može iskoristiti u roku od 28 dana na temperaturi 2-30°C. Držite bočicu podalje od svjetlosti.

Sljedeća tablica prikazuje sažetak uvjeta za transport, skladištenje i korištenje kompleta u cjelini i svake pojedine komponente:

Komponenta	Uvjeti transporta	Uvjeti skladištenja	Uvjeti tijekom korištenja
Cijeli VIASURE <i>Mycoplasma genitalium</i> with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System	2 – 30 °C tijekom roka trajanja navedenog na naljepnici kompleta.	Prije korištenja: 2-30°C tijekom roka trajanja navedenog na naljepnici kompleta.	<i>* Pogledajte uvjete tijekom korištenja za svaku komponentu.</i>
<i>Mycoplasma genitalium</i> with Macrolide Resistance reaction tube (1F folija)		Prije korištenja: 2-30°C tijekom roka trajanja navedenog na naljepnici kompleta. Nakon otvaranja vrećice sa silika-gelom: 2-30°C do 28 dana.	Sobna temperatura.
Rehydration Buffer tube		Prije korištenja: 2-30°C tijekom roka trajanja navedenog na naljepnici kompleta. Nakon otvaranja vrećice sa silika-gelom: 2-30°C do 28 dana.	Sobna temperatura.

Tablica 3. Sažetak uvjeta za transport, skladištenje i korištenje VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System i svake komponente.

7. Mjere opreza za korisnike

- Proizvod je namijenjen korištenju od strane kvalificiranog i educiranog kliničkog laboratorijskog osoblja koje je posebno educirano i osposobljeno za tehnike PCR-a u stvarnom vremenu i postupaka dijagnostike *in vitro*.
- Za *in vitro* dijagnostičku upotrebu.
- Upute za uporabu proizvoda VIASURE i korisnički priručnik za BD MAX™ System moraju se pažljivo pročitati prije korištenja testa VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System. Nemojte obavljati test dok ne shvatite informacije o postupcima, sigurnosnim mjerama opreza i ograničenjima opisanima u njima.
- Nemojte koristiti reagense i/ili materijale kojima je istekao rok valjanosti.
- Nemojte koristiti komplet ako je potrgana naljepnica kojom je zatvorena vanjska kutija.
- Nemojte koristiti reagense ako je zaštitna kutija otvorena ili oštećena po prispjeću.
- Nemojte koristiti reagense ako su zaštitne vrećice otvorene ili oštećene po prispjeću.
- Nemojte koristiti reagense ako desikant u vrećicama s reagensima nije prisutan ili je oštećen.

- Nemojte vaditi desikant iz vrećica s reagensima.
- Nemojte koristiti reagense ako je folija potrgana ili oštećena.
- Nemojte miješati reagense iz različitih vrećica, kompleta i/ili serija.
- Nakon svake upotrebe odmah zatvorite zaštitne vrećice s reagensima pomoću patentnog zatvarača radi zaštite glavne smjese od sunčeve svjetlosti. Prije zatvaranja istisnite višak zraka iz vrećica.
- Zaštitite reagense protiv vlage. Duže izlaganje vlazi može utjecati na učinkovitost proizvoda.
- Kako ne bi došlo do oštećenja naljepnice, nemojte koristiti proizvod u blizini otapala.
- Izgled reakcije smjese u stabiliziranom formatu koji se obično nalazi na dnu epruvete razlikuje se od uobičajenog (bez stožastog oblika, inhomogeni, manji/veći i/ili bojom različit od bjeličastog) ne mijenja funkcionalnost testa.
- Pazite da su reakcijska epruveta i epruveta s rehidracijskim puferom sigurno postavljene na svoje mjesto prilikom postavljanja stalka BD MAX™ System.
- U slučajevima gdje se drugi testovi PCR-om obavljaju u istom općem prostoru laboratorija potreban je oprez kako ne bi došlo do kontaminacije testa VIASURE *Mycoplasma genitalium with Macrolide Resistance* Assay for BD MAX™ System, kompleta za ekstrakciju BD MAX™ ExK™ TNA-3, ili bilo kojih dodatnih reagensa potrebnih za testiranje i za BD MAX™ sustav. Svakako izbjegavajte kontaminaciju reagensa s mikrobima i ribonukleazama (RNase)/deoksiribonukleazama (DNase). Preporučuje se uporaba jednokratnih, sterilnih vrhova volumetrijskih pipeta ili otpornih na aerosol, bez Rnase/Dnase. Koristite novi vrh sa svakim uzorkom. Rukavice se moraju promijeniti prije rukovanja reagensima i patronama (BD MAX™ PCR Cartridge).
- Radi sprječavanja kontaminacije okruženja amplikonima, nemojte odvajati PCR patronu BD MAX™ Cartridge nakon uporabe. Brtve na PCR patroni BD MAX™ Cartridge dizajnirane su za sprječavanje kontaminacije.
- Koristite jednosmjerni radni proces. Treba započeti u području za ekstrakciju, a zatim preći u područje za amplifikaciju i detekciju. Nemojte vraćati uzorke, opremu i reagense u područje u kojem je obavljen prethodni korak.
- Pridržavajte se dobre laboratorijske prakse. Nosite zaštitnu odjeću, jednokratne rukavice, zaštitne naočale i masku. Nemojte jesti, piti, pušiti niti nanositi kozmetičke proizvode u radnom prostoru. Operite ruke nakon što završite test. Izbjegavajte kontaminaciju i dodir s kožom, očima i odjećom.
- Uzorci se moraju smatrati potencijalno zaraznima i/ili biološki opasnima, a isto vrijedi za reagense i materijale koji su bili izloženi uzorcima i mora se njima rukovati u skladu s nacionalnim sigurnosnim propisima. Poduzmite neophodne mjere opreza prilikom prikupljanja, transporta, pohrane, rukovanja i odlaganja uzoraka u otpad.
- Uzorcima i reagensima potrebno je rukovati u biološkom zaštitnom kabinetu. Koristite osobnu zaštitnu opremu (OZO) u skladu s važećim smjernicama za rukovanje potencijalno zaraznim uzorcima. Zbrinite otpad u skladu s lokalnim i državnim propisima.

- Preporučuje se redovita dekontaminacija opreme koja se često koristi, naročito mikropipeta i radnih površina.
- U skladu s Uredbom (EZ) br. 1907/2006. (REACH), kompleti VIASURE Assays za BD MAX™ System ne zahtijevaju sigurnosne listove materijala (Material Safety Data Sheets) zbog njihove klasifikacije kao neopasni za zdravlje i okoliš jer ne sadrže tvari i/ili smjese koje udovoljavaju kriterijima za razvrstavanje opasnosti dostupne u Uredbi (EZ) br. 1272/2008. (CLP) ili koje su u koncentracijama višim od vrijednosti utvrđene u spomenutoj uredbi za njihovo prijavljivanje. Tvrtki Certest Biotec S.L. može se podnijeti zahtjev za izdavanje izjave kojom se potvrđuje da nije potreban sigurnosni list (Safety Data Sheet).
- Pazite da je definicija programa testa za PCR na sustavu BD MAX™ System napravljena prema uputama u odjeljku „Protokol za PCR” (parametri ekstrakcije uzorka, prilagođeni crtični kodovi, postavke za PCR itd.).
- Posavjetujte se s Korisničkim priručnikom za sustav BD MAX™ System u vezi s dodatnim upozorenjima, mjerama opreza i postupcima.
- Potvrda o analizi nije priložena uz uređaj, no može se preuzeti s web-mjesta Certest Biotec S.L. (www.certest.es) u slučaju potrebe.

8. Testni postupak

8.1. Prikupljanje, transport i pohrana uzoraka

VIASURE *Mycoplasma genitalium* with *Macrolide Resistance* Assay for BD MAX™ System testiran je na uzorcima vaginalnih briseva koje je prikupio zdravstveni djelatnik korištenjem Copan eSwab® (Liquid Amies Elution Swab tvrtke Copan) i samostalno prikupljenim uzorcima prvog jutarnjeg mokraćnog mlaza muškaraca i žena u sterilnoj posudi za prikupljanje bez konzervansa. Drukčije vrste uzoraka mora validirati korisnik.

Prikupljanje, pohrana i transport uzoraka treba obavljati u uvjetima koje je validirao korisnik. Općenito, kliničke uzorke treba prikupiti i označiti na odgovarajući način u čiste spremnike s transportnim medijem ili bez njega (ovisno o vrsti uzorka). Nakon prikupljanja, uzorke treba staviti u vrećicu s oznakom bioopasnosti te ih treba transportirati i obraditi što je prije moguće da bi se zajamčila kvaliteta testa. Uzorci prikupljeni za molekularno testiranje moraju se čuvati u kontroliranim uvjetima kako se nukleinske kiseline ne bi razgradile tijekom skladištenja. Treba izbjegavati ponavljanje ciklusa smrzavanja i odmrzavanja kako bi se spriječilo propadanje uzorka i nukleinskih kiselina.

Klinički uzorci moraju se prikupljati, transportirati i pohraniti u skladu s odgovarajućim laboratorijskim smjernicama i/ili priručnicima o pravilima laboratorija.

Interna studija stabilnosti uzoraka provedena je s VIASURE *Mycoplasma genitalium* with *Macrolide Resistance* Assay for BD MAX™ System koristeći negativnu matricu vaginalnog brisa prikupljenu u Copan

eSwab®, matrice urina žena i muškaraca s dodatkom referentnog soja osjetljivog na makrolide (Amplirun® Total Macrolide Resistant MGE Control) u koncentraciji 3xLoD. Stabilnost je analizirana pomoću dva različita testa: primarna stabilnost (25°C: 4 sata i 2 dana; 4°C: 1 i 2 dana; -20°C: 12 mjeseci) i ugniježdene stabilnost. Za test ugniježdene stabilnosti, uzorci inkubirani na 25°C tijekom 4 sata i uzorci inkubirani na 4°C tijekom 1 dana analizirani su 3 dana nakon dodavanja u epruvetu za uzorak s puferom (sample buffer tube, SBT); uzorci inkubirani na 25°C tijekom 2 dana i uzorci inkubirani na 4°C tijekom 2 dana analizirani su 7 dana nakon dodavanja u SBT. Osim toga, uzorci su analizirani nakon prolaska kroz pet ciklusa zamrzavanja (na -80°C) i odmrzavanja (na 25°C). Rezultati su pokazali dobru učinkovitost pohranjenih uzoraka u svim testiranim uvjetima, ispunjavajući prvotno navedene kriterije prihvatljivosti.

8.2. Priprema uzoraka i ekstrakcija DNA

Pripremu uzorka obavite u skladu s preporukama iz uputa za uporabu kompleta za ekstrakciju koji koristite, BD MAX™ ExK™ TNA-3.

1. Pipetom prenesite 400 µL vaginalnog brisa ili 750 µL uzorka urina u BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube epruvetu za uzorak s puferom te je zatvorite čepom s membranom. Izmiješajte uzorak vrtloženjem pri visokoj brzini tijekom 1 minute. Pređite na rad s BD MAX™ System Operation.

Napomena: Pobrinite se da se vrtloženje obavi nekoliko minuta prije pokretanja postupka. Ako se ista epruveta BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube koristi za ponavljanje testa, preporučuje se ručno protresti epruvetu nekoliko minuta prije početka testa kako bi se osiguralo pravilno homogeniziranje uzorka.

Imajte na umu da korisnik treba razviti i validirati postupke pripreme ekstrakcije specifične za primjenu te da neki drugi uzorci mogu zahtijevati prethodnu obradu.

8.3. Protokol za PCR

Napomena: Detaljne upute potražite u Korisničkom priručniku za sustav BD MAX™ System.

8.3.1. Kreiranje programa za test PCR-a za VIASURE *Mycoplasma genitalium* with *Macrolide Resistance Assay* for BD MAX™ System

Napomena: Ako ste već kreirali test za VIASURE *Mycoplasma genitalium* with *Macrolide Resistance Assay* for BD MAX™ System, možete preskočiti korak 8.3.1 i prijeći izravno na 8.3.2.

- 1) Na zaslonu „Run“ (Pokreni) na sustavu BD MAX™ System odaberite karticu „Test Editor“ (Uređivač testa).
- 2) Kliknite na gumb „Create“ (Kreiraj).

Na kartici „Basic Information“ (Osnovne informacije):

- 3) U polju „Test Name“ (Naziv testa) dajte ime svom testu, npr. VIASURE MGM.

Napomena: Naziv testa mora biti jedinstven i smije imati najviše dvadeset znakova.

- 4) S padajućeg izbornika „Extraction Type“ (Vrsta ekstrakcije) odaberite „ExK TNA-3“.
- 5) S padajućeg izbornika „Master Mix Format“ (Oblik glavne smjese) odaberite „Type 5: Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer“ (Tip 5: Koncentrirani liofilizirani MM s puferom za rehidraciju).
- 6) U polju „Sample Extraction Parameters“ (Parametri ekstrakcije uzorka) odaberite „User Defined“ (Korisnički definirani) i prilagodite vrijednosti sljedećih parametara (Tablica 4).

<i>Sample Extraction Parameters</i> (Parametri ekstrakcije uzorka)	<i>Value (units)</i> (Vrijednost (jedinice))
<i>Lysis Heat Time</i> (Vrijeme toplinske lize)	15 (min)
<i>Lysis Temperature</i> (Temperatura lize)	55 (°C)
<i>Sample Tip Height</i> (Visina vrha za uzorak)	1600 (steps)
<i>Sample Volume</i> (Volumen uzorka)	500 (µL) (protokol za uzorke urina) 425 (µL) (protokol za uzorke vaginalnih briseva)
<i>Wash Volume</i> (Volumen ispiranja)	500 (µL)
<i>Neutralization Volume</i> (Volumen neutralizacije)	n.a.
<i>DNase Heat Time</i> (Vrijeme zagrijavanja za Dnazu)	n.a.

Tablica 4. Parametri ekstrakcije uzorka izvedene s BD MAX™ ExK™ TNA-3. n.a. = nije primjenjivo.

- 7) U polju „Ct Calculation“ (Ct izračun) odaberite „Call Ct at Threshold Crossing“ (Izračunaj Ct pri prelasku granice) (odabrano prema zadanim postavkama).
- 8) Na radnom softveru verzije 5.00 ili više te sa snap-in epruvetama s crtičnim kodom, u polju „Custom Barcodes“ (Prilagođeni crtični kodovi) odaberite sljedeću konfiguraciju:
- „Snap-In 2 Barcode“ (Snap-In 2 crtični kod): 1F (za *Mycoplasma genitalium with Macrolide Resistance* reaction tube).
 - „Snap-In 3 Barcode“ (Snap-In 3 crtični kod): 11 (u vezi epruvete Rehydration Buffer tube).

Na kartici „PCR Settings“ (Postavke za PCR):

- 9) U polje „PCR settings“ (Postavke za PCR) unesite sljedeće parametre opisane u Tablici 5: „Alias“ (Drugi naziv) (do sedam alfanumeričkih znakova), „PCR Gain“ (Dobit PCR-a), „Threshold“ (Prag), „Ct Min“ i „Ct Max“ (Ct Maks).

<i>Channel</i> (Kanal)	<i>Alias</i> (Drugi naziv)	<i>PCR Gain</i> (Dobit PCR-a)	<i>Threshold</i> (Granica)	<i>Ct Min</i> (Ct Min)	<i>Ct Max</i> (Ct Maks)
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)	EIC	60	200	0	35/40*

Tablica 5. Postavke za PCR.

Napomena: Preporučuje se postavljanje gore navedenih minimalnih graničnih vrijednosti za svaki kanal kao početnu točku, ali završne postavke mora odrediti krajnji korisnik tijekom tumačenja rezultata kako bi se osiguralo da granice spadaju u eksponencijalnu fazu krivulja fluorescencije i iznad bilo kojeg pozadinskog signala. Granična vrijednost različitih instrumenata može se razlikovati zbog različitih intenziteta signala.

*Zbog varijabilnosti broja ljudskih stanica u uzorcima urina, granična vrijednost za endogenu unutarnju kontrolu (EIC) postavljena je na 35 za uzorke vaginalnih briseva i 40 za uzorke urina žena i muškaraca kako bi se osiguralo pravilno prikupljanje uzoraka.

10) U polje „Color compensation“ (Kompenzacija boje) unesite sljedeće parametre (Tablica 6).

		<i>False Receiving Channel</i> (Kanal s lažnim rezultatima)					
		<i>Channel</i> (Kanal)	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
<i>Excitation Channel</i> (Kanal za pobuđivanje)	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	

Tablica 6. Parametri „Color compensation“ (Kompenzacija boje).

Na kartici „Melt Settings“ (Postavke taljenja) nije potrebna nikakva radnja, ne primjenjuje se na ovaj proizvod.

Na kartici „Test Steps“ (Koraci testa):

11) Unesite naziv koraka (do dvadeset znakova) i postavite sljedeće parametre za definiranje svakog koraka protokola za PCR: „Profile Type“ (Vrsta profila), „Cycles“ (Ciklusi), „Time“ (Vrijeme) i „Temperature“ (Temperatura) te odaberite polje „Detect“ (Detekcija) za definiranje koraka detekcije (Tablica 7). Kliknite na gumb „Add“ (Dodaj) za dodavanje novog koraka i ponavljajte postupak dok ne definirate sve potrebne korake.

Napomena: Polje „Type“ (Vrsta) mora biti prazno.

<i>Step</i> (Korak)	<i>Step name</i> (Naziv koraka)	<i>Profile Type</i> (Vrsta profila)	<i>Cycles</i> (Ciklusi)	<i>Time (s)</i> (Vrijeme (s))	<i>Temperature</i> (Temperatura)	<i>Detect</i> (Detekcija)
Initial denaturation (Početna denaturacija)	IN-denaturation	Hold	1	120	95°C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Denaturacija i sparivanje/produljenje (prikupljanje podataka))	Annealing/Extension	2-Temperature	45	10	95°C	-
				58	60°C	✓

Tablica 7. Protokol za PCR.

Na kartici „Result Logic“ (Logika rezultata):

- 12) U polju „Target“ (Cilj) imenujte svoj cilj: tj. Res (do sedam alfanumeričkih znakova). Ponavljajte korake 12 – 15 za svaki cilj (tj. Sen ili Mg) slijedeći tablice specifične za cilj koji se definira.
- 13) Kliknite na potvrdni okvir „Analyze“ (Analiziraj) za uključivanje željenih valnih duljina (kanali za PCR) u analizu ciljnog rezultata (Tablice 8 – 10).

<i>Wavelength</i> (Valna duljina)	<i>Alias</i> (Drugi naziv)	<i>Type</i> (Vrsta)	<i>Analyze</i> (Analiza)
475/520	Res	PCR	✓
680/715	EIC	PCR	✓

Tablica 8. Odabir kanala za PCR u kartici „Result logic“ (Logika rezultata) za cilj Res (rezistencija na makrolide).

<i>Wavelength</i> (Valna duljina)	<i>Alias</i> (Drugi naziv)	<i>Type</i> (Vrsta)	<i>Analyze</i> (Analiza)
530/565	Sen	PCR	✓
680/715	EIC	PCR	✓

Tablica 9. Odabir kanala za PCR u kartici „Result logic“ (Logika rezultata) za cilj Sen (osjetljivost na makrolide).

<i>Wavelength</i> (Valna duljina)	<i>Alias</i> (Drugi naziv)	<i>Type</i> (Vrsta)	<i>Analyze</i> (Analiza)
585/630	Mg	PCR	✓
680/715	EIC	PCR	✓

Tablica 10. Odabir kanala za PCR u kartici „Result logic“ (Logika rezultata) za cilj Mg (*Mycoplasma genitalium*).

- 14) Kliknite na gumb „Edit Logic“ (Uredi logiku).
- 15) U prozoru „Edit Logic“ (Uredi logiku) navedene su sve kombinacije vrsta rezultata. Za svaki redak u padajućem izborniku „Result“ (Rezultat) odaberite rezultat koji se prikazuje kada su ispunjeni uvjeti u tom retku, slijedeći Tablice 11 – 13 za uzorke vaginalnih briseva i Tablice 14 – 16 za uzorke urina.

Protokol za uzorke vaginalnih briseva

<i>Result</i> (Rezultat)	Res (475/520)	EIC (680/715)
POS	Valid (Valjano)	Valid (Valjano)
UNR	Valid (Valjano)	Invalid (Nevaljano)
NEG	Invalid (Nevaljano)	Valid (Valjano)
UNR	Invalid (Nevaljano)	Invalid (Nevaljano)

Tablica 11. Popis kombinacija vrsta rezultata i logike rezultata za cilj Res (rezistencija na makrolide) u protokolu za uzorke vaginalnih briseva. Dostupni rezultati su POS (Pozitivno), NEG (Negativno) i UNR (Neriješeno).

<i>Result</i> (Rezultat)	Sen (530/565)	EIC (680/715)
POS	Valid (Valjano)	Valid (Valjano)
UNR	Valid (Valjano)	Invalid (Nevaljano)
NEG	Invalid (Nevaljano)	Valid (Valjano)
UNR	Invalid (Nevaljano)	Invalid (Nevaljano)

Tablica 12. Popis kombinacija vrsta rezultata i logike rezultata za cilj Sen (osjetljivost na makrolide) u protokolu za uzorke vaginalnih briseva. Dostupni rezultati su POS (Pozitivno), NEG (Negativno) i UNR (Neriješeno).

<i>Result</i> (Rezultat)	Mg (585/630)	EIC (680/715)
POS	Valid (Valjano)	Valid (Valjano)
UNR	Valid (Valjano)	Invalid (Nevaljano)
NEG	Invalid (Nevaljano)	Valid (Valjano)
UNR	Invalid (Nevaljano)	Invalid (Nevaljano)

Tablica 13. Popis kombinacija vrsta rezultata i logike rezultata za cilj Mg (*Mycoplasma genitalium*) u protokolu za uzorke vaginalnih briseva. Dostupni rezultati su POS (Pozitivno), NEG (Negativno) i UNR (Neriješeno).

Protokol za uzorke urina

<i>Result</i> (Rezultat)	Res (475/520)	EIC (680/715)
POS	Valid (Valjano)	Valid (Valjano)
POS	Valid (Valjano)	Invalid (Nevaljano)
NEG	Invalid (Nevaljano)	Valid (Valjano)
UNR	Invalid (Nevaljano)	Invalid (Nevaljano)

Tablica 14. Popis kombinacija vrsta rezultata i logike rezultata za cilj Res (rezistencija na makrolide) u protokolu za uzorke urina. Dostupni rezultati su POS (Pozitivno), NEG (Negativno) i UNR (Neriješeno).

<i>Result</i> (Rezultat)	Sen (530/565)	EIC (680/715)
POS	Valid (Valjano)	Valid (Valjano)
POS	Valid (Valjano)	Invalid (Nevaljano)
NEG	Invalid (Nevaljano)	Valid (Valjano)
UNR	Invalid (Nevaljano)	Invalid (Nevaljano)

Tablica 15. Popis kombinacija vrsta rezultata i logike rezultata za cilj Sen (osjetljivost na makrolide) u protokolu za uzorke urina. Dostupni rezultati su POS (Pozitivno), NEG (Negativno) i UNR (Neriješeno).

<i>Result</i> (Rezultat)	Mg (585/630)	EIC (680/715)
POS	Valid (Valjano)	Valid (Valjano)
POS	Valid (Valjano)	Invalid (Nevaljano)
NEG	Invalid (Nevaljano)	Valid (Valjano)
UNR	Invalid (Nevaljano)	Invalid (Nevaljano)

Tablica 16. Popis kombinacija vrsta rezultata i logike rezultata za cilj Mg (*Mycoplasma genitalium*) u protokolu za uzorke urina. Dostupni rezultati su POS (Pozitivno), NEG (Negativno) i UNR (Neriješeno).

Napomena: Prema prethodno definiranom Ct Max (Tablica 5):

- i. Rezultat za kanale Res (475/520), Sen (530/565) ili Mg (585/630) smatra se „Valid“ (Valjani) kada je dobivena Ct vrijednost ≤ 40 ; a „Invalid“ (Nevaljanim) kada je dobivena Ct vrijednost > 40 .
- ii. Rezultat za kanal EIC (680/715) smatra se „Valid“ (Valjani) kada je dobivena Ct vrijednost ≤ 35 za uzorke vaginalnih briseva i ≤ 40 za uzorke urina; a „Invalid“ (Nevaljanim) kada je dobivena Ct vrijednost > 35 odnosno > 40 .

*Iako je granična vrijednost za cilj EIC u uzorcima urina 40, moguće je da se ne uoči krivulja amplifikacije za EIC u slučaju pozitivnog signala za oba cilja – Res ili Sen i cilj Mg. U tom je slučaju logika rezultata POS (pozitivno). Pogledajte Odjeljak 9. Tumačenje rezultata.

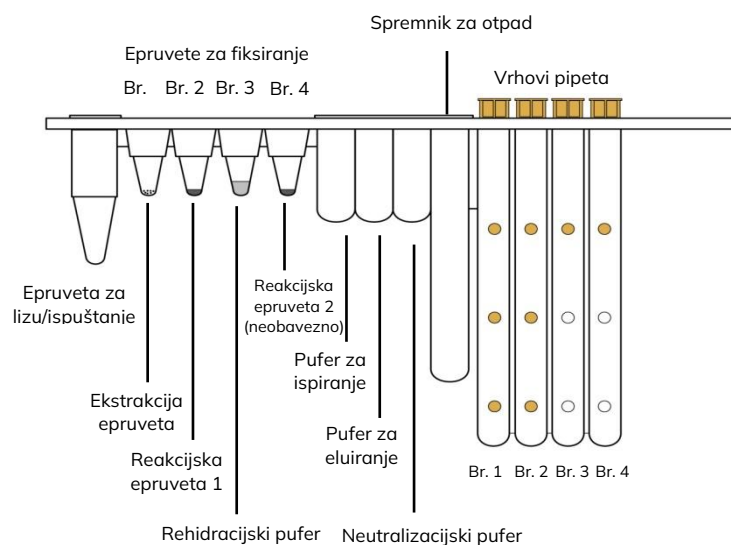
16) Kliknite na gumb „Save“ (Spremi) da biste spremili test.

8.3.2. Postavljanje BD MAX™ stalka

- 1) Za svaki uzorak koji treba testirati izvadite pojedinačne trake s reagensima u bloku iz kompleta BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit. Lagano udarite svaku traku o čvrstu površinu kako biste osigurali da se sve tekućine nalaze na dnu epruveta i stavite ih na stalke za uzorke sustava BD MAX™ System.
- 2) Izvadite potrebni broj BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes epruveta za ekstrakciju (B4) (bijela folija) iz njihove zaštitne vrećice. Postavite epruvetu/e za ekstrakciju (bijela folija) u njihove odgovarajuće položaje u TNA traku (položaj 1, bijela oznaka u boji na stalku. Pogledajte Sliku 1). Istisnite višak zraka i zatvorite vrećicu patentnom zatvaračem.
- 3) Odredite i razdvojite odgovarajući broj reakcijskih epruveta *Mycoplasma genitalium with Macrolide Resistance* reaction tube (1F folija) i postavite ih u njihove odgovarajuće položaje na traci (položaj 2, označen zelenom bojom na stalku. Pogledajte Sliku 1).
 - a. Istisnite višak zraka i zatvorite aluminijske vrećice patentnim zatvaračem.
 - b. U cilju obavljanja pravilnog postupka rehidracije pazite da se liofilizirani proizvod nalazi na dnu epruvete te da ne prijanja za gornji dio epruvete ili za zatvarač od folije. Lagano pritisnite svaku epruvetu na tvrdj površini kako biste se uvjerali da je sav proizvod na dnu epruvete.

- 4) Izvadite odgovarajući broj epruveta Rehydration Buffer tube (folija 11) i postavite ih u njihove odgovarajuće položaje na traci (položaj 3, nije obojen na stalku. Pogledajte Sliku 1).
 - a. Istisnite višak zraka i zatvorite vrećicu patentnim zatvaračem.
 - b. U cilju osiguravanja pravilnog prijenosa pazite da se tekućina nalazi na dnu epruvete te da ne pranja za gornji dio epruvete ili za zatvarač od folije. Lagano pritisnite svaku epruvetu na tvrdoj površini kako biste se uvjerali da je sav proizvod na dnu epruvete.

Slika 1. Traka BD MAX™ TNA Reagent (TNA) iz kompleta BD MAX™ ExK™ TNA-3.



8.3.3. Postavljanje BD MAX™ instrumenta

- 1) Odaberite karticu „Worklist“ (Radni popis) na zaslonu „Run“ (Pokreni) na sustavu BD MAX™ System s verzijom softvera v4.50A ili novijom.
- 2) S padajućeg izbornika „Test“ odaberite željeni test: npr. VIASURE MGM (ako test nije već kreiran, pogledajte odjeljak 8.3.1).
- 3) U padajućem izborniku „Kit Lot Number“ (Broj serije kompleta) odaberite odgovarajući broj serije za komplet (nalazi se na vanjskoj kutiji kompleta za ekstrakciju koji se koristi) (neobavezno).
Napomena: Brojevi serija moraju biti definirani u prikazu „Inventory“ (Zalihe) prije nego što se ovdje mogu odabrati.
- 4) Unesite identifikacijski broj epruvete Sample Buffer Tube u polje „Sample tube“ (Epruveta s uzorkom) skeniranjem crtičnog koda pomoću skenera ili ručnim unošenjem broja.
- 5) Ispunite polje „Patient ID“ (ID bolesnika) i/ili „Accession“ (Pristup) i pritisnite tipku Tab (Tabulator) ili Enter. Nastavite s postupkom dok ne unesete sve crtične kodove epruveta Sample Buffer Tube. Pazite da se ID uzorka/bolesnika i epruvete Sample Buffer Tube podudaraju.
- 6) Stavite pripremljenu epruvetu za uzorak s puferom na BD MAX™ stalak/stalke.

- 7) Stavite stalak/stalke u sustav BD MAX™ System (stalak A se nalazi na lijevoj strani sustava BD MAX™ System, dok se stalak B nalazi na desnoj strani).
- 8) Stavite potrebni broj patrona BD MAX™ PCR Cartridge(s) u sustav BD MAX™ System.
- 9) Zatvorite vrata sustava BD MAX™ System.
- 10) Kliknite „Start“ (Pokreni) da započnete postupak.

8.3.4. Izvješće o rezultatima BD MAX™

- 1) Na traci izbornika kliknite na gumb „Results“ (Rezultati).
- 2) Kliknite dvaput na svoj postupak na popisu ili pritisnite gumb „view“ (prikaz).
- 3) Gumbi „Print“ (Ispiši) i „Export“ (Izvezi) na dnu zaslona bit će omogućeni.

Da biste ispisali rezultate:

1. Kliknite na gumb „Print“ (Ispiši).
2. U prozoru pretpregleda „Print“ (Ispiši) izvješća o postupku odaberite: „Run Details“ (Podaci o postupku), „Test Details“ (Podaci o testu) i „Plots“ (Grafikon).
3. Kliknite na „Print“ (Ispiši) za ispis izvješća ili kliknite na „Export“ (Izvezi) za izvoz izvješća u PDF-u na USB.

Da biste izvezli rezultate:

1. Kliknite na gumb „Export“ (Izvezi) za prijenos izvješća (PDF i CSV datoteke) na USB.
2. Kada je izvoz dovršen, ikona uspjeha/neuspjeha pojavljuje se u prozoru „Results Export“ (Rezultat izvoza).

9. Tumačenje rezultata

Detaljne upute za analiziranje podataka potražite u Korisničkom priručniku za sustav BD MAX™ System.

Analizu podataka obavlja BD MAX™ softver prema uputama proizvođača. BD MAX™ softver kreira izvješće o Ct vrijednostima i amplifikacijskim krivuljama za svaki kanal detekcije svakog uzorka testiranog na sljedeći način:

- Ct vrijednost 0 znači da softver nije izračunao Ct vrijednost s navedenom granicom (pogledajte Tablicu 5). Amplifikacijska krivulja uzorka koja pokazuje „0“ za Ct vrijednost mora se provjeriti ručno.
- Ct vrijednost od -1 označava da nije došlo do procesa amplifikacije, da softver nije izračunao Ct vrijednost ili da je izračunata Ct vrijednost ispod navedenog praga ili iznad utvrđene Ct Max vrijednosti (granične).
- Svaku drugu Ct vrijednost treba tumačiti u vezi s amplifikacijskom krivuljom i u skladu s definiranom logikom rezultata, prema smjernicama za tumačenje uzoraka navedenim u Tablicama 17 i 18.

Provjerite signal endogene unutarnje kontrole (EIC) da potvrdite funkcionira li amplifikacijska smjesa ispravno. Pored toga, provjerite da nema izvješća o kvaru sustava BD MAX™ System. Prema definiranoj logici rezultata moguće je da se ne uoči krivulja amplifikacije za EIC u uzorcima urina u slučaju pozitivnog signala za oba cilja – Mg i Res ili cilj Sen. Pažljivo pročitajte tumačenje za pojedinačne uzorke urina (Tablica 18).

Rezultate treba očitati i analizirati pomoću sljedećih tablica:

Tumačenje rezultata za uzorke vaginalnih briseva

Rezistencija na makrolide (naziv cilja: Res)	Osjetljivost na makrolide (naziv cilja: Sen)	<i>M. genitalium</i> (naziv cilja: Mg)	Interpretacija za pojedinačne uzorke bolesnika
NEG	POS	POS	Detektirana osjetljivost na makrolide i <i>M. genitalium</i> DNA, nije detektirana rezistencija na makrolide DNA
POS	NEG	POS	Detektirana rezistencija na makrolide i <i>M. genitalium</i> DNA, nije detektirana osjetljivost na makrolide DNA
POS	POS	POS	Detektirana rezistencija na makrolide, osjetljivost na makrolide i <i>M. genitalium</i> DNA. NEJASAN REZULTAT ¹
POS	POS	NEG	Detektirana rezistencija na makrolide i osjetljivost na makrolide DNA, nije detektirana <i>M. genitalium</i> DNA. NEJASAN REZULTAT ¹
POS	NEG	NEG	Detektirana rezistencija na makrolide DNA, nije detektirana osjetljivost na makrolide i <i>M. genitalium</i> DNA. NEJASAN REZULTAT ¹
NEG	POS	NEG	Detektirana osjetljivost na makrolide DNA, nije detektirana rezistencija na makrolide i <i>M. genitalium</i> DNA. NEJASAN REZULTAT ¹
NEG	NEG	POS	Detektirana <i>M. genitalium</i> DNA, nije detektirana rezistencija na makrolide i osjetljivost na makrolide DNA. NEJASAN REZULTAT ^{1,2}
NEG	NEG	NEG	Nije detektirana rezistencija na makrolide, osjetljivost na makrolide i <i>M. genitalium</i> DNA
UNR	UNR	UNR	Neriješeni (UNR) rezultat dobiven u prisutnosti inhibitora reakcije PCR-a, uzorcima ispod granice detekcije testa ili kada dođe do nekog općeg problema (koji nije pokriven šifrom o pogrešci) pri obradi uzorka i/ili amplifikaciji. ³
IND	IND	IND	Rezultat testa nije moguće utvrditi (IND). Zbog kvara sustava BD MAX™ System. Rezultat testa prikazan u slučaju kvara instrumenta povezanog sa šifrom o pogrešci. ⁴
INC	INC	INC	Nepotpun rezultat testa (INC). Zbog kvara sustava BD MAX™ System. Rezultat testa prikazan u slučaju neuspješnog obavljanja postupka. ⁴

Tablica 17. Tumačenje uzoraka za uzorke vaginalnih briseva.

1 Potrebno je ponovno testiranje. Preporučuje se ponoviti test iz iste epruvete za uzorak s puferom (SBT) ili iz primarnog uzorka pripremom nove SBT. U slučaju ponovnog dobivanja nejasnih rezultata potrebno je prikupiti novi uzorak (u koncentriranijem obliku, ako je moguće) i ponovno ga testirati.

NAPOMENA: Uzorci vaginalnih briseva mogu se čuvati bez prenošenja u SBT do 2 dana ako se čuvaju na temperaturi od 25°C ili na temperaturi od 4°C. U slučaju ponavljanja testa iz iste SBT, preporučuje se ručno protresti SBT kako bi se osiguralo pravilno homogeniziranje uzorka. Uzorci vaginalnih briseva mogu se čuvati u SBT-u najviše 7 dana na 25°C ili 4°C (ako su prethodno pohranjeni na 25°C ili 4°C najviše 2 dana).

2 Komplet detektira sljedeće mutacije povezane s rezistencijom na makrolide: gen *23S rRNA* (A2058T, A2058C, A2058G, A2059C, A2059G). U slučaju prisutnosti druge mutacije, komplet nije validiran za njezinu detekciju, stoga će se amplifikacija uočiti u kanalu ROX (detekcija bakterije *M. genitalium*), a ne u kanalima FAM i HEX (detekcija rezistencije na makrolide odnosno osjetljivosti na makrolide).

3 Endogena unutarnja kontrola (EIC) mora pokazati amplifikacijski signal s Ct vrijednošću ≤ 35 da bi se uzela u obzir. Ako postoji odsutnost signala za EIC ili Ct vrijednost > 35, rezultat se smatra Neriješenim (UNR) te je potrebno ponovno testiranje. Provjerite izvješće o rezultatima i Ct vrijednosti odabranih ciljeva te poduzmite odgovarajuće radnje s obzirom na sljedeće:

- I. Kada rezultati ciljanih gena nisu valjani (Ct > 40), potrebno je ponoviti test iz iste SBT ili iz primarnog uzorka uz pripremu nove SBT. Ako se ponovno dobije rezultat UNR, potrebno je razmotriti dvije mogućnosti. S jedne strane, koncentracija uzorka može biti ispod LoD, stoga se preporučuje prikupiti koncentriraniji uzorak. S druge strane, potrebno je razmotriti mogućnost prisutnosti inhibitora u reakciji PCR-a te se preporučuje razrijediti te uzorke 1/10. Slijedite smjernice laboratorija i/ili priručnike s politikama laboratorija za mikrobiologiju.
- II. Kada su rezultati ciljanih gena rezistentnih na makrolide, osjetljivih na makrolide i/ili bakterije *M. genitalium* valjani (Ct ≤ 40), moguće je da nema amplifikacije ili da je amplifikacija iz EIC s Ct vrijednošću > 35 prilikom testiranja visoko koncentriranih uzoraka zbog preferencijalne amplifikacije specifičnih nukleinskih kiselina cilja. Ako se smatra potrebnim, razrijedite te uzorke u omjeru 1/10, ponovno pripremite epruvetu Sample Buffer Tube (SBT) i ponovite testiranje. Slijedite smjernice laboratorija i/ili priručnike s politikama laboratorija za mikrobiologiju.

4 Rezultati Neodređeno (IND) ili Nepotpuno (INC) mogu se dobiti zbog kvara sustava te je potrebno ponovno testiranje. Pogledajte korisnički priručnik sustava BD MAX™ System za tumačenje kodova upozorenja i pogrešaka.

Tumačenje rezultata za uzorke urina

Rezistencija na makrolide (naziv cilja: Res)	Osjetljivost na makrolide (naziv cilja: Sen)	<i>M. genitalium</i> (naziv cilja: Mg)	Interpretacija za pojedinačne uzorke bolesnika
NEG	POS	POS	Detektirana osjetljivost na makrolide i <i>M. genitalium</i> DNA, nije detektirana rezistencija na makrolide DNA
POS	NEG	POS	Detektirana rezistencija na makrolide i <i>M. genitalium</i> DNA, nije detektirana osjetljivost na makrolide DNA
POS	POS	POS	Detektirana rezistencija na makrolide, osjetljivost na makrolide i <i>M. genitalium</i> DNA. NEJASAN REZULTAT ¹
POS	POS	NEG	Detektirana rezistencija na makrolide i osjetljivost na makrolide DNA, nije detektirana <i>M. genitalium</i> DNA. NEJASAN REZULTAT ¹

Rezistencija na makrolide (naziv cilja: Res)	Osjetljivost na makrolide (naziv cilja: Sen)	<i>M. genitalium</i> (naziv cilja: Mg)	Interpretacija za pojedinačne uzorke bolesnika
POS	NEG	NEG	Detektirana rezistencija na makrolide DNA, nije detektirana osjetljivost na makrolide i <i>M. genitalium</i> DNA. NEJASAN REZULTAT ¹
NEG	POS	NEG	Detektirana osjetljivost na makrolide DNA, nije detektirana rezistencija na makrolide i <i>M. genitalium</i> DNA. NEJASAN REZULTAT ¹
NEG	NEG	POS	Detektirana <i>M. genitalium</i> DNA, nije detektirana rezistencija na makrolide i osjetljivost na makrolide DNA. NEJASAN REZULTAT ^{1,2}
NEG	NEG	NEG	Nije detektirana rezistencija na makrolide, osjetljivost na makrolide i <i>M. genitalium</i> DNA
UNR	POS	POS	Detektirana osjetljivost na makrolide i <i>M. genitalium</i> DNA, nije detektirana rezistencija na makrolide DNA ³
POS	UNR	POS	Detektirana rezistencija na makrolide i <i>M. genitalium</i> DNA, nije detektirana osjetljivost na makrolide DNA ³
UNR	UNR	UNR	Neriješeni (UNR) rezultat dobiven u prisutnosti inhibitora reakcije PCR-a ili kada dođe do nekog općeg problema (koji nije pokriven šifrom o pogrešci) pri obradi uzorka i/ili amplifikaciji. ⁴
POS	POS	UNR	Neriješeno (UNR) – ponoviti testiranje ¹
POS	UNR	UNR	Neriješeno (UNR) – ponoviti testiranje ¹
UNR	POS	UNR	Neriješeno (UNR) – ponoviti testiranje ¹
UNR	UNR	POS	Neriješeno (UNR) – ponoviti testiranje ¹
IND	IND	IND	Rezultat testa nije moguće utvrditi (IND). Zbog kvara sustava BD MAX™ System. Rezultat testa prikazan u slučaju kvara instrumenta povezanog sa šifrom o pogrešci. ⁵
INC	INC	INC	Nepotpun rezultat testa (INC). Zbog kvara sustava BD MAX™ System. Rezultat testa prikazan u slučaju neuspješnog obavljanja postupka. ⁵

Tablica 18. Tumačenje uzoraka za uzorke urina.

1 Potrebno je ponovno testiranje. Preporučuje se ponoviti test iz iste epruvete za uzorak s puferom (SBT) ili iz primarnog uzorka pripremom nove SBT. U slučaju ponovnog dobivanja nejasnih rezultata potrebno je prikupiti novi uzorak (u koncentriranijem obliku, ako je moguće) i ponovno ga testirati.

NAPOMENA: Uzorci urina mogu se čuvati bez prenošenja u SBT do 4 sata ako se čuvaju na temperaturi od 25°C ili 1 dan ako se čuvaju na temperaturi od 4°C. U slučaju ponavljanja testa iz iste SBT, preporučuje se ručno protresti SBT kako bi se osiguralo pravilno homogeniziranje uzorka. Uzorci urina mogu se čuvati u SBT-u najviše 3 dana na 25°C (ako su prethodno pohranjeni na 25°C najviše 4 sata) ili najviše 3 dana na 4°C (ako su prethodno pohranjeni na 4°C najviše 1 dan).

2 Komplet detektira sljedeće mutacije povezane s rezistencijom na makrolide: gen *23S rRNA* (A2058T, A2058C, A2058G, A2059C, A2059G). U slučaju prisutnosti druge mutacije, komplet nije validiran za njezinu detekciju, stoga će se amplifikacija uočiti u kanalu ROX (detekcija bakterije *M. genitalium*), a ne u kanalima FAM i HEX (detekcija rezistencije na makrolide odnosno osjetljivosti na makrolide).

3 Iako je granična vrijednost za cilj endogene unutarnje kontrole (EIC) u uzorcima urina postavljena na 40, zbog niskog broja ljudskih stanica u urinu dopušteno je da se ne uoči krivulja amplifikacije u EIC u slučaju pozitivnog signala za ciljeve rezistencije na makrolide (FAM kanal) ili osjetljivosti na makrolide (HEX kanal) i cilj bakterije *Mycoplasma genitalium* (ROX kanal). U tom slučaju ne postoji rizik od prijavljivanja lažno pozitivnog rezultata jer se amplifikacija treba uočiti istovremeno u dva različita kanala.

4 EIC mora pokazati amplifikacijski signal s Ct vrijednošću ≤ 40 da bi se uzeo u obzir. Ako postoji odsutnost signala za EIC ili Ct vrijednost > 40 , rezultat se smatra Neriješenim (UNR) te je potrebno ponovno testiranje. Preporučuje se ponoviti test iz iste SBT ili iz primarnog uzorka pripremom nove SBT, ili prikupiti uzorak s većom koncentracijom. Također se može dogoditi da je rezultat Neriješeno (UNR) zbog prisutnosti inhibitora u PCR reakciji. U tim slučajevima preporučuje se razrijediti te uzorke u omjeru 1/10. Slijedite smjernice laboratorija i/ili priručnike s politikama laboratorija za mikrobiologiju.

5 Rezultati Neodređeno (IND) ili Nepotpuno (INC) mogu se dobiti zbog kvara sustava te je potrebno ponovno testiranje. Pogledajte korisnički priručnik sustava BD MAX™ System za tumačenje kodova upozorenja i pogrešaka.

Napomena: Kada koristite vanjske kontrole, one bi trebale dati sljedeće očekivane rezultate: negativne za ENC i pozitivne za EPC (očekuje se da će poznati pozitivni uzorci biti pozitivni samo za mikroorganizme prisutne u uzorku). Kada dođe do pogreške vanjske kontrole, potrebno je ponovno testiranje.

U slučaju stalnog dvosmislenog rezultata preporučuje se pregledati upute za uporabu te proces ekstrakcije koji koristi korisnik; za potvrdu ispravne učinkovitosti svakog PCR koraka te pregled parametara; te za provjeru sigmoidnog oblika krivulje i intenzitet fluorescencije.

Rezultate testa treba procijeniti zdravstveni djelatnik uzimajući u obzir anamnezu, kliničke simptome i druge dijagnostičke testove.

10. Ograničenja testa

- Rezultate testa treba procijeniti zdravstveni djelatnik uzimajući u obzir anamnezu, kliničke simptome i druge dijagnostičke testove.
- VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System validiran je samo s uzorcima vaginalnih briseva i uzorcima urina muškaraca i žena.
- Za dobru učinkovitost testa liofilizirani proizvod mora biti na dnu epruvete te ne smije prianjati na gornjem dijelu epruvete ili čepa od folije. Lagano pritisnite svaku epruvetu na tvrdj površini kako biste se uvjerali da je sav proizvod na dnu epruvete.
- Moguće je da se u praznim kanalima sustava BD MAX™ System može pojaviti unakrsni razgovor ako ne postoji cilj koji treba detektirati, stoga je prilikom tumačenja rezultata potrebno odabrati samo kanale u kojima su isti amplificirani. Za sva pitanja obratite se na viasuresupport@certest.es.
- Kvaliteta testa ovisi o kvaliteti uzorka; nukleinska kiselina mora biti pravilno ekstrahirana iz kliničkih uzoraka.

- Ovaj je test kvalitativni test i ne daje kvantitativne vrijednosti te ne ukazuje na broj prisutnih organizama. Nije moguće povezati Ct vrijednosti dobivene PCR-om s koncentracijom uzorka jer one ovise o korištenom termocikleru i samom ciklusu.
- Izuzetno niske razine ciljnog elementa ispod razine detekcije mogu biti detektirane, no moguće je da se rezultati neće moći ponoviti.
- Imajte na umu planirani raspon mjerenja testa jer uzorci s koncentracijama iznad ili ispod tog raspona mogu dati pogrešne rezultate.
- Postoji mogućnost pojave lažnih pozitivnih rezultata zbog unakrsne kontaminacije uzoraka bakterije *M. genitalium* rezistentne na makrolide i/ili osjetljive na makrolide koji sadrže visoke koncentracije ciljne DNA ili u slučaju kontaminacije izazvane proizvodima PCR-a iz ranijih reakcija.
- Lažno negativni rezultati mogu nastati uslijed nekoliko čimbenika te njihovih kombinacija uključujući:
 - nepravilno prikupljanje uzoraka, transport, pohrana i/ili metode rukovanja.
 - Nepravilne postupke obrade (uključujući ekstrakciju DNA).
 - Degradacija DNA tijekom otpreme/pohrane i/ili obrade uzorka.
 - Mutacije ili polimorfizmi u regijama vezanja početnica ili sonde mogu utjecati na detekciju novih ili nepoznatih sojeva bakterije *M. genitalium* ili genetskih markera rezistencije na makrolide i osjetljivosti na makrolide.
 - Bakterijsko opterećenje u uzorku koje je ispod granice detekcije za test.
 - Prisutnost qPCR inhibitora ili drugih tipova interferirajućih tvari. Nije procijenjen utjecaj cjepiva, nekih antivirusnih terapija, antibiotika, kemoterapijskih sredstva, imunosupresiva ili antimikotika korištenih za prevenciju infekcija ili tijekom liječenja infekcije.
 - Učinak interferirajućih tvari procijenjen je samo za one navedene u odjeljku 12.5.1 (studija o interferirajućim tvarima) ove upute za uporabu. U ovom odjeljku možete provjeriti najčešće endogene i egzogene tvari koje izazivaju potpuno ili djelomično ometanje reakcije qPCR. Druge tvari koje nisu navedene u ovom dijelu mogu dovesti do pogrešnih rezultata.
 - Neuspjeh u pridržavanju uputa za uporabu te prilikom postupka testiranja.
- Komplet detektira sljedeće mutacije povezane s rezistencijom na makrolide: gen *23S rRNA* (A2058T, A2058C, A2058G, A2059C, A2059G). Proizvod ne može detektirati soj bakterije *M. genitalium* rezistentan na makrolide koji sadrži mutaciju A2059T, koja je manje prevladavajuća. Samo u tom slučaju moguće je uočiti amplifikaciju u kanalu ROX (detekcija bakterije *M. genitalium*), a ne u kanalima FAM i HEX (detekcija rezistencije na makrolide odnosno osjetljivosti na makrolide).
- Pozitivan rezultat testa ne ukazuje nužno na prisutnost živih mikroorganizama te ne ukazuje da su ti mikroorganizmi infektivni ili uzročni agensi za kliničke simptome. Međutim, pozitivan rezultat ukazuje na prisutnost ciljnih sekvenci bakterije *M. genitalium* rezistentne na makrolide i bakterije *M. genitalium* osjetljive na makrolide.

- Negativni rezultati ne isključuju prisutnost DNA bakterije *M. genitalium* rezistentne na makrolide i/ili osjetljive na makrolide u kliničkom uzorku i ne smiju se koristiti kao jedini temelj za odlučivanje o liječenju ili pružanju druge zdravstvene skrbi bolesniku. Nisu određene optimalne vrste uzoraka i izračun vremena vršnih razina mikroba tijekom infekcija čiji su uzrok bakterija *M. genitalium*. Za detekciju patogena može biti potrebno prikupljanje više uzoraka (vrste i vremenske točke) od istog bolesnika.
- Ako su dijagnostički testovi za druge spolno prenosive bolesti (SPB) i/ili antimikrobnu rezistenciju negativni, a klinička opažanja, anamneza bolesnika i epidemiološke informacije sugeriraju da je moguća infekcija bakterijom *M. genitalium*, potrebno je razmotriti mogućnost lažno negativnog rezultata i ponovnog testiranja bolesnika.
- Vrijednosti fluorescencije mogu varirati zbog višestrukih čimbenika kao što su: oprema za PCR (čak i ako je isti model), sustav ekstrakcije, vrsta uzorka, prethodna obrada uzorka itd. između ostalog.
- Pozitivne i negativne prediktivne vrijednosti vrlo su ovisne o prevalenciji u svim testovima za *in vitro* dijagnostiku. Učinkovitost testa VIASURE *Mycoplasma genitalium* with *Macrolide Resistance Assay* for BD MAX™ System može varirati ovisno o prevalenciji i populaciji koja se testira.
- U slučaju neriješenih, neutvrdivih ili nepotpunih rezultata primjenom VIASURE *Mycoplasma genitalium* with *Macrolide Resistance Assay* for BD MAX™ System potrebno je ponovno testiranje. Neriješeni rezultati mogu biti posljedica prisutnosti inhibitora u uzorku ili nepravilne rehidracije epruvete s liofiliziranom reakcijskom smjesom. Ako postoji kvar na instrumentu, dobivaju se neutvrdivi ili nepotpuni rezultati.

11. Kontrola kvalitete

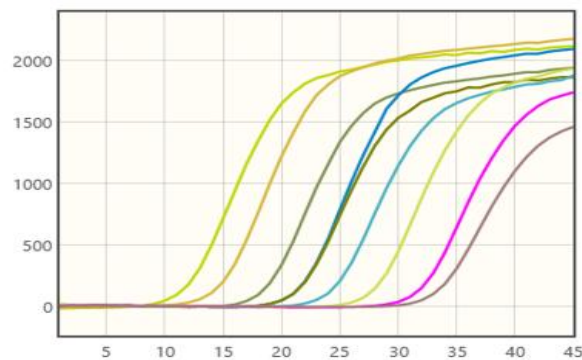
Test VIASURE *Mycoplasma genitalium* with *Macrolide Resistance Assay* for BD MAX™ System sadrži endogenu unutarnju kontrolu (EIC) u svakoj reakcijskoj epruveti pomoću koje se potvrđuje pravilno provođenje tehnike. Osim toga, korištenje vanjskih kontrola (EPC i ENC) omogućuje potvrdu učinkovitosti testa. Sustav BD MAX™ System ne koristi vanjske kontrole u svrhu tumačenja rezultata, već ih smatra uzorkom. Vanjska pozitivna kontrola (EPC) namijenjena je praćenju moguće neispravnosti reagensa testa, dok je vanjska negativna kontrola (ENC) namijenjena detekciji kontaminacije okoline ili reagensa ciljnim nukleinskim kiselinama.

12. Značajke analitičke učinkovitosti

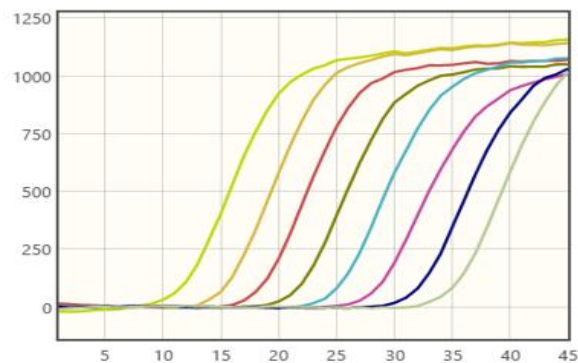
12.1. Analitička linearnost

Linearnost testa određena je i potvrđena testiranjem serije desetostrukih razrjeđenja matrice vaginalnog brisa, uzoraka urina muškaraca i žena koji sadrže poznatu koncentraciju specifične i sintetske DNA bakterije *M. genitalium* osjetljive na makrolide ili rezistentne na makrolide (u rasponu od $2E+07$ do $2E+00$ kopija/ μ L). Izračunata je aritmetička sredina, standardna devijacija i koeficijent varijacije Ct vrijednosti, kao i učinkovitost i regresijski koeficijent PCR reakcije, a primjeri amplifikacijskog grafikona dobivenog testom u jednoj od procijenjenih matrica navedeni su u nastavku.

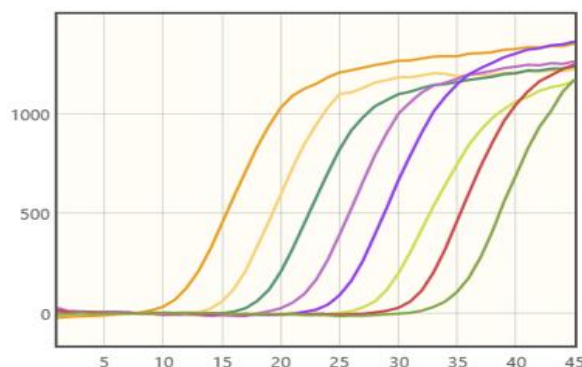
Slika 2. Serije razrjeđenja sintetske DNA bakterije *M. genitalium* osjetljive na makrolide (gen *23S rRNA* (wild type) + gen *adhezina MgPA*) ($2E+07$ do $2E+00$ kopija/ μ L): analiza predložka provedena na BD MAX™ System (530/565 (HEX) kanal).



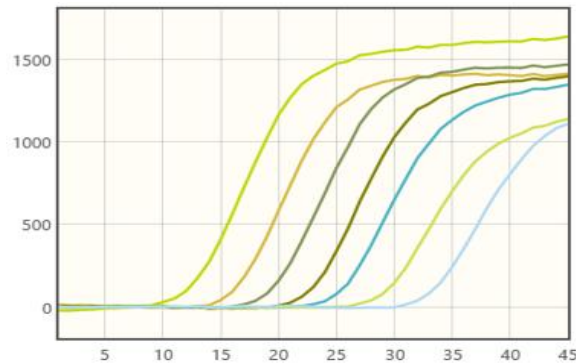
Slika 3. Serije razrjeđenja sintetske DNA bakterije *M. genitalium* rezistentne na makrolide (gen *23S rRNA* (mutacija A2058C) + gen *adhezina MgPA*) ($2E+07$ do $2E+00$ kopija/ μ L): analiza predložka provedena na BD MAX™ System (475/520 (FAM) kanal).



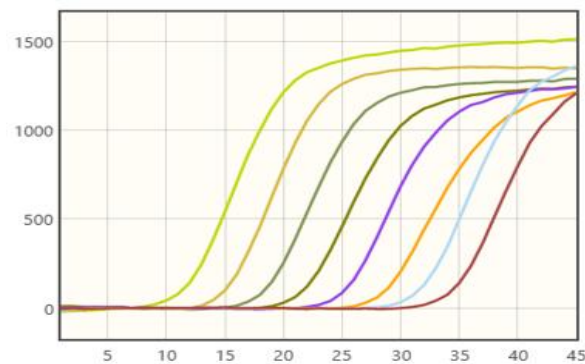
Slika 4. Serije razrjeđenja sintetske DNA bakterije *M. genitalium* rezistentne na makrolide (gen *23S rRNA* (mutacija A2058G) + gen *adhezina MgPA*) ($2E+07$ do $2E+00$ kopija/ μ L): analiza predložka provedena na BD MAX™ System (475/520 (FAM) kanal).



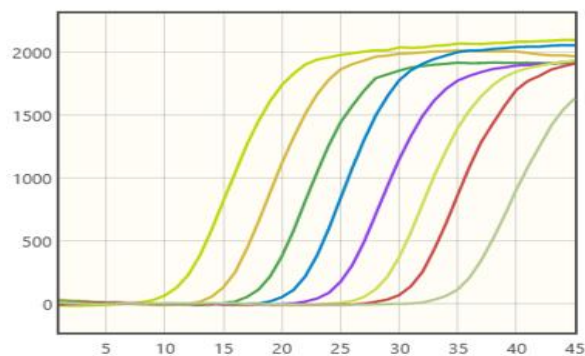
Slika 5. Serije razrjeđenja sintetske DNA bakterije *M. genitalium* rezistentne na makrolide (gen *23S rRNA* (mutacija A2058T) + gen *adhezina MgPA*) ($2E+07$ do $2E+00$ kopija/ μ L): analiza predložka provedena na BD MAX™ System (475/520 (FAM) kanal).



Slika 6. Serije razrjeđenja sintetske DNA bakterije *M. genitalium* rezistentne na makrolide (gen *23S rRNA* (mutacija A2059C) + gen *adhezina MgPA*) ($2E+07$ do $2E+00$ kopija/ μ L): analiza predložka provedena na BD MAX™ System (475/520 (FAM) kanal).



Slika 7. Serije razrjeđenja sintetske DNA bakterije *M. genitalium* rezistentne na makrolide (gen *23S rRNA* (mutacija A2059G) + gen *adhezina MgPA*) ($2E+07$ do $2E+00$ kopija/ μ L): analiza predložka provedena na BD MAX™ System (475/520 (FAM) kanal).



12.2. Analitička osjetljivost. Granica osjetljivosti testa (LOD)

Analitička osjetljivost ili granica osjetljivosti testa (LoD) VIASURE *Mycoplasma genitalium* with *Macrolide Resistance* Assay for BD MAX™ System analizirana je s tri serije korištenjem matrice vaginalnog brisa, uzoraka urina muškaraca i žena. Referentni sojevi ili sintetska DNA (u slučaju nedostupnosti soja) korišteni su kako je navedeno u sljedećoj tablici:

Cilj		Soj/Sintetska DNA	Vanjska referenca
Osjetljivost na makrolide + <i>Mycoplasma genitalium</i>	gen <i>23S rRNA</i> (divlji tip) + gen <i>adhezina MgPA</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> soj M30	49895™
Rezistencija na makrolide + <i>Mycoplasma genitalium</i>	gen <i>23S rRNA</i> (mutacija A2058C) + gen <i>adhezina MgPA</i>	Sintetski DNA (MGRXPC)	n.a.
	gen <i>23S rRNA</i> (mutacija A2058G) + gen <i>adhezina MgPA</i>	AMPLIRUN® TOTAL MACROLIDE RESISTANT MGE CONTROL	MBTC029
	gen <i>23S rRNA</i> (mutacija A2058T) + gen <i>adhezina MgPA</i>	Sintetski DNA (MGRXPC)	n.a.
	gen <i>23S rRNA</i> (mutacija A2059C) + gen <i>adhezina MgPA</i>	Sintetski DNA (MGRXPC)	n.a.
	gen <i>23S rRNA</i> (mutacija A2059G) + gen <i>adhezina MgPA</i>	AMPLIRUN® TOTAL MACROLIDE RESISTANT MGE CONTROL	MBTC029

Tablica 19. Referentni sojevi i sintetska DNA korišteni za test granice osjetljivosti testa.

VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System pokazao je granicu osjetljivosti testa navedenu u sljedećoj tablici, s pozitivnom stopom od $\geq 95\%$.

Granica osjetljivosti testa (LOD) (kopija/ μ L)						
Matrica	<i>M. genitalium</i> osjetljiv na makrolide	<i>M. genitalium</i> rezistentan na makrolide (A2059G)	<i>M. genitalium</i> rezistentan na makrolide (A2058G)	<i>M. genitalium</i> rezistentan na makrolide (A2058C)	<i>M. genitalium</i> rezistentan na makrolide (A2058T)	<i>M. genitalium</i> rezistentan na makrolide (A2059C)
Ženski urin	3,33E-02	3,00E+00	9,99E-01	6,00E+00	6,00E+00	2,00E+00
Muški urin	1,00E-01	9,00E-01	3,00E-01	2,00E+00	2,00E+00	2,00E+00
Vaginalna matrica	1,00E-01	2,70E+00	3,33E-01	2,00E+00	6,00E+00	2,00E+00

Tablica 20. Granica osjetljivosti testa VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System.

Stoga, rezultati dobiveni testiranjem pokazali su da je osjetljivost proizvoda VIASURE dosljedna i pouzdana u svim proizvodnim serijama.

12.3. Mjerni raspon

Mjerni raspon testa određen je testiranjem serije desetostrukih razrjeđenja koja sadrže poznatu koncentraciju specifične i sintetske DNA koja pripada bakteriji *M. genitalium* osjetljivoj na makrolide i bakteriji *M. genitalium* rezistentnoj na makrolide. Rezultati su omogućili potvrdu pravilne detekcije cilja u mjernom rasponu navedenom u sljedećoj tablici:

Cilj	Mjerni raspon (kopije/ μ l)					
	Ženska urinarna matrica		Muška urinarna matrica		Vaginalna matrica	
<i>M. genitalium</i> osjetljiva na makrolide	2E+07	2E+01	2E+07	2E+00	2E+07	2E+00
<i>M. genitalium</i> (A2059G) rezistentna na makrolide	2E+07	2E+00	2E+07	2E+00	2E+07	2E+00
<i>M. genitalium</i> (A2058G) rezistentna na makrolide	2E+07	2E+01	2E+07	2E+01	2E+07	2E+00
<i>M. genitalium</i> (A2058C) rezistentna na makrolide	2E+07	2E+01	2E+07	2E+00	2E+07	2E+00
<i>M. genitalium</i> (A2058T) rezistentna na makrolide	2E+07	2E+00	2E+07	2E+01	2E+07	2E+01
<i>M. genitalium</i> (A2059C) rezistentna na makrolide	2E+07	2E+01	2E+07	2E+01	2E+07	2E+00

Tablica 21. Mjerni raspon testa VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System.

Zaključno, mjerni raspon testa VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System uspješno je utvrđen u skladu s početno navedenim kriterijima prihvaćanja valjanosti, pokazujući pouzdane, točne i reproducibilne rezultate u širokom spektru bakterijskih opterećenja, potvrđujući njegovu korisnost u različitim kliničkim dijagnostičkim scenarijima.

12.4. Točnost

12.4.1. Istinitost

Istinitost testa VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System procijenjena je testiranjem referentnog materijala navedenog u nastavku.

1. Sintetski fragmenti cDNA

- Sintetski fragment cDNA za gene *23S rRNA* (divlji tip) i *adhezina MgPA* bakterije *M. genitalium* osjetljive na makrolide: MGRXPC, kanali HEX i ROX.
- Sintetski fragment cDNA za gene *23S rRNA* (mutacija A2058C) i *adhezina MgPA* bakterije *M. genitalium* rezistentne na makrolide: MGRXPC, kanali FAM i ROX.
- Sintetski fragment cDNA za gene *23S rRNA* (mutacija A2058G) i *adhezina MgPA* bakterije *M. genitalium* rezistentne na makrolide: MGRXPC, kanali FAM i ROX.
- Sintetski fragment cDNA za gene *23S rRNA* (mutacija A2058T) i *adhezina MgPA* bakterije *M. genitalium* rezistentne na makrolide: MGRXPC, kanali FAM i ROX.
- Sintetski fragment cDNA za gene *23S rRNA* (mutacija A2059C) i *adhezina MgPA* bakterije *M. genitalium* rezistentne na makrolide: MGRXPC, kanali FAM i ROX.
- Sintetski fragment cDNA za gene *23S rRNA* (mutacija A2059G) i *adhezina MgPA* bakterije *M. genitalium* rezistentne na makrolide: MGRXPC, kanali FAM i ROX.

2. Američka zbirka tipova kultura (ATCC®)

Vanjska referenca	Mikroorganizam	Naziv proizvoda	Varijanta
49895	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> Tully et al.	Soj M30
33530	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> Tully et al.	Soj G37
49898	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> Tully et al.	Soj TW48-5G
49123	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> Tully et al.	Soj TW10-5G
49899	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> Tully et al.	Soj UMTB-10G
49896	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> Tully et al.	Soj TW10-6G
49897	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> Tully et al.	Soj R32G [R32]

Tablica 22. Referentni materijal iz Američke zbirke tipova kultura (ATCC).

3. Kontrole

Vanjska referenca	Mikroorganizam	Naziv proizvoda	Varijanta
MBTC029	<i>Mycoplasma genitalium</i>	AMPLIRUN® TOTAL MACROLIDE RESISTANT MGE CONTROL	- soj osjetljivog tipa - mutacija A2059G u genu <i>23 rRNA</i> - mutacija A2058G u genu <i>23 rRNA</i>

Tablica 23. Kontrolni materijal tvrtke Vircell S.L.

4. Programi vanjske procjene kvalitete (EQA)

Vanjska referenca	Podrijetlo	Mikroorganizam	Naziv proizvoda	Varijanta
MG23S-03	QCMD	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> G37 (WT)	Soj G37
MG23S-06	QCMD	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> M6303	<i>23S rDNA</i> mutacija A2059G, rezistencija na makrolide
MG23S-07	QCMD	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> M6593	<i>23S rDNA</i> mutacija A2059G, rezistencija na makrolide
MG101S-04	QCMD	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> M6303	rezistencija na makrolide
MG101S-06	QCMD	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> M6593	rezistencija na makrolide

Tablica 24. Referentni materijal iz programa vanjske procjene kvalitete (EQA).

12.4.2. Preciznost

Kako bi se odredila preciznost testa VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System, provedene su analize unutar testa (ponovljivost), među testovima, među serijama i među opremom (reproducibilnost) korištenjem matrice vaginalnog brisa, matrice urina žena i muškaraca s dodatkom poznate koncentracije referentnih sojeva: *Mycoplasma genitalium* soj M30 (Ref: 49895™) za bakteriju *M. genitalium* osjetljivu na makrolide i AMPLIRUN® TOTAL MACROLIDE RESISTANT MGE CONTROL (Ref: MBTC029) za bakteriju *M. genitalium* rezistentnu na makrolide.

Intra-test

Intra-test proveden je analizom šest replikata svih uzoraka u istom ciklusu korištenjem VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System. Sažetak rezultata prikazan je u donjoj tablici.

Soj <i>M. genitalium</i> osjetljiv na makrolide						
Matrica	Cilj	Uzorak	Kanal	Ct (\bar{x})	σ	CV %
Muški urin	Osjetljivost na makrolide	3xLoD	530/565 (HEX)	32,02	0,27	0,85
		5xLoD	530/565 (HEX)	30,98	0,32	1,03
		Negativna kontrola	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
		Negativna kontrola	585/630 (ROX)	Neg	n.a.	n.a.
	EIC	3xLoD	680/715 (CY5.5)	34,38	0,80	2,32
		5xLoD	680/715 (CY5.5)	34,05	0,53	1,55
		Negativna kontrola	680/715 (CY5.5)	35,23	1,20	3,41
Ženski urin	Osjetljivost na makrolide	3xLoD	530/565 (HEX)	34,02	0,83	2,44
		5xLoD	530/565 (HEX)	33,50	0,67	2,01
		Negativna kontrola	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
		Negativna kontrola	585/630 (ROX)	Neg	n.a.	n.a.
	EIC	3xLoD	680/715 (CY5.5)	32,75	0,50	1,53
		5xLoD	680/715 (CY5.5)	33,22	0,37	1,12
		Negativna kontrola	680/715 (CY5.5)	32,97	0,23	0,71
Vaginalna matrica	Osjetljivost na makrolide	3xLoD	530/565 (HEX)	32,48	0,29	0,88
		5xLoD	530/565 (HEX)	30,90	0,71	2,30
		Negativna kontrola	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
		Negativna kontrola	585/630 (ROX)	Neg	n.a.	n.a.
	EIC	3xLoD	680/715 (CY5.5)	31,12	0,47	1,50
		5xLoD	680/715 (CY5.5)	31,20	0,61	1,97
		Negativna kontrola	680/715 (CY5.5)	31,23	0,25	0,80

Tablica 25. Rezultati unutar testa za VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System sa sojem bakterije *M. genitalium* osjetljivom na makrolide. (Ct) = ciklus praga. (\bar{x}) = aritmetička srednja Ct vrijednost, (σ) = standardna devijacija, (CV %) = koeficijent varijacije, Neg = negativno, n.a. = nije primjenjivo.

Soj <i>M. genitalium</i> rezistentan na makrolide						
Matrica	Cilj	Uzorak	Kanal	Ct (\bar{x})	σ	CV %
Muški urin	Rezistencija na makrolide	3xLoD	475/520 (FAM)	36,17	0,62	1,70
		5xLoD	475/520 (FAM)	35,05	0,63	1,81
		Negativna kontrola	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
		Negativna kontrola	585/630 (ROX)	Neg	n.a.	n.a.

Soj <i>M. genitalium</i> rezistentan na makrolide						
Matrica	Cilj	Uzorak	Kanal	Ct (\bar{x})	σ	CV %
	EIC	3xLoD	680/715 (CY5.5)	32,58	1,24	3,80
		5xLoD	680/715 (CY5.5)	32,12	0,39	1,22
		Negativna kontrola	680/715 (CY5.5)	33,28	0,66	1,99
Ženski urin	Rezistencija na makrolide	3xLoD	475/520 (FAM)	33,72	0,51	1,52
		5xLoD	475/520 (FAM)	33,30	0,37	1,12
		Negativna kontrola	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
		Negativna kontrola	585/630 (ROX)	Neg	n.a.	n.a.
	EIC	3xLoD	680/715 (CY5.5)	31,45	0,29	0,92
		5xLoD	680/715 (CY5.5)	30,73	0,56	1,83
		Negativna kontrola	680/715 (CY5.5)	34,45	0,44	1,27
Vaginalna matrica	Rezistencija na makrolide	3xLoD	475/520 (FAM)	34,33	1,34	3,90
		5xLoD	475/520 (FAM)	33,75	0,27	0,79
		Negativna kontrola	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
		Negativna kontrola	585/630 (ROX)	Neg	n.a.	n.a.
	EIC	3xLoD	680/715 (CY5.5)	32,13	0,73	2,28
		5xLoD	680/715 (CY5.5)	31,20	0,72	2,29
		Negativna kontrola	680/715 (CY5.5)	34,15	0,50	1,46

Tablica 26. Rezultati unutar testa za VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System sa sojem bakterije *M. genitalium* rezistentnom na makrolide. (Ct) = ciklus praga. (\bar{x}) = aritmetička srednja Ct vrijednost, (σ) = standardna devijacija, (CV %) = koeficijent varijacije, Neg = negativno, n.a. = nije primjenjivo.

Intertestno

Intertestno je testirano testiranjem četiri replikata različitih uzoraka u tri različita dana od strane tri različita operatera, korištenjem VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System. Sažetak rezultata prikazan je u donjoj tablici.

Soj <i>M. genitalium</i> osjetljiv na makrolide						
Matrica	Cilj	Uzorak	Kanal	Ct (\bar{x})	σ	CV %
Muški urin	Osjetljivost na makrolide	3xLoD	530/565 (HEX)	34,48	0,85	2,46
		5xLoD	530/565 (HEX)	33,66	0,75	2,22
		Negativna kontrola	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
		Negativna kontrola	585/630 (ROX)	Neg	n.a.	n.a.
	EIC	3xLoD	680/715 (CY5.5)	34,06	1,65	4,85
		5xLoD	680/715 (CY5.5)	34,04	1,85	5,44
		Negativna kontrola	680/715 (CY5.5)	34,10	1,74	5,09
Ženski urin	Osjetljivost na makrolide	3xLoD	530/565 (HEX)	34,36	1,80	5,24
		5xLoD	530/565 (HEX)	34,01	1,84	5,42
		Negativna kontrola	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	
		Negativna kontrola	585/630 (ROX)	Neg	n.a.	n.a.	
	EIC	3xLoD	680/715 (CY5.5)	33,81	1,75	5,18	
		5xLoD	680/715 (CY5.5)	33,29	0,98	2,94	
		Negativna kontrola	680/715 (CY5.5)	34,04	1,39	4,10	
	Vaginalna matrica	Osjetljivost na makrolide	3xLoD	530/565 (HEX)	33,06	0,90	2,73
			5xLoD	530/565 (HEX)	31,90	0,68	2,13
			Negativna kontrola	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	
		Negativna kontrola	585/630 (ROX)	Neg	n.a.	n.a.	
EIC		3xLoD	680/715 (CY5.5)	31,21	0,51	1,62	
		5xLoD	680/715 (CY5.5)	31,03	0,55	1,76	
		Negativna kontrola	680/715 (CY5.5)	30,84	0,77	2,49	

Tablica 27. Rezultati među testovima za VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System sa sojem bakterije *M. genitalium* osjetljivom na makrolide. (Ct) = ciklus praga. (\bar{x}) = aritmetička srednja Ct vrijednost, (σ) = standardna devijacija, (CV %) = koeficijent varijacije, Neg = negativno, n.a. = nije primjenjivo.

Soj <i>M. genitalium</i> rezistentan na makrolide						
Matrica	Cilj	Uzorak	Kanal	Ct (\bar{x})	σ	CV %
Muški urin	Rezistencija na makrolide	3xLoD	475/520 (FAM)	35,98	1,00	2,78
		5xLoD	475/520 (FAM)	35,31	0,90	2,56
		Negativna kontrola	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
		Negativna kontrola	585/630 (ROX)	Neg	n.a.	n.a.
	EIC	3xLoD	680/715 (CY5.5)	33,10	0,76	2,30
		5xLoD	680/715 (CY5.5)	32,54	0,74	2,27
		Negativna kontrola	680/715 (CY5.5)	34,65	1,30	3,74
Ženski urin	Rezistencija na makrolide	3xLoD	475/520 (FAM)	33,08	1,28	3,87
		5xLoD	475/520 (FAM)	31,98	0,79	2,48
		Negativna kontrola	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
		Negativna kontrola	585/630 (ROX)	Neg	n.a.	n.a.
	EIC	3xLoD	680/715 (CY5.5)	31,15	0,43	1,40
		5xLoD	680/715 (CY5.5)	30,14	0,54	1,78
		Negativna kontrola	680/715 (CY5.5)	33,54	1,09	3,25
Vaginalna matrica	Rezistencija na makrolide	3xLoD	475/520 (FAM)	34,72	1,34	3,87
		5xLoD	475/520 (FAM)	34,22	1,27	3,71
		Negativna kontrola	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
		Negativna kontrola	585/630 (ROX)	Neg	n.a.	n.a.

EIC	3xLoD	680/715 (CY5.5)	30,61	0,44	1,42
	5xLoD	680/715 (CY5.5)	30,59	0,64	2,08
	Negativna kontrola	680/715 (CY5.5)	30,98	0,55	1,78

Tablica 28. Rezultati među testovima za VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System sa sojem bakterije *M. genitalium* rezistentnom na makrolide. (Ct) = ciklus praga. (\bar{x}) = aritmetička srednja Ct vrijednost, (σ) = standardna devijacija, (CV %) = koeficijent varijacije, Neg = negativno, n.a. = nije primjenjivo.

Inter-serija

Vrijednosti inter-serija određene su sa šest replikata različitih uzoraka korištenjem tri serije VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System. Sažetak rezultata prikazan je u donjoj tablici.

Soj <i>M. genitalium</i> osjetljiv na makrolide						
Matrica	Cilj	Uzorak	Kanal	Ct (\bar{x})	σ	CV %
Muški urin	Osjetljivost na makrolide	3xLoD	530/565 (HEX)	32,77	0,89	2,71
		5xLoD	530/565 (HEX)	31,46	0,57	1,81
		Negativna kontrola	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
		Negativna kontrola	585/630 (ROX)	Neg	n.a.	n.a.
	EIC	3xLoD	680/715 (CY5.5)	34,74	0,67	1,92
		5xLoD	680/715 (CY5.5)	34,96	1,48	4,22
		Negativna kontrola	680/715 (CY5.5)	35,44	1,01	2,85
Ženski urin	Osjetljivost na makrolide	3xLoD	530/565 (HEX)	34,72	0,81	2,34
		5xLoD	530/565 (HEX)	33,39	0,77	2,39
		Negativna kontrola	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
		Negativna kontrola	585/630 (ROX)	Neg	n.a.	n.a.
	EIC	3xLoD	680/715 (CY5.5)	35,46	1,79	5,08
		5xLoD	680/715 (CY5.5)	34,58	1,15	3,32
		Negativna kontrola	680/715 (CY5.5)	33,53	0,58	1,74
Vaginalna matrica	Osjetljivost na makrolide	3xLoD	530/565 (HEX)	31,62	0,98	3,11
		5xLoD	530/565 (HEX)	30,88	0,83	2,67
		Negativna kontrola	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
		Negativna kontrola	585/630 (ROX)	Neg	n.a.	n.a.
	EIC	3xLoD	680/715 (CY5.5)	31,29	0,46	1,47
		5xLoD	680/715 (CY5.5)	31,26	0,38	1,23
		Negativna kontrola	680/715 (CY5.5)	31,06	0,39	1,27

Tablica 29. Rezultati među serijama za VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System sa sojem bakterije *M. genitalium* osjetljivom na makrolide. (Ct) = ciklus praga. (\bar{x}) = aritmetička srednja Ct vrijednost, (σ) = standardna devijacija, (CV %) = koeficijent varijacije, Neg = negativno, n.a. = nije primjenjivo.

Soj <i>M. genitalium</i> rezistentan na makrolide						
Matrica	Cilj	Uzorak	Kanal	Ct (\bar{x})	σ	CV %
Muški urin	Rezistencija na makrolide	3xLoD	475/520 (FAM)	36,46	1	2,73
		5xLoD	475/520 (FAM)	35,47	0,76	2,14
		Negativna kontrola	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
		Negativna kontrola	585/630 (ROX)	Neg	n.a.	n.a.
	EIC	3xLoD	680/715 (CY5.5)	33,57	1,25	3,73
		5xLoD	680/715 (CY5.5)	32,55	0,61	1,88
		Negativna kontrola	680/715 (CY5.5)	32,49	0,73	2,24
Ženski urin	Rezistencija na makrolide	3xLoD	475/520 (FAM)	32,81	0,96	2,93
		5xLoD	475/520 (FAM)	32,38	0,84	2,59
		Negativna kontrola	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
		Negativna kontrola	585/630 (ROX)	Neg	n.a.	n.a.
	EIC	3xLoD	680/715 (CY5.5)	30,25	0,91	3,02
		5xLoD	680/715 (CY5.5)	30,13	0,58	1,92
		Negativna kontrola	680/715 (CY5.5)	33,51	1,02	3,06
Vaginalna matrica	Rezistencija na makrolide	3xLoD	475/520 (FAM)	34,34	1,39	4,05
		5xLoD	475/520 (FAM)	33,96	0,62	1,82
		Negativna kontrola	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
		Negativna kontrola	585/630 (ROX)	Neg	n.a.	n.a.
	EIC	3xLoD	680/715 (CY5.5)	31,43	0,75	2,40
		5xLoD	680/715 (CY5.5)	30,76	0,58	1,87
		Negativna kontrola	680/715 (CY5.5)	32,24	1,44	4,46

Tablica 30. Rezultati među serijama za VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System sa sojem bakterije *M. genitalium* rezistentnom na makrolide. (Ct) = ciklus praga. (\bar{x}) = aritmetička srednja Ct vrijednost, (σ) = standardna devijacija, (CV %) = koeficijent varijacije, Neg = negativno, n.a. = nije primjenjivo.

Inter-oprema

Vrijednosti inter-oprema određene su sa šest replikata istih uzoraka korištenih za intratestne, intertestne i inter-serijske vrijednosti, korištenjem testa VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System. Navedeni testovi provedeni su na tri laboratorijska mjesta s tri različita sustava BD MAX™ System. Sažetak rezultata prikazan je u donjoj tablici.

Soj <i>M. genitalium</i> osjetljiv na makrolide						
Matrica	Cilj	Uzorak	Kanal	Ct (\bar{x})	σ	CV %
Muški urin	Osjetljivost na makrolide	3xLoD	530/565 (HEX)	31,96	0,43	1,35
		5xLoD	530/565 (HEX)	31,00	0,40	1,30
		Negativna kontrola	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
		Negativna kontrola	585/630 (ROX)	Neg	n.a.	n.a.
	EIC	3xLoD	680/715 (CY5.5)	34,48	0,87	2,53
		5xLoD	680/715 (CY5.5)	34,51	0,87	2,51
		Negativna kontrola	680/715 (CY5.5)	32,46	0,62	1,92
Ženski urin	Osjetljivost na makrolide	3xLoD	530/565 (HEX)	34,31	0,97	2,81
		5xLoD	530/565 (HEX)	33,72	0,52	1,54
		Negativna kontrola	530/565 (HEX)	Neg	n.a.	n.a.
	<i>M. genitalium</i>	3xLoD	585/630 (ROX)	33,85	0,80	2,35
		5xLoD	585/630 (ROX)	33,38	0,63	1,88
		Negativna kontrola	585/630 (ROX)	Neg	n.a.	n.a.
	EIC	3xLoD	680/715 (CY5.5)	33,16	0,56	1,69
		5xLoD	680/715 (CY5.5)	33,06	0,44	1,32
		Negativna kontrola	680/715 (CY5.5)	33,08	0,62	1,87
Vaginalna matrica	Osjetljivost na makrolide	3xLoD	530/565 (HEX)	32,55	0,81	2,48
		5xLoD	530/565 (HEX)	32,57	0,52	1,60
		Negativna kontrola	530/565 (HEX)	Neg	n.a.	n.a.
	<i>M. genitalium</i>	3xLoD	585/630 (ROX)	31,42	0,88	2,81
		5xLoD	585/630 (ROX)	31,54	0,44	1,40
		Negativna kontrola	585/630 (ROX)	Neg	n.a.	n.a.
	EIC	3xLoD	680/715 (CY5.5)	31,12	0,33	1,07
		5xLoD	680/715 (CY5.5)	33,58	0,56	1,68
		Negativna kontrola	680/715 (CY5.5)	30,84	0,50	1,61

Tablica 31. Rezultati među opremom za VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System sa sojem bakterije *M. genitalium* osjetljivom na makrolide. (Ct) = ciklus praga. (\bar{x}) = aritmetička srednja Ct vrijednost, (σ) = standardna devijacija, (CV %) = koeficijent varijacije, Neg = negativno, n.a. = nije primjenjivo.

Soj <i>M. genitalium</i> rezistentan na makrolide						
Matrica	Cilj	Uzorak	Kanal	Ct (\bar{x})	σ	CV %
Muški urin	Rezistencija na makrolide	3xLoD	475/520 (FAM)	36,58	1,31	3,58
		5xLoD	475/520 (FAM)	35,13	0,53	1,51
		Negativna kontrola	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
		Negativna kontrola	585/630 (ROX)	Neg	n.a.	n.a.
	EIC	3xLoD	680/715 (CY5.5)	32,29	0,90	2,79
		5xLoD	680/715 (CY5.5)	31,88	0,67	2,11
		Negativna kontrola	680/715 (CY5.5)	32,89	0,77	2,34
Ženski urin	Rezistencija na makrolide	3xLoD	475/520 (FAM)	33,67	0,43	1,28
		5xLoD	475/520 (FAM)	32,85	0,64	1,96
		Negativna kontrola	475/520 (FAM)	Neg	n.a.	n.a.

Soj <i>M. genitalium</i> rezistentan na makrolide						
Matrica	Cilj	Uzorak	Kanal	Ct (\bar{x})	σ	CV %
	<i>M. genitalium</i>	3xLoD	585/630 (ROX)	32,46	0,44	1,35
		5xLoD	585/630 (ROX)	31,44	0,42	1,34
		Negativna kontrola	585/630 (ROX)	Neg	n.a.	n.a.
	EIC	3xLoD	680/715 (CY5.5)	31,40	0,26	0,82
		5xLoD	680/715 (CY5.5)	30,66	0,43	1,41
		Negativna kontrola	680/715 (CY5.5)	34,59	0,65	1,87
Vaginalna matrica	Rezistencija na makrolide	3xLoD	475/520 (FAM)	34,47	0,89	2,59
		5xLoD	475/520 (FAM)	33,46	0,61	1,84
		Negativna kontrola	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
		Negativna kontrola	585/630 (ROX)	Neg	n.a.	n.a.
	EIC	3xLoD	680/715 (CY5.5)	31,87	0,57	1,78
		5xLoD	680/715 (CY5.5)	31,27	0,59	1,88
		Negativna kontrola	680/715 (CY5.5)	33,72	0,54	1,61

Tablica 32. Rezultati među opremom za VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System sa sojem bakterije *M. genitalium* rezistentnom na makrolide. (Ct) = ciklus praga. (\bar{x}) = aritmetička srednja Ct vrijednost, (σ) = standardna devijacija, (CV %) = koeficijent varijacije, Neg = negativno, n.a. = nije primjenjivo.

Zaključno, studija preciznosti potvrdila je pouzdanu učinkovitost i dosljednost u svim testiranim matricama, u skladu s početno navedenim kriterijima prihvaćanja valjanosti.

12.5. Analitička specifičnost i reaktivnost

Analitička specifičnost i analitička reaktivnost za VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System procijenjene su *in silico* i eksperimentalno, primjenom različitih početnih materijala kao što su certificirani referentni sojevi, certificirane referentne RNA/DNA te materijali iz programa vanjskih osiguravanja kvalitete (EQA).

12.5.1. Analitička specifičnost

Analitička specifičnost sposobnost je testa da detektira predviđenu metu. Za analitičku specifičnost treba razmotriti dvije komponente: Unakrsnu reaktivnost i interferenciju. Unakrsna reaktivnost može se pojaviti kada su prisutne genetski povezane sekvence u uzorku bolesnika, dok se interferencija može pojaviti ako prisutnost specifičnih tvari koje su potencijalno prisutne u matricama uzorka utječe na učinkovitost testa qPCR.

Analiza *in silico* unakrsna reaktivnost

Unakrsna reaktivnost procijenjena je korištenjem referentnih sekvenci patogena iz NCBI Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) i/ili alata za pretraživanje i/ili alata za usklađivanje kao što je BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) te internog bioinformatičkog analitičkog softvera. Provedena je BLAST analiza za svaku početnicu i sondu preko NCBI Genbank baze podataka o nukleotidima te interna bioinformatička analiza.

Usklađene sekvence s postotkom usklađenosti manjim od 80 % homologije smatrane su neosjetljivima za detekciju. Rezultati su bili sljedeći:

Mycoplasma genitalium (gen *adhezina MgPA*)

Sve analizirane sekvence bile su ispod 80 % homologije s *Mycoplasma genitalium* (gen *adhezina MgPA*) setom početnica i sonde.

Stoga ciljni dizajni VIASURE *Mycoplasma genitalium* ne bi trebali uzrokovati lažno pozitivne rezultate u detekciji bakterije *Mycoplasma genitalium* kada su prisutni drugi organizmi.

Mycoplasma genitalium (gen *23S rRNA*)

BLAST analiza filtrirana prema genu *23S rRNA* bakterije *M. genitalium* (isključujući bakteriju *M. genitalium*) pokazuje visoku homolognost između početnica i sondi i nekoliko sekvenci „*Uncultured Mycoplasma sp.* (taksonomski ID: 167967)“ i jedne sekvencije „*Synthetic Mycoplasma genitalium JCVI-1.0* (taksonomski ID: 488339)“.

Sekvence „*Uncultured Mycoplasma sp.* (taksonomski ID: 167967)“ detektirane su s početnicama i sondama za bakteriju *M. genitalium* rezistentnu na makrolide i osjetljivu na makrolide, stoga ne postoji rizik od unakrsne reaktivnosti u proizvodu jer je za pozitivan rezultat potrebna detekcija u kanalu za mikroorganizam (*M. genitalium*) i u kanalu za rezistenciju na makrolide ili osjetljivost na makrolide.

„*Synthetic Mycoplasma genitalium JCVI-1.0* (taksonomski ID: 488339)“ detektira se s početnicama i sondom za osjetljivost na makrolide. To je sekvenca koja odgovara ciljnom mikroorganizmu i mora se detektirati. Ta se sekvenca pojavljuje u unakrsnoj reaktivnosti jer ima drugačiji taksonomski ID od onog korištenog u isključenju.

Stoga nijedna od analiziranih sekvenci, uključujući one koje pokazuju homologiju veću od 80 %, ne može utjecati na ispravnu detekciju bakterije *Mycoplasma genitalium* (gen *23S rRNA*).

Analitička specifičnost eksperimentalno ispitivanje

Eksperimentalno ispitivanje unakrsne reaktivnosti

Unakrsna reaktivnost testa VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System potvrđena je testiranjem panela različitih mikroorganizama povezanih sa simptomima spolno prenosivih infekcija ili ekološki i filogenetski relevantnih mikroorganizama. Kada je to bilo moguće i kada su bili dostupni podaci o koncentraciji, interferirajući mikroorganizmi ocijenjeni su na medicinski relevantnim razinama (obično 1E+05 – 1E+06 CFU (jedinica koja formira koloniju)/mL za bakterije i 1E+04 – 1E+05 PFU (jedinica koja formira plak)/mL za viruse). Nije zabilježena unakrsna reaktivnost između bilo kojih od sljedećih testiranih mikroorganizama, izuzev za ciljane mikroorganizme.

Testiranje unakrsne reaktivnosti					
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	<i>Haemophilus ducreyi</i>	-	<i>Mycoplasma genitalium</i> soj TW48-5G	-/+
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i>	-	<i>Mycoplasma genitalium</i> soj UMTB-10G	-/+
<i>Atopobium vaginae</i>	-	Herpes simplex virus 2	-	<i>Mycoplasma genitalium</i> Tully et al. soj TW10-5G	-/+
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	Human Herpesvirus 1 soj 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> soj G37	-/+	<i>Treponema pallidum</i>	-
<i>Enterococcus faecium</i>	-	<i>Mycoplasma genitalium</i> soj R32G [R32]	-/+	<i>Trichomonas vaginalis</i>	-
<i>Escherichia coli</i>	-	<i>Mycoplasma genitalium</i> soj TW10-6G	-/+	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	-
<i>Gardnerella vaginalis</i>	-				

Tablica 33. Referentni mikroorganizmi uključeni u test unakrsne reaktivnosti. Rezultat + ili – odnosi se na pozitivni ili negativni rezultat dobiven u različitim kanalima ovisno o detektiranom cilju. Ako je testirani mikroorganizam jedan od ciljeva koje detektira uređaj, dobiva se pozitivni rezultat u odgovarajućem kanalu, ali negativni rezultat u ostalim kanalima.

U zaključku, rezultati testova unakrsne reaktivnosti zadovoljili su kriterije prihvaćanja valjanosti i ukazuju na visoku specifičnost testa VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System za detekciju ciljane bakterije *M. genitalium* rezistentne na makrolide i bakterije *M. genitalium* osjetljive na makrolide, čime se smanjuje rizik od lažno pozitivnih rezultata. Budući da nisu uočene nespecifične amplifikacije s drugim povezanim mikroorganizmima, to sugerira da je uređaj sposoban precizno razlikovati ciljeve.

Studija interferirajućih mikrobioloških agensa

Provedena je studija interferirajućih mikrobioloških agensa kako bi se analizirali potencijalni interferirajući mikrobiološki agensi koji ometaju VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System. Testiran je panel različitih mikroorganizama od kliničkog, okolišnog i filogenetskog značaja u prisutnosti referentnih sojeva: *Mycoplasma genitalium* soj M30 (Ref: 49895™) za bakteriju *M. genitalium* osjetljivu na makrolide i AMPLIRUN® TOTAL MACROLIDE RESISTANT MGE CONTROL (Ref: MBTC029) za bakteriju *M. genitalium* rezistentnu na makrolide. Kada je to bilo moguće i kada su bili dostupni podaci o koncentraciji, interferirajući mikroorganizmi ocijenjeni su na medicinski relevantnim razinama (obično 1E+05 – 1E+06 CFU (jedinica koja formira koloniju)/mL za bakterije i 1E+04 – 1E+05 PFU (jedinica koja formira plak)/mL za viruse). Svaka točkasta analiza provedena je jedanput po uzorku.

Pozitivna kontrola matrice (Positive Matrix Control, PMC) i negativna kontrola matrice (Negative Matrix Control, NMC) uključene su kao kontrole testa. PMC odgovara matrici vaginalnog brisa, matrici urina žena i muškaraca s dodatkom specifičnih sojeva bakterije *M. genitalium* osjetljivih na makrolide i rezistentnih na makrolide bez ikakvih interferirajućih mikroorganizama, dok NMC odgovara negativnim matricama bez ikakvih interferirajućih mikroorganizama.

Naziv mikroorganizma	Testirana koncentracija	Rezultat
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/μL	N.I
<i>Haemophilus influenzae</i>	5,20E+02 CFU/μL	N.I
Virus Herpes simplex 1	1,60E+05 TCID50/mL	N.I
<i>Listeria monocytogenes</i>	5,80E+06 CFU/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/μL	N.I
<i>Treponema pallidum</i>	3,40E+04 stanica/mL	N.I
<i>Klebsiella oxytoca</i>	7,60E+03 kop/μL	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/μL	N.I
<i>Candida albicans</i>	4,18E+04 CFU/μL	N.I
<i>Candida glabrata</i>	2,46E+03 CFU/μL	N.I
<i>Candida tropicalis</i>	2,88E+03 CFU/μL	N.I
<i>Chlamydia trachomatis</i> serovar E	6,40E+05 IFU/mL	N.I
<i>Enterobacter cloacae</i>	1,28E+03 CFU/μL	N.I
<i>Enterococcus faecalis</i>	5,00E+04 CFU/mL	N.I

Naziv mikroorganizma	Testirana koncentracija	Rezultat
<i>Enterococcus faecium</i>	3,50E+04 CFU/mL	N.I
Virus Herpes simplex 2	7,24E+03 TCID50/mL	N.I
Humani papiloma virus 16	1,00E+02 IU/ μ L	N.I
Humani papiloma virus 18	1,00E+02 IU/ μ L	N.I
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3,65E+03 CFU/ μ L	N.I
<i>Listeria monocytogenes</i>	n.a.	N.I
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	6,20E+03 CFU/ μ L	N.I
<i>Neisseria meningitidis</i>	5,70E+04 CFU/ μ L	N.I
<i>Proteus mirabilis</i>	2,55E+03 CFU/ μ L	N.I
<i>Serratia marcescens</i>	n.a.	N.I
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	9,20E+03 CFU/ μ L	N.I
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	2,00E+04 CFU/ μ L	N.I

Tablica 34. Test na interferirajuće mikrobnе agense. N.I. = Nema interferencije, n.a. = nije primjenjivo.

U zaključku, nije uočena interferencija u detekciji RNA bakterije *M. genitalium* osjetljive i/ili rezistentne na makrolide u matrici vaginalnog brisa, urinu žena i muškaraca s bilo kojim od testiranih mikroorganizama.

Studija interferirajućih tvari

Provedena je studija interferirajućih tvari kako bi se testirao potencijalno interferirajući učinak endogenih i egzogenih tvari za VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System. Ukupno 17, 25 i 28 potencijalno interferirajućih tvari dodano je negativnim uzorcima vaginalnog brisa odnosno urina muškaraca i žena, obogaćenim referentnim sojevima: *Mycoplasma genitalium* soj M30 (Ref: 49895™) za bakteriju *M. genitalium* osjetljivu na makrolide i AMPLIRUN® TOTAL MACROLIDE RESISTANT MGE CONTROL (Ref: MBTC029) za bakteriju *M. genitalium* rezistentnu na makrolide i ocijenjeno sa šest replikata.

Pozitivna kontrola matrice (Positive Matrix Control, PMC) i negativna kontrola matrice (Negative Matrix Control, NMC) uključene su kao kontrole testa. PMC odgovara matrici vaginalnog brisa prikupljenoj u Copan eSwab®, matrici urina žena i muškaraca s dodatkom specifičnih sojeva bakterije *M. genitalium* osjetljivih na makrolide i rezistentnih na makrolide bez interferirajuće tvari, dok NMC odgovara negativnim matricama bez interferirajuće tvari niti dodanih mikroorganizama/ referentnog materijala. Dobiveni su sljedeći rezultati:

Vaginalna matrica		
Naziv tvari	Testirana koncentracija	Rezultat
PMC	-	n.a.
NMC	-	n.a.
Aciklovir	6,60E-02 mg/mL	N.I.
Metronidazol	1,23E-01 mg/mL	N.I.
Klotrimazol	2,50E+00 mg/mL	N.I.

Mikonazol nitrat	2,50E+00 mg/mL	N.I.
Kontracepcijski gel Conceptrol (nonoksinol-9)	2,50E+00 mg/mL	N.I.
Tiokonazol	2,50E+00 mg/mL	N.I.
Leukociti/monociti	2,00E+06 stanica/mL	N.I.
Premeno Duo (hijaluronska kiselina i mliječna kiselina)	2,50E+00 mg/mL	N.I.
Dezodorans u spreju za žene	5,00E+01 µL/mL	N.I.
Tekući lubrikant za rodnicu – na bazi vode, Durex Frescor	5,00E+01 µL/mL	N.I.
Lubrikant za rodnicu – na bazi ulja, SOIVRE Intim Oil	5,00E+01 µL/mL	N.I.
Vaginalna krema DermoVagisil	2,50E+00 mg/mL	N.I.
Gel za hemoroide HEMOAL Preparation H	2,50E+00 mg/mL	N.I.
Estradiol	7,50E-03 ng/mL	N.I.
Progesteron	6,00E+00 ng/mL	N.I.
Sjemeni tekućina	5 %	N.I.
Puna krv	1 %	N.I.

Tablica 35. Potencijalno interferirajuće tvari u vaginalnoj matrici. N.I.: Nema prijavljene interferencije / I: Interferencija, n.a. = nije primjenjivo.

Muški urin		
Naziv tvari	Testirana koncentracija	Rezultat
PMC	-	n.a.
NMC	-	n.a.
Ibuprofen	2,19E-01 mg/mL	N.I.
Naproksen	3,60E-01 mg/mL	N.I.
Amoksisilin	5,40E-02 mg/mL	N.I.
Azitromicin	1,10E-02 mg/mL	N.I.
Ceftriakson	8,40E+01 mg/dL	N.I.
Eritromicin	1,38E-01 mg/mL	N.I.
Metronidazol	1,23E-01 mg/mL	N.I.
Sulfametoksazol	1,12E+00 mg/mL	N.I.
Tetraciklin hidroklorid	2,40E-02 µg/mL	N.I.
Trimetoprim	4,20E-02 µg/mL	N.I.
Albumin	1,00E+01 mg/mL	N.I.
Bilirubin	4,00E-01 mg/mL	N.I.
Glukoza (dekstroza)	1,00E+01 mg/mL	N.I.
Leukociti/monociti	2,00E+06 stanica/mL	N.I.
Nizak pH (HCl)	n.a.	N.I.
Visok pH (NaOH)	n.a.	N.I.
Sjemeni tekućina	5 %	N.I.
Urea	1,20E+00 mg/mL	N.I.

Muški urin		
Naziv tvari	Testirana koncentracija	Rezultat
Mokraćna kiselina	2,35E-01 mg/mL	N.I.
Puna krv	1 %	I.*
	0,25 %	N.I.
	0,125 %	N.I.
Antocijanini (brusnica <i>Vaccinium macrocarpon</i>)	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.
Fenazopiridin hidroklorid	1,60E-01 mg/mL	N.I.
Salicilna kiselina	1,50E-01 mg/mL	N.I.

Tablica 36. Potencijalno interferirajuće tvari u muškoj urinarnoj matrici. N.I.: Nema prijavljene interferencije / I: Interferencija, n.a. = nije primjenjivo.

* Inhibicija uočena samo za cilj bakterije *Mycoplasma genitalium* rezistentne na makrolide.

Ženska urinarna matrica		
Naziv tvari	Testirana koncentracija	Rezultat
PMC	-	n.a.
NMC	-	n.a.
Ibuprofen	2,19E-01 mg/mL	N.I.
Naproxen	3,60E-01 mg/mL	N.I.
Amoksicilin	5,40E-02 mg/mL	N.I.
Azitromicin	1,10E-02 mg/mL	N.I.
Ceftriakson	8,40E+01 mg/dL	N.I.
Eritromicin	1,38E-01 mg/mL	N.I.
Metronidazol	1,23E-01 mg/mL	N.I.
Sulfametoksazol	1,12E+00 mg/mL	N.I.
Tetraciklin hidroklorid	2,40E-02 µg/mL	N.I.
Trimetoprim	4,20E-02 µg/mL	N.I.
Albumin	1,00E+01 mg/mL	N.I.
Bilirubin	4,00E-01 mg/mL	N.I.
Glukoza (dekstroza)	1,00E+01 mg/mL	N.I.
Leukociti/monociti	2,00E+06 stanica/mL	N.I.
Niski pH (HCl) 4	n.a.	I.*
Niski pH (HCl) 5	n.a.	I.*
Niski pH (HCl) 6	n.a.	N.I.
Visok pH (NaOH)	n.a.	N.I.
Sjemena tekućina	5 %	N.I.
Urea	1,20E+00 mg/mL	N.I.
Mokraćna kiselina	2,35E-01 mg/mL	N.I.

Ženska urinarna matrica		
Naziv tvari	Testirana koncentracija	Rezultat
Puna krv	1 %	N.I.
Antocijanini (brusnica <i>Vaccinium macrocarpon</i>)	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.
Fenazopiridin hidroklorid	1,60E-01 mg/mL	N.I.
Salicilna kiselina	1,50E-01 mg/mL	N.I.
17- α etinilestradiol	7,50E-03 ng/mL	N.I.
Noretindron	1,60E+01 ng/mL	N.I.
Dezodorans u spreju za žene	5,00E+01 μ L/mL	N.I.

Tablica 37. Potencijalno interferirajuće tvari u ženskoj urinarnoj matrici. N.I.: Nema prijavljene interferencije / I: Interferencija, n.a. = nije primjenjivo.

* Inhibicija uočena samo za cilj bakterije *Mycoplasma genitalium* osjetljive na makrolide.

U zaključku, na VIASURE *Mycoplasma genitalium* with *Macrolide Resistance Assay* for BD MAX™ System testirane su različite potencijalno interferirajuće tvari, endogene i egzogene. Dobiveni rezultati navode na zaključak da pri testiranim koncentracijama nije uočena interferencija bilo koje od ocijenjenih tvari.

12.5.2. Analitička reaktivnost

Analitička reaktivnost može se definirati kao postotak ciljnih sojeva mikroba ili uzoraka DNA/RNA koji daju ispravan pozitivan rezultat. Analitička reaktivnost proučavana je *in silico* i eksperimentalna ispitivanja.

Analiza *in silico* analitičke reaktivnosti

Analitička reaktivnost VIASURE *Mycoplasma genitalium* with *Macrolide Resistance Assay* for BD MAX™ System procijenjena je korištenjem javno dostupne baze podataka o nukleotidnim sekvencama kao što je NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) i internog softvera za bioinformatičku analizu kako bi se pokazalo da se ciljni geni mogu ispravno detektirati ispitivanim proizvodom. *In silico* analiza dizajna početnica i sonde provedena je kroz usklađivanje s ukupno 2399 analiziranom sekvencom (sekvence preuzete iz baze podataka s uklonjenim duplikatima). Dobiveni rezultati prikazani su u sljedećoj tablici:

<i>Mycoplasma genitalium</i>					
Gen	Usklađene sekvence: 486				
	Bez nepodudaranja	S nepodudaranjem	Sekvence s potvrđenom detekcijom	Sekvence bez detekcije	Sekvence s nepoznatom detekcijom
<i>Adhezin MgPa</i>	74,07 %	25,93 %	74,07 %	0 %	25,93 %*

<i>Mycoplasma genitalium</i>					
Gen	Usklađene sekvence: 17				
	Bez nepodudaranja	S nepodudaranjem	Sekvence s potvrđenom detekcijom	Sekvence bez detekcije	Sekvence s nepoznatom detekcijom
<i>23S rRNA</i>	82,35 %	17,65 %	100 %	0 %	0 %

Tablica 38. Test analitičke reaktivnosti *in silico*. „Usklađene sekvence” = broj usklađenih sekvenci bez ili s nepodudaranjem iz ukupnog broja analiziranih sekvenci, „Sekvence s potvrđenom detekcijom” = sekvence bez nepodudaranja ili eksperimentalno analizirane sekvence čija je detekcija zajamčena, „Sekvence bez detekcije” = sekvence prethodno *in silico* analizirane čija se eksperimentalna detekcija ne može zajamčiti zbog prethodnih negativnih eksperimentalnih dokaza, „Sekvence s nepoznatom detekcijom” = sekvence prethodno *in silico* analizirane čija se eksperimentalna detekcija ne može zajamčiti zbog nedostatka eksperimentalnih dokaza.

*Valja napomenuti da je 20,78 % ukupnog broja usklađenih sekvenci (101/486) pokazalo nebitna nepodudaranja za koja se smatra da su otkrivena.

Ukratko, analiza inkluzivnosti pokazala je ispravnu detekciju gena *MgPA adhezina* i *23S rRNA* bakterije *M. genitalium* s VIASURE *Mycoplasma genitalium* with *Macrolide Resistance Assay* for BD MAX™ System.

Eksperimentalno ispitivanje analitičke reaktivnosti

Analitička reaktivnost VIASURE *Mycoplasma genitalium* with *Macrolide Resistance Assay* for BD MAX™ System za bakteriju *Mycoplasma genitalium* procijenjena je u odnosu na DNA sljedećih sojeva, pokazujući pozitivne rezultate:

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

12.6. Metrološka sljedivost

Ovaj test nije osmišljen u svrhe mjerenja.

13. Značajke kliničke učinkovitosti

Kliničke performanse VIASURE *Mycoplasma genitalium* with *Macrolide Resistance Assay* for BD MAX™ System testirane su na uzorcima vaginalnih briseva i urina. Dobiveni su sljedeći rezultati:

	Centar	Vrsta uzorka	Hodogram	Cilj
1	Certest Biotec S.L. u suradnji s Hospital Universitario Miguel Servet (Zaragoza, Španjolska)	Vaginalni brisevi	Komplet BD MAX™ ExK™ TNA-3 + sustav BD MAX™ System	<i>Mycoplasma genitalium</i> osjetljiva na makrolide
				<i>Mycoplasma genitalium</i> rezistentna na makrolide
2	Certest Biotec S.L. (Zaragoza, Španjolska) koristeći uzorke iz Cerba Xpert	Urin	Komplet BD MAX™ ExK™ TNA-3 + sustav BD MAX™ System	<i>Mycoplasma genitalium</i> osjetljiva na makrolide
				<i>Mycoplasma genitalium</i> rezistentna na makrolide

Tablica 39. Mjesto, vrsta uzorka, radni proces i cilj.

Istinski pozitivne i negativne vrijednosti, lažne pozitivne i negativne vrijednosti, vrijednosti osjetljivosti i specifičnosti, pozitivne prediktivne vrijednosti (PPV), negativne prediktivne vrijednosti (NPV) i omjeri vjerojatnosti (LR) za VIASURE *Mycoplasma genitalium with Macrolide Resistance Assay* for BD MAX™ System izračunate su u odnosu na svaki komparativni test kako je prikazano u sljedećoj tablici:

Centar	Komparatorski test	Cilj	TP	TN	FP	FN	Osjetljivost	Specifičnost	PPV	NPV	LR+	LR-
1	Allplex™ MG & AziR Assay (Seegene)	MG rezistentna na makrolide	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 osjetljiva na makrolide	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 rezistentna na makrolide	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 osjetljiva na makrolide	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)

Tablica 40. Istinski pozitivne (TP) i negativne (TN) vrijednosti, lažno pozitivne (FP) i lažno negativne (FN) vrijednosti, osjetljivost, specifičnost, pozitivne prediktivne vrijednosti (PPV), negativne prediktivne vrijednosti (NPV) i omjeri vjerojatnosti (LR) za VIASURE *Mycoplasma genitalium with Macrolide Resistance Assay* for BD MAX™ System.

U zaključku, rezultati pokazuju visoku podudarnost u detekciji bakterije *Mycoplasma genitalium* osjetljive na makrolide i bakterije *Mycoplasma genitalium* rezistentne na makrolide korištenjem VIASURE *Mycoplasma genitalium with Macrolide Resistance Assay* for BD MAX™ System.

14. Sažetak sigurnosti i učinkovitosti

Sažetak sigurnosti i učinkovitosti testa VIASURE *Mycoplasma genitalium with Macrolide Resistance Assay* for BD MAX™ System može se preuzeti s web-stranice: certest.es/viasure/labeling. Taj sažetak također se nalazi na web-stranici EUDAMED (<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>).

Literatura

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>

Simboli za IVD komponente i reagense

 <i>In vitro</i> dijagnostički uređaj	 Čuvati na suhom	 Rok valjanosti	 Proizvođač	 Šifra serije
 Pogledajte upute za uporabu	 Ograničenje temperature	 Sadržaj dovoljan za <n> test(ova)	 Jedinstveni identifikacijski broj uređaja	 Kataloški broj
 CE oznaka	 Držite podalje od sunčeve svjetlosti			

Robni žigovi

BD MAX™ je registrirani zaštitni znak kompanije Becton, Dickinson and Company.

Zadržana prava na promjenu. Sva prava pridržana. © Certest Biotec, S.L.

Svi drugi robni žigovi koji se mogu pojaviti u ovoj uputi o lijeku vlasništvo su njihovih vlasnika.



Certest Biotec, S.L.

Po. Industrial Río Gállego II, Calle J, N° 1, 50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (Španjolska)

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

Podaci o australskom naručitelju:

Becton Dickinson Pty Ltd., 66 Waterloo Road.

Macquarie Park NSW 2113, Australija

Podaci o novozelandskom naručitelju:

Becton Dickinson Limited, 14B George Bourke Drive.

Mt. Wellington Auckland 1060, Novi Zeland

Kontrola promjene		
Verzija br.	Promjene	Datum
00	Izvorna verzija. Ova verzija je prijevod izvornog dokumenta engleski: IUo-444224en0226.00	18/02/2026

Tablica A2. Tablica kontrole promjene.

Revizija: 18. veljače 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.