

Real Time PCR Detection Kit

Mycoplasma genitalium with Macrolide Resistance
Assay for BD MAX™ System

Istruzioni per l'uso

CE IVD
2797

Le presenti istruzioni per l'uso si applicano ai seguenti codici di riferimento:

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

Tabella A1. Codice del prodotto da usare con 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.

Se la propria lingua non è presente nell'elenco, consultare il sito web **certest.es/viasure/labeling**. Se la propria lingua non è presente sul sito web, contattare viasure@certest.es.

Nota: l'utilizzatore deve segnalare al produttore e alle autorità competenti dello Stato membro in cui si trova come utilizzatore e/o paziente qualunque grave incidente relativo al prodotto.

Contenuto

1.	Destinazione d'uso.....	6
2.	Introduzione e spiegazione.....	6
3.	Principio della procedura.....	8
4.	Reagenti forniti.....	9
5.	Reagenti e strumenti necessari e non inclusi.....	9
6.	Condizioni di trasporto, conservazione e utilizzo.....	10
7.	Precauzioni per gli utilizzatori.....	10
8.	Procedura di test.....	12
8.1.	Raccolta, trasporto e conservazione dei campioni.....	12
8.2.	Preparazione del campione ed estrazione del DNA.....	13
8.3.	Protocollo PCR.....	13
8.3.1.	Creazione del programma di test PCR per VIASURE <i>Mycoplasma genitalium with Macrolide Resistance Assay</i> for BD MAX™ System.....	13
8.3.2.	Preparazione della griglia BD MAX™.....	18
8.3.3.	Configurazione dello strumento BD MAX™.....	19
8.3.4.	Report dei risultati di BD MAX™.....	20
9.	Interpretazione dei risultati.....	20
10.	Limiti del test.....	25
11.	Controllo di qualità.....	27
12.	Caratteristiche delle prestazioni analitiche.....	27
12.1.	Linearità analitica.....	27
12.2.	Sensibilità analitica. Limite di rivelabilità (LoD).....	29
12.3.	Intervallo di misurazione.....	30
12.4.	Accuratezza.....	30
12.4.1.	Esattezza.....	30
12.4.2.	Precisione.....	32
12.5.	Specificità analitica e reattività analitica.....	38
12.5.1.	Specificità analitica.....	38

12.5.2. Reattività analitica	45
12.6. Tracciabilità metrologica	46
13. Caratteristiche di prestazione clinica	46
14. Sintesi relativa alla sicurezza e alle prestazioni	47
Bibliografia.....	48
Simboli per reagenti e componenti IVD	48
Marchi commerciali.....	48

ITALIANO

1. Destinazione d'uso

VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System è un test qPCR automatizzato concepito per il rilevamento qualitativo del DNA di *Mycoplasma genitalium* e di specifiche mutazioni puntiformi (conferite da sostituzioni di basi nel *23S rRNA*) coinvolte nella resistenza ai macrolidi in tamponi vaginali e campioni di urina maschile e femminile, raccolti da pazienti con sospetta infezione da *M. genitalium* secondo il parere del loro medico (HCP). L'uso previsto di questo test è quello di facilitare la diagnosi di un'infezione da *M. genitalium* e il rilevamento della potenziale resistenza ai macrolidi in combinazione con i segni clinici e i sintomi del paziente e/o i fattori di rischio epidemiologico. I risultati positivi indicano la presenza dell'acido nucleico (NA) target, ma non escludono la presenza dell'acido nucleico di altri patogeni non rilevati dal test. I risultati negativi non escludono la presenza degli acidi nucleici target e non devono essere usati come unica base per il trattamento o per altre decisioni riguardanti la gestione del paziente. Questo test utilizza BD MAX™ System per l'estrazione automatizzata del DNA e la successiva qPCR avvalendosi dei reagenti forniti in combinazione con i reagenti universali e i materiali di consumo per BD MAX™ System. Il DNA viene estratto dai campioni, amplificato mediante test qPCR e identificato mediante l'uso di primer specifici e sonde marcate con un colorante fluorescente specifico per *M. genitalium* e mutazioni nel gene *23S rRNA* associate alla resistenza ai macrolidi.

Il prodotto deve essere utilizzato da personale di laboratorio clinico qualificato e addestrato, specificamente istruito e formato riguardo a tecniche di PCR in tempo reale e procedure diagnostiche in vitro; la formazione deve includere anche lo strumento di PCR in tempo reale (termociclatore) e il sistema di estrazione degli acidi nucleici.

2. Introduzione e spiegazione

Le infezioni sessualmente trasmissibili (IST) rappresentano un grave problema di salute pubblica a livello mondiale, in quanto influiscono sulla qualità della vita e provocano gravi morbilità e mortalità.

Il *Mycoplasma genitalium* (MG) è una causa comune di uretrite non gonococcica (NGU) e uretrite non causata da clamidia negli uomini e di cervicite nelle donne, e si ritiene sia associato a malattia infiammatoria pelvica, infertilità e parto pretermine (Baumann et al., 2018; Jensen et al., 2022; van der Schalk et al., 2020). Il MG è un organismo a forma di fiasco con un organello terminale leggermente ricurvo, in grado di provocare infiammazione nel tratto urogenitale aderendo alle cellule epiteliali ospiti e provocando segnali infiammatori acuti attraverso recettori dell'immunità innata altamente espressi (Gnanadurai & Fifer, 2020). Questo microrganismo è un organismo a crescita lenta noto per essere il procariote più piccolo in grado di replicarsi in modo indipendente, che si è diffuso nelle ultime decadi come patogeno a trasmissione sessuale a causa della sua capacità di colonizzare l'apparato riproduttivo maschile e femminile (Gnanadurai & Fifer, 2020;

Jensen et al., 2022). L'infezione da MG durante la gravidanza è stata associata al parto pretermine e potrebbe svolgere un ruolo nell'aborto spontaneo precoce e nelle infezioni neonatali (Heavey, 2017). Può coesistere con *Chlamydia trachomatis* e altre infezioni sessualmente trasmissibili, rendendo difficile determinare i suoi effetti indipendenti (Heavey, 2017).

I macrolidi sono una classe di farmaci utilizzati per la gestione e il trattamento di varie infezioni batteriche, come polmonite, sinusite, faringite, tonsillite, infezioni cutanee senza complicanze e otite media o infezione da *Helicobacter pylori*, ma sono anche usati comunemente per trattare le infezioni sessualmente trasmissibili come le infezioni gonococciche e da clamidia (Patel & Hashmi, 2023). Il meccanismo d'azione consiste nel legarsi alla subunità ribosomiale batterica 50S (vicino al sito della peptidil-transferasi (regione V)) o ai residui A2058 e A2059 (numerazione di *Escherichia coli*) di *23S rRNA*, provocando l'interruzione della sintesi proteica batterica (van der Schalk et al., 2020).

Il problema crescente della resistenza ai macrolidi è motivo di grande preoccupazione, con tassi di resistenza a livello mondiale compresi tra il 30% e il 100% (Gnanadurai & Fifer, 2020). I batteri sviluppano la resistenza ai macrolidi principalmente attraverso due meccanismi: i polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) e la metilazione dell'rRNA. Tuttavia, poiché il MG è privo degli enzimi necessari per la metilazione, può sviluppare la resistenza solo attraverso la modificazione del target tramite SNP (van der Schalk et al., 2020). Spesso la resistenza deriva da una singola mutazione della base nella posizione A2058 o A2059 (sulla base della numerazione di *Escherichia coli*) nel *23S rRNA*, con un impatto minimo sulla vitalità batterica, consentendo una trasmissione continua (Gnanadurai & Fifer, 2020). L'azitromicina è il macrolide usato più comunemente per trattare le infezioni da MG, sebbene ora vengano raccomandate anche la josamicina e la pristinamicina (Gnanadurai & Fifer, 2020; Jensen et al., 2022; van der Schalk et al., 2020).

La coltivazione del MG è difficile poiché la crescita richiede settimane o mesi, rendendo impraticabili i test standard di suscettibilità. Sebbene i test di suscettibilità agli antibiotici utilizzando ceppi di MG coltivati in colture cellulari Vero abbiano prodotto risultati simili ai metodi tradizionali di diluizione in brodo, questo approccio non è fattibile per i laboratori di diagnosi primaria o per la maggior parte dei laboratori di riferimento (Gnanadurai & Fifer, 2020).

A causa dell'assenza della parete cellulare, il MG non è visibile sulle secrezioni genitali con colorazione di Gram. Inoltre, i test sierologici basati sugli anticorpi non sono affidabili a causa della reattività crociata con altri micoplasmi, tra cui *Mycoplasma pneumoniae* (Gnanadurai & Fifer, 2020). Tuttavia, i test di amplificazione degli acidi nucleici (NAAT) come la reazione a catena della polimerasi e l'amplificazione mediata da trascrizione, forniscono un rilevamento accurato del MG (Baumann et al., 2018; Heavey, 2017; Jensen et al., 2022). I NAAT possono essere eseguiti su diversi tipi di campioni genitali, ma i tamponi vaginali per le donne e i campioni di urina di prima minzione per gli uomini sembrano fornire i migliori risultati per testare la presenza del MG (Heavey, 2017). A causa dell'elevato tasso di resistenza antimicrobica, si raccomanda di eseguire test simultanei di resistenza genotipica per indirizzare il trattamento appropriato (Gnanadurai & Fifer, 2020).

3. Principio della procedura

VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System è concepito per il rilevamento qualitativo simultaneo e la differenziazione del DNA di *Mycoplasma genitalium* e di specifici marcatori genetici associati alla sensibilità e alla resistenza ai macrolidi in tamponi vaginali e campioni di urina maschile e femminile. Dopo l'isolamento del DNA, l'identificazione di *M. genitalium* e dei marcatori genetici di sensibilità e resistenza ai macrolidi avviene mediante l'amplificazione di una regione specifica del gene *adesina MgPa* di *M. genitalium* e del gene *23S rRNA*, le cui specifiche mutazioni puntiformi sono coinvolte nella sensibilità e nella resistenza ai macrolidi, utilizzando primer specifici e sonde marcate a fluorescenza. La popolazione target del test comprende soggetti con segni o sospetta infezione sessualmente trasmissibile, partner sessuali di soggetti con infezione da *M. genitalium* diagnosticata e popolazioni ad alto rischio, come uomini che hanno rapporti sessuali con altri uomini (MSM), soggetti affetti da HIV e pazienti seguiti da cliniche di salute sessuale.

VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System si basa sull'attività esonucleasica 5' della DNA polimerasi. Durante l'amplificazione del DNA, questo enzima idrolizza la sonda legata alla sequenza complementare di DNA, separando il quencher dal marcatore. Questa reazione genera un'amplificazione del segnale fluorescente che è proporzionale alla quantità di template target. Questa fluorescenza viene misurata sul sistema BD MAX™.

VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System contiene in ciascuna provetta tutti i componenti necessari per un test PCR in tempo reale (sonde/primer specifici, dNTPs, tampone, polimerasi) in formato stabilizzato¹, oltre a un controllo interno endogeno (EIC) (gene *RNAse P umano*) per controllare l'integrità del campione, monitorare il processo di estrazione e/o escludere l'inibizione dell'attività della polimerasi. I geni costitutivi umani sono coinvolti nel mantenimento di base delle cellule e, pertanto, ci si aspetta che siano presenti in tutte le cellule umane nucleate e che mantengano livelli di espressione relativamente costanti.

Target	Canale	Gene
Resistenza ai macrolidi	475/520 (FAM)	<i>23S rRNA</i>
Sensibilità ai macrolidi	530/565 (HEX)	<i>23S rRNA</i>
<i>Mycoplasma genitalium</i>	585/630 (ROX)	<i>Adesina MgPa</i>
Controllo interno endogeno (EIC)	680/715 (Cy5.5)	<i>RNAse P</i>

Tabella 1. Target, canale e geni.

¹ Si prega di notare che i termini "stabilizzato" e "liofilizzato" sono utilizzati in modo identico e come sinonimi in tutto il documento.

4. Reagenti forniti

VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System include i seguenti materiali e reagenti illustrati nella Tabella 2:

Reagente/Materiale	Descrizione	Intervallo di concentrazione	Codice	Quantità
<i>Mycoplasma genitalium</i> with Macrolide Resistance reaction tube	Lioprotettori e stabilizzatori	±6 g/100 mL*	Sigillo 1F	2 confezioni da 12 provette trasparenti
	Nucleotidi trifosfato (dNTPs)	±1 mM*		
	Primer e sonde	0,2-1 nMol/μL*		
	Enzimi	10-100 U/reaz.*		
Rehydration Buffer tube	Miscela di soluzione fisiologica	±13 mM	Sigillo 11	1 confezione da 24 provette trasparenti
	Tampone (TRIS, pH)	±67 mM		

Tabella 2. Reagenti e materiali forniti con VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System con Cat. N. 444224.

* Per i componenti in formato stabilizzato, l'intervallo di concentrazione è inteso post-reidratazione.

5. Reagenti e strumenti necessari e non inclusi

Nel seguente elenco sono riportati i materiali necessari per l'uso e non inclusi in VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System.

- Strumento per PCR in tempo reale: BD MAX™ System (Cod.: 441916).
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Cod.: 442827 o 442828).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Cod.: 437519).
- Vortex.
- Micropipette (tra i 2 e i 1000 μL).
- Acqua priva di nucleasi.
- Punte con filtro.
- Guanti monouso privi di talco.

Opzionale:

- I materiali del controllo esterno possono essere utilizzati nell'ambito della procedura di controllo di qualità del test. I materiali di controllo disponibili in commercio e/o i campioni precedentemente caratterizzati come positivi o negativi possono essere utilizzati come controllo positivo esterno (EPC) o controllo negativo esterno (ENC), rispettivamente. La selezione e la validazione di EPC ed ENC devono essere effettuate in conformità con le normative locali, statali e/o federali applicabili e con le procedure standard di controllo di qualità del laboratorio. Inoltre, quando si utilizzano materiali di controllo disponibili in commercio, l'utilizzatore deve attenersi alle relative istruzioni per l'uso.

6. Condizioni di trasporto, conservazione e utilizzo

- I kit possono essere trasportati e conservati a 2-30°C fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta del kit.
- Onde evitare versamenti di liquido, evitare vibrazioni durante il trasporto.
- Dopo l'apertura delle confezioni in alluminio che contengono le provette di reazione, il prodotto può essere utilizzato fino a un massimo di 28 giorni a 2-30°C. Conservare la fiala al riparo dalla luce.

La tabella seguente riepiloga le condizioni generali di trasporto, conservazione e utilizzo del kit e di ciascun componente:

Componente	Condizioni di trasporto	Condizioni di conservazione	Condizioni di utilizzo
Kit completo VIASURE <i>Mycoplasma genitalium</i> with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System	2-30°C durante il periodo di conservazione indicato sull'etichetta del kit.	Prima dell'uso: 2-30°C durante il periodo di conservazione indicato sull'etichetta del kit.	* Fare riferimento alla condizioni di utilizzo di ciascun componente.
<i>Mycoplasma genitalium</i> with Macrolide Resistance reaction tube (sigillo 1F)		Prima dell'uso: 2-30°C durante il periodo di conservazione indicato sull'etichetta del kit. Dopo apertura della confezione con gel di silice: 2-30°C fino a 28 giorni.	Temperatura ambiente.
Rehydration Buffer tube		Prima dell'uso: 2-30°C durante il periodo di conservazione indicato sull'etichetta del kit. Dopo apertura della confezione con gel di silice: 2-30°C fino a 28 giorni.	Temperatura ambiente.

Tabella 3. Riepilogo delle condizioni di trasporto, conservazione e utilizzo di VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System e di ciascun componente.

7. Precauzioni per gli utilizzatori

- Il prodotto è destinato all'uso di personale di laboratorio clinico qualificato e addestrato, con una specifica formazione nell'esecuzione di tecniche di PCR in tempo reale e di procedure di diagnostica *in vitro*.
- Per uso diagnostico *in vitro*.
- Le Istruzioni per l'uso del prodotto VIASURE e il Manuale utente di BD MAX™ System vanno letti con attenzione prima di utilizzare VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System. Eseguire il test soltanto dopo aver compreso le informazioni sulle procedure, le precauzioni di sicurezza e le limitazioni ivi riportate.
- Non utilizzare reagenti e/o materiali scaduti.
- Non utilizzare il kit se l'etichetta che sigilla la scatola esterna è rotta.
- Non utilizzare i reagenti se all'arrivo la scatola protettiva è aperta o rotta.
- Non utilizzare i reagenti se all'arrivo la confezione protettiva è aperta o rotta.
- Non utilizzare i reagenti se all'interno della loro confezione il materiale essiccante non è presente o è rotto.
- Non rimuovere il materiale essiccante dalla confezione dei reagenti.

- Non utilizzare i reagenti se il sigillo metallico è rotto o danneggiato.
- Non mescolare reagenti di diverse confezioni e/o kit e/o lotti.
- Per proteggere la master mix dalla luce solare, dopo ogni utilizzo richiudere immediatamente la confezione protettiva dei reagenti con la chiusura a zip. Rimuovere l'aria in eccesso dalle confezioni prima di sigillarle.
- Proteggere i reagenti dall'umidità. L'esposizione prolungata all'umidità può influire sulle prestazioni del prodotto.
- Per evitare il deterioramento dell'etichetta, non utilizzare il prodotto vicino a solventi.
- Se la miscela di reazione in formato stabilizzato, normalmente presente in fondo alla provetta, ha un aspetto diverso da quello solito (senza forma conica, non omogenea, più piccola/più grande e/o di colore differente dal biancastro) non altera la funzionalità del test.
- Assicurarsi che la provetta di reazione e la provetta del tampone di reidratazione siano innestate saldamente in posizione durante l'allestimento della griglia BD MAX™.
- Nel caso in cui vengano eseguiti altri test PCR nella stessa area del laboratorio, assicurarsi che VIASURE *Mycoplasma genitalium with Macrolide Resistance Assay* for BD MAX™ System, il kit di estrazione BD MAX™ ExK™ TNA-3, i reagenti aggiuntivi richiesti per il test e il BD MAX™ System non siano contaminati. Evitare sempre la contaminazione dei reagenti con microbi e ribonucleasi (RNasi)/desossiribonucleasi (DNasi). Si consiglia l'uso di puntali per pipette di trasferimento positivi o resistenti agli aerosol e privi di RNasi/DNasi. Usare un nuovo puntale per ogni campione. È necessario cambiarsi i guanti prima di manipolare reagenti e cartucce (BD MAX™ PCR Cartridge).
- Per evitare la contaminazione dell'ambiente da parte di amplicon, non disassemblare la BD MAX™ PCR Cartridge dopo l'uso. I sigilli della BD MAX™ PCR Cartridge sono progettati per prevenire la contaminazione.
- Progettare un flusso di lavoro unidirezionale. Deve iniziare nell'area di estrazione e poi spostarsi nell'area di amplificazione e rilevamento. Non riportare campioni, strumenti e reagenti nell'area in cui è stato eseguito il passaggio precedente.
- Rispettare le buone pratiche di laboratorio. Indossare indumenti protettivi e utilizzare guanti monouso, occhialini e mascherina. Non mangiare, bere, fumare o applicare prodotti cosmetici all'interno dell'area di lavoro. Lavarsi le mani al termine del test. Evitare la contaminazione e il contatto con la pelle, gli occhi e gli indumenti.
- I campioni devono essere trattati come potenzialmente infettivi e/o a rischio biologico, così come i reagenti e i materiali che sono stati esposti ai campioni e devono essere gestiti nel rispetto delle normative di sicurezza nazionali. Prendere le precauzioni necessarie durante la raccolta, il trasporto, la conservazione, la manipolazione e lo smaltimento dei campioni.
- I campioni e i reagenti devono essere manipolati in una cappa di biosicurezza. Usare dispositivi di protezione individuale (DPI) compatibili con le linee guida correnti per la manipolazione dei campioni potenzialmente infettivi. Smaltire i rifiuti in conformità ai regolamenti locali e nazionali.

- Si raccomanda una decontaminazione degli strumenti utilizzati abitualmente, soprattutto le micropipette e le superfici di lavoro.
- In conformità al Regolamento (CE) n. 1907/2006 (REACH), i VIASURE Assays for BD MAX™ System non richiedono una scheda di dati sulla sicurezza dei materiali vista la classificazione come non pericolosi per la salute e per l'ambiente, poiché non contengono sostanze e/o miscele che soddisfano i criteri di classificazione dei rischi riportati nel Regolamento (CE) n. 1272/2008 (CLP) o presenti a concentrazioni superiori al valore definito nel regolamento sopra menzionato in base alla relativa dichiarazione. È possibile richiedere a Certest Biotec S.L. una dichiarazione in cui si afferma che non è richiesta la scheda sulla sicurezza dei materiali.
- Assicurarsi che la definizione del programma di test PCR sul BD MAX™ System sia eseguita attenendosi alle istruzioni riportate nella sezione "Protocollo PCR" (parametri di estrazione del campione, codici a barre personalizzati, impostazioni PCR, ecc.).
- Consultare il manuale utilizzatore del BD MAX™ System per maggiori informazioni su avvertenze, precauzioni e procedure.
- Il certificato di analisi non è incluso nel dispositivo. In caso di necessità, può essere scaricato dal sito web di Certest Biotec S.L. (www.certest.es).

8. Procedura di test

8.1. Raccolta, trasporto e conservazione dei campioni

VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System è stato testato su campioni di tamponi vaginali raccolti da personale medico utilizzando Copan eSwab® (Liquid Amies Elution Swab di Copan) e su campioni di urina maschile e femminile di prima minzione autoprelevati in contenitori per campioni sterili senza conservanti. Altri tipi di campioni devono essere convalidati dall'utilizzatore.

Il prelievo, la conservazione e il trasporto dei campioni devono rispettare le condizioni convalidate dall'utilizzatore. In generale, i campioni clinici devono essere raccolti ed etichettati in modo appropriato in contenitori puliti con o senza mezzo di trasporto (a seconda del tipo di campione). Dopo il prelievo, i campioni devono essere messi in un sacchetto per materiale a rischio biologico e devono essere trasportati e processati il prima possibile per garantire la qualità del test. I campioni inviati per il test molecolare devono essere conservati in condizioni controllate, in modo che gli acidi nucleici non si degradino durante la conservazione. Devono essere evitati cicli ripetuti di congelamento-scongelo per prevenire il deterioramento del campione e degli acidi nucleici.

I campioni clinici devono essere prelevati, trasportati e conservati secondo le linee guida di laboratorio e/o i manuali di gestione di laboratorio appropriati.

È stato condotto uno studio interno sulla stabilità dei campioni con VIASURE *Mycoplasma genitalium* with *Macrolide Resistance Assay* for BD MAX™ System utilizzando una matrice vaginale negativa raccolta in Copan eSwab® e una matrice di urina femminile e maschile addizionata con il ceppo di riferimento sensibile ai macrolidi (Amplirun® Total Macrolide Resistant MGE Control) a una concentrazione di 3xLoD. La stabilità è stata analizzata mediante due test diversi: stabilità primaria (25°C: 4 ore e 2 giorni; 4°C: 1 e 2 giorni; -20°C: 12 mesi) e stabilità annidata. Per il test di stabilità annidata, i campioni incubati a 25°C per 4 ore e i campioni incubati a 4°C per 1 giorno sono stati analizzati 3 giorni dopo l'aggiunta alla provetta del tampone campione (SBT); i campioni incubati a 25°C per 2 giorni e i campioni incubati a 4°C per 2 giorni sono stati analizzati 7 giorni dopo l'aggiunta alla SBT. Inoltre, i campioni sono stati analizzati dopo cinque cicli di congelamento (a -80°C) e scongelamento (a 25°C). I risultati hanno mostrato buone prestazioni dei campioni conservati in tutte le condizioni di test, conformemente ai criteri di accettabilità stabiliti inizialmente.

8.2. Preparazione del campione ed estrazione del DNA

Preparare il campione nel rispetto delle raccomandazioni presenti nelle istruzioni per l'uso del kit di estrazione BD MAX™ ExK™ TNA-3.

1. Pipettare 400 µL di tampone vaginale o 750 µL di campione di urina in una BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube e chiudere la provetta con un tappo perforabile. Effettuare una miscelazione completa del campione vortexandolo ad alta velocità per 1 minuto. Proseguire con l'azionamento del BD MAX™ System Operation.

Nota: assicurarsi che l'utilizzo del vortex avvenga pochi minuti prima dell'avvio del ciclo. Se si utilizza lo stesso BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube per ripetere il test, si raccomanda di agitare manualmente la provetta per alcuni minuti prima di avviare il test per garantire un'omogeneizzazione corretta del campione.

Le procedure di preparazione dell'estrazione per applicazioni specifiche devono essere sviluppate e convalidate dall'utilizzatore e altri tipi di campioni potrebbero richiedere un pretrattamento.

8.3. Protocollo PCR

Nota: consultare il manuale utilizzatore del BD MAX™ System per istruzioni dettagliate.

8.3.1. Creazione del programma di test PCR per VIASURE *Mycoplasma genitalium* with *Macrolide Resistance Assay* for BD MAX™ System

Nota: se è già stato creato il test per VIASURE *Mycoplasma genitalium* with *Macrolide Resistance Assay* for BD MAX™ System, è possibile saltare il passaggio 8.3.1 e andare direttamente all'8.3.2.

- 1) Nella schermata "Run" (Esegui) del BD MAX™ System, selezionare la scheda "Test Editor" (Modifica test).
- 2) Fare clic sul pulsante "Create" (Crea).

Nella scheda "Basic Information" (Informazioni di base):

- 3) Nel campo "Test Name" (Nome del test), inserire il nome del test, ossia, VIASURE MGM.
Nota: il nome del test deve essere univoco e non deve superare i venti caratteri.
- 4) Nel menu a tendina "Extraction Type" (Tipo di estrazione), selezionare "ExK TNA-3".
- 5) Nel menu a tendina "Master Mix Format" (Formato master mix), scegliere "Type 5: Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer" (Tipo 5: master mix liofilizzato concentrato con tampone di reidratazione).
- 6) Nel campo "Sample Extraction Parameters" (Parametri di estrazione del campione) selezionare "User Defined" (Definiti dall'utilizzatore) e regolare i valori dei parametri riportati di seguito (Tabella 4).

<i>Sample Extraction Parameters</i> (Parametri di estrazione del campione)	<i>Value (units)</i> (Valore (unità))
<i>Lysis Heat Time</i> (Tempo di lisi per calore)	15 (min)
<i>Lysis Temperature</i> (Temperatura di lisi)	55 (°C)
<i>Sample Tip Height</i> (Altezza della punta del campione)	1600 (steps)
<i>Sample Volume</i> (Volume del campione)	500 (µL) (protocollo per campioni di urina) 425 (µL) (protocollo per campioni vaginali)
<i>Wash Volume</i> (Volume di lavaggio)	500 (µL)
<i>Neutralization Volume</i> (Volume di neutralizzazione)	n.a.
<i>DNase Heat Time</i> (Tempo di riscaldamento della DNasi)	n.a.

Tabella 4. Parametri di estrazione del campione eseguita con BD MAX™ ExK™ TNA-3. n.a. = Non applicabile.

- 7) Nel campo "Ct Calculation" (Calcolo Ct) selezionare "Call Ct at Threshold Crossing" (Analizzare il Ct al superamento della soglia) (selezione predefinita).
- 8) Se si utilizza la versione 5.00 o superiore del software e si dispone di provette snap-in sigillate con codice a barre, nel campo "Custom Barcodes" (Codici a barre personalizzati) selezionare la seguente configurazione:
 - a. Snap-In 2 Barcode (Codice a barre Snap-In 2): 1F (per la *Mycoplasma genitalium* with *Macrolide Resistance* reaction tube).
 - b. Snap-In 3 Barcode (Codice a barre Snap-In 3): 11 (per la Rehydration Buffer tube).

Nella scheda "PCR Settings" (Impostazioni PCR):

- 9) Nel campo "PCR Settings" (Impostazioni PCR) inserire i seguenti parametri descritti nella Tabella 5: "Alias" (fino a sette caratteri alfanumerici), "PCR Gain" (Guadagno PCR), "Threshold" (Soglia), "Ct Min" (Ct minimo) e "Ct Max" (Ct massimo).

<i>Channel</i> (Canale)	<i>Alias</i> (Alias)	<i>PCR Gain</i> (Guadagno PCR)	<i>Threshold</i> (Soglia)	<i>Ct Min</i> (Ct Min)	<i>Ct Max</i> (Ct Max)
475/520 (FAM)	Res	40	200	0	40
530/565 (HEX)	Sen	40	200	0	40
585/630 (ROX)	Mg	40	200	0	40
630/665 (Cy5)	-	-	-	-	-
680/715 (Cy5.5)	EIC	60	200	0	35/40*

Tabella 5. "PCR settings" (Impostazioni di PCR).

Nota: come punto di partenza, si consiglia di impostare i valori soglia minimi sopraelencati per ciascun canale; tuttavia, le impostazioni finali devono essere stabilite dall'utilizzatore finale durante l'interpretazione dei risultati in modo da assicurarsi che le soglie rientrino nella fase esponenziale delle curve di fluorescenza e che siano al di sopra di qualsiasi segnale di fondo. Il valore soglia per i diversi strumenti può variare a causa delle diverse intensità del segnale.

* A causa della variabilità del numero di cellule umane contenute nei campioni di urina, il valore di cut-off per il target del controllo interno endogeno (EIC) è fissato a 35 per i campioni di tamponi vaginali e a 40 per i campioni di urina femminile e maschile, per garantire una raccolta corretta del campione.

- 10) Nel campo "Color compensation" (Compensazione del colore) inserire i seguenti parametri (Tabella 6).

		<i>False Receiving Channel</i> (Canale di ricezione falso)					
		<i>Channel</i> (Canale)	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
<i>Excitation Channel</i> (Canale di eccitazione)	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	

Tabella 6. Parametri "Color compensation" (Compensazione del colore).

Nella scheda "Melt Settings" (Impostazioni di melting) non è necessaria alcuna azione poiché il parametro non si applica a questo prodotto.

Nella scheda "Test Steps" (Fasi del test):

- 11) Inserire il nome della fase (fino a venti caratteri) e impostare i seguenti parametri per definire ciascuna fase del protocollo PCR: "Profile Type" (Tipo di profilo), "Cycles" (Cicli), "Time" (Tempo) e "Temperature" (Temperatura), quindi selezionare il campo "Detect" (Rileva) per definire la fase di rilevamento (Tabella 7). Fare clic sul pulsante "Add" (Aggiungi) per aggiungere una nuova fase e ripetere l'operazione fino a definire tutte le fasi necessarie.

Nota: il campo "Type" (Tipo) deve essere vuoto.

<i>Step</i> (Fase)	<i>Step name</i> (Nome fase)	<i>Profile Type</i> (Tipo profilo)	<i>Cycles</i> (Cicli)	<i>Time (s)</i> (Tempo (s))	<i>Temperature</i> (Temperatura)	<i>Detect</i> (Rilevazione)
Initial denaturation (Denaturazione iniziale)	IN-denaturation	Hold	1	120	95°C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data Collection) (Denaturazione e Appaiamento/Estensione (Raccolta dati))	Annealing/Extension	2- Temperature	45	10	95°C	-
				58	60°C	✓

Tabella 7. Protocollo PCR.

Nella scheda "Result Logic" (Logica del risultato):

- 12) Nel campo "Target" assegnare un nome al target, ovvero Res (utilizzando al massimo sette caratteri alfanumerici). Ripetere i passaggi 12-15 per ogni target (ovvero Sen o Mg) seguendo le tabelle specifiche per il target da definire.
- 13) Fare clic sulla casella di controllo "Analyze" (Analizza) per includere le lunghezze d'onda desiderate (canali PCR) nell'analisi dei risultati del target (Tabelle 8-10).

<i>Wavelength</i> (Lunghezza d'onda)	<i>Alias</i> (Alias)	<i>Type</i> (Tipo)	<i>Analyze</i> (Analizza)
475/520	Res	PCR	✓
680/715	EIC	PCR	✓

Tabella 8. Selezione dei canali PCR nella scheda "Result logic" (Logica del risultato) per il target Res (Resistente ai macrolidi).

<i>Wavelength</i> (Lunghezza d'onda)	<i>Alias</i> (Alias)	<i>Type</i> (Tipo)	<i>Analyze</i> (Analizza)
530/565	Sen	PCR	✓
680/715	EIC	PCR	✓

Tabella 9. Selezione dei canali PCR nella scheda "Result logic" (Logica del risultato) per il target Sen (Sensibilità ai macrolidi).

<i>Wavelength</i> (Lunghezza d'onda)	<i>Alias</i> (Alias)	<i>Type</i> (Tipo)	<i>Analyze</i> (Analizza)
585/630	Mg	PCR	✓
680/715	EIC	PCR	✓

Tabella 10. Selezione dei canali PCR nella scheda "Result logic" (Logica del risultato) per il target Mg (*Mycoplasma genitalium*).

- 14) Fare clic sul pulsante "Edit Logic" (Modifica logica).
- 15) Nella finestra "Edit Logic" (Modifica logica) vengono elencate tutte le combinazioni di tipi di risultato. Per ogni riga, nel menu a tendina "Result" (Risultato), selezionare il risultato che viene richiamato quando si verificano le condizioni di quella riga, seguendo le Tabelle 11-13 per i campioni vaginali e le Tabelle 14-16 per i campioni di urina.

Campioni di tamponi vaginali

<i>Result</i> (Risultato)	Res (475/520)	EIC (680/715)
POS	Valid (Valido)	Valid (Valido)
UNR	Valid (Valido)	Invalid (Non valido)
NEG	Invalid (Non valido)	Valid (Valido)
UNR	Invalid (Non valido)	Invalid (Non valido)

Tabella 11. Elenco della combinazione di tipi di risultato e di logica del risultato per il target Res (Resistenza ai macrolidi) nel protocollo dei campioni vaginali. I risultati disponibili sono POS (Positivo), NEG (Negativo) e UNR (Non risolto).

<i>Result</i> (Risultato)	Sen (530/565)	EIC (680/715)
POS	Valid (Valido)	Valid (Valido)
UNR	Valid (Valido)	Invalid (Non valido)
NEG	Invalid (Non valido)	Valid (Valido)
UNR	Invalid (Non valido)	Invalid (Non valido)

Tabella 12. Elenco della combinazione di tipi di risultato e di logica del risultato per il target Sen (Sensibilità ai macrolidi) nel protocollo dei campioni vaginali. I risultati disponibili sono POS (Positivo), NEG (Negativo) e UNR (Non risolto).

<i>Result</i> (Risultato)	Mg (585/630)	EIC (680/715)
POS	Valid (Valido)	Valid (Valido)
UNR	Valid (Valido)	Invalid (Non valido)
NEG	Invalid (Non valido)	Valid (Valido)
UNR	Invalid (Non valido)	Invalid (Non valido)

Tabella 13. Elenco della combinazione di tipi di risultato e di logica del risultato per il target Mg (*Mycoplasma genitalium*) nel protocollo dei campioni vaginali. I risultati disponibili sono POS (Positivo), NEG (Negativo) e UNR (Non risolto).

Campioni di urina

<i>Result</i> (Risultato)	Res (475/520)	EIC (680/715)
POS	Valid (Valido)	Valid (Valido)
POS	Valid (Valido)	Invalid (Non valido)
NEG	Invalid (Non valido)	Valid (Valido)
UNR	Invalid (Non valido)	Invalid (Non valido)

Tabella 14. Elenco della combinazione di tipi di risultato e di logica del risultato per il target Res (Resistenza ai macrolidi) nel protocollo dei campioni di urina. I risultati disponibili sono POS (Positivo), NEG (Negativo) e UNR (Non risolto).

<i>Result</i> (Risultato)	Sen (530/565)	EIC (680/715)
POS	Valid (Valido)	Valid (Valido)
POS	Valid (Valido)	Invalid (Non valido)
NEG	Invalid (Non valido)	Valid (Valido)
UNR	Invalid (Non valido)	Invalid (Non valido)

Tabella 15. Elenco della combinazione di tipi di risultato e di logica del risultato per il target Sen (Sensibilità ai macrolidi) nel protocollo dei campioni di urina. I risultati disponibili sono POS (Positivo), NEG (Negativo) e UNR (Non risolto).

<i>Result</i> (Risultato)	Mg (585/630)	EIC (680/715)
POS	Valid (Valido)	Valid (Valido)
POS	Valid (Valido)	Invalid (Non valido)
NEG	Invalid (Non valido)	Valid (Valido)
UNR	Invalid (Non valido)	Invalid (Non valido)

Tabella 16. Elenco della combinazione di tipi di risultato e di logica del risultato per il target Mg (*Mycoplasma genitalium*) nel protocollo dei campioni di urina. I risultati disponibili sono POS (Positivo), NEG (Negativo) e UNR (Non risolto).

Nota: in base al Ct Max precedentemente definito (Tabella 5):

- i. Il tipo di risultato per i canali Res (475/520), Sen (530/565) o Mg (585/630) è considerato "Valid" (Valido) quando il valore di Ct ottenuto è ≤ 40 e "Invalid" (Non valido) quando il valore di Ct ottenuto è > 40 .
- ii. Il tipo di risultato per il canale EIC (680/715) è considerato "Valid" (Valido) quando il valore di Ct ottenuto è ≤ 35 per i campioni di tamponi vaginali e ≤ 40 per i campioni di urina, e "Invalid" (Non valido) quando il valore di Ct ottenuto è rispettivamente > 35 e > 40 .

* Sebbene il valore di cut-off per il target del controllo interno endogeno (EIC) nei campioni di urina sia fissato a 40, è possibile che non venga osservata la curva di amplificazione dell'EIC nel caso in cui si rilevi un segnale positivo per entrambi i target Res o Sen e Mg. In questo caso, la logica del risultato sarà POS (positivo). Vedere la sezione 9. Interpretazione dei risultati.

16) Fare clic sul pulsante "Save" (Salva) per salvare il test.

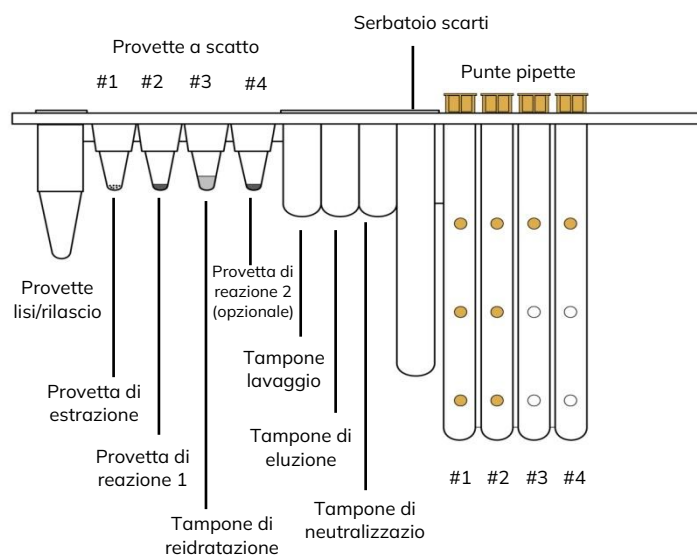
8.3.2. Preparazione della griglia BD MAX™

- 1) Per ogni campione da testare, rimuovere una Unitized Reagent Strip dal BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit. Picchiettare delicatamente ogni striscia su una superficie dura per assicurarsi che tutti i liquidi si trovino sul fondo delle provette, quindi posizionarle sulla griglia del BD MAX™ System.
- 2) Rimuovere il numero richiesto di provette di estrazione BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (B4) (sigillo bianco) dalla loro confezione protettiva. Posizionare l'/gli Extraction Tube(s) (sigillo bianco) nelle posizioni corrispondenti sulla striscia di TNA (posizione 1, codifica di colore bianco sulla griglia. Vedere Figura 1). Rimuovere l'aria in eccesso e chiudere la confezione con la cerniera.
- 3) Determinare e separare il numero appropriato di *Mycoplasma genitalium with Macrolide Resistance* reaction tubes (sigillo 1F) e posizionarle nelle posizioni corrispondenti sulla striscia (posizione 2, codifica di colore verde sulla griglia. Vedere Figura 1).
 - a. Rimuovere l'aria in eccesso e chiudere la confezione in alluminio con la cerniera.
 - b. Per effettuare una corretta reidratazione, assicurarsi che il prodotto liofilizzato si trovi nella parte inferiore della provetta e non aderisca alla parte superiore della provetta o alla

guarnizione metallica. Picchiettare delicatamente ciascuna provetta su una superficie solida per assicurarsi che tutto il prodotto si trovi in fondo alla provetta.

- 4) Rimuovere il numero richiesto di Rehydration Buffer tubes (sigillo 11) e posizzarle nelle posizioni corrispondenti sulla striscia (posizione 3, nessuna codifica di colore sulla griglia. Vedere Figura 1).
 - a. Rimuovere l'aria in eccesso e chiudere la confezione con la cerniera.
 - b. Per effettuare un trasferimento corretto, assicurarsi che il liquido si trovi nella parte inferiore della provetta e non aderisca alla parte superiore della provetta o alla guarnizione metallica. Picchiettare delicatamente ciascuna provetta su una superficie solida per assicurarsi che tutto il tampone si trovi in fondo alla provetta.

Figura 1. BD MAX™ TNA Reagent Strip (TNA) dal BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit.



8.3.3. Configurazione dello strumento BD MAX™

- 1) Selezionare la scheda "Worklist" (Elenco di lavoro) sulla schermata "Run" (Esegui) del software BD MAX™ System nella versione v4.50A o superiore.
- 2) Nel menu a tendina "Test" selezionare il test desiderato, ossia VIASURE MGM (se non è ancora stato creato, vedere la sezione 8.3.1).
- 3) Nel menu a tendina "Kit Lot Number" (Numero di lotto del kit), selezionare il numero di lotto appropriato per il kit (riportato sulla scatola esterna del kit di estrazione utilizzato) (opzionale).

Nota: i numeri di lotto devono essere definiti nella schermata "Inventory" (Inventario) prima di poterli selezionare in questo punto.

- 4) Inserire il numero identificativo della Sample Buffer Tube nel campo "Sample tube" (Provetta del campione), mediante scansione del codice a barre con lo scanner oppure manualmente.
- 5) Compilare il campo "Patient ID" (ID paziente) e/o "Accession" (Accesso) e fare clic sul tasto Tab (Tabulazione) o su Enter (Invio). Continuare fino all'inserimento dei codici a barre di tutte le Sample

Buffer Tube. Assicurarsi che l'ID campione/paziente e le Sample Buffer Tube siano abbinati correttamente.

- 6) Posizionare la Sample Buffer Tube preparata sulla(e) griglia(e).
- 7) Caricare le griglie sul BD MAX™ SYSTEM (la griglia A si trova sul lato sinistro del BD MAX™ System, la griglia B sul lato destro).
- 8) Posizionare il numero richiesto di BD MAX™ PCR Cartridge nel BD MAX™ System.
- 9) Chiudere la porta del BD MAX™ System.
- 10) Fare clic su “Start” (Inizia) per iniziare la procedura.

8.3.4. Report dei risultati di BD MAX™

- 1) Nella barra dei menu, fare clic sul pulsante “Results” (Risultati).
- 2) Fare clic due volte sul test in esecuzione incluso nell'elenco oppure premere il pulsante “View” (Visualizza).
- 3) I pulsanti “Print” (Stampa) ed “Export” (Esporta) nella parte inferiore della schermata risulteranno attivi.

Per stampare i risultati:

1. Fare clic sul pulsante “Print” (Stampa).
2. Nella finestra di anteprima di stampa del rapporto di esecuzione, selezionare: “Run Details” (Dettagli esecuzione), “Test Details” (Dettagli test) e “Plots” (Grafici).
3. Fare clic su “Print” (Stampa) per stampare il rapporto o su “Export” (Esporta) per esportare un PDF del rapporto su una chiavetta USB.

Per esportare i risultati:

1. Fare clic sul pulsante “Export” (Esporta) per trasferire il rapporto (file PDF e CSV) su una chiavetta USB.
2. Al termine dell'esportazione, nella finestra “Results Export” (Esportazione dei risultati) viene visualizzata l'icona di successo o di errore.

9. Interpretazione dei risultati

Per una descrizione dettagliata su come analizzare i dati, fare riferimento al manuale utente del BD MAX™ System.

L'analisi dei dati viene svolta dal software del sistema BD MAX™, sulla base delle istruzioni del produttore. Il software del BD MAX™ System riporta i valori di Ct e le curve di amplificazione per tutti i canali di rilevazione di ciascun campione testato nel seguente modo:

- Valore di Ct pari a 0: indica che il software non ha calcolato nessun valore di Ct nei limiti specificati (vedere la Tabella 5). La curva di amplificazione del campione che presenta un valore di Ct pari a "0" deve essere controllata manualmente.
- Un valore di Ct pari a -1 indica che non è avvenuto alcun processo di amplificazione, che non è stato calcolato alcun valore di Ct dal software oppure che il valore di Ct calcolato è inferiore alla soglia specificata o superiore al Ct Max stabilito (Cut-off).
- Qualunque altro valore di Ct deve essere interpretato in correlazione con la curva di amplificazione e secondo la logica del risultato prestabilita, nel rispetto delle linee guida di interpretazione riportate nelle Tabelle 17-18.

Controllare il segnale del controllo interno endogeno (EIC) per verificare il corretto funzionamento della miscela di amplificazione. Inoltre, verificare che non sia presente nessun report di errore del BD MAX™ System. Si prega di notare che, in base alla logica del risultato predefinita, è possibile che non venga osservata la curva di amplificazione dell'EIC nei campioni di urina nel caso in cui si rilevi un segnale positivo per entrambi i target Mg e Res o Sen. Leggere attentamente l'interpretazione dei singoli campioni di urina del paziente (Tabella 18).

I risultati devono essere letti e analizzati utilizzando la seguente tabella:

Interpretazione dei risultati di campioni di tamponi vaginali

Resistenza ai macrolidi (nome del target: Res)	Sensibilità ai macrolidi (nome del target: Sen)	<i>M. genitalium</i> (nome del target: Mg)	Interpretazione di singoli campioni del paziente
NEG	POS	POS	DNA di sensibilità ai macrolidi e di <i>M. genitalium</i> rilevato, DNA di resistenza ai macrolidi non rilevato
POS	NEG	POS	DNA di resistenza ai macrolidi e di <i>M. genitalium</i> rilevato, DNA di sensibilità ai macrolidi non rilevato
POS	POS	POS	DNA di resistenza ai macrolidi, di sensibilità ai macrolidi e di <i>M. genitalium</i> rilevato RISULTATO NON CONCLUSIVO ¹
POS	POS	NEG	DNA di resistenza ai macrolidi e di sensibilità ai macrolidi rilevato, DNA di <i>M. genitalium</i> non rilevato. RISULTATO NON CONCLUSIVO ¹
POS	NEG	NEG	DNA di resistenza ai macrolidi rilevato, DNA di sensibilità ai macrolidi e di <i>M. genitalium</i> non rilevato. RISULTATO NON CONCLUSIVO ¹
NEG	POS	NEG	DNA di sensibilità ai macrolidi rilevato, DNA di resistenza ai macrolidi e di <i>M. genitalium</i> non rilevato. RISULTATO NON CONCLUSIVO ¹
NEG	NEG	POS	DNA di <i>M. genitalium</i> rilevato, DNA di resistenza ai macrolidi e di sensibilità ai macrolidi non rilevato. RISULTATO NON CONCLUSIVO ^{1,2}

NEG	NEG	NEG	DNA di resistenza ai macrolidi, di sensibilità ai macrolidi e di <i>M. genitalium</i> non rilevato
UNR	UNR	UNR	Risultato Non risolto (UNR) dovuto alla presenza di inibitori nella reazione PCR, a campioni inferiori al limite di rilevabilità o a un problema generale (non segnalato da un codice di errore) durante le fasi di elaborazione del campione e/o di amplificazione. ³
IND	IND	IND	Risultato test indeterminato (IND). Dovuto a guasto nel sistema BD MAX™. Questo risultato del test viene visualizzato in caso di guasto dello strumento associato ad un codice di errore. ⁴
INC	INC	INC	Risultato test incompleto (INC). Dovuto a guasto nel sistema BD MAX™. Visualizzazione del risultato del test in caso di mancato completamento del test. ⁴

Tabella 17. Interpretazione dei campioni di tamponi vaginali.

1 È necessario ripetere i test. Si raccomanda di ripetere il test dalla stessa provetta Sample Buffer Tube (SBT) o dal campione primario preparando una nuova SBT. In caso di risultato continuamente non conclusivo, ottenere un nuovo campione (più concentrato, se possibile) e ripetere i test.

NOTA: i campioni di tamponi vaginali possono essere conservati senza trasferimento nella SBT fino a 2 giorni se conservati a 25°C o a 4°C. In caso di ripetizione del test dalla stessa SBT, si raccomanda di agitare manualmente la SBT per garantire un'omogeneizzazione corretta del campione. Si prega di notare che i campioni di tamponi vaginali possono essere conservati nella SBT per un massimo di 7 giorni a 25°C o a 4°C (se precedentemente conservati a 25°C o a 4°C per un massimo di 2 giorni).

2 Il kit rileva le seguenti mutazioni associate alla resistenza ai macrolidi: gene *23S rRNA* (A2058T, A2058C, A2058G, A2059C, A2059G). In presenza di un'altra mutazione, il kit non è convalidato per il relativo rilevamento. Pertanto, l'amplificazione sarà osservata nel canale ROX (rilevamento di *M. genitalium*) e non nei canali FAM e HEX (rilevamento, rispettivamente, di resistenza e sensibilità ai macrolidi).

3 Per essere preso in considerazione, il controllo interno endogeno (EIC) deve mostrare un segnale di amplificazione con un valore di Ct ≤35. In assenza del segnale dell'EIC o in presenza di un valore di Ct >35, il risultato viene considerato Non risolto (UNR) ed è necessario ripetere il test. Controllare il report dei risultati e i valori di Ct dei target selezionati e adottare le azioni appropriate, considerando quanto segue:

- I. Quando i risultati dei geni target sono Non validi (Ct >40), è necessario ripetere il test dalla stessa SBT o dal campione primario, preparando una nuova SBT. Se si ottiene nuovamente un risultato UNR, devono essere considerate due possibilità. Da un lato, la concentrazione del campione potrebbe essere al di sotto del LoD, quindi si raccomanda di ottenere un campione più concentrato. Dall'altro lato, si deve considerare la potenziale presenza di inibitori nella reazione PCR e si raccomanda di diluire i campioni 1:10. Seguire le linee guida del laboratorio e/o i manuali di gestione del laboratorio di microbiologia.
- II. Quando i risultati dei geni target di resistenza ai macrolidi, di sensibilità ai macrolidi e/o di *M. genitalium* sono validi (Ct ≤40), è possibile non osservare nessun segnale di amplificazione oppure osservare un'amplificazione dell'EIC con un valore di Ct >35 durante l'analisi di campioni a concentrazione elevata, a causa di un'amplificazione preferenziale degli acidi nucleici specifici del target. Se ritenuto necessario, diluire questi campioni in un rapporto 1:10, preparare di nuovo la Sample Buffer Tube (SBT) e ripetere il test. Seguire le linee guida del laboratorio e/o i manuali di gestione del laboratorio di microbiologia.

4 È possibile ottenere risultati Indeterminati (IND) o Incompleti (INC) a causa di un errore di sistema; in tal caso, è necessario ripetere i test. Per l'interpretazione dei codici di avvertenza ed errore, fare riferimento al manuale utilizzatore del BD MAX™ System.

Interpretazione dei risultati di campioni di urina

Resistenza ai macrolidi (nome del target: Res)	Sensibilità ai macrolidi (nome del target: Sen)	<i>M. genitalium</i> (nome del target: Mg)	Interpretazione di singoli campioni del paziente
NEG	POS	POS	DNA di sensibilità ai macrolidi e di <i>M. genitalium</i> rilevato, DNA di resistenza ai macrolidi non rilevato
POS	NEG	POS	DNA di resistenza ai macrolidi e di <i>M. genitalium</i> rilevato, DNA di sensibilità ai macrolidi non rilevato
POS	POS	POS	DNA di resistenza ai macrolidi, di sensibilità ai macrolidi e di <i>M. genitalium</i> rilevato RISULTATO NON CONCLUSIVO ¹
POS	POS	NEG	DNA di resistenza ai macrolidi e di sensibilità ai macrolidi rilevato, DNA di <i>M. genitalium</i> non rilevato. RISULTATO NON CONCLUSIVO ¹
POS	NEG	NEG	DNA di resistenza ai macrolidi rilevato, DNA di sensibilità ai macrolidi e di <i>M. genitalium</i> non rilevato. RISULTATO NON CONCLUSIVO ¹
NEG	POS	NEG	DNA di sensibilità ai macrolidi rilevato, DNA di resistenza ai macrolidi e di <i>M. genitalium</i> non rilevato. RISULTATO NON CONCLUSIVO ¹
NEG	NEG	POS	DNA di <i>M. genitalium</i> rilevato, DNA di resistenza ai macrolidi e di sensibilità ai macrolidi non rilevato. RISULTATO NON CONCLUSIVO ^{1,2}
NEG	NEG	NEG	DNA di resistenza ai macrolidi, di sensibilità ai macrolidi e di <i>M. genitalium</i> non rilevato
UNR	POS	POS	DNA di sensibilità ai macrolidi e di <i>M. genitalium</i> rilevato, DNA di resistenza ai macrolidi non rilevato ³
POS	UNR	POS	DNA di resistenza ai macrolidi e di <i>M. genitalium</i> rilevato, DNA di sensibilità ai macrolidi non rilevato ³
UNR	UNR	UNR	Risultato non risolto (UNR) dovuto alla presenza di inibitori nella reazione PCR o a un problema generale (non segnalato da un codice di errore) durante le fasi di elaborazione del campione e/o di amplificazione. ⁴
POS	POS	UNR	Non risolto (UNR) - Ripetere i test ¹
POS	UNR	UNR	Non risolto (UNR) - Ripetere i test ¹
UNR	POS	UNR	Non risolto (UNR) - Ripetere i test ¹
UNR	UNR	POS	Non risolto (UNR) - Ripetere i test ¹
IND	IND	IND	Risultato test indeterminato (IND). Dovuto a guasto nel sistema BD MAX™. Questo risultato del test viene visualizzato in caso di guasto dello strumento associato ad un codice di errore. ⁵
INC	INC	INC	Risultato test incompleto (INC). Dovuto a guasto nel sistema BD MAX™. Visualizzazione del risultato del test in caso di mancato completamento del test. ⁵

Tabella 18. Interpretazione dei campioni di urina.

1 È necessario ripetere i test. Si raccomanda di ripetere il test dalla stessa provetta Sample Buffer Tube (SBT) o dal campione primario preparando una nuova SBT. In caso di risultato continuamente non conclusivo, ottenere un nuovo campione (più concentrato, se possibile) e ripetere i test.

NOTA: i campioni di urina possono essere conservati senza trasferimento nella SBT per un massimo di 4 ore se conservati a 25°C o per 1 giorno se conservati a 4°C. In caso di ripetizione del test dalla stessa SBT, si raccomanda di agitare manualmente la SBT per garantire un'omogeneizzazione corretta del campione. Si prega di notare che i campioni di urina possono essere conservati nella SBT per un massimo di 3 giorni a 25°C (se precedentemente conservati a 25°C per un massimo di 4 ore) o per un massimo di 3 giorni a 4°C (se precedentemente conservati a 4°C per un massimo di 1 giorno).

2 Il kit rileva le seguenti mutazioni associate alla resistenza ai macrolidi: gene *23S rRNA* (A2058T, A2058C, A2058G, A2059C, A2059G). In presenza di un'altra mutazione, il kit non è convalidato per il relativo rilevamento. Pertanto, l'amplificazione sarà osservata nel canale ROX (rilevamento di *M. genitalium*) e non nei canali FAM e HEX (rilevamento, rispettivamente, di resistenza e sensibilità ai macrolidi).

3 Sebbene il valore di cut-off per il target del controllo interno endogeno (EIC) nei campioni di urina sia fissato a 40, a causa del basso numero di cellule umane presenti nell'urina, è consentito non osservare la curva di amplificazione dell'EIC nel caso in cui si rilevi un segnale positivo per entrambi i target di resistenza (canale FAM) o sensibilità (canale HEX) ai macrolidi e il target *Mycoplasma genitalium* (canale ROX). In questo caso, non sussiste il rischio di riportare un risultato falso positivo perché l'amplificazione deve essere osservata contemporaneamente in due canali diversi.

4 Per essere preso in considerazione, il controllo interno endogeno (EIC) deve mostrare un segnale di amplificazione con un valore di Ct ≤40. In assenza del segnale dell'EIC o in presenza di un valore di Ct >40, il risultato viene considerato Non risolto (UNR) ed è necessario ripetere i test. Si raccomanda di ripetere il test dalla stessa provetta SBT o dal campione primario preparando una nuova SBT oppure ottenere un campione più concentrato. Può anche accadere che il risultato Non risolto (UNR) sia dovuto alla presenza di inibitori nella reazione PCR; in questi casi, si raccomanda di diluire tali campioni in un rapporto 1:10. Seguire le linee guida del laboratorio e/o i manuali di gestione del laboratorio di microbiologia.

5 È possibile ottenere risultati Indeterminati (IND) o Incompleti (INC) a causa di un errore di sistema; in tal caso, è necessario ripetere i test. Per l'interpretazione dei codici di avvertenza ed errore, fare riferimento al manuale utilizzatore del sistema BD MAX™.

Nota: l'utilizzo di controlli esterni deve fornire i seguenti risultati attesi: negativo per l'ENC e positivo per l'EPC (si prevede che i campioni positivi noti siano positivi solo per i microrganismi presenti nel campione). In caso di errore del controllo esterno, è necessario ripetere i test.

In caso di un risultato ambiguo continuo, si raccomanda di rileggere le istruzioni per l'uso e la procedura di estrazione usata dall'utilizzatore, di verificare la corretta esecuzione di ciascun passaggio del test PCR e di rivedere i parametri. Infine, si raccomanda di verificare la forma sigmoide della curva e l'intensità della fluorescenza.

I risultati del test devono essere valutati da un operatore sanitario nell'ambito di anamnesi, sintomi clinici e altri test diagnostici.

10. Limiti del test

- I risultati del test devono essere valutati da un operatore sanitario nell'ambito di anamnesi, sintomi clinici e altri test diagnostici.
- VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System è stato convalidato solo con tamponi vaginali e campioni di urina maschile e femminile.
- Per prestazioni del test ottimali, il prodotto liofilizzato deve trovarsi in fondo alla provetta e non deve aderire alla parte superiore della provetta o del sigillo di alluminio. Picchiettare delicatamente ciascuna provetta su una superficie solida per assicurarsi che tutto il prodotto si trovi in fondo alla provetta.
- Poiché è possibile che, in assenza di target da rilevare, nei canali vuoti di BD MAX™ System possa verificarsi *crossstalk*, durante l'interpretazione dei risultati è necessario selezionare solo i canali in cui sono presenti target da amplificare. Per eventuali chiarimenti, contattare viasuresupport@certest.es.
- La qualità del test è subordinata alla qualità del campione; l'estrazione dell'acido nucleico dai campioni clinici deve essere effettuata in modo corretto.
- Questo test è un test qualitativo, non fornisce pertanto valori quantitativi né indica il numero di microrganismi presenti. Non è possibile mettere in correlazione i valori Ct ottenuti dalla PCR con la concentrazione del campione, perché essi dipendono dal termociclatore utilizzato e dall'esecuzione in sé.
- Benché possano essere rilevati livelli estremamente bassi, al di sotto del limite di rilevamento, i risultati potrebbero non essere riproducibili.
- È necessario prestare attenzione all'intervallo di misurazione previsto dal test perché i campioni con concentrazioni superiori o inferiori a tale range possono fornire risultati errati.
- Esiste la possibilità di risultati falsi positivi a causa della contaminazione crociata con campioni di *M. genitalium* resistente ai macrolidi e/o di *M. genitalium* sensibile ai macrolidi contenenti concentrazioni elevate di DNA target oppure per la contaminazione dovuta ai prodotti della PCR di reazioni precedenti.
- Risultati falsi negativi possono dipendere da numerosi fattori, anche in combinazione tra loro, tra cui:
 - Metodi non corretti di prelievo, trasporto, conservazione e/o manipolazione dei campioni.
 - Procedure di elaborazione errate (inclusa l'estrazione di DNA).
 - Deterioramento del DNA durante l'invio/la conservazione e/o l'elaborazione dei campioni.
 - Mutazioni o polimorfismi nei siti di legame del primer o della sonda possono influenzare il rilevamento di ceppi nuovi o non noti di *M. genitalium* o dei marcatori genetici di resistenza e sensibilità ai macrolidi.
 - Carica batterica del campione al di sotto del limite di rilevabilità del test.
 - Presenza di inibitori della qPCR o di altri tipi di sostanze interferenti. Non è stato valutato l'impatto di vaccini, alcune terapie antivirali, antibiotiche, chemioterapiche, farmaci immunosoppressori o antimicotici utilizzati per prevenire l'infezione o durante il trattamento della stessa.

- L'effetto delle sostanze interferenti è stato valutato solo per quelle riportate nella sezione 12.5.1 (Studio sulle sostanze interferenti) delle presenti istruzioni per l'uso. Consultare tale sezione per controllare le sostanze endogene ed esogene più comuni capaci di indurre un'interferenza totale o parziale sulla reazione qPCR. Anche altre sostanze, non indicate, potrebbero indurre risultati errati.
- Mancata aderenza alle istruzioni per l'uso e alla procedura di test.
- Il kit rileva le seguenti mutazioni associate alla resistenza ai macrolidi: gene *23S rRNA* (A2058T, A2058C, A2058G, A2059C, A2059G). Il ceppo di *M. genitalium* resistente ai macrolidi contenente la mutazione A2059T, che è meno prevalente, non può essere rilevato dal dispositivo. Solo in questo caso, è possibile osservare l'amplificazione nel canale ROX (rilevamento di *M. genitalium*) e non nei canali FAM e HEX (rilevamento, rispettivamente, di resistenza e sensibilità ai macrolidi).
- Un risultato positivo non indica necessariamente la presenza di microrganismi vitali e non implica che questi microrganismi siano infettivi o siano gli agenti eziologici dei sintomi clinici. Tuttavia, un risultato positivo indica la presenza delle sequenze target di *M. genitalium* resistente ai macrolidi e di *M. genitalium* sensibile ai macrolidi.
- Risultati negativi non precludono la presenza di DNA di *M. genitalium* resistente ai macrolidi e/o sensibile ai macrolidi in un campione clinico e non devono essere utilizzati come unica indicazione per il trattamento o per altre decisioni sulla gestione del paziente. Non sono stati definiti tipi di campioni e timing ottimali per il picco dei livelli microbici in caso di infezione da *M. genitalium*. Per rilevare il patogeno può essere necessario prelevare più campioni (tipi e punti temporali di campionamento) dallo stesso paziente.
- Se i test diagnostici per altre malattie sessualmente trasmissibili (MST) e/o la resistenza antimicrobica sono negativi e le osservazioni cliniche, l'anamnesi del paziente e le informazioni epidemiologiche indicano la possibilità di un'infezione da *M. genitalium*, è necessario prendere in considerazione un risultato falso negativo e valutare la ripetizione dei test.
- I valori di fluorescenza possono variare a causa di molteplici fattori, tra cui: apparecchiatura PCR (anche se dello stesso modello), sistema di estrazione, tipo di campione, precedente trattamento del campione, ecc. tra gli altri.
- I valori predittivi positivi e negativi dipendono in larga misura dalla prevalenza in tutti i test diagnostici in vitro. Le prestazioni di VIASURE *Mycoplasma genitalium* with *Macrolide Resistance Assay* for BD MAX™ System possono variare in base alla prevalenza e alla popolazione testata.
- È richiesto un nuovo test nel caso in cui si ottengano risultati Non risolti, Indeterminati o Incompleti utilizzando VIASURE *Mycoplasma genitalium* with *Macrolide Resistance Assay* for BD MAX™ System. I risultati Non risolti possono essere dovuti alla presenza di inibitori nel campione o a una reidratazione non corretta della provetta di miscelazione di reazione liofilizzata. Un danno agli strumenti può comportare risultati indeterminati o incompleti.

11. Controllo di qualità

VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System contiene un controllo interno endogeno (EIC) in ogni provetta di reazione, che conferma le prestazioni corrette della tecnica. Inoltre, l'uso di controlli esterni (EPC ed ENC) consente di confermare le prestazioni del test. I controlli esterni non vengono utilizzati dal sistema BD MAX™ ai fini dell'interpretazione dei risultati, ma vengono considerati come un campione. Il controllo positivo esterno (EPC) è concepito per monitorare un eventuale mancato funzionamento dei reagenti del test, mentre il controllo negativo esterno (ENC) serve a rilevare la contaminazione ambientale o dei reagenti da parte di acidi nucleici target.

12. Caratteristiche delle prestazioni analitiche

12.1. Linearità analitica

La linearità del test è stata determinata e confermata testando una serie di diluizioni 1:10 di matrice vaginale e di campioni di urina maschile e femminile a una concentrazione nota di DNA specifico e sintetico proveniente da *M. genitalium* sensibile ai macrolidi o resistente ai macrolidi (nel range compreso tra $2E+07$ e $2E+00$ copie/ μ L). Sono stati calcolati la media aritmetica, la deviazione standard e il coefficiente di variazione dei valori di Ct, nonché l'efficienza e il coefficiente di regressione della reazione PCR. Di seguito sono riportati esempi di grafici di amplificazione riguardanti un test condotto su una delle matrici valutate.

Figura 2. Serie di diluizioni da template di DNA sintetico di *M. genitalium* sensibile ai macrolidi (gene *23S rRNA* (wild type) + gene *adesina MgPA*) (da $2E+07$ a $2E+00$ copie/ μ L) analizzate su BD MAX™ System (canale 530/565 (HEX)).

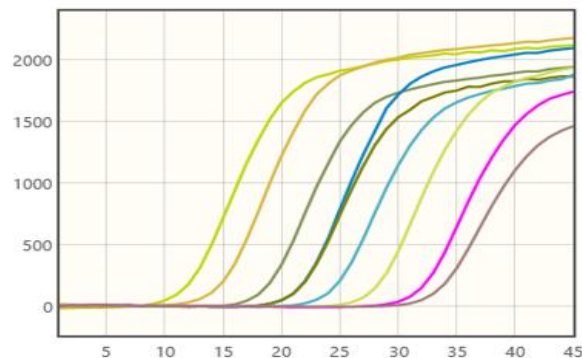


Figura 3. Serie di diluizioni da template di DNA sintetico di *M. genitalium* resistente ai macrolidi (gene *23S rRNA* (Mutazione A2058C) + gene *adesina MgPA*) (da $2E+07$ a $2E+00$ copie/ μ L) analizzate su BD MAX™ System (canale 475/520 (FAM)).

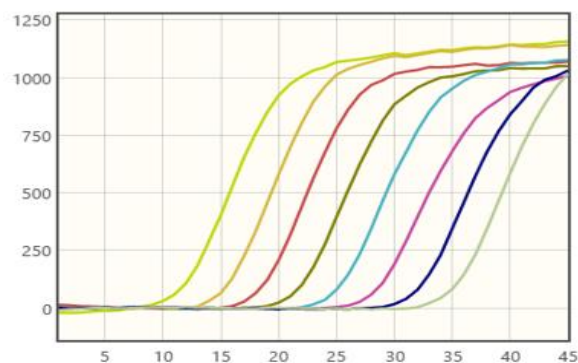


Figura 4. Serie di diluizioni da template di DNA sintetico di *M. genitalium* resistente ai macrolidi (gene *23S rRNA* (Mutazione A2058G) + gene *adesina MgPA*) (da $2E+07$ a $2E+00$ copie/ μ L) analizzate su BD MAX™ System (canale 475/520 (FAM)).

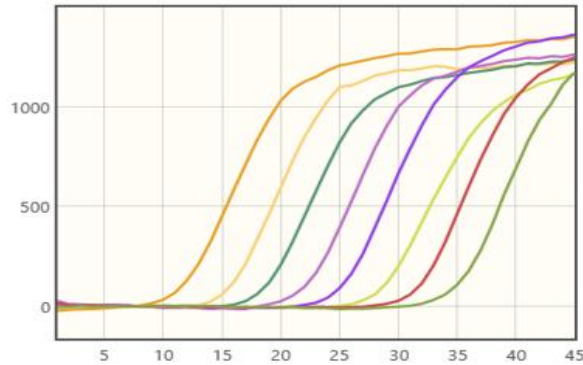


Figura 5. Serie di diluizioni da template di DNA sintetico di *M. genitalium* resistente ai macrolidi (gene *23S rRNA* (Mutazione A2058T) + gene *adesina MgPA*) (da $2E+07$ a $2E+00$ copie/ μ L) analizzate su BD MAX™ System (canale 475/520 (FAM)).

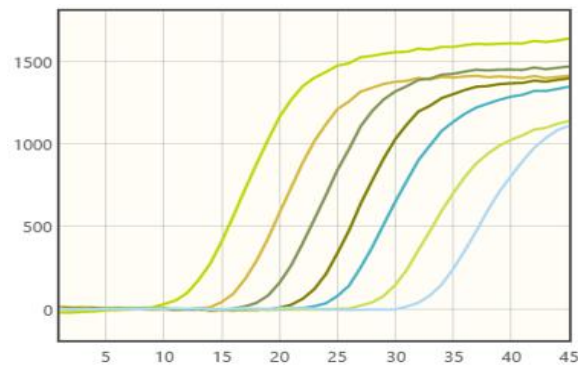


Figura 6. Serie di diluizioni da template di DNA sintetico di *M. genitalium* resistente ai macrolidi (gene *23S rRNA* (Mutazione A2059C) + gene *adesina MgPA*) (da $2E+07$ a $2E+00$ copie/ μ L) analizzate su BD MAX™ System (canale 475/520 (FAM)).

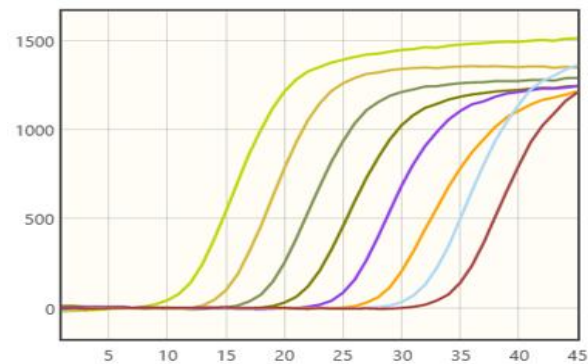
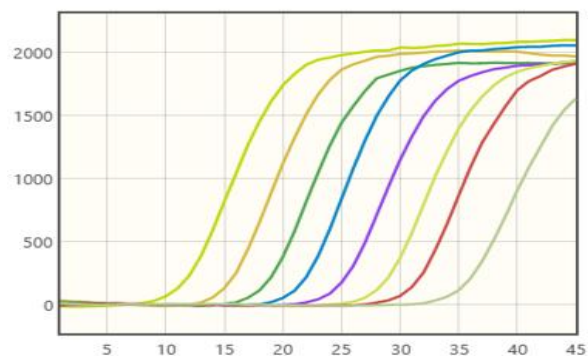


Figura 7. Serie di diluizioni da template di DNA sintetico di *M. genitalium* resistente ai macrolidi (gene *23S rRNA* (Mutazione A2059G) + gene *adesina MgPA*) (da $2E+07$ a $2E+00$ copie/ μ L) analizzate su BD MAX™ System (canale 475/520 (FAM)).



12.2. Sensibilità analitica. Limite di rivelabilità (LoD)

La sensibilità analitica o il limite di rilevabilità (LoD) di VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System è stato analizzato su tre lotti utilizzando una matrice vaginale e campioni di urina maschile e femminile. I ceppi di riferimento o il DNA sintetico (in caso di mancata disponibilità di ceppi) utilizzati sono riportati nella seguente tabella:

Target		Ceppo/DNA sintetico	Codice prodotto esterno
Sensibilità ai macrolidi + <i>Mycoplasma genitalium</i>	Gene <i>23S rRNA</i> (wild type) + Gene <i>adesina MgPA</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> ceppo M30	49895™
Resistenza ai macrolidi + <i>Mycoplasma genitalium</i>	Gene <i>23S rRNA</i> (mutazione A2058C) + Gene <i>adesina MgPA</i>	DNA sintetico (MGRXPC)	n.a.
	Gene <i>23S rRNA</i> (mutazione A2058G) + Gene <i>adesina MgPA</i>	AMPLIRUN® TOTAL MACROLIDE RESISTANT MGE CONTROL	MBTC029
	Gene <i>23S rRNA</i> (mutazione A2058T) + Gene <i>adesina MgPA</i>	DNA sintetico (MGRXPC)	n.a.
	Gene <i>23S rRNA</i> (mutazione A2059C) + Gene <i>adesina MgPA</i>	DNA sintetico (MGRXPC)	n.a.
	Gene <i>23S rRNA</i> (mutazione A2059G) + Gene <i>adesina MgPA</i>	AMPLIRUN® TOTAL MACROLIDE RESISTANT MGE CONTROL	MBTC029

Tabella 19. Ceppi di riferimento e DNA sintetico utilizzati per il test del Limite di rilevabilità.

VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System ha mostrato il limite di rilevabilità indicato nella seguente tabella, con un tasso di positività $\geq 95\%$.

Limite di rivelabilità (LoD) (copie/ μ L)						
Matrice	<i>M. genitalium</i> sensibile ai macrolidi	<i>M. genitalium</i> resistente ai macrolidi (A2059G)	<i>M. genitalium</i> resistente ai macrolidi (A2058G)	<i>M. genitalium</i> resistente ai macrolidi (A2058C)	<i>M. genitalium</i> resistente ai macrolidi (A2058T)	<i>M. genitalium</i> resistente ai macrolidi (A2059C)
Urina femminile	3,33E-02	3,00E+00	9,99E-01	6,00E+00	6,00E+00	2,00E+00
Urina maschile	1,00E-01	9,00E-01	3,00E-01	2,00E+00	2,00E+00	2,00E+00
Vaginale	1,00E-01	2,70E+00	3,33E-01	2,00E+00	6,00E+00	2,00E+00

Tabella 20. Limite di rilevabilità di VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System.

Pertanto, i risultati ottenuti dimostrano che la sensibilità del dispositivo VIASURE è costante e affidabile nei vari lotti di produzione.

12.3. Intervallo di misurazione

L'intervallo di misurazione del test è stato determinato testando una serie di diluizioni 1:10 a concentrazione nota di DNA specifico e sintetico proveniente da *M. genitalium* sensibile ai macrolidi e da *M. genitalium* resistente ai macrolidi. I risultati hanno permesso di confermare il corretto rilevamento dei target nell'intervallo di misurazione indicato nella tabella che segue:

Target	Intervallo di misurazione (copie/ μ L)					
	Matrice di urina femminile		Matrice di urina maschile		Matrice vaginale	
<i>M. genitalium</i> sensibile ai macrolidi	2E+07	2E+01	2E+07	2E+00	2E+07	2E+00
<i>M. genitalium</i> resistente ai macrolidi (A2059G)	2E+07	2E+00	2E+07	2E+00	2E+07	2E+00
<i>M. genitalium</i> resistente ai macrolidi (A2058G)	2E+07	2E+01	2E+07	2E+01	2E+07	2E+00
<i>M. genitalium</i> resistente ai macrolidi (A2058C)	2E+07	2E+01	2E+07	2E+00	2E+07	2E+00
<i>M. genitalium</i> resistente ai macrolidi (A2058T)	2E+07	2E+00	2E+07	2E+01	2E+07	2E+01
<i>M. genitalium</i> resistente ai macrolidi (A2059C)	2E+07	2E+01	2E+07	2E+01	2E+07	2E+00

Tabella 21. Intervallo di misurazione di VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System.

In conclusione, l'intervallo di misurazione di VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System è stato determinato con successo in base ai criteri di convalida dell'accettazione stabiliti inizialmente, garantendo risultati affidabili, accurati e riproducibili su un'ampia gamma di cariche batteriche, confermandone l'utilità in vari scenari di diagnosi clinica.

12.4. Accuratezza

12.4.1. Esattezza

L'esattezza di VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System è stata valutata testando il materiale di riferimento riportato di seguito.

1. Frammenti di cDNA sintetico

- Frammento di cDNA sintetico per i geni *23S rRNA* (wild type) e *adesina MgPA* di *M. genitalium* sensibile ai macrolidi: canali MGRXPC, HEX e ROX.
- Frammento di cDNA sintetico per i geni *23S rRNA* (mutazione A2058C) e *adesina MgPA* di *M. genitalium* resistente ai macrolidi: canali MGRXPC, FAM e ROX.
- Frammento di cDNA sintetico per i geni *23S rRNA* (mutazione A2058G) e *adesina MgPA* di *M. genitalium* resistente ai macrolidi: canali MGRXPC, FAM e ROX.
- Frammento di cDNA sintetico per i geni *23S rRNA* (mutazione A2058T) e *adesina MgPA* di *M. genitalium* resistente ai macrolidi: canali MGRXPC, FAM e ROX.

- Frammento di cDNA sintetico per i geni *23S rRNA* (mutazione A2059C) e *adesina MgPA* di *M. genitalium* resistente ai macrolidi: canali MGRXPC, FAM e ROX.
- Frammento di cDNA sintetico per i geni *23S rRNA* (mutazione A2059G) e *adesina MgPA* di *M. genitalium* resistente ai macrolidi: canali MGRXPC, FAM e ROX.

2. American Type Culture Collection (ATCC®)

Codice prodotto esterno	Microorganismo	Nome del prodotto	Varietà
49895	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> Tully et al.	Ceppo M30
33530	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> Tully et al.	Ceppo G37
49898	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> Tully et al.	Ceppo TW48-5G
49123	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> Tully et al.	Ceppo TW10-5G
49899	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> Tully et al.	Ceppo UMTB-10G
49896	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> Tully et al.	Ceppo TW10-6G
49897	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> Tully et al.	Ceppo R32G [R32]

Tabella 22. Materiale di riferimento della American Type Culture Collection (ATCC®).

3. Controlli

Codice prodotto esterno	Microorganismo	Nome del prodotto	Varietà
MBTC029	<i>Mycoplasma genitalium</i>	AMPLIRUN® TOTAL MACROLIDE RESISTANT MGE CONTROL	- Ceppo tipo sensibile - Mutazione A2059G nel gene <i>23 rRNA</i> - Mutazione A2058G nel gene <i>23 rRNA</i>

Tabella 23. Materiale di controllo di Vircell S.L.

4. Programmi di valutazione esterna della qualità (EQA)

Codice prodotto esterno	Provenienza	Microorganismo	Nome del prodotto	Varietà
MG23S-03	QCMD	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> G37 (WT)	Ceppo G37
MG23S-06	QCMD	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> M6303	<i>23S rDNA</i> mutazione A2059G, resistente ai macrolidi
MG23S-07	QCMD	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> M6593	<i>23S rDNA</i> mutazione A2059G, resistente ai macrolidi
MG101S-04	QCMD	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> M6303	Resistente ai macrolidi
MG101S-06	QCMD	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> M6593	Resistente ai macrolidi

Tabella 24. Materiale di riferimento proveniente da programmi di valutazione esterna della qualità (EQA).

12.4.2. Precisione

Per determinare la precisione di VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System, sono state eseguite determinazioni intra-saggio (ripetibilità), inter-saggio, inter-lotto e inter-apparecchiatura (riproducibilità) utilizzando una matrice vaginale e una matrice di urina femminile e maschile addizionate a una concentrazione nota dei ceppi di riferimento: *Mycoplasma genitalium* ceppo M30 (Cod.: 49895™) per *M. genitalium* sensibile ai macrolidi e AMPLIRUN® TOTAL MACROLIDE RESISTANT MGE CONTROL (Cod.: MBTC029) per *M. genitalium* resistente ai macrolidi.

Intra-saggio

L'intra-saggio è stato effettuato analizzando sei repliche di tutti i campioni nello stesso ciclo con VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System. Una sintesi dei risultati è riportata nella tabella seguente.

Ceppo di <i>M. genitalium</i> sensibile ai macrolidi						
Matrice	Target	Campione	Canale	Ct (\bar{x})	σ	CV %
Urina maschile	Sensibile ai macrolidi	3xLoD	530/565 (HEX)	32,02	0,27	0,85
		5xLoD	530/565 (HEX)	30,98	0,32	1,03
		Controllo negativo	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
		Controllo negativo	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
		Controllo negativo	680/715 (CY5.5)	35,23	1,20	3,41
Urina femminile	Sensibile ai macrolidi	3xLoD	530/565 (HEX)	34,02	0,83	2,44
		5xLoD	530/565 (HEX)	33,50	0,67	2,01
		Controllo negativo	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
		Controllo negativo	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
		Controllo negativo	680/715 (CY5.5)	32,97	0,23	0,71
Vaginale	Sensibile ai macrolidi	3xLoD	530/565 (HEX)	32,48	0,29	0,88
		5xLoD	530/565 (HEX)	30,90	0,71	2,30
		Controllo negativo	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
		Controllo negativo	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
		Controllo negativo	680/715 (CY5.5)	31,23	0,25	0,80

Tabella 25. Risultati intra-saggio di VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System con ceppo di *M. genitalium* sensibile ai macrolidi. (Ct) = ciclo-soglia. (\bar{x}) = valore medio aritmetico del Ct, (σ) = deviazione standard, (CV %) = coefficiente di variazione, Neg = negativo, n.a.= non applicabile.

Ceppo di <i>M. genitalium</i> resistente ai macrolidi						
Matrice	Target	Campione	Canale	Ct (\bar{x})	σ	CV %
Urina maschile	Resistente ai macrolidi	3xLoD	475/520 (FAM)	36,17	0,62	1,70
		5xLoD	475/520 (FAM)	35,05	0,63	1,81
		Controllo negativo	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
		Controllo negativo	585/630 (ROX)	Neg	n.a.	n.a.
	EIC	3xLoD	680/715 (CY5.5)	32,58	1,24	3,80
		5xLoD	680/715 (CY5.5)	32,12	0,39	1,22
		Controllo negativo	680/715 (CY5.5)	33,28	0,66	1,99
Urina femminile	Resistente ai macrolidi	3xLoD	475/520 (FAM)	33,72	0,51	1,52
		5xLoD	475/520 (FAM)	33,30	0,37	1,12
		Controllo negativo	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
		Controllo negativo	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
		Controllo negativo	680/715 (CY5.5)	34,45	0,44	1,27
Vaginale	Resistente ai macrolidi	3xLoD	475/520 (FAM)	34,33	1,34	3,90
		5xLoD	475/520 (FAM)	33,75	0,27	0,79
		Controllo negativo	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
		Controllo negativo	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
		Controllo negativo	680/715 (CY5.5)	34,15	0,50	1,46

Tabella 26. Risultati intra-saggio di VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System con ceppo di *M. genitalium* resistente ai macrolidi. (Ct) = ciclo-soglia. (\bar{x}) = valore medio aritmetico del Ct, (σ) = deviazione standard, (CV %) = coefficiente di variazione, Neg = negativo, n.a.= non applicabile.

Inter-saggio

L'inter-saggio è stato effettuato analizzando quattro repliche dei diversi campioni, in tre giorni diversi, da tre diversi operatori che hanno utilizzato VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System. Una sintesi dei risultati è riportata nella tabella seguente.

Ceppo di <i>M. genitalium</i> sensibile ai macrolidi						
Matrice	Target	Campione	Canale	Ct (\bar{x})	σ	CV %
Urina maschile	Sensibile ai macrolidi	3xLoD	530/565 (HEX)	34,48	0,85	2,46
		5xLoD	530/565 (HEX)	33,66	0,75	2,22
		Controllo negativo	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
		Controllo negativo	585/630 (ROX)	Neg	n.a.	n.a.

Ceppo di <i>M. genitalium</i> sensibile ai macrolidi						
Matrice	Target	Campione	Canale	Ct (\bar{x})	σ	CV %
	EIC	3xLoD	680/715 (CY5.5)	34,06	1,65	4,85
		5xLoD	680/715 (CY5.5)	34,04	1,85	5,44
		Controllo negativo	680/715 (CY5.5)	34,10	1,74	5,09
Urina femminile	Sensibile ai macrolidi	3xLoD	530/565 (HEX)	34,36	1,80	5,24
		5xLoD	530/565 (HEX)	34,01	1,84	5,42
		Controllo negativo	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
		Controllo negativo	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
		Controllo negativo	680/715 (CY5.5)	34,04	1,39	4,10
Vaginale	Sensibile ai macrolidi	3xLoD	530/565 (HEX)	33,06	0,90	2,73
		5xLoD	530/565 (HEX)	31,90	0,68	2,13
		Controllo negativo	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
		Controllo negativo	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
		Controllo negativo	680/715 (CY5.5)	30,84	0,77	2,49

Tabella 27. Risultati inter-saggio di VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System con ceppo di *M. genitalium* sensibile ai macrolidi. (Ct) = ciclo-soglia. (\bar{x}) = valore medio aritmetico del Ct, (σ) = deviazione standard, (CV %) = coefficiente di variazione, Neg = negativo, n.a.= non applicabile.

Ceppo di <i>M. genitalium</i> resistente ai macrolidi						
Matrice	Target	Campione	Canale	Ct (\bar{x})	σ	CV %
Urina maschile	Resistente ai macrolidi	3xLoD	475/520 (FAM)	35,98	1,00	2,78
		5xLoD	475/520 (FAM)	35,31	0,90	2,56
		Controllo negativo	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
		Controllo negativo	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
		Controllo negativo	680/715 (CY5.5)	34,65	1,30	3,74
Urina femminile	Resistente ai macrolidi	3xLoD	475/520 (FAM)	33,08	1,28	3,87
		5xLoD	475/520 (FAM)	31,98	0,79	2,48
		Controllo negativo	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
		Controllo negativo	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
		Controllo negativo	680/715 (CY5.5)	33,54	1,09	3,25

Vaginale	Resistente ai macrolidi	3xLoD	475/520 (FAM)	34,72	1,34	3,87
		5xLoD	475/520 (FAM)	34,22	1,27	3,71
		Controllo negativo	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
		Controllo negativo	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
		Controllo negativo	680/715 (CY5.5)	30,98	0,55	1,78

Tabella 28. Risultati inter-saggio di VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System con ceppo di *M. genitalium* resistente ai macrolidi. (Ct) = ciclo-soglia. (\bar{x}) = valore medio aritmetico del Ct, (σ) = deviazione standard, (CV %) = coefficiente di variazione, Neg = negativo, n.a.= non applicabile.

Inter-lotto

I valori inter-lotto sono stati determinati con sei repliche dei diversi campioni utilizzando tre lotti di VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System. Una sintesi dei risultati è riportata nella tabella seguente.

Ceppo di <i>M. genitalium</i> sensibile ai macrolidi						
Matrice	Target	Campione	Canale	Ct (\bar{x})	σ	CV %
Urina maschile	Sensibile ai macrolidi	3xLoD	530/565 (HEX)	32,77	0,89	2,71
		5xLoD	530/565 (HEX)	31,46	0,57	1,81
		Controllo negativo	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
		Controllo negativo	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
		Controllo negativo	680/715 (CY5.5)	35,44	1,01	2,85
Urina femminile	Sensibile ai macrolidi	3xLoD	530/565 (HEX)	34,72	0,81	2,34
		5xLoD	530/565 (HEX)	33,39	0,77	2,39
		Controllo negativo	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
		Controllo negativo	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
		Controllo negativo	680/715 (CY5.5)	33,53	0,58	1,74
Vaginale	Sensibile ai macrolidi	3xLoD	530/565 (HEX)	31,62	0,98	3,11
		5xLoD	530/565 (HEX)	30,88	0,83	2,67
		Controllo negativo	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
		Controllo negativo	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
		Controllo negativo	680/715 (CY5.5)	31,06	0,39	1,27

Tabella 29. Risultati inter-lotto di VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System con ceppo di *M. genitalium* sensibile ai macrolidi. (Ct) = ciclo-soglia. (\bar{x}) = valore medio aritmetico del Ct, (σ) = deviazione standard, (CV %) = coefficiente di variazione, Neg = negativo, n.a.= non applicabile.

Ceppo di <i>M. genitalium</i> resistente ai macrolidi						
Matrice	Target	Campione	Canale	Ct (\bar{x})	σ	CV %
Urina maschile	Resistente ai macrolidi	3xLoD	475/520 (FAM)	36,46	1	2,73
		5xLoD	475/520 (FAM)	35,47	0,76	2,14
		Controllo negativo	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
		Controllo negativo	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
		Controllo negativo	680/715 (CY5.5)	32,49	0,73	2,24
Urina femminile	Resistente ai macrolidi	3xLoD	475/520 (FAM)	32,81	0,96	2,93
		5xLoD	475/520 (FAM)	32,38	0,84	2,59
		Controllo negativo	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
		Controllo negativo	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
		Controllo negativo	680/715 (CY5.5)	33,51	1,02	3,06
Vaginale	Resistente ai macrolidi	3xLoD	475/520 (FAM)	34,34	1,39	4,05
		5xLoD	475/520 (FAM)	33,96	0,62	1,82
		Controllo negativo	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
		Controllo negativo	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
		Controllo negativo	680/715 (CY5.5)	32,24	1,44	4,46

Tabella 30. Risultati inter-lotto di VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System con ceppo di *M. genitalium* resistente ai macrolidi. (Ct) = ciclo-soglia. (\bar{x}) = valore medio aritmetico del Ct, (σ) = deviazione standard, (CV %) = coefficiente di variazione, Neg = negativo, n.a.= non applicabile.

Inter-apparecchiatura

I valori inter-apparecchiatura sono stati determinati con sei repliche degli stessi campioni utilizzati per le determinazioni intra-saggio, inter-saggio e inter-lotto utilizzando VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System. Questi test sono stati effettuati presso tre laboratori con tre BD MAX™ System diversi. Una sintesi dei risultati è riportata nella tabella seguente.

Ceppo di <i>M. genitalium</i> sensibile ai macrolidi						
Matrice	Target	Campione	Canale	Ct (\bar{x})	σ	CV %
Urina maschile	Sensibile ai macrolidi	3xLoD	530/565 (HEX)	31,96	0,43	1,35
		5xLoD	530/565 (HEX)	31,00	0,40	1,30
		Controllo negativo	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
		Controllo negativo	585/630 (ROX)	Neg	n.a.	n.a.

Ceppo di <i>M. genitalium</i> sensibile ai macrolidi						
Matrice	Target	Campione	Canale	Ct (\bar{x})	σ	CV %
	EIC	3xLoD	680/715 (CY5.5)	34,48	0,87	2,53
		5xLoD	680/715 (CY5.5)	34,51	0,87	2,51
		Controllo negativo	680/715 (CY5.5)	32,46	0,62	1,92
Urina femminile	Sensibile ai macrolidi	3xLoD	530/565 (HEX)	34,31	0,97	2,81
		5xLoD	530/565 (HEX)	33,72	0,52	1,54
		Controllo negativo	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
		Controllo negativo	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
		Controllo negativo	680/715 (CY5.5)	33,08	0,62	1,87
Vaginale	Sensibile ai macrolidi	3xLoD	530/565 (HEX)	32,55	0,81	2,48
		5xLoD	530/565 (HEX)	32,57	0,52	1,60
		Controllo negativo	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
		Controllo negativo	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
		Controllo negativo	680/715 (CY5.5)	30,84	0,50	1,61

Tabella 31. Risultati inter-apparecchiatura di VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System con ceppo di *M. genitalium* sensibile ai macrolidi. (Ct) = ciclo-soglia. (\bar{x}) = valore medio aritmetico del Ct, (σ) = deviazione standard, (CV %) = coefficiente di variazione, Neg = negativo, n.a.= non applicabile.

Ceppo di <i>M. genitalium</i> resistente ai macrolidi						
Matrice	Target	Campione	Canale	Ct (\bar{x})	σ	CV %
Urina maschile	Resistente ai macrolidi	3xLoD	475/520 (FAM)	36,58	1,31	3,58
		5xLoD	475/520 (FAM)	35,13	0,53	1,51
		Controllo negativo	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
		Controllo negativo	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
		Controllo negativo	680/715 (CY5.5)	32,89	0,77	2,34
Urina femminile	Resistente ai macrolidi	3xLoD	475/520 (FAM)	33,67	0,43	1,28
		5xLoD	475/520 (FAM)	32,85	0,64	1,96
		Controllo negativo	475/520 (FAM)	Neg	n.a.	n.a.
	<i>M. genitalium</i>	3xLoD	585/630 (ROX)	32,46	0,44	1,35
		5xLoD	585/630 (ROX)	31,44	0,42	1,34
		Controllo negativo	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
		Controllo negativo	680/715 (CY5.5)	34,59	0,65	1,87
Vaginale	Resistente ai macrolidi	3xLoD	475/520 (FAM)	34,47	0,89	2,59
		5xLoD	475/520 (FAM)	33,46	0,61	1,84
		Controllo negativo	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
		Controllo negativo	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
		Controllo negativo	680/715 (CY5.5)	33,72	0,54	1,61

Tabella 32. Risultati inter-apparecchiatura di VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System con ceppo di *M. genitalium* resistente ai macrolidi. (Ct) = ciclo-soglia. (\bar{x}) = valore medio aritmetico del Ct, (σ) = deviazione standard, (CV %) = coefficiente di variazione, Neg = negativo, n.a.= non applicabile.

In conclusione, lo studio sulla precisione ha confermato l'affidabilità delle prestazioni e la coerenza tra tutte le matrici testate, in conformità ai criteri di convalida dell'accettazione stabiliti inizialmente.

12.5. Specificità analitica e reattività analitica

La specificità analitica e la reattività analitica di VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System sono state valutate *in silico* e per via sperimentale utilizzando diversi materiali di partenza come ceppi di riferimento certificati, RNA/DNA di riferimento certificati e materiali provenienti da programmi EQA (External Quality Assurance).

12.5.1. Specificità analitica

La specificità analitica è la capacità del test di rilevare il target previsto. Per la specificità analitica devono essere considerati due componenti: la reattività crociata e l'interferenza. La reattività crociata può verificarsi quando sono presenti sequenze correlate geneticamente nel campione di un paziente, mentre l'interferenza può verificarsi se la presenza di sostanze specifiche potenzialmente presenti nelle matrici del campione influenza le prestazioni del test qPCR.

Analisi *in silico* della reattività crociata

La reattività crociata è stata valutata utilizzando le sequenze di riferimento dei patogeni provenienti da NCBI Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), e/o strumenti di ricerca e/o di allineamento come BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e un software interno di analisi bioinformatica. Sono state effettuate un'analisi BLAST di ciascun primer e sonda sulla NCBI Genbank Nucleotide Database e un'analisi bioinformatica interna.

Le sequenze allineate con una percentuale di allineamento inferiore all'80% di omologia sono state considerate di improbabile rivelazione. I risultati ottenuti sono stati i seguenti:

Mycoplasma genitalium (gene *adesina MgPA*)

Tutte le sequenze analizzate presentavano una percentuale di omologia inferiore all'80% con il set di primer e sonda di *Mycoplasma genitalium* (gene *adesina MgPA*).

Pertanto, i design target di VIASURE *Mycoplasma genitalium* non dovrebbero causare falsi positivi durante il rilevamento di *Mycoplasma genitalium* in presenza di altri organismi.

Mycoplasma genitalium (gene 23S rRNA)

L'analisi BLAST filtrata per il gene *23S rRNA* di *M. genitalium* (escludendo *M. genitalium*) mostra un'elevata omologia tra i primer e le sonde e diverse sequenze di "*Uncultured Mycoplasma sp.* (ID tassonomia: 167967)" e una sequenza di "*Synthetic Mycoplasma genitalium JCVI-1.0* (ID tassonomia: 488339)".

Le sequenze di "*Uncultured Mycoplasma sp.* (ID tassonomia: 167967)" vengono rilevate con i primer e le sonde del *M. genitalium* resistente ai macrolidi e sensibile ai macrolidi, pertanto non esiste alcun rischio di reattività crociata nel prodotto, poiché per considerare un campione come positivo, è necessario il rilevamento nel canale del microrganismo (*M. genitalium*) e nel canale di resistenza o di sensibilità ai macrolidi.

"*Synthetic Mycoplasma genitalium JCVI-1.0* (ID tassonomia: 488339)" viene rilevato con i primer e la sonda di sensibilità ai macrolidi. Si tratta di una sequenza corrispondente al microrganismo target e deve essere rilevata. Questa sequenza compare in caso di reattività crociata poiché possiede un ID tassonomia diverso da quello utilizzato per l'esclusione.

Pertanto, nessuna delle sequenze analizzate, incluse quelle che presentano una percentuale di omologia superiore all'80%, può influire sul corretto rilevamento del *Mycoplasma genitalium* (gene *23S rRNA*).

Specificità analitica: prova sperimentale**Reattività crociata: prova sperimentale**

La reattività crociata di VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System è stata confermata testando un pannello di diversi microrganismi associati a sintomi di infezioni sessualmente trasmissibili o microrganismi rilevanti dal punto di vista ambientale e filogenetico. Quando possibile e in presenza di dati sulla concentrazione, i microrganismi interferenti sono stati valutati a livelli di rilevanza medica (di solito 1E+05 - 1E+06 CFU (unità formanti colonie)/mL per i batteri e 1E+04 - 1E+05 PFU (unità formanti placche)/mL per i virus). Non è stata rilevata alcuna reattività crociata tra i microrganismi analizzati riportati di seguito, eccetto che per i microrganismi target.

Test di reattività crociata					
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	<i>Haemophilus ducreyi</i>	-	<i>Mycoplasma genitalium</i> ceppo TW48-5G	-/+
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	Haemophilus influenzae	-	<i>Mycoplasma genitalium</i> ceppo UMTB-10G	-/+
<i>Atopobium vaginae</i>	-	Herpes simplex virus 2	-	<i>Mycoplasma genitalium</i> Tully et al. ceppo TW10-5G	-/+
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	Human Herpesvirus 1, ceppo 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>Proteous mirabilis</i>	-

Test di reattività crociata					
<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> sottosp. ivanovii	-	<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> ceppo G37	-/+	<i>Treponema pallidum</i>	-
<i>Enterococcus faecium</i>	-	<i>Mycoplasma genitalium</i> ceppo R32G [R32]	-/+	<i>Trichomonas vaginalis</i>	-
<i>Escherichia coli</i>	-	<i>Mycoplasma genitalium</i> ceppo TW10-6G	-/+	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	-
<i>Gardnerella vaginalis</i>	-				

Tabella 33. Microrganismi di riferimento inclusi nel test di reattività crociata. Il risultato +/- si riferisce al risultato positivo o negativo ottenuto nei diversi canali a seconda del target rilevato. Nel caso in cui un microrganismo testato sia uno dei target rilevati dal dispositivo, si ottiene un risultato positivo nel canale corrispondente, ma un risultato negativo negli altri canali.

In conclusione, i risultati dei test di reattività crociata sono conformi ai criteri di convalida dell'accettazione e indicano una specificità elevata di VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System per il rilevamento dei target *M. genitalium* resistente ai macrolidi e *M. genitalium* sensibile ai macrolidi, riducendo quindi al minimo il rischio di risultati falsi positivi. Poiché non sono state osservate amplificazioni non specifiche con altri microrganismi correlati, ciò suggerisce che il dispositivo sia in grado di distinguere accuratamente i target.

Studio degli agenti microbici interferenti

È stato condotto uno studio specifico per analizzare i potenziali agenti microbici interferenti di VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System. È stato testato un pannello di diversi microrganismi rilevanti dal punto di vista clinico, ambientale e filogenetico in presenza dei ceppi di riferimento: *Mycoplasma genitalium* ceppo M30 (Cod.: 49895™) per *M. genitalium* sensibile ai macrolidi e AMPLIRUN® TOTAL MACROLIDE RESISTANT MGE CONTROL (Cod.: MBTC029) per *M. genitalium* resistente ai macrolidi. Quando possibile e in presenza di dati sulla concentrazione, i microrganismi interferenti sono stati valutati a livelli di rilevanza medica (di solito 1E+05 - 1E+06 CFU (unità formanti colonie)/mL per i batteri e 1E+04 - 1E+05 PFU (unità formanti placche)/mL per i virus). Ogni analisi è stata condotta una volta per campione.

Un controllo di matrice positiva (Positive Matrix Control, PMC) e un controllo di matrice negativa (Negative Matrix Control, NMC) sono inclusi come controlli del test. Il PMC corrisponde alla matrice vaginale, alla matrice di urina maschile e femminile addizionata con specifici ceppi di *M. genitalium* sensibili e resistenti ai macrolidi senza nessun agente microbico interferente, mentre l'NMC corrisponde alla matrici negative senza nessun agente microbico interferente.

Nome del microrganismo	Concentrazione testata	Risultato
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 cellule/mL	N.I
<i>Klebsiella oxytoca</i>	7,60E+03 copie/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> sierovariante 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
<i>Enterococcus faecium</i>	3,50E+04 CFU/mL	N.I
Virus Herpes simplex 2	7,24E+03 TCID50/mL	N.I
Papillomavirus umano 16	1,00E+02 UI/μL	N.I
Papillomavirus umano 18	1,00E+02 UI/μL	N.I
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3,65E+03 CFU/μL	N.I
<i>Listeria monocytogenes</i>	n.a.	N.I
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	6,20E+03 CFU/μL	N.I
<i>Neisseria meningitidis</i>	5,70E+04 CFU/μL	N.I
<i>Proteus mirabilis</i>	2,55E+03 CFU/μL	N.I
<i>Serratia marcescens</i>	n.a.	N.I
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	9,20E+03 CFU/μL	N.I
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	2,00E+04 CFU/μL	N.I

Tabella 34. Studio degli agenti microbici interferenti. N.I. = Nessuna interferenza, n.a. = non applicabile.

In conclusione, non è stata osservata nessuna interferenza nel rilevamento dell'RNA di *M. genitalium* sensibile ai macrolidi e/o resistente ai macrolidi nella matrice vaginale, nell'urina maschile e femminile con i microrganismi testati.

Studio delle sostanze interferenti

È stato condotto uno studio sulle sostanze interferenti per analizzare il potenziale effetto di interferenza delle sostanze endogene ed esogene su VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System. In totale 17, 25 e 28 sostanze potenzialmente interferenti sono state aggiunte al tampone vaginale negativo, alla matrice di urina maschile e femminile addizionati rispettivamente con i ceppi di riferimento: *Mycoplasma genitalium* ceppo M30 (Cod.: 49895™) per *M. genitalium* sensibile ai macrolidi e AMPLIRUN® TOTAL MACROLIDE RESISTANT MGE CONTROL (Cod.: MBTC029) per *M. genitalium* resistente ai macrolidi, quindi è stata eseguita la valutazione con sei repliche.

Un controllo di matrice positiva (Positive Matrix Control, PMC) e un controllo di matrice negativa (Negative Matrix Control, NMC) sono inclusi come controlli del test. Il PMC corrisponde alla matrice vaginale raccolta in Copan eSwab®, alla matrice di urina maschile e femminile addizionata con specifici ceppi di *M. genitalium* sensibili e resistenti ai macrolidi senza nessuna sostanza interferente, mentre il NMC corrisponde alla matrici negative senza nessuna sostanza interferente né microrganismi/materiali di riferimento aggiunti. Sono stati ottenuti i seguenti risultati:

Matrice vaginale		
Nome della sostanza	Concentrazione testata	Risultato
PMC	-	n.a.
NMC	-	n.a.
Aciclovir	6,60E-02 mg/mL	N.I.
Metronidazolo	1,23E-01 mg/mL	N.I.
Clotrimazolo	2,50E+00 mg/mL	N.I.
Nitrato di miconazolo	2,50E+00 mg/mL	N.I.
Gel contraccettivo Conceptrol (Nonossinolo-9)	2,50E+00 mg/mL	N.I.
Tioconazolo	2,50E+00 mg/mL	N.I.
Leucociti/monociti	2,00E+06 cellule/mL	N.I.
Premeno Duo (Acido ialuronico e acido lattico)	2,50E+00 mg/mL	N.I.
Deodorante spray femminile	5,00E+01 µL/mL	N.I.
Lubrificante vaginale liquido - a base acquosa Durex Frescor	5,00E+01 µL/mL	N.I.
Lubrificante vaginale - a base oleosa SOIVRE Intim Oil	5,00E+01 µL/mL	N.I.
Crema vaginale DermoVagisil	2,50E+00 mg/mL	N.I.
Unguento per emorroidi Preparazione H HEMOAL	2,50E+00 mg/mL	N.I.
Estradiolo	7,50E-03 ng/mL	N.I.
Progesterone	6,00E+00 ng/mL	N.I.
Liquido seminale	5%	N.I.
Sangue intero	1%	N.I.

Tabella 35. Sostanze potenzialmente interferenti nella matrice vaginale. N.I.: nessuna interferenza segnalabile / I: Interferenza, n.a. = non applicabile.

Urina maschile		
Nome della sostanza	Concentrazione testata	Risultato
PMC	-	n.a.
NMC	-	n.a.
Ibuprofene	2,19E-01 mg/mL	N.I.
Naproxene	3,60E-01 mg/mL	N.I.
Amoxicillina	5,40E-02 mg/mL	N.I.
Azitromicina	1,10E-02 mg/mL	N.I.
Ceftriaxone	8,40E+01 mg/dL	N.I.
Eritromicina	1,38E-01 mg/mL	N.I.
Metronidazolo	1,23E-01 mg/mL	N.I.
Sulfametoxazolo	1,12E+00 mg/mL	N.I.
Tetraciclina cloridrato	2,40E-02 µg/mL	N.I.
Trimetoprim	4,20E-02 µg/mL	N.I.
Albumina	1,00E+01 mg/mL	N.I.
Bilirubina	4,00E-01 mg/mL	N.I.
Glucosio (Destrosio)	1,00E+01 mg/mL	N.I.
Leucociti/monociti	2,00E+06 cellule/mL	N.I.
pH basso (HCl)	n.a.	N.I.
pH alto (NaOH)	n.a.	N.I.
Liquido seminale	5%	N.I.
Urea	1,20E+00 mg/mL	N.I.
Acido urico	2,35E-01 mg/mL	N.I.
Sangue intero	1%	I.*
	0,25%	N.I.
	0,125%	N.I.
Antocianina (mirtillo rosso vaccinium macrocarpon)	1,09E-01 mg/mL	N.I.
Talquistina	2,64E+00 mL Talq/mL dvte	N.I.
4-Acetamidofenolo	1,56E-01 mg/mL	N.I.
Fenazopiridina cloridrato	1,60E-01 mg/mL	N.I.
Acido salicilico	1,50E-01 mg/mL	N.I.

Tabella 36. Sostanze potenzialmente interferenti nella matrice di urina maschile. N.I.: nessuna interferenza segnalabile / I: Interferenza, n.a. = non applicabile.

* Inibizione osservata soltanto per il target *Mycoplasma genitalium* resistente ai macrolidi.

Matrice di urina femminile		
Nome della sostanza	Concentrazione testata	Risultato
PMC	-	n.a.
NMC	-	n.a.
Ibuprofene	2,19E-01 mg/mL	N.I.
Naproxene	3,60E-01 mg/mL	N.I.

Matrice di urina femminile		
Nome della sostanza	Concentrazione testata	Risultato
Amoxicillina	5,40E-02 mg/mL	N.I.
Azitromicina	1,10E-02 mg/mL	N.I.
Ceftriaxone	8,40E+01 mg/dL	N.I.
Eritromicina	1,38E-01 mg/mL	N.I.
Metronidazolo	1,23E-01 mg/mL	N.I.
Sulfametoxazolo	1,12E+00 mg/mL	N.I.
Tetraciclina cloridrato	2,40E-02 µg/mL	N.I.
Trimetoprim	4,20E-02 µg/mL	N.I.
Albumina	1,00E+01 mg/mL	N.I.
Bilirubina	4,00E-01 mg/mL	N.I.
Glucosio (Destrosio)	1,00E+01 mg/mL	N.I.
Leucociti/monociti	2,00E+06 cellule/mL	N.I.
pH basso (HCl) 4	n.a.	I.*
pH basso (HCl) 5	n.a.	I.*
pH basso (HCl) 6	n.a.	N.I.
pH alto (NaOH)	n.a.	N.I.
Liquido seminale	5%	N.I.
Urea	1,20E+00 mg/mL	N.I.
Acido urico	2,35E-01 mg/mL	N.I.
Sangue intero	1%	N.I.
Antocianina (mirtillo rosso vaccinium macrocarpon)	1,09E-01 mg/mL	N.I.
Talquistina	2,64E+00 mL Talq/mL dvte	N.I.
4-Acetamidofenolo	1,56E-01 mg/mL	I.*
	3,90E-02 mg/mL	N.I.
	9,75E-03 mg/mL	N.I.
Fenazopiridina cloridrato	1,60E-01 mg/mL	N.I.
Acido salicilico	1,50E-01 mg/mL	N.I.
17- α -Etinilestradiolo	7,50E-03 ng/mL	N.I.
Noretindrone	1,60E+01 ng/mL	N.I.
Deodorante spray femminile	5,00E+01 µL/mL	N.I.

Tabella 37. Sostanze potenzialmente interferenti nella matrice di urina femminile. N.I.: nessuna interferenza segnalabile / I: Interferenza, n.a. = non applicabile.

* Inibizione osservata soltanto per il target *Mycoplasma genitalium* sensibile ai macrolidi.

In conclusione, diverse sostanze potenzialmente interferenti, sia endogene che esogene, sono state testate su VIASURE *Mycoplasma genitalium* with *Macrolide Resistance Assay* for BD MAX™ System. I risultati ottenuti portano a concludere che, alle concentrazioni testate, non si osserva nessuna interferenza delle sostanze valutate.

12.5.2. Reattività analitica

La reattività analitica può essere definita come la percentuale di ceppi microbici target o di campioni di DNA/RNA che danno il risultato positivo corretto. La reattività analitica è stata studiata *in silico* e mediante analisi sperimentale.

Analisi *in silico* della reattività analitica

La reattività analitica di VIASURE *Mycoplasma genitalium* with *Macrolide Resistance Assay* for BD MAX™ System è stata valutata utilizzando una banca dati di sequenze nucleotidiche di pubblico dominio come NCBI Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), e un software interno di analisi bioinformatica, per dimostrare che i geni target possono essere rilevati correttamente dal dispositivo in esame. L'analisi *in silico* del design di primer e sonda è stata eseguita attraverso l'allineamento rispetto a un totale di 2.399 sequenze analizzate (sequenze scaricate dalla banca dati con duplicati rimossi). I risultati ottenuti vengono mostrati nella seguente tabella:

<i>Mycoplasma genitalium</i>					
Gene	Sequenze allineate: 486				
	Senza mismatch	Con mismatch	Sequenze con rilevamento confermato	Sequenze senza rilevamento	Sequenze con rilevamento non noto
<i>Adesina MgPA</i>	74,07%	25,93%	74,07%	0%	25,93%*
<i>Mycoplasma genitalium</i>					
Gene	Sequenze allineate: 17				
	Senza mismatch	Con mismatch	Sequenze con rilevamento confermato	Sequenze senza rilevamento	Sequenze con rilevamento non noto
<i>23S RNA</i>	82,35%	17,65%	100%	0%	0%

Tabella 38. Analisi *in silico* della reattività analitica. "Sequenze allineate" = numero di sequenze allineate senza o con mismatch rispetto al totale delle sequenze analizzate, "Sequenze con rilevamento confermato" = sequenze senza mismatch o analizzate sperimentalmente il cui rilevamento è garantito, "Sequenze senza rilevamento" = sequenze precedentemente analizzate *in silico* il cui rilevamento sperimentale non può essere garantito a causa di precedenti evidenze sperimentali negative, "Sequenze con rilevamento non noto" = sequenze precedentemente analizzate *in silico* il cui rilevamento sperimentale non può essere garantito per mancanza di evidenze sperimentali.

*Va notato che il 20,78% del totale delle sequenze allineate (101/486) presentava mismatch non critici che sono considerati rilevati.

In sintesi, l'analisi di inclusività ha dimostrato un rilevamento corretto dei geni *adesina MgPA* e *23S rRNA* di *M. genitalium* con VIASURE *Mycoplasma genitalium* with *Macrolide Resistance Assay* for BD MAX™ System.

Reattività analitica: prova sperimentale

La reattività analitica di VIASURE *Mycoplasma genitalium* with *Macrolide Resistance Assay* for BD MAX™ System per il *Mycoplasma genitalium* è stata valutata rispetto al DNA dei seguenti ceppi, con risultati positivi:

- *Mycoplasma genitalium* ceppo G37 (codice ATCC: 33530)
- *Mycoplasma genitalium* ceppo TW48-5G (codice ATCC: 49898)

- *Mycoplasma genitalium* ceppo TW10-5G (codice ATCC: 49123)
- *Mycoplasma genitalium* ceppo UMTB-10G (codice ATCC: 49899)
- *Mycoplasma genitalium* ceppo TW10-6G (codice ATCC: 49896)
- *Mycoplasma genitalium* ceppo R32G [R32] (codice ATCC: 49897)

12.6. Tracciabilità metrologica

Questo test non è stato progettato con finalità di misurazione.

13. Caratteristiche di prestazione clinica

La prestazione clinica di VIASURE *Mycoplasma genitalium with Macrolide Resistance Assay* for BD MAX™ System è stata testata utilizzando campioni vaginali e di urina. I risultati sono stati i seguenti:

	Sito	Tipo di campione	Flusso di lavoro	Target
1	Certest Biotec S.L. In collaborazione con Hospital Universitario Miguel Servet (Saragozza, Spagna)	Tamponi vaginali	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	<i>Mycoplasma genitalium</i> sensibile ai macrolidi
				<i>Mycoplasma genitalium</i> resistente ai macrolidi
2	Certest Biotec S.L. (Saragozza, Spagna) utilizzando campioni di Cerba Xpert	Urina	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	<i>Mycoplasma genitalium</i> sensibile ai macrolidi
				<i>Mycoplasma genitalium</i> resistente ai macrolidi

Tabella 39. Sito, tipo di campione, flusso di lavoro e target.

I valori reali positivi e negativi, i valori falsi positivi e negativi, la sensibilità, la specificità, i valori predittivi positivi (PPV) e predittivi negativi (NPV), e i rapporti di probabilità (LR) di VIASURE *Mycoplasma genitalium with Macrolide Resistance Assay* for BD MAX™ System sono stati calcolati in relazione a ciascun test di confronto, come mostrato nella seguente tabella:

Sito	Test di confronto	Target	TP	TN	FP	FN	Sensibilità	Specificità	PPV	NPV	LR+	LR-
1	Allplex™ MG & AziR Assay (Seegene)	MG resistente ai macrolidi	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 sensibile ai macrolidi	50	86	3	2	0,96 (0,87-0,99)	0,97 (0,91-0,99)	0,94 (0,85-0,99)	0,98 (0,92- 1,00)	28,53 (9,37- 86,88)	0,040 (0,010- 0,155)
2	Allplex™ MG & AziR Assay (Seegene)	MG resistente ai macrolidi	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 sensibile ai macrolidi	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)

Tabella 40. Valori positivi (TP) e negativi (TN) reali, valori falsi positivi (FP) e falsi negativi (FN), sensibilità, specificità, valori predittivi positivi (PPV), valori predittivi negativi (NPV) e rapporti di probabilità (LR) di VIASURE *Mycoplasma genitalium with Macrolide Resistance Assay* for BD MAX™ System.

In conclusione, i risultati mostrano un'elevata concordanza nel rilevare *Mycoplasma genitalium* sensibile ai macrolidi e resistente ai macrolidi utilizzando VIASURE *Mycoplasma genitalium with Macrolide Resistance* Assay for BD MAX™ System.

14. Sintesi relativa alla sicurezza e alle prestazioni

La Sintesi relativa alla sicurezza e alle prestazioni di VIASURE *Mycoplasma genitalium with Macrolide Resistance* Assay for BD MAX™ System può essere scaricata dalla pagina web: certest.es/viasure/labeling. Tale sintesi sarà inoltre disponibile sul sito web EUDAMED (<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>).

Bibliografia

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 per reagenti e componenti IVD

 Dispositivo per uso diagnostico <i>in vitro</i>	 Mantenere asciutto	 Usare entro	 Fabbricante	 Codice del lotto
 Consultare le istruzioni per l'uso	 Limitazione della temperatura	 Contenuto sufficiente per <n> test	 Identificazione unica del dispositivo	 Numero di catalogo
 Marcatura CE	 Tenere lontano dalla luce del sole			

Marchi commerciali

BD MAX™ è un marchio commerciale registrato di Becton, Dickinson and Company.

Diritti di modifica riservati. Tutti i diritti riservati. © Certest Biotec, S.L.

Tutti gli altri marchi che possono apparire in questo foglietto illustrativo sono di proprietà dei rispettivi proprietari.



Certest Biotec, S.L.

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

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

Informazioni sullo sponsor in Australia: Becton Dickinson Pty Ltd., 66 Waterloo Road.
Macquarie Park NSW 2113, Australia

Informazioni sullo sponsor in Nuova Zelanda: Becton Dickinson Limited, 14B George Bourke Drive.
Mt. Wellington Auckland 1060, Nuova Zelanda

Controllo modifiche		
Versione N.	Modifiche	Data
00	Versione originale. Questa versione è una traduzione del documento originale in inglese: IUo-444224en0226.00	18/02/2026

Tabella A2. Tabella di controllo delle modifiche.

Revisione: 18 febbraio 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.