

Real Time PCR Detection Kit

Mycoplasma genitalium with Macrolide
Resistance Assay for BD MAX™ System
Instruções de utilização

CE IVD
2797

Estas Instruções de utilização aplicam-se às seguintes referências:

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

Tabela A1. Referência do produto a usar com o 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.

Consulte certest.es/viasure/labeling caso o seu idioma não se encontre na lista. Contacte viasure@certest.es caso o seu idioma não se encontre no website.

Nota: O utilizador deve notificar o fabricante e as autoridades competentes do Estado-Membro no qual está estabelecido como utilizador e/ou doente de qualquer incidente grave relacionado com o produto.

Índice

1.	Finalidade prevista.....	6
2.	Resumo e explicação	6
3.	Princípio do procedimento.....	8
4.	Reagentes fornecidos	9
5.	Reagentes e equipamentos necessários e não fornecidos	9
6.	Condições de transporte, armazenamento e utilização	10
7.	Precauções para o utilizador.....	10
8.	Procedimento do teste.....	12
8.1.	Colheita, transporte e conservação de amostras	12
8.2.	Preparação da amostra e extração de DNA.....	13
8.3.	Protocolo de PCR.....	13
8.3.1.	Programação do teste de PCR para o VIASURE <i>Mycoplasma genitalium with Macrolide Resistance</i> Assay for BD MAX™ System	14
8.3.2.	Preparação do suporte para tubos do BD MAX™ System.....	18
8.3.3.	Configuração do instrumento BD MAX™.....	19
8.3.4.	Relatório de resultados do BD MAX™.....	20
9.	Interpretação dos resultados.....	20
10.	Limitações do teste	25
11.	Controlo de qualidade	27
12.	Características de desempenho analítico	27
12.1.	Linearidade analítica.....	27
12.2.	Sensibilidade analítica. Limite de deteção (LoD).....	29
12.3.	Intervalo de medição.....	30
12.4.	Exatidão	31
12.4.1.	Veracidade	31
12.4.2.	Precisão.....	32
12.5.	Especificidade e reatividade analítica	38
12.5.1.	Especificidade analítica.....	39

12.5.2. Reatividade analítica	45
12.6. Rastreabilidade metrológica	46
13. Características de desempenho clínico.....	46
14. Resumo de segurança e desempenho	47
Bibliografia.....	48
Símbolos para componentes IVD e reagentes.....	48
Marcas comerciais	48

PORTUGUÊS

1. Finalidade prevista

O VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System é um teste de qPCR automatizado concebido para a deteção qualitativa de DNA de *Mycoplasma genitalium* e mutações pontuais específicas (conferidas por substituições de base no *23S rRNA*) implicadas na resistência aos macrólidos em esfregaços vaginais e amostras de urina de homens e mulheres, provenientes de doentes com suspeita de infeção por *M. genitalium* pelo respetivo profissional de saúde (PS). Este teste destina-se a ser utilizado como um auxiliar no diagnóstico de infeção por *M. genitalium* e na deteção de potencial resistência aos macrólidos, em combinação com os sinais e sintomas clínicos do doente e/ou fatores de risco epidemiológicos. Os resultados positivos indicam a presença de ácidos nucleicos (NA) alvo, mas não excluem a presença de NA de outros agentes patogénicos não detetados pelo teste. Os resultados negativos não excluem a presença dos NA alvo, e não devem ser utilizados como único fundamento para o tratamento ou outras decisões de gestão do doente. O ensaio utiliza o BD MAX™ System para a extração automatizada de DNA e qPCR subsequente empregando os reagentes fornecidos em conjunto com reagentes universais e descartáveis para o BD MAX™ System. O DNA é extraído a partir de amostras, amplificado utilizando qPCR e detetado utilizando oligonucleótidos específicos e sondas marcadas com moléculas fluorescentes para *M. genitalium* e mutações no gene do *23S rRNA* associadas à resistência aos macrólidos.

O produto destina-se a ser utilizado por pessoal de laboratório qualificado e com formação, especificamente instruído e treinado nas técnicas de PCR em tempo real e procedimentos de diagnóstico *in vitro* (incluindo formação no instrumento de PCR em tempo real (termociclador) e no sistema de extração de ácido nucleico).

2. Resumo e explicação

As infeções sexualmente transmissíveis (IST) constituem um problema de saúde pública importante a nível mundial, afetando a qualidade de vida e causando morbidade e mortalidade graves.

O *Mycoplasma genitalium* (MG) é uma causa comum de uretrite não gonocócica (UNG) e uretrite não clamídica em homens e cervicite em mulheres, sendo também referido como estando associado à doença inflamatória pélvica, infertilidade e parto prematuro (Baumann et al., 2018; Jensen et al., 2022; van der Schalk et al., 2020). O MG é um organismo em forma de frasco com um orgânulo terminal ligeiramente curvado, capaz de causar inflamação no trato urogenital por adesão às células epiteliais do hospedeiro, desencadeando sinais inflamatórios agudos através de sensores imunológicos inatos altamente expressos (Gnanadurai & Fifer, 2020). Este microrganismo é um organismo de crescimento lento conhecido por ser o procarionte mais pequeno capaz de replicação independente, que surgiu nas últimas décadas como um agente patogénico de transmissão sexual devido à sua capacidade de colonizar o trato reprodutor de homens e mulheres (Gnanadurai & Fifer, 2020; Jensen et al., 2022). A infeção por MG durante a gravidez tem sido associada a parto prematuro e pode desempenhar um papel na perda precoce da gravidez e em

infecções neonatais (Heavey, 2017). Pode coexistir com *Chlamydia trachomatis* e outras infecções sexualmente transmissíveis, tornando difícil determinar os seus efeitos independentes (Heavey, 2017).

Os macrólidos são uma classe de fármacos utilizados no tratamento de várias infecções bacterianas, como pneumonia, sinusite, faringite, amigdalite, infecções cutâneas não complicadas e otite média ou infecção por *Helicobacter pylori*, mas também são frequentemente utilizados para tratar infecções sexualmente transmissíveis, como infecções gonocócicas e clamídicas (Patel & Hashmi, 2023). O mecanismo de ação consiste na ligação à subunidade ribossômica 50S bacteriana (próxima do sítio da peptidil transferase (região V)) ou aos resíduos A2058 e A2059 (numeração de *Escherichia coli*) de 23S rRNA, causando a cessação da síntese proteica bacteriana (van der Schalk et al., 2020).

A crescente questão da resistência aos macrólidos é uma preocupação séria, com taxas de resistência global variando entre 30% e 100% (Gnanadurai & Fifer, 2020). As bactérias desenvolvem resistência aos macrólidos principalmente através de dois mecanismos: polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) e metilação de rRNA. No entanto, uma vez que o MG não possui as enzimas necessárias para a metilação, só pode desenvolver resistência através da modificação do alvo através de SNP (van der Schalk et al., 2020). A resistência resulta frequentemente de uma mutação de base única na posição A2058 ou A2059 (com base na numeração *Escherichia coli*) no 23S rRNA, com impacto mínimo na aptidão bacteriana, permitindo a continuação da transmissão (Gnanadurai & Fifer, 2020). A azitromicina é o macrólido mais utilizado para tratar infecções por MG, embora a josamicina e a pristinamicina também estejam a ser recomendadas (Gnanadurai & Fifer, 2020; Jensen et al., 2022; van der Schalk et al., 2020).

A cultura de MG é difícil, pois requer semanas a meses de crescimento, tornando os testes de suscetibilidade padrão impraticáveis. Embora os testes de suscetibilidade a antibióticos usando estirpes de MG cultivadas em culturas de células Vero tenham produzido resultados semelhantes aos métodos tradicionais de diluição em caldo, esta abordagem não é viável para laboratórios de diagnóstico primário ou para a maioria dos laboratórios de referência (Gnanadurai & Fifer, 2020).

Devido à ausência de parede celular, o MG não é visível em secreções genitais coradas por Gram. Além disso, os testes serológicos baseados em anticorpos não são fiáveis devido à reatividade cruzada com outros micoplasmas, incluindo *Mycoplasma pneumoniae* (Gnanadurai & Fifer, 2020). No entanto, os testes de amplificação de ácidos nucleicos (*nucleic acid amplification tests*, NAATs), como a reação em cadeia da polimerase e a amplificação mediada por transcrição, fornecem uma deteção precisa do MG (Baumann et al., 2018; Heavey, 2017; Jensen et al., 2022). Os NAATs podem ser realizados em vários tipos de amostras genitais, mas os esfregaços vaginais no caso das mulheres e as amostras de urina da primeira micção no caso dos homens parecem fornecer os melhores resultados ao testar para MG (Heavey, 2017). Devido à alta taxa de resistência antimicrobiana, recomenda-se a realização de testes simultâneos de resistência genotípica para orientar o tratamento adequado (Gnanadurai & Fifer, 2020).

3. Princípio do procedimento

O VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System foi concebido para a detecção e diferenciação qualitativa simultânea de DNA de *Mycoplasma genitalium* e de marcadores genéticos específicos associados à resistência e sensibilidade aos macrólidos em esfregaços vaginais e amostras de urina de homens e mulheres. Após o isolamento do DNA, a identificação de *M. genitalium* e marcadores genéticos de resistência e sensibilidade aos macrólidos é realizada pela amplificação de uma região específica do gene da *adesina MgPa* de *M. genitalium* e do *gene 23S rRNA*, cujas mutações pontuais específicas estão implicadas na resistência e sensibilidade aos macrólidos, utilizando oligonucleótidos específicos e sondas marcadas com fluorescência. A população-alvo do teste inclui indivíduos com sinais ou suspeita de infecção sexualmente transmissível, parceiros sexuais de indivíduos com infecção por *M. genitalium* e populações de alto risco, como homens que fazem sexo com homens (HSH), indivíduos com VIH e doentes que frequentam clínicas de saúde sexual.

O VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System baseia-se na atividade de exonuclease 5' da polimerase do DNA. Durante a amplificação do DNA, esta enzima hidrolisa a sonda ligada à sequência de DNA complementar, separando o fluoróforo do *quencher*. Esta reação gera um aumento no sinal fluorescente que é proporcional à quantidade do modelo-alvo. Esta fluorescência é monitorizada no BD MAX™ System.

O VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System contém em cada tubo todos os componentes necessários para realizar o ensaio PCR em tempo real (oligonucleótidos/sondas específicos, dNTPs, tampão, polimerase) num formato estabilizado¹, bem como um Controlo Interno Endógeno (EIC) (gene *RNAse P humano*) para o seguimento da integridade da amostra, para monitorizar o processo de extração e/ou descartar a inibição da atividade da polimerase. Os genes de manutenção (*housekeeping*) humanos estão envolvidos na manutenção celular básica e, por conseguinte, espera-se que estejam presentes em todas as células humanas nucleadas e mantenham níveis de expressão relativamente constantes.

Alvo	Canal	Gene
Resistência aos macrólidos	475/520 (FAM)	<i>23S rRNA</i>
Sensibilidade aos macrólidos	530/565 (HEX)	<i>23S rRNA</i>
<i>Mycoplasma genitalium</i>	585/630 (ROX)	<i>Adesina MgPA</i>
Controlo Interno Endógeno (EIC)	680/715 (Cy5.5)	<i>RNAse P</i>

Tabela 1. Alvo, canais e genes.

¹Tenha em atenção que os termos "estabilizado" e "liofilizado" são utilizados de forma indistinta e como sinónimos ao longo de todo o documento.

4. Reagentes fornecidos

O VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System inclui os seguintes materiais e reagentes detalhados na Tabela 2:

Reagente/Material	Descrição	Intervalo de concentração	Código	Quantidade
<i>Mycoplasma genitalium</i> with Macrolide Resistance reaction tube	Lioprotetores e estabilizadores	±6 g/100 mL*	Folha 1F	2 envelopes de 12 tubos transparentes
	Desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTP)	±1 mM*		
	Oligonucleótidos e sondas	0,2-1 nMol/μL*		
	Enzimas	10-100 U/reação*		
Rehydration Buffer tube	Mistura de solução salina	±13 mM	Selo 11	1 envelope de 24 tubos transparentes
	Tampões (TRIS, pH)	±67 mM		

Tabela 2. Reagentes e materiais fornecidos com o VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System com o N.º de Catálogo 444224.

* Para componente em formato estabilizado, o intervalo de concentração indica o intervalo após reidratação.

5. Reagentes e equipamentos necessários e não fornecidos

A seguinte lista inclui os materiais que são necessários para a utilização, mas que não estão incluídos no VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System.

- Equipamento de PCR em tempo real: BD MAX™ System (Ref: 441916).
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref:442827 ou 442828).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519).
- Vórtex.
- Micropipetas (entre 2 e 1000 μL).
- Água sem nuclease.
- Pontas com filtro.
- Luvas descartáveis sem pó.

Opcional:

- Os materiais de controlo externos podem ser utilizados como parte do procedimento de controlo de qualidade do desempenho do ensaio. Podem ser utilizados como controlo positivo externo (EPC) ou controlo negativo externo (ENC), respetivamente, materiais de controlo disponíveis no mercado e/ou amostras previamente caracterizadas como positivas ou negativas. A seleção e validação do EPC e do ENC devem ser feitas de acordo com os regulamentos locais, estaduais e/ou federais aplicáveis e com os procedimentos padrão de controlo de qualidade do laboratório. Além disso, ao utilizar materiais de controlo disponíveis no mercado, o utilizador deve seguir as respetivas instruções de utilização.

6. Condições de transporte, armazenamento e utilização

- Os kits podem ser transportados e armazenados entre 2 a 30°C até à data de validade indicada na etiqueta do kit.
- Evitar vibrações durante o transporte, de modo a prevenir fugas de líquido.
- Após a abertura dos envelopes de alumínio que contêm os tubos de reação, o produto pode ser utilizado até 28 dias a 2-30°C. Manter o frasco afastado da luz.

A tabela seguinte resume as condições de transporte, armazenamento e utilização do kit no geral e de cada componente:

Componente	Condições de transporte	Condições de armazenamento	Condições em utilização
VIASURE <i>Mycoplasma genitalium</i> with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System completo	2-30 °C durante o prazo de validade indicado na etiqueta do kit.	Antes da utilização: 2-30°C durante o prazo de validade indicado na etiqueta do kit.	<i>* Consultar as condições durante a utilização de cada componente.</i>
<i>Mycoplasma genitalium</i> with Macrolide Resistance reaction tube (folha 1F)		Antes da utilização: 2-30°C durante o prazo de validade indicado na etiqueta do kit. Uma vez aberto o envelope com o gel de sílica: 2-30°C por um período máximo de 28 dias.	Temperatura ambiente.
Rehydration Buffer tube		Antes da utilização: 2-30 °C durante o prazo de validade indicado na etiqueta do kit. Uma vez aberto o envelope com o gel de sílica: 2-30°C por um período máximo de 28 dias.	Temperatura ambiente.

Tabela 3. Resumo das condições de transporte, armazenamento e utilização do produto VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System e de cada componente.

7. Precauções para o utilizador

- O produto destina-se a ser utilizado por pessoal de laboratório qualificado e com formação, especificamente instruído e treinado nas técnicas de PCR em tempo real e procedimentos de diagnóstico *in vitro*.
- Para utilização em diagnóstico *in vitro*.
- As instruções de utilização do produto VIASURE e o Manual do utilizador do BD MAX™ System devem ser lidos atentamente antes da utilização do VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System. Não realizar o ensaio antes de terem sido compreendidas as informações sobre procedimentos, precauções de segurança e limitações descritas neste documento.
- Não utilizar reagentes e/ou materiais após a data de validade.
- Não utilizar o kit se a etiqueta de controlo da caixa exterior estiver rasgada ou danificada.
- Não utilizar os reagentes se o estojo exterior estiver aberto ou danificado aquando da receção.
- Não utilizar os reagentes se os envelopes ou os sacos que protegem os tubos estiverem abertos ou danificados aquando da receção.

- Não utilizar os tubos de reação se o material dessecante incluído em cada envelope de alumínio não existir ou estiver danificado.
- Não remover o material dessecante dos envelopes de alumínio.
- Não utilizar os tubos de reagentes se o alumínio protetor estiver rasgado ou danificado.
- Não misturar reagentes de diferentes envelopes e/ou kits e/ou lotes.
- Fechar os envelopes de alumínio que protegem os reagentes com o fecho hermético imediatamente depois de cada utilização, de modo a proteger a mistura principal da luz solar. Antes de fechar os envelopes, eliminar qualquer excesso de ar.
- Proteger os reagentes da humidade. Uma exposição prolongada à humidade pode afetar o desempenho do produto.
- Para evitar a deterioração da etiqueta, não utilizar o produto perto de solventes.
- O aparecimento da mistura de reação num formato estabilizado, normalmente depositada no fundo do tubo, diferente do habitual (sem um formato cónico, não homogénea, de tamanho menor/maior e/ou uma cor diferente de esbranquiçado) não altera a funcionalidade do teste.
- Assegurar que o tubo de reação e o tubo de tampão de rehidratação ficam bem encaixados durante a preparação do suporte para tubos do BD MAX™ System.
- No caso de outros testes de PCR serem realizados dentro da mesma área geral do laboratório, deve ter-se o cuidado de assegurar que o VIASURE *Mycoplasma genitalium with Macrolide Resistance* Assay for BD MAX™ System, o kit de extração BD MAX™ ExK™ TNA-3 ou quaisquer outros reagentes adicionais que sejam necessários para realizar os testes e o sistema BD MAX™ não estão contaminados. Evitar sempre a contaminação microbiana e por ribonuclease (RNase)/desoxirribonuclease (DNase) dos reagentes. Recomenda-se a utilização de pontas de pipeta estéreis, descartáveis, sem RNase/DNase, resistentes a aerossóis ou de deslocamento positivo. Utilizar uma ponta nova para cada espécime. É necessário mudar de luvas antes da manipulação dos reagentes e dos cartuchos (BD MAX™ PCR Cartridge).
- De modo a evitar a contaminação do ambiente por amplicões, não quebrar o BD MAX™ PCR Cartridge após a utilização. Os selos do BD MAX™ PCR Cartridge foram concebidos para evitar a contaminação.
- Conceber um fluxo de trabalho unidirecional. Deve-se começar na área de extração e, em seguida, passar para a área de amplificação e de deteção. Não colocar as amostras, os equipamentos e os reagentes utilizados em contacto com a área onde foi realizado o passo anterior.
- Seguir as boas práticas do laboratório. Utilizar vestuário de proteção, luvas descartáveis, óculos e máscara. Não comer, beber, fumar ou aplicar produtos de cosmética na área de trabalho. Lavar as mãos após terminar o teste. Evitar a contaminação e o contacto com a pele, olhos e roupa.
- As amostras devem ser tratadas como potencialmente infecciosas e/ou com risco biológico, bem como todos os reagentes e materiais que tenham sido expostos às amostras, e devem ser manuseados de acordo com os regulamentos de segurança nacionais. Tomar as precauções necessárias durante a colheita, transporte, armazenamento, tratamento e eliminação de amostras.

- As amostras e reagentes têm de ser manuseados numa câmara de segurança biológica. Utilizar equipamento de proteção individual (EPI) consistente com as orientações atuais para o manuseamento de amostras potencialmente infecciosas. Eliminar os resíduos em conformidade com os regulamentos locais e nacionais.
- Recomenda-se a descontaminação periódica dos equipamentos utilizados habitualmente, em especial de micropipetas e das superfícies de trabalho.
- Em conformidade com o Regulamento (CE) n.º 1907/2006 (REACH), os ensaios VIASURE para o BD MAX™ System não requerem Fichas de dados de segurança devido à sua classificação como não perigosos para a saúde e o ambiente, porque não contêm substâncias e/ou misturas que cumpram os critérios de classificação de perigos disponíveis no Regulamento (CE) n.º 1272/2008 (CLP), ou que estejam presentes em concentrações superiores ao valor estabelecido no regulamento mencionado para a sua declaração. Pode ser solicitada à Certest Biotec S.L. uma declaração que indique a dispensa da Ficha de Dados de Segurança do Material.
- Assegurar que a definição do programa de teste de PCR no BD MAX™ System é feita seguindo as instruções da secção "Protocolo de PCR" (parâmetros de extração de amostras, códigos de barras personalizados, definições de PCR, etc.).
- Consultar o manual do utilizador do BD MAX™ System para obter informações sobre advertências, precauções e procedimentos adicionais.
- O certificado de análise não é fornecido juntamente com o dispositivo; no entanto, pode ser transferido a partir do website da Certest Biotec S.L. (www.certest.es) em caso de necessidade.

8. Procedimento do teste

8.1. Colheita, transporte e conservação de amostras

O VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System foi testado em amostras de esfregaços vaginais colhidos por profissionais de saúde utilizando Copan eSwab® (zaragatoas de eluição líquida Amies da Copan) e em amostras de urina de primeira micção de homens e mulheres autocolhidas num recipiente estéril para recolha de amostras sem conservantes. Outros tipos de amostras têm de ser validados pelo utilizador.

A colheita, conservação e transporte de espécimes devem ser realizados segundo as condições validadas pelo utilizador. No geral, as amostras clínicas devem ser colhidas e etiquetadas adequadamente em recipientes limpos com ou sem meio de transporte (dependendo do tipo de amostra). Após a colheita, os espécimes devem ser colocados num saco para materiais com risco biológico e devem ser transportados e processados assim que possível, de modo a garantir a qualidade do teste. Os espécimes submetidos a testes moleculares têm de ser armazenados em condições controladas, de modo a que os ácidos nucleicos não se

degradem durante o armazenamento. Devem ser evitados ciclos de congelação-descongelação para prevenir a degradação da amostra e dos ácidos nucleicos.

Os espécimes clínicos têm de ser colhidos transportados e armazenados de acordo com orientações laboratoriais e/ou manuais de políticas de laboratório apropriados.

Foi realizado um estudo de estabilidade de amostras interno com o VIASURE *Mycoplasma genitalium* with *Macrolide Resistance* Assay for BD MAX™ System utilizando matriz vaginal negativa colhida em Copan eSwab®, matriz de urina feminina e masculina inoculada com a estirpe de referência sensível aos macrólidos (Amplirun® Total Macrolide Resistant MGE Control) na concentração de 3xLoD. A estabilidade foi analisada por meio de dois ensaios diferentes: estabilidade primária (25°C: 4 horas e 2 dias; 4°C: 1 e 2 dias; -20°C: 12 meses), e estabilidade aninhada. Para o ensaio de estabilidade aninhada, as amostras incubadas a 25°C durante 4 horas e as amostras incubadas a 4°C durante 1 dia foram analisadas 3 dias após a adição ao tubo de tampão de amostra (SBT); as amostras incubadas a 25°C durante 2 dias e as amostras incubadas a 4°C durante 2 dias foram analisadas 7 dias após a adição ao SBT. Além disso, as amostras foram analisadas após serem submetidas a cinco ciclos de congelação (a -80°C) e descongelação (a 25°C). Os resultados mostraram um bom desempenho das amostras armazenadas em todas as condições testadas, cumprindo os critérios de aceitação estabelecidos inicialmente.

8.2. Preparação da amostra e extração de DNA

Realizar a preparação das amostras de acordo com as recomendações nas instruções de utilização do kit de extração utilizado, BD MAX™ ExK™ TNA-3.

1. Pipetar 400 µL de esfregaço vaginal ou 750 µL de amostra de urina para um BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube e fechar o tubo com uma tampa com septo. Assegurar uma mistura completa através de agitação em vórtex durante 1 minuto a alta velocidade. Prosseguir com o BD MAX™ System Operation.

Nota: Certifique-se de que a agitação em vórtex é realizada alguns minutos antes de iniciar a execução. Se for utilizado o mesmo tubo BD MAX™ ExK™ TNA-3 Sample Buffer Tube para repetir o teste, recomenda-se agitar manualmente o tubo durante alguns minutos antes de iniciar o teste, para garantir a homogeneização adequada da amostra.

Ter em atenção que os procedimentos de preparação para a extração específica da aplicação devem ser desenvolvidos e validados pelo utilizador e que algumas outras amostras podem requerer pré-processamento.

8.3. Protocolo de PCR

Nota: Consultar o manual do utilizador do BD MAX™ System para obter instruções mais detalhadas.

8.3.1. Programação do teste de PCR para o VIASURE *Mycoplasma genitalium* with *Macrolide Resistance Assay* for BD MAX™ System

Nota: Se já tiver criado o teste para o VIASURE *Mycoplasma genitalium* with *Macrolide Resistance Assay* for BD MAX™ System, pode ignorar o passo 8.3.1 e avançar diretamente para o passo 8.3.2.

- 1) No ecrã "Run" (Executar) do BD MAX™ System, selecionar o separador "Test Editor" (Editor de testes).
- 2) Clicar no botão "Create" (Criar).

No separador "Basic Information" (Informações básicas):

- 3) No campo "Test Name" (Nome do teste), escrever o nome do teste: por ex., VIASURE MGM.

Nota: O nome do teste tem de ser único e pode ter um máximo de vinte caracteres.

- 4) No menu de lista pendente "Extraction Type" (Tipo de extração), selecionar "ExK TNA-3".
- 5) No menu de lista pendente "Master Mix Format" (Formato de mistura principal), escolher "Type 5: Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer" (Tipo 5: MP liofilizada concentrada com tampão de reidratação).
- 6) No campo "Sample Extraction Parameters" (Parâmetros de extração da amostra), selecionar "User Defined" (Definidos pelo utilizador) e ajustar os valores dos seguintes parâmetros (Tabela 4).

<i>Sample Extraction Parameters</i> (Parâmetros de extração da amostra)	<i>Value (units)</i> (Valor (unidades))
<i>Lysis Heat Time</i> (Tempo de lise por calor)	15 (min)
<i>Lysis Temperature</i> (Temperatura de lise)	55 (°C)
<i>Sample Tip Height</i> (Altura da ponta da amostra)	1600 (steps)
<i>Sample Volume</i> (Volume da amostra)	500 (µL) (protocolo de amostras de urina) 425 (µL) (protocolo de amostras vaginais)
<i>Wash Volume</i> (Volume de lavagem)	500 (µL)
<i>Neutralization Volume</i> (Volume de neutralização)	n.a.
<i>DNase Heat Time</i> (Tempo de aquecimento de DNase)	n.a.

Tabela 4. Parâmetros de extração de amostras realizada com o BD MAX™ ExK™ TNA-3. n.a. = Não aplicável.

- 7) No campo "Ct Calculation" (Cálculo Ct) selecionar "Call Ct at Threshold Crossing" (Ativar Ct aquando do cruzamento do limite) (selecionado por definição).
- 8) Se estiver a ser utilizada a versão 5.00 do software ou uma versão posterior e estiverem a ser utilizados tubos de encaixe com selo e código de barras, no campo "Custom Barcodes" (Personalizar códigos de barra) selecionar a configuração seguinte:
 - a. "Snap-In 2 Barcode" (Código de barras da posição de encaixe 2): 1F (relativamente a *Mycoplasma genitalium* with *Macrolide Resistance* reaction tube).

- b. "Snap-In 3 Barcode" (Código de barras da posição de encaixe 3): 11 (relativamente ao Rehydration Buffer tube).

No separador "PCR Settings" (Definições de PCR):

- 9) No campo "PCR Settings" (Definições de PCR), introduzir os seguintes parâmetros descritos na Tabela 5: "Alias" (até sete caracteres alfanuméricos), "PCR Gain" (Ganho de PCR), "Threshold" (Limite), "Ct Min" (Ct Mín.) e "Ct Max" (Ct Máx.).

<i>Channel</i> (Canal)	<i>Alias</i> (Alias)	<i>PCR Gain</i> (Ganho de PCR)	<i>Threshold</i> (Limite)	<i>Ct Min</i> (Ct Mín.)	<i>Ct Max</i> (Ct Máx)
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*

Tabela 5. PCR settings (Definições de PCR).

Nota: Recomenda-se o estabelecimento dos valores-limite mínimos acima indicados para cada canal como valores de partida, mas os valores finais têm de ser determinados pelo utilizador final durante a interpretação do resultado, de modo a assegurar que os limites estão dentro da fase exponencial das curvas de fluorescência e acima de qualquer sinal de fundo. O valor-limite para diferentes instrumentos pode variar devido a diferentes intensidades do sinal.

*Devido à variabilidade do número de células humanas presentes nas amostras de urina, o valor do limite para o alvo do Controlo Interno Endógeno (EIC) é de 35 para as amostras de esfregaços vaginais e de 40 para as amostras de urina de mulheres e homens, de modo a garantir uma colheita adequada da amostra.

- 10) No campo "Color compensation" (Compensação de cor), introduzir os seguintes parâmetros (Tabela 6).

		<i>False Receiving Channel</i> (Canal recetor falso)					
		<i>Channel</i> (Canal)	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
<i>Excitation Channel</i> (Canal de excitação)	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	

Tabela 6. Parâmetros de "Compensação de cor".

No separador "Melt Settings" (Definições de fusão) não é necessária qualquer ação, não é aplicável a este produto.

No separador "Test Steps" (Etapas do teste):

- 11) Introduzir o nome da etapa (até vinte caracteres) e programar os seguintes parâmetros para definir cada etapa do protocolo de PCR: "Profile Type" (Tipo de perfil), "Cycles" (Ciclos), "Time" (Tempo) e "Temperature" (Temperatura) e selecionar o campo "Detect" (Detetar) para definir a etapa de deteção (Tabela 7). Clicar no botão "Add" (Adicionar) para adicionar um novo passo e repetir até serem definidos todos os passos necessários.

Nota: O campo "Type" (Tipo) tem de estar vazio.

<i>Step</i> (Etapa)	<i>Step name</i> (Nome da etapa)	<i>Profile Type</i> (Tipo de perfil)	<i>Cycles</i> (Ciclos)	<i>Time (s)</i> (Tempo (s))	<i>Temperature</i> (Temperatura)	<i>Detect</i> (Detetar)
Initial denaturation (Desnaturação inicial)	IN-denaturation	Hold	1	120	95°C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Desnaturação e hibridização/Extensão (recolha de dados))	Annealing/Extension	2-Temperature	45	10	95°C	-
				58	60°C	✓

Tabela 7. Protocolo de PCR.

No separador "Result Logic" (Lógica de resultados):

- 12) No campo "Target" (Alvo), atribuir um nome ao seu alvo: ou seja, Res (até sete caracteres alfanuméricos). Repetir os passos 12-15 para cada alvo (ou seja, Sen ou Mg) seguindo as tabelas específicas para o alvo que está a ser definido.
- 13) Clicar na caixa de verificação "Analyze" (Analisar) para incluir os comprimentos de onda desejados (canais de PCR) na análise de resultados do alvo (Tabelas 8-10).

<i>Wavelength</i> (Comprimento de onda)	<i>Alias</i> (Alias)	<i>Type</i> (Tipo)	<i>Analyze</i> (Analisar)
475/520	Res	PCR	✓
680/715	EIC	PCR	✓

Tabela 8. Seleção de canais de PCR em "Result logic" (Lógica de resultados) para o alvo Res (Resistência aos macrólidos).

<i>Wavelength</i> (Comprimento de onda)	<i>Alias</i> (Alias)	<i>Type</i> (Tipo)	<i>Analyze</i> (Analisar)
530/565	Sen	PCR	✓
680/715	EIC	PCR	✓

Tabela 9. Seleção de canais de PCR em "Result logic" (Lógica de resultados) para o alvo Sen (Sensibilidade aos macrólidos).

<i>Wavelength</i> (Comprimento de onda)	<i>Alias</i> (Alias)	<i>Type</i> (Tipo)	<i>Analyze</i> (Analisar)
585/630	Mg	PCR	✓
680/715	EIC	PCR	✓

Tabela 10. Seleção de canais de PCR em "Result logic" (Lógica de resultados) para o alvo Mg (*Mycoplasma genitalium*).

14) Clicar no botão "Edit Logic" (Editar lógica).

15) Na janela "Edit Logic" (Editar lógica), são listadas todas as combinações de tipos de resultados. Para cada linha, no menu pendente "Result" (Resultado), seleccionar o resultado correspondente quando se cumprem as condições dessa linha, seguindo as Tabelas 11-13 para as amostras vaginais e as Tabelas 14-16 para as amostras de urina.

Amostras de esfregaços vaginais

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

Tabela 11. Lista da combinação de tipos de resultados e lógica de resultados para o alvo Res (Resistência aos macrólidos) no protocolo de amostras vaginais. Os resultados disponíveis são POS (Positivo), NEG (Negativo) e UNR (Não resolvido).

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

Tabela 12. Lista da combinação de tipos de resultados e lógica de resultados para o alvo Sen (Sensibilidade aos macrólidos) no protocolo de amostras vaginais. Os resultados disponíveis são POS (Positivo), NEG (Negativo) e UNR (Não resolvido).

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

Tabela 13. Lista da combinação de tipos de resultados e lógica de resultados para o alvo Mg (*Mycoplasma genitalium*) no protocolo de amostras vaginais. Os resultados disponíveis são POS (Positivo), NEG (Negativo) e UNR (Não resolvido).

Amostras de urina

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

Tabela 14. Lista da combinação de tipos de resultados e lógica de resultados para o alvo Res (Resistência aos macrólidos) no protocolo de amostras de urina. Os resultados disponíveis são POS (Positivo), NEG (Negativo) e UNR (Não resolvido).

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

Tabela 15. Lista da combinação de tipos de resultados e lógica de resultados para o alvo Sen (Sensibilidade aos macrólidos) no protocolo de amostras de urina. Os resultados disponíveis são POS (Positivo), NEG (Negativo) e UNR (Não resolvido).

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

Tabela 16. Lista da combinação de tipos de resultados e lógica de resultados para o alvo Mg (*Mycoplasma genitalium*) no protocolo de amostras de urina. Os resultados disponíveis são POS (Positivo), NEG (Negativo) e UNR (Não resolvido).

Nota: De acordo com o Ct Máx. definido previamente (Tabela 5):

- i. O tipo de resultado para os canais Res (475/520), Sen (530/565) ou Mg (585/630) é considerado "Valid" (Válido) quando o valor de Ct obtido é ≤ 40 ; e "Invalid" (Inválido) quando o valor de Ct obtido é > 40 .
- ii. O tipo de resultado para o canal EIC (680/715) é considerado "Valid" (Válido) quando o valor de Ct obtido é ≤ 35 para amostras de esfregaços vaginais e ≤ 40 para amostras de urina; e "Invalid" (Inválido) quando o valor de Ct obtido é > 35 e > 40 , respetivamente.

* Embora o valor-limite para o alvo do EIC em amostras de urina seja 40, é possível não observar a curva de amplificação no EIC em caso de sinal positivo no alvo Res ou Sen e no alvo Mg. Neste caso, a lógica de resultados é POS (Positivo). Consultar a Secção 9. Interpretação dos resultados.

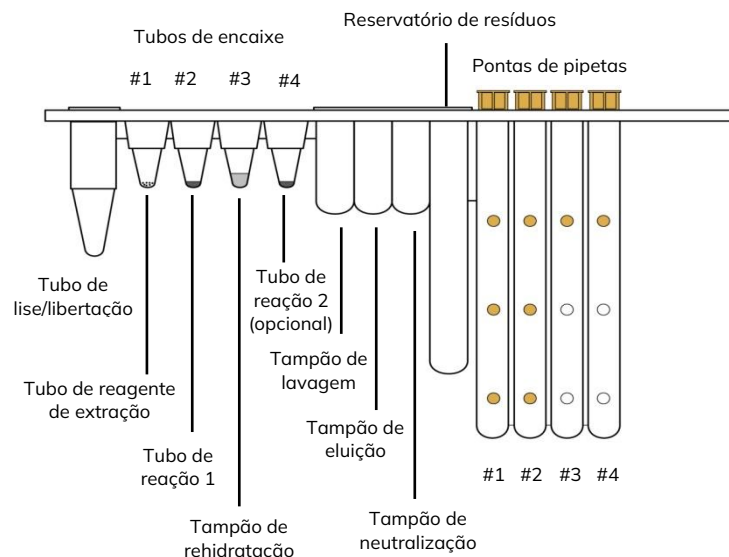
16) Clicar no botão "Save" (Guardar) para guardar o teste.

8.3.2. Preparação do suporte para tubos do BD MAX™ System

- 1) Para cada amostra a testar, retirar uma tira de reagentes individual (Unitized Reagent Strips) do BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit. Bater levemente cada tira sobre uma superfície dura para se certificar de que todos os líquidos se encontram no fundo dos tubos e colocar a tira de reagentes no suporte para tubos do BD MAX™ System.
- 2) Determinar e separar o número de tubos de reagente de extração necessários (BD MAX™ ExK™ TNA Extraction Tubes (B4) (selo branco)) da sua bolsa protetora. Colocar o(s) tubo(s) de reagente de extração (selo branco) na sua posição correspondente dentro da tira de reagentes TNA (Posição de encaixe 1, código de cor branca no suporte para tubos. Ver Figura 1). Eliminar o excesso de ar e fechar as bolsas protetoras com o fecho hermético.
- 3) Determinar e separar o número apropriado de *Mycoplasma genitalium with Macrolide Resistance* reaction tubes (folha 1F) e encaixe-los nas posições correspondentes na tira (Posição de encaixe 2, código de cor verde no suporte. Ver Figura 1).
 - a. Eliminar o excesso de ar e fechar os envelopes de alumínio com o fecho hermético.

- b. Para uma reidratação correta, deve certificar-se de que o produto liofilizado está no fundo do tubo e não agarrado à área superior do tubo ou ao vedante de alumínio. Bater levemente cada tubo sobre uma superfície dura para se certificar que todo o produto se encontra no fundo do tubo.
- 4) Remover o número necessário de Rehydration Buffer Tubes (selo 11) e colocá-los nas posições correspondentes na tira (Posição de encaixe 3, código sem cor no suporte para tubos. Ver Figura 1).
- a. Eliminar o excesso de ar e fechar os envelopes com o fecho hermético.
- b. De modo a assegurar uma transferência correta, deve certificar-se de que o líquido está no fundo do tubo e não agarrado à área superior do tubo ou ao vedante de alumínio. Bater levemente cada tubo sobre uma superfície dura para se certificar que todo o tampão se encontra no fundo do tubo.

Figura 1. Tira de BD MAX™ TNA Reagent (TNA) do kit BD MAX™ ExK™ TNA-3.



8.3.3. Configuração do instrumento BD MAX™

- 1) Selecionar o separador "Worklist" (Lista de trabalho) no ecrã "Run" (Executar) utilizando o software v4.50A ou superior do BD MAX™ System.
- 2) No menu de lista pendente "Test" (Teste), selecionar o teste pretendido, ou seja, VIASURE MGM (se ainda não tiver sido criado, consultar a secção 8.3.1).
- 3) No menu pendente "Kit Lot Number" (N.º de lote do kit), selecionar o número de lote apropriado para o kit (encontra-se na caixa exterior do kit de extração utilizado) (opcional).

Nota: Os números de lote têm de ser definidos no separador "Inventory" (Inventário) antes de poderem ser selecionados aqui.

- 4) Introduzir o número de identificação do Sample Buffer Tube no campo "Sample tube" (Tubo de amostra), quer através da digitalização do código de barras com o leitor ou através de entrada manual.

- 5) Preencher o campo "Patient ID" (ID do doente) e/ou "Accession" (Acesso) e clicar na tecla Tab ou Enter. Continuar até estarem introduzidos todos os códigos de barras dos Sample Buffer Tubes. Certificar-se de que a identificação do espécime/doente e dos Sample Buffer Tubes estão corretamente equiparados.
- 6) Colocar o Sample Buffer Tube preparado no(s) suportes BD MAX™.
- 7) Colocar o(s) suporte(s) no BD MAX™ System (o suporte para tubos A encontra-se no lado esquerdo do BD MAX™ System e o suporte para tubos B no lado direito).
- 8) Colocar o número necessário de BD MAX™ PCR Cartridge no BD MAX™ System.
- 9) Fechar a porta do BD MAX™ System.
- 10) Clicar em "Start" (Iniciar) para iniciar o procedimento.

8.3.4. Relatório de resultados do BD MAX™

- 1) Na barra de menus, clicar no botão "Results" (Resultados).
- 2) Clicar duas vezes na execução incluído na lista ou premir o botão "View" (Visualizar).
- 3) Os botões "Print" (Imprimir) e "Export" (Exportar) na parte inferior do ecrã serão ativados.

Para imprimir os resultados:

1. Clicar no botão "Print" (Imprimir).
2. Na janela de pré-visualização "Print" (Imprimir) do relatório de execução, selecionar: "Run Details" (Detalhes da execução), "Test Details" (Detalhes do teste) e "Plots" (Gráficos).
3. Clicar em "Print" (Imprimir) para imprimir o relatório ou clicar em "Export" (Exportar) para exportar um PDF do relatório para uma pen USB.

Para exportar os resultados:

1. Clicar no botão "Export" (Exportar) para transferir o relatório (ficheiro PDF e CSV) para uma pen USB.
2. Quando a exportação estiver concluída, o ícone de sucesso/falha aparece na janela "Results Export" (Exportação de resultados).

9. Interpretação dos resultados

Para uma descrição detalhada de como analisar os dados, consultar o manual do utilizador do BD MAX™ System.

A análise dos dados é realizada com o software BD MAX™ de acordo com as instruções de utilização do fabricante. O software do BD MAX™ System disponibiliza os valores de Ct e mostra as curvas de amplificação para cada um dos canais de deteção de cada amostra analisada da seguinte forma:

- Um valor de Ct de 0 indica que o software não calculou nenhum valor de Ct com o limiar especificado (consultar a Tabela 5). Se a curva de amplificação mostra um "0" como valor de Ct, é necessário analisá-la manualmente.

- Um valor de Ct igual a -1 indica que não ocorreu nenhum processo de amplificação, que não foi calculado nenhum valor de Ct pelo software ou que o valor de Ct calculado está abaixo do limite especificado ou acima do Ct Máx. estabelecido (valor-limite).

- Qualquer outro valor de Ct deve ser interpretado em correlação com a curva de amplificação e de acordo com a lógica de resultados definida, segundo as orientações de interpretação descritas nas Tabelas 17-18.

Verificar a emissão do sinal do Controlo Interno Endógeno (EIC) para confirmar o funcionamento correto da mistura de amplificação. Para além disso, verificar se não há nenhum relatório de anomalia do BD MAX™ System. Tenha em atenção que, de acordo com a lógica de resultados definida, é possível não observar a curva de amplificação no EIC em amostras de urina em caso de sinal positivo nos alvos Mg e Res ou Sen. Leia atentamente a interpretação para amostras de urina individuais do doente (Tabela 18).

Os resultados devem ser lidos e analisados utilizando as tabelas seguintes:

Interpretação de resultados para amostras de esfregaços vaginais

Resistência aos macrólidos (nome do alvo: Res)	Sensibilidade aos macrólidos (nome do alvo: Sen)	<i>M. genitalium</i> (nome do alvo: Mg)	Interpretação de amostras individuais do doente
NEG	POS	POS	DNA de sensibilidade aos macrólidos e de <i>M. genitalium</i> detetado, DNA de resistência aos macrólidos não detetado
POS	NEG	POS	DNA de resistência aos macrólidos e de <i>M. genitalium</i> detetado, DNA de sensibilidade aos macrólidos não detetado
POS	POS	POS	DNA de resistência aos macrólidos, sensibilidade aos macrólidos e <i>M. genitalium</i> detetado RESULTADO INCONCLUSIVO ¹
POS	POS	NEG	DNA de resistência aos macrólidos e de sensibilidade aos macrólidos detetado, DNA de <i>M. genitalium</i> não detetado. RESULTADO INCONCLUSIVO ¹
POS	NEG	NEG	DNA de resistência aos macrólidos detetado, DNA de sensibilidade aos macrólidos e de <i>M. genitalium</i> não detetado. RESULTADO INCONCLUSIVO ¹
NEG	POS	NEG	DNA de sensibilidade aos macrólidos detetado, DNA de resistência aos macrólidos e de <i>M. genitalium</i> não detetado. RESULTADO INCONCLUSIVO ¹
NEG	NEG	POS	DNA de <i>M. genitalium</i> detetado, DNA de resistência aos macrólidos e de sensibilidade aos macrólidos não detetado. RESULTADO INCONCLUSIVO ^{1,2}
NEG	NEG	NEG	DNA de resistência aos macrólidos, sensibilidade aos macrólidos e <i>M. genitalium</i> não detetado

Resistência aos macrólidos (nome do alvo: Res)	Sensibilidade aos macrólidos (nome do alvo: Sen)	<i>M. genitalium</i> (nome do alvo: Mg)	Interpretação de amostras individuais do doente
UNR	UNR	UNR	Resultado não resolvido (UNR) obtido na presença de inibidores na reação de PCR, de amostras abaixo do limite de detecção ou quando ocorre um problema geral (não indicado por um código de erro) nas etapas de processamento e/ou amplificação da amostra. ³
IND	IND	IND	Resultado indeterminado do ensaio (IND). Devido a anomalia do BD MAX™ System. Resultado do ensaio apresentado no caso de falha do instrumento associado a um código de erro. ⁴
INC	INC	INC	Resultado incompleto do ensaio (INC). Devido a anomalia do BD MAX™ System. Resultado do ensaio apresentado no caso de falha de uma execução completa. ⁴

Tabela 17. Interpretação de resultados para amostras de esfregaços vaginais.

1 É necessário repetir o teste. Recomenda-se a repetição do ensaio a partir do mesmo Sample Buffer Tube (SBT) ou da amostra primária, preparando um novo SBT. Em caso de resultado inconclusivo novamente, obter uma nova amostra (mais concentrada, se possível) e repetir o teste.

NOTA: As amostras de esfregaços vaginais podem ser mantidas sem transferência para o SBT durante um período máximo de 2 dias, se armazenadas a 25°C ou 4°C. No caso de repetir o teste a partir do mesmo SBT, recomenda-se agitar manualmente o SBT para garantir a homogeneização adequada da amostra. Tenha em atenção que as amostras de esfregaços vaginais podem ser armazenadas no SBT durante um máximo de 7 dias a 25°C ou 4°C (se anteriormente armazenadas a 25°C ou 4°C durante um máximo de 2 dias).

2 O kit deteta as seguintes mutações associadas à resistência aos macrólidos: gene *23S rRNA* (A2058T, A2058C, A2058G, A2059C, A2059G). Em caso de presença de outra mutação, o kit não está validado para a sua detecção, portanto, a amplificação será observada no canal ROX (detecção de *M. genitalium*) e não nos canais FAM e HEX (detecção de resistência aos macrólidos e sensibilidade aos macrólidos, respetivamente).

3 O Controlo Interno Endógeno (EIC) deve apresentar um sinal de amplificação com valor de Ct ≤ 35 para ser considerado. Se houver ausência de sinal para o EIC ou o valor de Ct for >35 , o resultado é considerado Não Resolvido (UNR) e é necessário repetir o teste. Verificar o relatório de resultados e os valores de Ct dos alvos selecionados e proceder em conformidade tendo em conta o seguinte:

- I. Quando os resultados dos genes-alvo são inválidos (Ct > 40), é necessário repetir o ensaio a partir do mesmo SBT ou da amostra primária, preparando um novo SBT. Se for novamente obtido um resultado UNR, devem ser considerados dois cenários. Por um lado, a concentração da amostra pode estar abaixo do LoD, portanto, recomendar-se-ia obter uma amostra mais concentrada. Por outro lado, deve ser considerada a potencial presença de inibidores na reação de PCR e recomendar-se-ia diluir estas amostras 1/10. Seguir as diretrizes do laboratório e/ou os manuais de políticas do laboratório de microbiologia.
- II. Quando os resultados dos genes-alvo de resistência aos macrólidos, sensibilidade aos macrólidos e/ou *M. genitalium* são válidos (Ct ≤ 40), é possível não ver nenhuma amplificação ou amplificação de EIC com um valor de Ct > 35 ao testar amostras altamente concentradas, devido a uma amplificação preferencial de ácidos nucleicos específicos do alvo. Se for considerado necessário, diluir estas amostras na proporção de 1/10, preparar novamente o Sample Buffer Tube (SBT) e repetir o teste. Seguir as diretrizes do laboratório e/ou os manuais de políticas do laboratório de microbiologia.

4 Podem ser obtidos resultados Indeterminados (IND) ou Incompletos (INC) devido a uma falha do sistema e é necessário repetir o teste. Consultar o manual do utilizador do BD MAX™ System para a interpretação dos códigos de aviso e de erro.

Interpretação de resultados para amostras de urina

Resistência aos macrólidos (nome do alvo: Res)	Sensibilidade aos macrólidos (nome do alvo: Sen)	<i>M. genitalium</i> (nome do alvo: Mg)	Interpretação de amostras individuais do doente
NEG	POS	POS	DNA de sensibilidade aos macrólidos e <i>de M. genitalium</i> detetado, DNA de resistência aos macrólidos não detetado
POS	NEG	POS	DNA de resistência aos macrólidos e <i>de M. genitalium</i> detetado, DNA de sensibilidade aos macrólidos não detetado
POS	POS	POS	DNA de resistência aos macrólidos, sensibilidade aos macrólidos e <i>M. genitalium</i> detetado RESULTADO INCONCLUSIVO ¹
POS	POS	NEG	DNA de resistência aos macrólidos e de sensibilidade aos macrólidos detetado, DNA de <i>M. genitalium</i> não detetado. RESULTADO INCONCLUSIVO ¹
POS	NEG	NEG	DNA de resistência aos macrólidos detetado, DNA de sensibilidade aos macrólidos e de <i>M. genitalium</i> não detetado. RESULTADO INCONCLUSIVO ¹
NEG	POS	NEG	DNA de sensibilidade aos macrólidos detetado, DNA de resistência aos macrólidos e de <i>M. genitalium</i> não detetado. RESULTADO INCONCLUSIVO ¹
NEG	NEG	POS	DNA de <i>M. genitalium</i> detetado, DNA de resistência aos macrólidos e de sensibilidade aos macrólidos não detetado. RESULTADO INCONCLUSIVO ^{1,2}
NEG	NEG	NEG	DNA de resistência aos macrólidos, sensibilidade aos macrólidos e <i>M. genitalium</i> não detetado
UNR	POS	POS	DNA de sensibilidade aos macrólidos e <i>M. genitalium</i> detetado, DNA de resistência aos macrólidos não detetado ³
POS	UNR	POS	DNA de resistência aos macrólidos e <i>de M. genitalium</i> detetado, DNA de sensibilidade aos macrólidos não detetado ³
UNR	UNR	UNR	Resultado não resolvido (UNR) obtido na presença de inibidores na reação de PCR ou quando ocorre um problema geral (não indicado por um código de erro) nos passos de processamento e/ou amplificação da amostra. ⁴
POS	POS	UNR	Não resolvido (UNR) – Repetir teste ¹
POS	UNR	UNR	Não resolvido (UNR) – Repetir teste ¹
UNR	POS	UNR	Não resolvido (UNR) – Repetir teste ¹

Resistência aos macrólidos (nome do alvo: Res)	Sensibilidade aos macrólidos (nome do alvo: Sen)	<i>M. genitalium</i> (nome do alvo: Mg)	Interpretação de amostras individuais do doente
UNR	UNR	POS	Não resolvido (UNR) – Repetir teste ¹
IND	IND	IND	Resultado indeterminado do ensaio (IND). Devido a anomalia do BD MAX™ System. Resultado do ensaio apresentado no caso de falha do instrumento associado a um código de erro. ⁵
INC	INC	INC	Resultado incompleto do ensaio (INC). Devido a anomalia do BD MAX™ System. Resultado do ensaio apresentado no caso de falha de uma execução completa. ⁵

Tabela 18. Interpretação de resultados para amostras de urina.

1 É necessário repetir o teste. Recomenda-se a repetição do ensaio a partir do mesmo Sample Buffer Tube (SBT) ou da amostra primária, preparando um novo SBT. Em caso de resultado inconclusivo novamente, obter uma nova amostra (mais concentrada, se possível) e repetir o teste.

NOTA: As amostras de urina podem ser mantidas sem transferência para o SBT durante um período máximo de 4 horas, se armazenadas a 25°C, ou durante 1 dia, se armazenadas a 4°C. Em caso de repetição do teste a partir do mesmo SBT, recomenda-se agitar manualmente o SBT para assegurar a homogeneização adequada da amostra. Tenha em atenção que as amostras de urina podem ser armazenadas no SBT durante um máximo de 3 dias a 25°C (se anteriormente armazenadas a 25°C durante um máximo de 4 horas) ou durante um máximo de 3 dias a 4°C (se anteriormente armazenadas a 4°C durante um máximo de 1 dia).

2 O kit deteta as seguintes mutações associadas à resistência aos macrólidos: gene *23S rRNA* (A2058T, A2058C, A2058G, A2059C, A2059G). Em caso de presença de outra mutação, o kit não está validado para a sua deteção, portanto, a amplificação será observada no canal ROX (deteção de *M. genitalium*) e não nos canais FAM e HEX (deteção de resistência aos macrólidos e sensibilidade aos macrólidos, respetivamente).

3 Embora o valor-limite para o alvo do Controlo Interno Endógeno (EIC) em amostras de urina seja 40, devido ao baixo número de células humanas na urina, é permitido não observar a curva de amplificação no EIC no caso de sinal positivo nos alvos resistência aos macrólidos (canal FAM) ou sensibilidade aos macrólidos (canal HEX) e *Mycoplasma genitalium* (canal ROX). Neste caso, não existe risco de relato de um resultado falso positivo porque a amplificação deve ser observada simultaneamente em dois canais diferentes.

4 O EIC deve apresentar um sinal de amplificação com valor de Ct ≤ 40 para ser considerado. Se houver ausência de sinal para o EIC ou o valor de Ct for >40, o resultado é considerado Não Resolvido (UNR) e é necessário repetir o teste. Recomenda-se a repetição do ensaio a partir do mesmo SBT ou a partir da amostra primária preparando um novo SBT, ou obter uma amostra mais concentrada. Também pode acontecer que o resultado Não Resolvido (UNR) se deva à presença de inibidores na reação de PCR; nestes casos, recomenda-se a diluição destas amostras na razão de 1/10. Seguir as diretrizes do laboratório e/ou os manuais de políticas do laboratório de microbiologia.

5 Podem ser obtidos resultados Indeterminados (IND) ou Incompletos (INC) devido a uma falha do sistema e é necessário repetir o teste. Consultar o manual do utilizador do BD MAX™ System para a interpretação dos códigos de aviso e de erro.

Nota: Quando utilizar controlos externos, estes devem produzir os seguintes resultados esperados: negativos para o ENC e positivos para o EPC (espera-se que os espécimes positivos conhecidos sejam positivos apenas para os microrganismos presentes no espécime). Quando ocorre uma falha de controlo externo, é necessário repetir o teste.

Em caso de um resultado ambíguo contínuo, é recomendável reler as instruções de utilização, o processo de extração usado pelo utilizador; para verificar o desempenho correto de cada passo da PCR e rever os parâmetros e para verificar a forma sigmoideia da curva e a intensidade da fluorescência.

Os resultados do teste devem ser avaliados por um profissional de saúde no contexto da história clínica, sintomas clínicos e outros testes diagnósticos.

10. Limitações do teste

- Os resultados do teste devem ser avaliados por um profissional de saúde no contexto da história clínica, sintomas clínicos e outros testes diagnósticos.
- O VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System apenas foi validado com esfregaços vaginais e amostras de urina de homens e mulheres.
- Para o bom desempenho do teste, o produto liofilizado deve estar no fundo do tubo e não agarrado à área superior do tubo ou ao vedante de alumínio. Bater levemente cada tubo sobre uma superfície dura para se certificar que todo o produto se encontra no fundo do tubo.
- É possível que seja observada interferência em canais vazios do BD MAX™ System caso não exista alvo a ser detetado, pelo que é necessário selecionar apenas os canais onde os alvos estejam amplificados ao realizar a interpretação dos resultados. Contactar viasuresupport@certest.es para eventuais pedidos de esclarecimentos.
- A qualidade do teste depende da qualidade da amostra; o ácido nucleico tem de ser corretamente extraído das amostras clínicas.
- O teste é um teste qualitativo e não fornece valores quantitativos, nem indica o número de organismos presentes. Não é possível correlacionar os valores de Ct obtidos por PCR com a concentração da amostra, pois esses valores dependem do termociclador utilizado e do próprio ensaio.
- Podem ser detetados níveis extremamente baixos de alvos abaixo do limite de deteção, mas os resultados podem não ser reproduzíveis.
- Ter em atenção o intervalo de medição previsto do ensaio, pois amostras com concentrações acima ou abaixo deste intervalo podem apresentar resultados erróneos.
- Existe a possibilidade de resultados falsos positivos devido a contaminação cruzada por amostras de *M. genitalium* resistentes aos macrólidos e/ou amostras de *M. genitalium* sensíveis aos macrólidos, que contêm elevadas concentrações de DNA-alvo ou devido a contaminação com produtos de PCR de reações anteriores.
- Resultados falsos negativos podem ser causados por vários fatores e respetivas combinações, incluindo:
 - Métodos incorretos de colheita, transporte, armazenamento e/ou manuseamento de espécimes.
 - Procedimentos de processamento incorretos (incluindo extração de DNA).
 - Degradação do DNA durante a expedição/armazenamento e/ou processamento das amostras.

- Mutações ou polimorfismos em regiões de ligação de oligonucleótidos ou sondas que podem afetar a detecção de estirpes novas ou desconhecidas de *M. genitalium* ou marcadores genéticos de resistência e sensibilidade aos macrólidos.
- Uma carga bacteriana no espécime abaixo do limite de detecção para o ensaio.
- A presença de inibidores de qPCR ou de outros tipos de substâncias interferentes. Não foram avaliados os efeitos de vacinas, algumas terapêuticas antivirais, antibióticos, fármacos quimioterapêuticos ou imunossupressores, ou de antifúngicos utilizados para prevenir infecções ou utilizados durante o tratamento da infecção.
- O efeito de substâncias interferentes apenas foi avaliado para as indicadas na secção 12.5.1 (estudo de substâncias interferentes) destas Instruções de utilização. Consultar esta secção para obter informações sobre as substâncias endógenas e exógenas mais comuns que induzem interferência total ou parcial na reação de qPCR. Outras substâncias não indicadas nesta parte podem conduzir a resultados erróneos.
- A não observância das instruções de utilização e do procedimento do ensaio.
- O kit deteta as seguintes mutações associadas à resistência aos macrólidos: gene *23S rRNA* (A2058T, A2058C, A2058G, A2059C, A2059G). A estirpe de *M. genitalium* resistente aos macrólidos que contém a mutação A2059T, que é menos prevalente, não pode ser detetada pelo dispositivo. Apenas neste caso, é possível observar amplificação no canal ROX (detecção de *M. genitalium*) e não nos canais FAM e HEX (detecção de resistência aos macrólidos e sensibilidade aos macrólidos, respetivamente).
- Um resultado de teste positivo não indica necessariamente a presença de microrganismos viáveis e não significa que estes microrganismos são infecciosos ou que são os agentes causadores de sintomas clínicos. No entanto, um resultado positivo pode ser indicativo da presença de sequências-alvo de *M. genitalium* resistente aos macrólidos e *M. genitalium* sensível aos macrólidos.
- Resultados negativos não excluem a presença de DNA de *M. genitalium* resistente aos macrólidos e sensível aos macrólidos numa amostra clínica e não devem ser utilizados como único fundamento para o tratamento ou outras decisões de gestão do doente. Não foram determinados os tipos de espécimes ideais e o momento em que se alcançam os níveis microbianos máximos durante a infeção causada por *M. genitalium*. Pode ser necessária a colheita de vários espécimes (tipos e pontos temporais) do mesmo doente para detetar o agente patogénico.
- Se os testes de diagnóstico para outras doenças sexualmente transmissíveis (DST) e/ou resistência antimicrobiana forem negativos e as observações clínicas, os antecedentes do doente e as informações epidemiológicas sugerirem a possibilidade de infeção por *M. genitalium*, então deve considerar-se o resultado como um falso negativo e deve discutir-se a possibilidade de testar novamente o doente.
- Os valores de fluorescência podem variar devido a vários fatores, tais como: equipamento de PCR (mesmo que seja do mesmo modelo), sistema de extração, tipo de amostra, tratamento prévio da amostra, etc., entre outros.

- Os valores preditivos positivos e negativos são altamente dependentes da prevalência em todos os testes de diagnóstico *in vitro*. O desempenho do VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System pode variar dependendo da prevalência e da população testada.
- Em caso de obtenção de resultados não resolvidos, indeterminados ou incompletos utilizando o VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System, será necessário repetir o teste. Os resultados não resolvidos podem dever-se à presença de inibidores na amostra ou a uma reidratação incorreta do tubo de mistura da reação liofilizada. Se ocorrer uma avaria no instrumento, serão obtidos resultados indeterminados ou incompletos.

11. Controlo de qualidade

O VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System contém um Controlo Interno Endógeno (EIC) em cada tubo de reação que confirma o desempenho correto da técnica. Além disso, a utilização de controlos externos (EPC e ENC) permite confirmar o desempenho do ensaio. Os controlos externos não são utilizados pelo BD MAX™ System para fins de interpretação de resultados, mas são considerados como uma amostra. O Controlo Positivo Externo (EPC) destina-se a monitorizar uma possível falha dos reagentes do ensaio, enquanto o Controlo Negativo Externo (ENC) se destina a detetar a contaminação ambiental ou de reagentes por ácidos nucleicos-alvo.

12. Características de desempenho analítico

12.1. Linearidade analítica

A linearidade do ensaio foi determinada e confirmada testando uma série de diluições 1:10 sucessivas de matriz vaginal, de amostras de urina de homens e mulheres contendo uma concentração conhecida de DNA específico e sintético pertencente a *M. genitalium* sensível ou resistente aos macrólidos (no intervalo de $2E+07$ a $2E+00$ cópias/ μ L). Foram calculados a média aritmética, o desvio-padrão e o coeficiente de variação dos valores de Ct, bem como a eficiência e o coeficiente de regressão da reação de PCR, e inclui-se abaixo exemplos do gráfico de amplificação resultante de um ensaio numa das matrizes avaliadas.

Figura 2. Diluições em série de um modelo de DNA sintético de *M. genitalium* sensível aos macrólidos (gene *23S rRNA* (wild type) + gene da *adesina MgPA*) ($2E+07$ a $2E+00$ cópias/ μ L). Ensaio realizado no equipamento BD MAX™ System (canal 530/565 (HEX)).

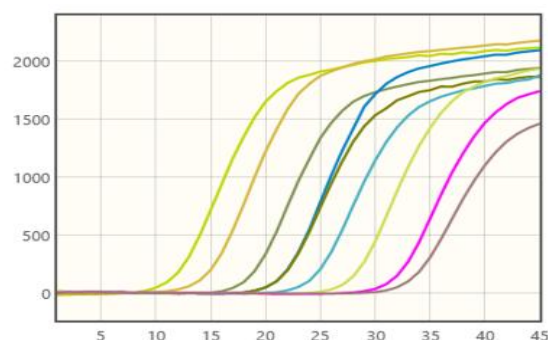


Figura 3. Diluições em série de um modelo de DNA sintético de *M. genitalium* resistente aos macrólidos (gene *23S rRNA* (mutação A2058C) + gene da *adesina MgPA*) ($2E+07$ a $2E+00$ cópias/ μ L). Ensaio realizado no equipamento BD MAX™ System (canal 475/520 (FAM)).

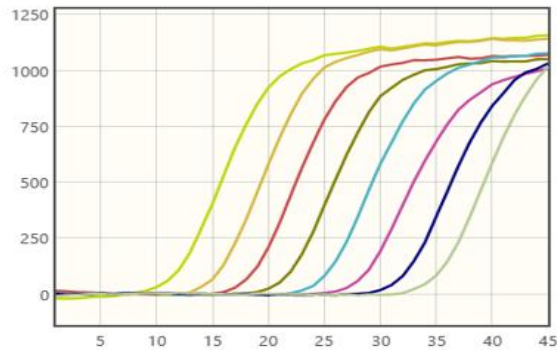


Figura 4. Diluições em série de um modelo de DNA sintético de *M. genitalium* resistente aos macrólidos (gene *23S rRNA* (mutação A2058G) + gene da *adesina MgPA*) ($2E+07$ a $2E+00$ cópias/ μ L). Ensaio realizado no equipamento BD MAX™ System (canal 475/520 (FAM)).

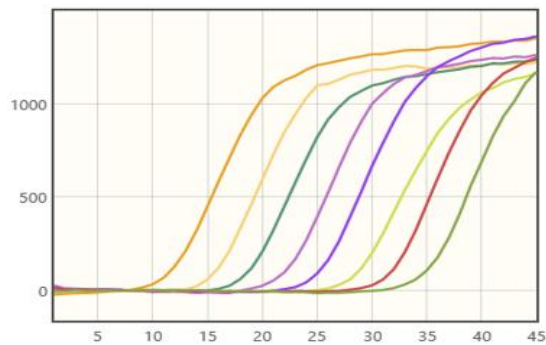


Figura 5. Diluições em série de um modelo de DNA sintético de *M. genitalium* resistente aos macrólidos (gene *23S rRNA* (mutação A2058T) + gene da *adesina MgPA*) ($2E+07$ a $2E+00$ cópias/ μ L). Ensaio realizado no equipamento BD MAX™ System (canal 475/520 (FAM)).

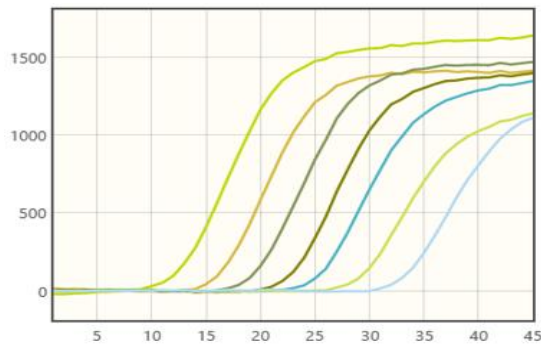


Figura 6. Diluições em série de um modelo de DNA sintético de *M. genitalium* resistente aos macrólidos (gene *23S rRNA* (mutação A2059C) + gene da *adesina MgPA*) ($2E+07$ a $2E+00$ cópias/ μ L). Ensaio realizado no equipamento BD MAX™ System (canal 475/520 (FAM)).

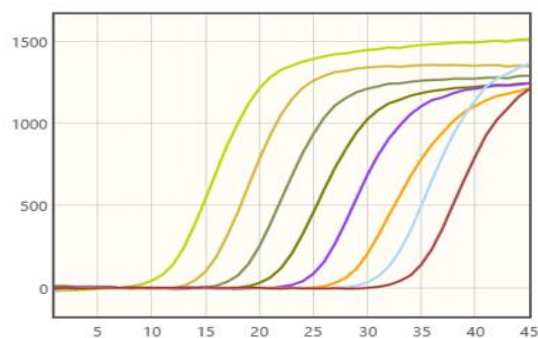
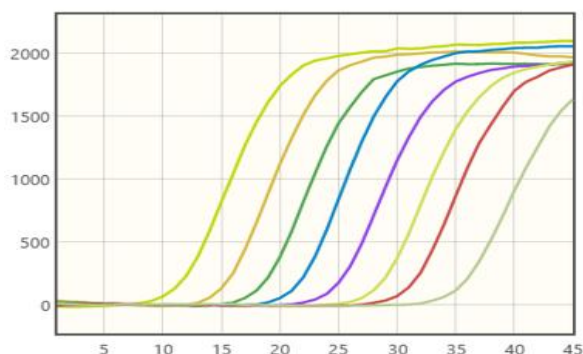


Figura 7. Diluições em série de um modelo de DNA sintético de *M. genitalium* resistente aos macrólidos (gene *23S rRNA* (mutação A2059G) + gene da *adesina MgPA*) (2E+07 a 2E+00 cópias/μL). Ensaio realizado no equipamento BD MAX™ System (canal 475/520 (FAM)).



12.2. Sensibilidade analítica. Limite de detecção (LoD)

A sensibilidade analítica ou o limite de detecção (LoD) do VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System foi analisada com três lotes utilizando matriz vaginal, amostras de urina de homens e mulheres. As estirpes de referência ou DNA sintético (em caso de indisponibilidade de estirpes), utilizados são detalhados na tabela seguinte:

	Alvo	Estirpe/DNA sintético	Referência externa
Sensibilidade aos macrólidos + <i>Mycoplasma genitalium</i>	Gene <i>23S rRNA</i> (wild type) + gene da <i>adesina MgPA</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> , estirpe M30	49895™
Resistência aos macrólidos + <i>Mycoplasma genitalium</i>	Gene <i>23S rRNA</i> (mutação A2058C) + gene da <i>adesina MgPA</i>	DNA sintético (MGRXPC)	n.a.
	Gene <i>23S rRNA</i> (mutação A2058G) + gene da <i>adesina MgPA</i>	AMPLIRUN® TOTAL MACROLIDE RESISTANT MGE CONTROL	MBTC029
	Gene <i>23S rRNA</i> (mutação A2058T) + gene da <i>adesina MgPA</i>	DNA sintético (MGRXPC)	n.a.
	Gene <i>23S rRNA</i> (mutação A2059C) + gene da <i>adesina MgPA</i>	DNA sintético (MGRXPC)	n.a.
	Gene <i>23S rRNA</i> (mutação A2059G) + gene da <i>adesina MgPA</i>	AMPLIRUN® TOTAL MACROLIDE RESISTANT MGE CONTROL	MBTC029

Tabela 19. Estirpes de referência e DNA sintético utilizados para o ensaio do limite de detecção.

O VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System demonstrou o limite de detecção indicado na tabela seguinte, com uma taxa positiva de $\geq 95\%$.

Limite de detecção (LoD) (cópias/μL)						
Matriz	<i>M. genitalium</i> sensível aos macrólidos	<i>M. genitalium</i> resistente aos macrólidos (A2059G)	<i>M. genitalium</i> resistente aos macrólidos (A2058G)	<i>M. genitalium</i> resistente aos macrólidos (A2058C)	<i>M. genitalium</i> resistente aos macrólidos (A2058T)	<i>M. genitalium</i> resistente aos macrólidos (A2059C)
Urina feminina	3,33E-02	3,00E+00	9,99E-01	6,00E+00	6,00E+00	2,00E+00
Urina masculina	1,00E-01	9,00E-01	3,00E-01	2,00E+00	2,00E+00	2,00E+00
Vaginal	1,00E-01	2,70E+00	3,33E-01	2,00E+00	6,00E+00	2,00E+00

Tabela 20. Limite de detecção do VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System.

Portanto, os resultados obtidos mostram que a sensibilidade do dispositivo VIASURE é consistente e fiável entre os diferentes lotes de produção.

12.3. Intervalo de medição

O intervalo de medição do ensaio foi determinado testando uma série de diluições 1:10 sucessivas contendo uma concentração conhecida de DNA específico e sintético pertencente a *M. genitalium* sensível aos macrólidos e *M. genitalium* resistente aos macrólidos. Os resultados permitiram confirmar a detecção correta dos alvos no intervalo de medição indicado na tabela seguinte:

Alvo	Intervalo de medição (cópias/μL)					
	Matriz de urina feminina		Matriz de urina masculina		Matriz vaginal	
<i>M. genitalium</i> sensível aos macrólidos	2E+07	2E+01	2E+07	2E+00	2E+07	2E+00
<i>M. genitalium</i> resistente aos macrólidos (A2059G)	2E+07	2E+00	2E+07	2E+00	2E+07	2E+00
<i>M. genitalium</i> resistente aos macrólidos (A2058G)	2E+07	2E+01	2E+07	2E+01	2E+07	2E+00
<i>M. genitalium</i> resistente aos macrólidos (A2058C)	2E+07	2E+01	2E+07	2E+00	2E+07	2E+00
<i>M. genitalium</i> resistente aos macrólidos (A2058T)	2E+07	2E+00	2E+07	2E+01	2E+07	2E+01
<i>M. genitalium</i> resistente aos macrólidos (A2059C)	2E+07	2E+01	2E+07	2E+01	2E+07	2E+00

Tabela 21. Intervalo de medição do VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System.

Em conclusão, o intervalo de medição do VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System foi determinado com sucesso de acordo com os critérios de validação de aceitação estabelecidos inicialmente, garantindo resultados fiáveis, precisos e reproduzíveis num amplo espectro de cargas bacterianas, o que confirma a sua utilidade em vários cenários de diagnóstico clínico.

12.4. Exatidão

12.4.1. Veracidade

A veracidade do VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System foi avaliada testando os materiais de referência listados a seguir.

1. Fragmentos de cDNA sintéticos

- Fragmento de cDNA sintético para os genes *23S rRNA* (wild type) e *adesina MgPA* de *M. genitalium* sensível aos macrólidos: MGRXPC, canais HEX e ROX.
- Fragmento de cDNA sintético para os genes *23S rRNA* (mutação A2058C) e *adesina MgPA* de *M. genitalium* resistente aos macrólidos: MGRXPC, canais FAM e ROX.
- Fragmento de cDNA sintético para os genes *23S rRNA* (mutação A2058G) e *adesina MgPA* de *M. genitalium* resistente aos macrólidos: MGRXPC, canais FAM e ROX.
- Fragmento de cDNA sintético para os genes *23S rRNA* (mutação A2058T) e *adesina MgPA* de *M. genitalium* resistente aos macrólidos: MGRXPC, canais FAM e ROX.
- Fragmento de cDNA sintético para os genes *23S rRNA* (mutação A2059C) e *adesina MgPA* de *M. genitalium* resistente aos macrólidos: MGRXPC, canais FAM e ROX.
- Fragmento de cDNA sintético para os genes *23S rRNA* (mutação A2059G) e *adesina MgPA* de *M. genitalium* resistente aos macrólidos: MGRXPC, canais FAM e ROX.

2. American Type Culture Collection (ATCC®)

Referência externa	Microrganismo	Nome do produto	Variedade
49895	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> Tully et al.	Estirpe M30
33530	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> Tully et al.	Estirpe G37
49898	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> Tully et al.	Estirpe TW48-5G
49123	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> Tully et al.	Estirpe TW10-5G
49899	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> Tully et al.	Estirpe UMTB-10G
49896	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> Tully et al.	Estirpe TW10-6G
49897	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> Tully et al.	Estirpe R32G [R32]

Tabela 22. Material de referência da American Type Culture Collection (ATCC).

3. Controlos

Referência externa	Microrganismo	Nome do produto	Variedade
MBTC029	<i>Mycoplasma genitalium</i>	AMPLIRUN® TOTAL MACROLIDE RESISTANT MGE CONTROL	- Estirpe tipo sensível - Mutação A2059G no gene <i>23 rRNA</i> - Mutação A2058G no gene <i>23 rRNA</i>

Tabela 23. Material de controlo da Vircell S.L.

4. Programas de Avaliação Externa da Qualidade (EQA)

Referência externa	Proveniência	Microrganismo	Nome do produto	Variedade
MG23S-03	QCMD	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> G37 (WT)	Estirpe G37
MG23S-06	QCMD	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> M6303	23S rDNA mutação A2059G, resistente aos macrólidos
MG23S-07	QCMD	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> M6593	23S rDNA mutação A2059G, resistente aos macrólidos
MG101S-04	QCMD	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> M6303	Resistente aos macrólidos
MG101S-06	QCMD	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> M6593	Resistente aos macrólidos

Tabela 24. Material de referência de programas de avaliação de qualidade externa (EQA).

12.4.2. Precisão

Para determinar a precisão do VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System, foram realizados ensaios intra-ensaio (repetibilidade), inter-ensaio, inter-lote e inter-equipamento (reprodutibilidade) utilizando matriz vaginal, matriz de urina feminina e masculina, inoculadas com uma concentração conhecida das estirpes de referência: *Mycoplasma genitalium*, estirpe M30 (Ref.ª: 49895™) para *M. genitalium* sensível aos macrólidos e AMPLIRUN® TOTAL MACROLIDE RESISTANT MGE CONTROL (Ref.ª: MBTC029) para *M. genitalium* resistente aos macrólidos.

Intra-ensaio

O intra-ensaio foi testado analisando seis réplicas de todas as amostras no mesmo ensaio, utilizando o VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System. A tabela seguinte apresenta um resumo dos resultados.

Estirpe de <i>M. genitalium</i> sensível aos macrólidos						
Matriz	Alvo	Amostra	Canal	Ct (\bar{x})	σ	CV %
Urina masculina	Sensível aos macrólidos	3xLoD	530/565 (HEX)	32,02	0,27	0,85
		5xLoD	530/565 (HEX)	30,98	0,32	1,03
		Controlo 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
		Controlo 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
		Controlo negativo	680/715 (CY5.5)	35,23	1,20	3,41
Urina feminina	Sensível aos macrólidos	3xLoD	530/565 (HEX)	34,02	0,83	2,44
		5xLoD	530/565 (HEX)	33,50	0,67	2,01
		Controlo 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
		Controlo 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
		Controlo negativo	680/715 (CY5.5)	32,97	0,23	0,71
Vaginal	Sensível aos macrólidos	3xLoD	530/565 (HEX)	32,48	0,29	0,88
		5xLoD	530/565 (HEX)	30,90	0,71	2,30
		Controlo 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
		Controlo 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
		Controlo negativo	680/715 (CY5.5)	31,23	0,25	0,80

Tabela 25. Resultados intra-ensaio do VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System com a estirpe de *M. genitalium* sensível aos macrólidos. (Ct) = Ciclo-limite. (\bar{x}) = média aritmética do valor Ct, (σ) = desvio-padrão, (CV %) = coeficiente de variação, Neg. = negativo, n.a. = não aplicável.

Estirpe de <i>M. genitalium</i> resistente aos macrólidos						
Matriz	Alvo	Amostra	Canal	Ct (\bar{x})	σ	CV %
Urina masculina	Resistente aos macrólidos	3xLoD	475/520 (FAM)	36,17	0,62	1,70
		5xLoD	475/520 (FAM)	35,05	0,63	1,81
		Controlo 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
		Controlo 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
		Controlo negativo	680/715 (CY5.5)	33,28	0,66	1,99
Urina feminina	Resistente aos macrólidos	3xLoD	475/520 (FAM)	33,72	0,51	1,52
		5xLoD	475/520 (FAM)	33,30	0,37	1,12
		Controlo 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
		Controlo 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
		Controlo negativo	680/715 (CY5.5)	34,45	0,44	1,27
Vaginal	Resistente aos macrólidos	3xLoD	475/520 (FAM)	34,33	1,34	3,90
		5xLoD	475/520 (FAM)	33,75	0,27	0,79
		Controlo 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
		Controlo 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
		Controlo negativo	680/715 (CY5.5)	34,15	0,50	1,46

Tabela 26. Resultados intra-ensaio do VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System com a estirpe de *M. genitalium* resistente aos macrólidos. (Ct) = Ciclo-limite. (\bar{x}) = média aritmética do valor Ct, (σ) = desvio-padrão, (CV %) = coeficiente de variação, Neg. = negativo, n.a. = não aplicável.

Inter-ensaio

O inter-ensaio foi testado analisando quatro réplicas das diferentes amostras em três dias diferentes por três operadores diferentes, utilizando o VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System. A tabela seguinte apresenta um resumo dos resultados.

Estirpe de <i>M. genitalium</i> sensível aos macrólidos						
Matriz	Alvo	Amostra	Canal	Ct (\bar{x})	σ	CV %
Urina masculina	Sensível aos macrólidos	3xLoD	530/565 (HEX)	34,48	0,85	2,46
		5xLoD	530/565 (HEX)	33,66	0,75	2,22
		Controlo 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
		Controlo negativo	585/630 (ROX)	Neg.	n.a.	n.a.
	EIC	3xLoD	680/715 (CY5.5)	34,06	1,65	4,85
		5xLoD	680/715 (CY5.5)	34,04	1,85	5,44
		Controlo negativo	680/715 (CY5.5)	34,10	1,74	5,09
Urina feminina	Sensível aos macrólidos	3xLoD	530/565 (HEX)	34,36	1,80	5,24
		5xLoD	530/565 (HEX)	34,01	1,84	5,42
		Controlo 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
		Controlo 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
		Controlo negativo	680/715 (CY5.5)	34,04	1,39	4,10
Vaginal	Sensível aos macrólidos	3xLoD	530/565 (HEX)	33,06	0,90	2,73
		5xLoD	530/565 (HEX)	31,90	0,68	2,13
		Controlo 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
		Controlo 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
		Controlo negativo	680/715 (CY5.5)	30,84	0,77	2,49

Tabela 27. Resultados inter-ensaio do VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System com a estirpe de *M. genitalium* sensível aos macrólidos. (Ct) = Ciclo-limite. (\bar{x}) = média aritmética do valor Ct, (σ) = desvio-padrão, (CV %) = coeficiente de variação, Neg. = negativo, n.a. = não aplicável.

Estirpe de <i>M. genitalium</i> resistente aos macrólidos						
Matriz	Alvo	Amostra	Canal	Ct (\bar{x})	σ	CV %
Urina masculina	Resistente aos macrólidos	3xLoD	475/520 (FAM)	35,98	1,00	2,78
		5xLoD	475/520 (FAM)	35,31	0,90	2,56
		Controlo 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
		Controlo 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
		Controlo negativo	680/715 (CY5.5)	34,65	1,30	3,74

Urina feminina	Resistente aos macrólidos	3xLoD	475/520 (FAM)	33,08	1,28	3,87
		5xLoD	475/520 (FAM)	31,98	0,79	2,48
		Controlo 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
		Controlo 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
		Controlo negativo	680/715 (CY5.5)	33,54	1,09	3,25
Vaginal	Resistente aos macrólidos	3xLoD	475/520 (FAM)	34,72	1,34	3,87
		5xLoD	475/520 (FAM)	34,22	1,27	3,71
		Controlo 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
		Controlo 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
		Controlo negativo	680/715 (CY5.5)	30,98	0,55	1,78

Tabela 28. Resultados inter-ensaio do VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System com a estirpe de *M. genitalium* resistente aos macrólidos. (Ct) = Ciclo-limite. (\bar{x}) = média aritmética do valor Ct, (σ) = desvio-padrão, (CV %) = coeficiente de variação, Neg. = negativo, n.a. = não aplicável.

Inter-lote

Os valores inter-lote foram determinados com seis réplicas das diferentes amostras utilizando três lotes do VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System. A tabela seguinte apresenta um resumo dos resultados.

Estirpe de <i>M. genitalium</i> sensível aos macrólidos						
Matriz	Alvo	Amostra	Canal	Ct (\bar{x})	σ	CV %
Urina masculina	Sensível aos macrólidos	3xLoD	530/565 (HEX)	32,77	0,89	2,71
		5xLoD	530/565 (HEX)	31,46	0,57	1,81
		Controlo 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
		Controlo 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
		Controlo negativo	680/715 (CY5.5)	35,44	1,01	2,85
Urina feminina	Sensível aos macrólidos	3xLoD	530/565 (HEX)	34,72	0,81	2,34
		5xLoD	530/565 (HEX)	33,39	0,77	2,39
		Controlo 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
		Controlo 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
		Controlo negativo	680/715 (CY5.5)	33,53	0,58	1,74

Estirpe de <i>M. genitalium</i> sensível aos macrólidos						
Matriz	Alvo	Amostra	Canal	Ct (\bar{x})	σ	CV %
Vaginal	Sensível aos macrólidos	3xLoD	530/565 (HEX)	31,62	0,98	3,11
		5xLoD	530/565 (HEX)	30,88	0,83	2,67
		Controlo 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
		Controlo 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
		Controlo negativo	680/715 (CY5.5)	31,06	0,39	1,27

Tabela 29. Resultados inter-lote do VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System com a estirpe de *M. genitalium* sensível aos macrólidos. (Ct) = Ciclo-limite. (\bar{x}) = média aritmética do valor Ct, (σ) = desvio-padrão, (CV %) = coeficiente de variação, Neg. = negativo, n.a. = não aplicável.

Estirpe de <i>M. genitalium</i> resistente aos macrólidos						
Matriz	Alvo	Amostra	Canal	Ct (\bar{x})	σ	CV %
Urina masculina	Resistente aos macrólidos	3xLoD	475/520 (FAM)	36,46	1	2,73
		5xLoD	475/520 (FAM)	35,47	0,76	2,14
		Controlo 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
		Controlo 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
		Controlo negativo	680/715 (CY5.5)	32,49	0,73	2,24
Urina feminina	Resistente aos macrólidos	3xLoD	475/520 (FAM)	32,81	0,96	2,93
		5xLoD	475/520 (FAM)	32,38	0,84	2,59
		Controlo 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
		Controlo 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
		Controlo negativo	680/715 (CY5.5)	33,51	1,02	3,06
Vaginal	Resistente aos macrólidos	3xLoD	475/520 (FAM)	34,34	1,39	4,05
		5xLoD	475/520 (FAM)	33,96	0,62	1,82
		Controlo 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
		Controlo 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
		Controlo negativo	680/715 (CY5.5)	32,24	1,44	4,46

Tabela 30. Resultados inter-lote do VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System com a estirpe de *M. genitalium* resistente aos macrólidos. (Ct) = Ciclo-limite. (\bar{x}) = média aritmética do valor Ct, (σ) = desvio-padrão, (CV %) = coeficiente de variação, Neg. = negativo, n.a. = não aplicável.

Inter-equipamento

Os valores inter-equipamento foram determinados com seis réplicas das mesmas amostras utilizadas para o intra-ensaio, inter-ensaio e inter-lote, utilizando o VIASURE *Mycoplasma genitalium* with *Macrolide Resistance Assay* for BD MAX™ System. Estes ensaios foram executados em três centros laboratoriais com três BD MAX™ System diferentes. A tabela seguinte apresenta um resumo dos resultados.

Estirpe de <i>M. genitalium</i> sensível aos macrólidos						
Matriz	Alvo	Amostra	Canal	Ct (\bar{x})	σ	CV %
Urina masculina	Sensível aos macrólidos	3xLoD	530/565 (HEX)	31,96	0,43	1,35
		5xLoD	530/565 (HEX)	31,00	0,40	1,30
		Controlo 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
		Controlo negativo	585/630 (ROX)	Neg.	n.a.	n.a.
	EIC	3xLoD	680/715 (CY5.5)	34,48	0,87	2,53
		5xLoD	680/715 (CY5.5)	34,51	0,87	2,51
		Controlo negativo	680/715 (CY5.5)	32,46	0,62	1,92
Urina feminina	Sensível aos macrólidos	3xLoD	530/565 (HEX)	34,31	0,97	2,81
		5xLoD	530/565 (HEX)	33,72	0,52	1,54
		Controlo 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
		Controlo 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
		Controlo negativo	680/715 (CY5.5)	33,08	0,62	1,87
Vaginal	Sensível aos macrólidos	3xLoD	530/565 (HEX)	32,55	0,81	2,48
		5xLoD	530/565 (HEX)	32,57	0,52	1,60
		Controlo 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
		Controlo 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
		Controlo negativo	680/715 (CY5.5)	30,84	0,50	1,61

Tabela 31. Resultados inter-equipamento do VIASURE *Mycoplasma genitalium* with *Macrolide Resistance Assay* for BD MAX™ System com a estirpe de *M. genitalium* sensível aos macrólidos. (Ct) = Ciclo-limite, (\bar{x}) = média aritmética do valor Ct, (σ) = desvio-padrão, (CV %) = coeficiente de variação, Neg. = negativo, n.a. = não aplicável.

Estirpe de <i>M. genitalium</i> resistente aos macrólidos						
Matriz	Alvo	Amostra	Canal	Ct (\bar{x})	σ	CV %
Urina masculina	Resistente aos macrólidos	3xLoD	475/520 (FAM)	36,58	1,31	3,58
		5xLoD	475/520 (FAM)	35,13	0,53	1,51
		Controlo 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
		Controlo 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
		Controlo negativo	680/715 (CY5.5)	32,89	0,77	2,34
Urina feminina	Resistente aos macrólidos	3xLoD	475/520 (FAM)	33,67	0,43	1,28
		5xLoD	475/520 (FAM)	32,85	0,64	1,96
		Controlo 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
		Controlo 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
		Controlo negativo	680/715 (CY5.5)	34,59	0,65	1,87
Vaginal	Resistente aos macrólidos	3xLoD	475/520 (FAM)	34,47	0,89	2,59
		5xLoD	475/520 (FAM)	33,46	0,61	1,84
		Controlo 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
		Controlo 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
		Controlo negativo	680/715 (CY5.5)	33,72	0,54	1,61

Tabela 32. Resultados inter-equipamento do VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System com a estirpe de *M. genitalium* resistente aos macrólidos. (Ct) = Ciclo-limite. (\bar{x}) = média aritmética do valor Ct, (σ) = desvio-padrão, (CV %) = coeficiente de variação, Neg. = negativo, n.a. = não aplicável.

Em conclusão, o estudo de precisão confirmou o desempenho fiável e consistente em todas as matrizes testadas, cumprindo os critérios de validação de aceitação inicialmente estabelecidos.

12.5. Especificidade e reatividade analítica

A especificidade e a reatividade analítica foram avaliadas para o VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System *in silico* e experimentalmente, utilizando diferentes materiais de partida, tais como estirpes de referência certificadas, RNA/DNA de referência certificados e materiais de programas de avaliação de qualidade externa (EQA).

12.5.1. Especificidade analítica

A especificidade analítica é a capacidade do ensaio para detetar o alvo pretendido. Existem dois componentes a considerar para a especificidade analítica: reatividade cruzada e interferência. A reatividade cruzada pode ocorrer quando estão presentes sequências geneticamente relacionadas numa amostra de um doente, enquanto a interferência pode ocorrer se a presença de substâncias específicas potencialmente presentes nas matrizes da amostra afetar o desempenho da qPCR.

Análise *in silico* da reatividade cruzada

A reatividade cruzada foi avaliada utilizando sequências de referência de agentes patogénicos do NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), e/ou ferramentas de pesquisa e/ou de alinhamento como BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e um software interno de análise bioinformática. Foi realizada a análise BLAST para cada oligonucleótido e sonda utilizando a base de dados de nucleótidos do NCBI GenBank e um software interno de análise bioinformática.

As sequências alinhadas com uma percentagem de alinhamento inferior a 80% de homologia foram consideradas como sendo de deteção improvável. Os resultados obtidos foram os seguintes:

Mycoplasma genitalium (gene da adesina MgPA)

Todas as sequências analisadas apresentaram menos de 80% de homologia com o conjunto de oligonucleótidos e sondas de *Mycoplasma genitalium* (gene da adesina MgPA).

Por conseguinte, o desenho do alvo de VIASURE *Mycoplasma genitalium* não deverá causar falsos positivos na deteção de *Mycoplasma genitalium* quando estão presentes outros organismos.

Mycoplasma genitalium (gene 23S rRNA)

A análise BLAST filtrada pelo gene 23S rRNA de *M. genitalium* (excluindo *M. genitalium*) mostra uma elevada homologia entre os oligonucleótidos e sondas e várias sequências “*Uncultured Mycoplasma sp.* (ID taxonómico: 167967)” e uma sequência “*Synthetic Mycoplasma genitalium JCVI-1.0* (ID taxonómico: 488339)”.

As sequências “*Uncultured Mycoplasma sp.* (ID taxonómico: 167967)” são detetadas com os oligonucleótidos e sondas de *M. genitalium* resistente e sensível aos macrólidos, portanto, não existe risco de reatividade cruzada no produto, uma vez que, para considerar uma amostra positiva, é necessária a deteção no canal do microrganismo (*M. genitalium*) e no canal da resistência ou sensibilidade aos macrólidos.

A sequência “*Synthetic Mycoplasma genitalium JCVI-1.0* (ID taxonómico: 488339)” é detetada com os oligonucleótidos e sonda de sensibilidade aos macrólidos. Trata-se de uma sequência que corresponde ao microrganismo-alvo e deve ser detetada. Esta sequência surge na reatividade cruzada, uma vez que apresenta um ID taxonómico diferente do utilizado na exclusão.

Portanto, nenhuma das sequências analisadas, incluindo as que apresentam uma homologia superior a 80%, pode afetar a detecção correta de *Mycoplasma genitalium* (gene *23S rRNA*).

Especificidade analítica: ensaio experimental

Reatividade cruzada: ensaio experimental

A reatividade cruzada do VIASURE *Mycoplasma genitalium* with *Macrolide Resistance* Assay for BD MAX™ System foi confirmada testando um painel de diferentes microrganismos associados a sintomas de infeções sexualmente transmissíveis ou ambiental e filogeneticamente relevantes. Quando possível e estando disponíveis dados de concentração, os microrganismos interferentes foram avaliados em níveis clinicamente relevantes (habitualmente de 1E+05 – 1E+06 UFC (unidade formadora de colónias)/mL no caso de bactérias e de 1E+04 – 1E+05 UFP (unidade formadora de placa)/mL no caso de vírus). Não foi detetada nenhuma reatividade cruzada entre nenhum dos seguintes microrganismos testados, exceto os microrganismos visados.

Ensaio de reatividade cruzada					
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	<i>Haemophilus ducreyi</i>	-	<i>Mycoplasma genitalium</i> , estirpe TW48-5G	-/+
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	Haemophilus influenzae	-	<i>Mycoplasma genitalium</i> , estirpe UMTB-10G	-/+
<i>Atopobium vaginae</i>	-	Herpes simplex virus 2	-	<i>Mycoplasma genitalium</i> Tully et al., estirpe TW10-5G	-/+
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	Human Herpesvirus 1, estirpe HF	-	<i>Mycoplasma hominis</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	Human papillomavirus 16	-	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	-
<i>Candida dubliniensis</i>	-	Human papillomavirus 18	-	<i>Neisseria meningitidis</i>	-
<i>Candida glabrata</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Proteus mirabilis</i>	-
<i>Candida krusei</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Candida parapsilosis</i>	-	<i>Listeria innocua</i>	-	<i>Serratia marcescens</i>	-
<i>Candida tropicalis</i>	-	<i>Listeria ivanovii</i> subespécie 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> , estirpe G37	-/+	<i>Treponema pallidum</i>	-
<i>Enterococcus faecium</i>	-	<i>Mycoplasma genitalium</i> , estirpe R32G [R32]	-/+	<i>Trichomonas vaginalis</i>	-
<i>Escherichia coli</i>	-	<i>Mycoplasma genitalium</i> , estirpe TW10- 6G	-/+	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	-
<i>Gardnerella vaginalis</i>	-				

Tabela 33. Microrganismos de referência incluídos no ensaio de reatividade cruzada. O resultado +/- refere-se ao resultado positivo ou negativo obtido nos diferentes canais, consoante o alvo detetado. No caso de um microrganismo testado ser um dos alvos detetados pelo dispositivo, obtém-se um resultado positivo no canal correspondente, mas obtém-se um resultado negativo nos outros canais.

Em conclusão, os resultados dos ensaios de reatividade cruzada cumpriram os critérios de validação de aceitação e indicam uma elevada especificidade do VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System para a deteção de *M. genitalium* resistente aos macrólidos e *M. genitalium* sensível aos macrólidos, reduzindo assim o risco de resultados falsos positivos. Uma vez que não foram observadas amplificações não específicas com outros microrganismos relacionados, isto sugere que o dispositivo é capaz de distinguir com precisão os alvos.

Estudo de agentes microbianos interferentes

Foi realizado um estudo de agentes microbianos interferentes para analisar os potenciais agentes microbianos interferentes para o VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System. Um painel de diferentes microrganismos clinicamente, ambientalmente e filogeneticamente relevantes foi testado na presença das estirpes de referência: *Mycoplasma genitalium*, estirpe M30 (Ref.ª: 49895™) para *M. genitalium* sensível aos macrólidos e AMPLIRUN® TOTAL MACROLIDE RESISTANT MGE CONTROL (Ref.ª: MBTC029) para *M. genitalium* resistente aos macrólidos. Quando possível e estando disponíveis dados de concentração, os microrganismos interferentes foram avaliados em níveis clinicamente relevantes (habitualmente de 1E+05 – 1E+06 UFC (unidade formadora de colónias)/mL no caso de bactérias e de 1E+04 – 1E+05 UFP (unidade formadora de placa)/mL no caso de vírus). Cada análise pontual foi realizada uma vez por amostra.

Um controlo de matriz positiva (Positive Matrix Control, PMC) e um controlo de matriz negativa (Negative Matrix Control, NMC) foram incluídos como controlos do teste. O PMC corresponde à matriz vaginal, matriz de urina feminina e masculina inoculadas com as estirpes específicas de *M. genitalium* sensível e resistente aos macrólidos sem qualquer agente microbiano interferente, enquanto o NMC corresponde às matrizes negativas sem qualquer agente microbiano interferente.

Nome do microrganismo	Concentração testada	Resultado
PMC	-	n.a.
NMC	-	n.a.
<i>Acinetobacter baumannii</i>	8,10E+05 UFC/mL	N.I
<i>Gardnerella vaginalis</i>	4,40E+01 UFC/μL	N.I
<i>Haemophilus influenzae</i>	5,20E+02 UFC/μL	N.I
Vírus Herpes Simplex 1	1,60E+05 TCID50/mL	N.I
<i>Listeria monocytogenes</i>	5,80E+06 UFC/mL	N.I
<i>Mycoplasma hominis</i>	4,70E+06 UFC/mL	N.I
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4,09E+05 UFC/mL	N.I
<i>Staphylococcus aureus</i>	4,60E+05 UFC/mL	N.I
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1,80E+01 UFC/μL	N.I
<i>Treponema pallidum</i>	3,40E+04 células/mL	N.I
<i>Klebsiella oxytoca</i>	7,60E+03 cópias/μL	N.I
<i>Escherichia coli</i>	n.a.	N.I

Nome do microrganismo	Concentração testada	Resultado
<i>Aspergillus fumigatus</i>	n.a.	N.I
<i>Atopobium vaginae</i>	4,52E+03 UFC/μL	N.I
<i>Candida albicans</i>	4,18E+04 UFC/μL	N.I
<i>Candida glabrata</i>	2,46E+03 UFC/μL	N.I
<i>Candida tropicalis</i>	2,88E+03 UFC/μL	N.I
<i>Chlamydia trachomatis</i> seróvar E	6,40E+05 IFU/mL	N.I
<i>Enterobacter cloacae</i>	1,28E+03 UFC/μL	N.I
<i>Enterococcus faecalis</i>	5,00E+04 UFC/mL	N.I
<i>Enterococcus faecium</i>	3,50E+04 UFC/mL	N.I
Vírus Herpes Simplex 2	7,24E+03 TCID50/mL	N.I
Vírus do papiloma humano 16	1,00E+02 UI/μL	N.I
Vírus do papiloma humano 18	1,00E+02 UI/μL	N.I
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3,65E+03 UFC/μL	N.I
<i>Listeria monocytogenes</i>	n.a.	N.I
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	6,20E+03 UFC/μL	N.I
<i>Neisseria meningitidis</i>	5,70E+04 UFC/μL	N.I
<i>Proteus mirabilis</i>	2,55E+03 UFC/μL	N.I
<i>Serratia marcescens</i>	n.a.	N.I
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	9,20E+03 UFC/μL	N.I
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	2,00E+04 UFC/μL	N.I

Tabela 34. Ensaio de agentes microbianos interferentes. N.I. = Sem interferência., n.a. = não aplicável.

Em conclusão, não foram observadas interferências na detecção de RNA de *M. genitalium* sensível e/ou resistente aos macrólidos em matriz vaginal, urina feminina e masculina com qualquer um dos microrganismos testados.

Estudo de substâncias interferentes

Foi realizado um estudo de substâncias interferentes para testar o potencial efeito interferente de substâncias endógenas e exógenas sobre o VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System. Foram adicionadas 17, 25 e 28 substâncias potencialmente interferentes às matrizes negativas de esfregaços vaginais, urina masculina e urina feminina, respetivamente, enriquecidas com as estirpes de referência: *Mycoplasma genitalium*, estirpe M30 (Ref.^a: 49895™) para *M. genitalium* sensível aos macrólidos e AMPLIRUN® TOTAL MACROLIDE RESISTANT MGE CONTROL (Ref.^a: MBTC029) para *M. genitalium* resistente aos macrólidos, e avaliadas com seis réplicas.

Um controlo de matriz positiva (Positive Matrix Control, PMC) e um controlo de matriz negativa (Negative Matrix Control, NMC) foram incluídos como controlos do teste. O PMC corresponde à matriz vaginal recolhida em Copan eSwab®, matriz de urina feminina e masculina inoculadas com as estirpes específicas de *M. genitalium* sensível e resistente aos macrólidos sem substância interferente, enquanto o NMC corresponde às matrizes negativas sem substância interferente nem microrganismos/material de referência adicionados. Os resultados seguintes foram obtidos:

Matriz vaginal		
Nome da substância	Concentração testada	Resultado
PMC	-	n.a.
NMC	-	n.a.
Aciclovir	6,60E-02 mg/mL	N.I.
Metronidazol	1,23E-01 mg/mL	N.I.
Clotrimazol	2,50E+00 mg/mL	N.I.
Nitrato de miconazol	2,50E+00 mg/mL	N.I.
Gel contraceptivo Conceptrol (Nonoxinol-9)	2,50E+00 mg/mL	N.I.
Tioconazol	2,50E+00 mg/mL	N.I.
Leucócitos/monócitos	2,00E+06 célula/mL	N.I.
Premeno duo (ácido hialurônico e ácido láctico)	2,50E+00 mg/mL	N.I.
Desodorizante feminino em spray	5,00E+01 µL/mL	N.I.
Lubrificante vaginal líquido – à base de água, Durex Frescor	5,00E+01 µL/mL	N.I.
Lubrificante vaginal – à base de óleo, SOIVRE Intim Oil	5,00E+01 µL/mL	N.I.
DermaVagisil creme vaginal	2,50E+00 mg/mL	N.I.
Preparation H – Gel para Hemorroidas HEMOAL	2,50E+00 mg/mL	N.I.
Estradiol	7,50E-03 ng/mL	N.I.
Progesterona	6,00E+00 ng/mL	N.I.
Sémen	5%	N.I.
Sangue total	1%	N.I.

Tabela 35. Substâncias potencialmente interferentes na matriz vaginal. N.I.: sem interferência notificável / I: Interfere, n.a. = não aplicável.

Urina masculina		
Nome da substância	Concentração testada	Resultado
PMC	-	n.a.
NMC	-	n.a.
Ibuprofeno	2,19E-01 mg/mL	N.I.
Naproxeno	3,60E-01 mg/mL	N.I.
Amoxicilina	5,40E-02 mg/mL	N.I.
Azitromicina	1,10E-02 mg/mL	N.I.
Ceftriaxona	8,40E+01 mg/dL	N.I.
Eritromicina	1,38E-01 mg/mL	N.I.
Metronidazol	1,23E-01 mg/mL	N.I.
Sulfametoxazol	1,12E+00 mg/mL	N.I.
Cloridrato de tetraciclina	2,40E-02 µg/mL	N.I.
Trimetoprima	4,20E-02 µg/mL	N.I.
Albumina	1,00E+01 mg/mL	N.I.
Bilirrubina	4,00E-01 mg/mL	N.I.
Glicose (Dextrose)	1,00E+01 mg/mL	N.I.
Leucócitos/monócitos	2,00E+06 célula/mL	N.I.
pH baixo (HCl)	n.a.	N.I.
pH alto (NaOH)	n.a.	N.I.

Sémen	5%	N.I.
Ureia	1,20E+00 mg/mL	N.I.
Ácido úrico	2,35E-01 mg/mL	N.I.
Sangue total	1%	I.*
	0,25%	N.I.
	0,125%	N.I.
Antocianina (arando <i>Vaccinium macrocarpon</i>)	1,09E-01 mg/mL	N.I.
Talquistina	2,64E+00 mL Talq/mL dvte	N.I.
4-Acetamidofenol	1,56E-01 mg/mL	N.I.
Cloridrato de fenazopiridina	1,60E-01 mg/mL	N.I.
Ácido salicílico	1,50E-01 mg/mL	N.I.

Tabela 36. Substâncias potencialmente interferentes na matriz de urina masculina. N.I.: sem interferência notificável / I: Interfere, n.a. = não aplicável.

* Inibição observada apenas para o alvo *Mycoplasma genitalium* resistente aos macrólidos.

Matriz de urina feminina		
Nome da substância	Concentração testada	Resultado
PMC	-	n.a.
NMC	-	n.a.
Ibuprofeno	2,19E-01 mg/mL	N.I.
Naproxeno	3,60E-01 mg/mL	N.I.
Amoxicilina	5,40E-02 mg/mL	N.I.
Azitromicina	1,10E-02 mg/mL	N.I.
Ceftriaxona	8,40E+01 mg/dL	N.I.
Eritromicina	1,38E-01 mg/mL	N.I.
Metronidazol	1,23E-01 mg/mL	N.I.
Sulfametoxazol	1,12E+00 mg/mL	N.I.
Cloridrato de tetraciclina	2,40E-02 µg/mL	N.I.
Trimetoprima	4,20E-02 µg/mL	N.I.
Albumina	1,00E+01 mg/mL	N.I.
Bilirrubina	4,00E-01 mg/mL	N.I.
Glicose (Dextrose)	1,00E+01 mg/mL	N.I.
Leucócitos/monócitos	2,00E+06 célula/mL	N.I.
pH baixo (HCl) 4	n.a.	I.*
pH baixo (HCl) 5	n.a.	I.*
pH baixo (HCl) 6	n.a.	N.I.
pH alto (NaOH)	n.a.	N.I.
Sémen	5%	N.I.
Ureia	1,20E+00 mg/mL	N.I.
Ácido úrico	2,35E-01 mg/mL	N.I.
Sangue total	1%	N.I.
Antocianina (arando <i>Vaccinium macrocarpon</i>)	1,09E-01 mg/mL	N.I.
Talquistina	2,64E+00 mL Talq/mL dvte	N.I.
4-Acetamidofenol	1,56E-01 mg/mL	I.*
	3,90E-02 mg/mL	N.I.
	9,75E-03 mg/mL	N.I.

Cloridrato de fenazopiridina	1,60E-01 mg/mL	N.I.
Ácido salicílico	1,50E-01 mg/mL	N.I.
17- α etinilestradiol	7,50E-03 ng/mL	N.I.
Noretindrona	1,60E+01 ng/mL	N.I.
Desodorizante feminino em spray	5,00E+01 μ L/mL	N.I.

Tabela 37. Substâncias potencialmente interferentes na matriz de urina feminina. N.I.: sem interferência notificável / I: Interfere, n.a. = não aplicável.

* Inibição observada apenas para o alvo *Mycoplasma genitalium* sensível aos macrólidos.

Em conclusão, foram testadas diferentes substâncias potencialmente interferentes, tanto endógenas como exógenas, no VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System. Os resultados obtidos conduziram à conclusão de que, nas concentrações testadas, não se observa nenhuma interferência de nenhuma das substâncias avaliadas.

12.5.2. Reatividade analítica

A reatividade analítica pode ser definida como a percentagem de estirpes microbianas-alvo ou de amostras de DNA/RNA que fornecem o resultado positivo correto. A reatividade analítica foi estudada *in silico* e através de ensaios experimentais.

Análise *in silico* da reatividade analítica

A reatividade analítica do VIASURE *Mycoplasma genitalium* with Macrolide Resistance Assay for BD MAX™ System foi avaliada utilizando bases de dados de sequências de nucleótidos de acesso público, como o NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), e um software interno de análise bioinformática, de modo a demonstrar que os genes-alvo podem ser corretamente detetados pelo dispositivo em estudo. A análise *in silico* do desenho dos oligonucleótidos e das sondas foi realizada através do alinhamento com um total de 2399 sequências analisadas (sequências descarregadas da base de dados com duplicados removidos). Os resultados obtidos são mostrados na tabela seguinte:

<i>Mycoplasma genitalium</i>					
Gene	Sequências alinhadas: 486				
	Sem mismatches	Com mismatches	Sequências com detecção confirmada	Sequências sem detecção	Sequências com detecção desconhecida
<i>Adesina MgPA</i>	74,07%	25,93%	74,07%	0%	25,93%*
<i>Mycoplasma genitalium</i>					
Gene	Sequências alinhadas: 17				
	Sem mismatches	Com mismatches	Sequências com detecção confirmada	Sequências sem detecção	Sequências com detecção desconhecida
<i>23S RNA</i>	82,35%	17,65%	100%	0%	0%

Tabela 38. Reatividade analítica, ensaio *in silico*. "Sequências alinhadas" = número de sequências alinhadas sem ou com mismatches a partir do total de sequências analisadas, "Sequências com detecção confirmada" = sequências sem mismatches ou analisadas experimentalmente cuja detecção é garantida, "Sequências sem detecção" = sequências previamente analisadas *in silico* cuja detecção experimental não pode ser garantida devido a evidências experimentais negativas anteriores, "Sequências com detecção desconhecida" = sequências previamente analisadas *in silico* cuja detecção experimental não pode ser garantida devido à falta de evidências experimentais.

* Deve notar-se que 20,78% do total de sequências alinhadas (101/486) apresentaram mismatches não críticos, que são considerados detetáveis.

Em resumo, a análise de inclusividade demonstrou uma deteção correta dos genes da *adesina MgPA* e *23S rRNA* de *M. genitalium* com o VIASURE *Mycoplasma genitalium with Macrolide Resistance Assay* for BD MAX™ System.

Reatividade analítica, ensaio experimental

A reatividade analítica do VIASURE *Mycoplasma genitalium with Macrolide Resistance Assay* for BD MAX™ System no caso do *Mycoplasma genitalium* foi avaliada em relação ao DNA das seguintes estirpes, apresentando resultados positivos:

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

12.6. Rastreabilidade metrológica

Este ensaio não foi concebido para fins de medição.

13. Características de desempenho clínico

O desempenho clínico do VIASURE *Mycoplasma genitalium with Macrolide Resistance Assay* for BD MAX™ System foi testado utilizando amostras de esfregaços vaginais e de urina. Os resultados foram os seguintes:

	Centro	Tipo de amostra	Fluxo de trabalho	Alvo
1	Certest Biotec S.L. em colaboração com o Hospital Universitario Miguel Servet (Saragoça, Espanha)	Esfregaços vaginais	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	<i>Mycoplasma genitalium</i> sensível aos macrólidos
				<i>Mycoplasma genitalium</i> resistente aos macrólidos
2	Certest Biotec S.L. (Saragoça, Espanha) utilizando amostras da Cerba Xpert	Urina	BD MAX™ ExK™ TNA-3 kit + BD MAX™ System	<i>Mycoplasma genitalium</i> sensível aos macrólidos
				<i>Mycoplasma genitalium</i> resistente aos macrólidos

Tabela 39. Centro, tipo de amostra, fluxo de trabalho e alvo.

Os valores verdadeiros positivos e verdadeiros negativos, valores falsos positivos e falsos negativos, valores de sensibilidade, valores de especificidade, valores preditivos positivos (PPV), valores preditivos negativos (NPV) e razões de probabilidade (LR) para o VIASURE *Mycoplasma genitalium* with *Macrolide Resistance* Assay for BD MAX™ System foram calculados em relação a cada ensaio comparador conforme indicado na tabela seguinte:

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

Tabela 40. Valores verdadeiros positivos (TP) e verdadeiros negativos (TN), valores falsos positivos (FP) e falsos negativos (FN), sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos (PPV), valores preditivos negativos (NPV) e razões de probabilidade (LR) para o VIASURE *Mycoplasma genitalium* with *Macrolide Resistance* Assay for BD MAX™ System.

Em conclusão, os resultados mostram uma elevada concordância para detetar *Mycoplasma genitalium* sensível aos macrólidos e resistente aos macrólidos, utilizando o VIASURE *Mycoplasma genitalium* with *Macrolide Resistance* Assay for BD MAX™ System.

14. Resumo de segurança e desempenho

O resumo de segurança e desempenho do VIASURE *Mycoplasma genitalium* with *Macrolide Resistance* Assay for BD MAX™ System pode ser transferido a partir da página Web: certest.es/viasure/rotulagem. Este resumo também estará disponível no website da 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>

Símbolos para componentes IVD e reagentes

 Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i>	 Armazenar em local seco	 Data de validade	 Fabricante	 Número de lote
 Consultar as instruções de utilização	 Limitação de temperatura	 Contém <n> teste(s)	 Identificação única de dispositivo	 Número de referência
 Marcação CE	 Manter ao abrigo da luz solar			

Marcas comerciais

BD MAX™ é uma marca registada da Becton, Dickinson and Company.

Direitos de modificação reservados. Todos os direitos reservados. © Certest Biotec, S.L.

Todas as outras marcas comerciais que possam aparecer neste folheto informativo são propriedade dos respetivos titulares.



Certest Biotec, S.L.

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

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

Informações sobre o representante na Austrália: Becton Dickinson Pty Ltd., 66 Waterloo Road.
Macquarie Park NSW 2113, Austrália

Informações sobre o representante na Nova Zelândia: Becton Dickinson Limited, 14B George Bourke Drive.
Mt. Wellington Auckland 1060, Nova Zelândia

Controlo de alterações		
Versão n.º	Alterações	Data
00	Versão original. Esta versão é uma tradução do documento original em inglês: IUo-444224en0226.00	18-02-2026

Tabela A2. Tabela de controlo de alterações.

Revisão: 18 de fevereiro de 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.