

# Vitassay qPCR

## Macrolide Res- 23S rRNA Mutations

PCR en tiempo real para la detección cualitativa e identificación de mutaciones puntuales específicas (conferidas por sustituciones de bases en el 23S rRNA) implicadas en la resistencia a los macrólidos de *Mycoplasma genitalium* en hisopos genitales.

Real-time PCR kit for the qualitative detection and identification of specific point mutations (conferred by base substitutions in 23S rRNA) implicated in macrolide resistance of *Mycoplasma genitalium* from genital swabs.





## Uso previsto

Vitassay qPCR Macrolide Res- 23S rRNA Mutations permite la detección cualitativa y la identificación de mutaciones puntuales específicas (conferidas por sustituciones de bases en el 23S rRNA) implicadas en la resistencia a los macrólidos de *M. genitalium* mediante PCR en tiempo real en hisopos genitales de pacientes con infección confirmada por *Mycoplasma genitalium* mediante ensayos moleculares. Este producto está destinado para facilitar el diagnóstico de las posibles resistencias a los macrólidos, junto con los datos clínicos del paciente, los factores de riesgo epidemiológicos y los resultados de otras pruebas de laboratorio.

## Referencias

Vitassay qPCR Macrolide Res- 23S rRNA Mutations 4x8-well strip, low profile	7041077
Vitassay qPCR Macrolide Res- 23S rRNA Mutations 4x8-well strip, high profile	7042077

## Materiales/Reactivos suministrados

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S077/ 7042S077	Macrolide Res- 23S strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7C077	Macrolide Res- 23S Positive Control	rojo	1 vial
7001A	PCR grade water	blanco	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension buffer	verde	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	amarillo	1 vial x 1 mL
7004O	Tapas ópticas	-	4 tiras de 8 tapones

## Condiciones de Transporte y conservación

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- El control positivo resuspendido debe ser almacenado a -20°C. Para evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación, se recomienda distribuir en alícuotas.
- Conservar los reactivos en oscuridad.

## Material y equipamiento necesario, pero no proporcionado

- Sistema de recolección y transporte

- Congeladores de laboratorio (- 30°C a - 10°C y/o  $\leq$  -70°C).
- Kit de extracción de DNA
- Equipo de PCR a tiempo real (ver Adjunto I)
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL
- Vórtex
- Micropipetas (1-20  $\mu$ L, 20-200  $\mu$ L)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin polvo

## Resumen

Las enfermedades de transmisión sexual (ETS) son muy comunes y se transmiten de una persona a otra a través del contacto físico íntimo y de la actividad sexual que incluye el sexo vaginal, oral y anal. Las ETS en su mayoría pueden prevenirse al no tener relaciones sexuales. Las ETS no siempre causan síntomas, por lo que es posible tener una infección y no saberlo.

En las últimas décadas, *Mycoplasma genitalium* se ha convertido en un patógeno que puede causar ETS. La bacteria es un organismo de crecimiento lento con un genoma de sólo 580 Kb que codifica menos de 500 genes.

Las especies de *Mycoplasma* se suelen encontrar en la boca, el tracto respiratorio y el genitourinario. *M. genitalium* coloniza específicamente el tracto reproductivo masculino y femenino en órganos como la uretra, el cuello uterino y las trompas de Falopio.

Entre el 40 y el 75% de las mujeres portadoras de ETS carecen de síntomas específicos. Por otro lado, este organismo se ha relacionado con una gran cantidad de enfermedades graves como la cervicitis (prurito y flujo vaginal, disuria, sangrado irregular, entre otros), la enfermedad inflamatoria pélvica (dolor abdominal y pélvico, y flujo/sangrado vaginal anormal, entre otros) y la uretritis (disuria, prurito uretral y flujo uretral mucopurulento).

Su prevalencia media se sitúa entre el 0,5 y el 10% en la población general y entre el 20 y el 40% en personas con infecciones de transmisión sexual.

La resistencia a los antimicrobianos en *M. genitalium* puede desarrollarse como resultado de la presión selectiva producida por el uso de antibióticos que pueden provocar mutaciones, o de la selección de mutaciones preexistentes. Dado que no existe pared celular en los micoplasmas, incluido en *M. genitalium*, los antibióticos  $\beta$ -lactámicos y otros antibióticos que reaccionan contra esa estructura son ineficaces. Sólo un número pequeño de antibióticos, como los macrólidos, son eficaces contra los micoplasmas.

La terapia de primera línea recomendada contra este patógeno es el macrólido azitromicina. Sin embargo, debido a su uso generalizado para el tratamiento de las ITS, en particular como dosis única para *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae*, probablemente es la causa de la resistencia a los macrólidos en *M. genitalium* en todo el

mundo. La resistencia a los macrólidos es un problema creciente y muy grave, con tasas de resistencia estimadas en un 30-100% en todo el mundo. La resistencia puede desarrollarse con una mutación de una sola base, cuya posición más frecuente es A2058 o A2059 (numeración de *Escherichia coli*) del ARNr 23S, sin afectar a la vida del organismo, permitiendo su transmisión.

La prevalencia de la resistencia a los macrólidos ha aumentado con rapidez en Europa, especialmente en los países del norte (excepto Suecia), donde las estimaciones superan el 50%.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es el método elegido para el diagnóstico de *M. genitalium* debido a las dificultades que supone su cultivo y a la falta de pruebas serológicas estandarizadas para este. Esta técnica también permite detectar la resistencia a los macrólidos debida a la mutación del gen de *M. genitalium* que codifica el ARNr 23S. *M. genitalium* y sus mutaciones más comunes pueden detectarse simultáneamente mediante las nuevas tecnologías de amplificación de genes.

### **Principio del test**

Vitassay qPCR Macrolide Res- 23S rRNA Mutations se basa en la amplificación a tiempo real de una región conservada del gen 23S rRNA en la que se pueden producir mutaciones puntuales específicas relacionadas con la resistencia a macrólidos en *Mycoplasma genitalium*. Tras la extracción de DNA, la presencia de *M. genitalium* resistente/sensible a macrólidos se detecta mediante un aumento de la fluorescencia observada durante la reacción, tras la hidrólisis de la sonda fluorescente.

El ensayo está basado en la actividad 5' exonucleasa que utiliza dos *primers* y una sonda de hidrólisis fluorogénica para detectar la acumulación de la secuencia diana amplificada durante la reacción de PCR. Cuando la polimerasa comienza a extender los primers, la sonda es hidrolizada mediante su actividad exonucleasa 5' - 3' produciendo la separación espacial del fluoróforo y el *quencher*. El aumento de la señal fluorescente resultante es proporcional a la cantidad de producto amplificado en la muestra y es detectado mediante un equipo de PCR en tiempo real.

Vitassay qPCR Macrolide Res- 23S rRNA Mutations se trata de una prueba lista para usar que contiene en cada pocillo todos los reactivos necesarios en formato estabilizado para llevar a cabo la PCR a tiempo real. Además, un control interno permite la detección de una posible reacción de inhibición. La amplificación de la secuencia diana se detecta en el canal FAM (*M. genitalium* resistente a macrólidos) y en HEX, JOE o VIC, según el equipo utilizado, (*M. genitalium* sensible a macrólidos), mientras que el control interno es detectado en el canal Cy5.

## Precauciones

- Diseñado para uso profesional de diagnóstico *in vitro* (uso por personal de laboratorio clínico cualificado y capacitado).
- No utilizar el kit después de la fecha de caducidad.
- No mezclar reactivos de otros kits y/o diferentes lotes.
- No utilizar si el kit tiene signos de haber sido abierto o manipulado.
- No utilizar el kit si el material desecante de los diferentes sobres de aluminio está dañado o no está o si el aluminio protector está roto o dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio una vez abiertos.
- Se recomienda proteger los tubos de la humedad ya que una exposición prolongada puede afectar al rendimiento del producto.
- Trabajar siguiendo las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes desechables, gafas y mascarilla.
- No comer, beber o fumar en la zona de trabajo.
- Es importante seguir un flujo de trabajo en el laboratorio unidireccional: Área de Extracción, Área de Amplificación y Detección. No retornar muestras, equipos ni reactivos a un área anterior. Utilice áreas separadas para la preparación de muestras de pacientes y controles.
- Evite la contaminación con ribonucleasas (RNasa)/ desoxirribonucleasas (DNasa) o microbiológica de los reactivos. Se recomienda el uso de puntas de pipeta estériles desechables resistentes a los aerosoles o de desplazamiento positivo de RNasa/DNasa.
- Un aspecto de la mezcla de reacción en formato estabilizado, que normalmente se encuentra en el fondo del tubo, diferente al habitual (sin forma cónica, no homogénea, de menor/mayor tamaño y/o color diferente al blanquecino) no altera la funcionalidad de la prueba.
- Las muestras y todo material en contacto con ellas se deben tratar como potencialmente infecciosos y se deben gestionar según la legislación nacional sobre residuos sanitarios y la legislación nacional de seguridad. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, transporte, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Use equipos de protección individual (EPI) y cabina de seguridad biológica para el manejo de muestras potencialmente infecciosas y reactivos según recomendaciones actuales.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.

## Procedimiento

### Toma, transporte y conservación de muestras

Para la recogida, la conservación y el transporte de los especímenes deben seguirse las condiciones validadas por el usuario. Vitassay qPCR Macrolide Res- 23S rRNA Mutations ha sido testado en hisopos uretrales, hisopos rectales, hisopos endocervicales e hisopos vaginales recogidos con el Sistema de Recolección y Conservación de un solo uso ESwab®, compuesto por un hisopo de nylon flocado y 1 mL de medio de conservación “Liquid Amies” (Copan), así como en orina uretral recogida en tubos estériles (VACUETTE™, Greiner Bio-One) de pacientes con infección confirmada por *Mycoplasma genitalium*. El usuario debe validar otros tipos de muestras.

En general, las muestras clínicas deben recogerse adecuadamente en recipientes limpios, etiquetarse correctamente y procesarse con prontitud para garantizar la calidad de la prueba. Se recomienda utilizar muestras frescas para el ensayo. El transporte debe realizarse siempre conforme a la normativa local y nacional para el transporte de muestras biológicas. Las muestras de orina pueden transportarse a temperatura ambiente durante un máximo de 1 hora, o a 2-8°C hasta 24 horas. Para un transporte de mayor duración (más de 24 horas), se recomienda el envío a -20°C o menos. Las muestras recogidas en el Sistema de Recogida y Conservación ESwab® deben transportarse a 20-25°C durante un máximo de 5 días, o a 4°C durante un máximo de 7 días. Para un transporte de mayor duración (más de 7 días), se recomienda el envío a -20°C o menos. Las muestras pueden conservarse a 2-8°C hasta un máximo de 24 horas o congeladas a -20°C o menos (a -80°C idealmente) para una conservación de mayor duración. Los ciclos de congelación-descongelación deben ser evitados para prevenir la degradación de la muestra y los ácidos nucleicos.

Las muestras clínicas deben recolectarse, transportarse y almacenarse de acuerdo con pautas de laboratorio adecuadas. Para más información puede consultar las siguientes guías:

- IDSA (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018). A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94)
- García-Lechuz Moya, J.M., González López, J.J., Orta Mira, N., Sánchez Romero, M.I. (2017). Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Sánchez Romero, M.I., (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla, E., Cantón Moreno, R., (editores). *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)*.

## Extracción de DNA

Para el aislamiento de los ácidos nucleicos a partir de muestras clínicas se puede utilizar un sistema manual o automático compatible con ensayos de PCR en tiempo real. Realizar el pretratamiento de la muestra siguiendo las instrucciones del kit de extracción utilizado. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

- Invisorb® Spin Universal Kit (Invitek).
- DNA/RNA Extraction Kit (Vazyme).
- MagDEA Dx SV kit, empleando el equipo magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.).
- STARMag 96x4 Universal Cartridge Kit (Seegene®), empleando el Microlab® STARlet automatic extraction system (Hamilton).

## Preparación del control positivo

Reconstituir el contenido liofilizado del Macrolide Res- 23S Positive Control (tubo rojo) con 100 µL de agua ultrapura (PCR grade water, tubo blanco). Mezclar hasta conseguir una suspensión homogénea con ayuda del vórtex. Después del primer uso, dispensar en alícuotas para evitar repetidos ciclos de congelación-descongelación y almacenarlo a -20°C.

El control positivo contiene una gran cantidad de copias molde y el riesgo de contaminación es elevado. Por lo tanto, se recomienda abrir y manipular en un área del laboratorio separada de los otros componentes del kit y de las muestras a analizar.

## Preparación de la reacción

- Preparar el número de pocillos necesarios incluyendo muestras y controles (un control positivo y uno negativo para cada uno de los ensayos).
- Retirar el sello de aluminio que protege las tiras.
- Pipetear 15 µL de la solución de resuspensión (tubo verde) y añadirlos en cada pocillo.
- Pipetear 5 µL de DNA extraído, Control Negativo (tubo amarillo) o Control positivo reconstituido (tubo rojo) y añadirlos en los pocillos correspondientes.
- Cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Centrifugar brevemente (opcional).
- Colocar las tiras en el equipo de PCR a tiempo real.



## Programación del termociclador

Configurar el termociclador siguiendo las siguientes instrucciones:

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Activación de la polimerasa	95°C	2 min	1
Desnaturalización	95°C	10 seg	45
Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	60°C	50 seg	

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de hibridación (\*) a través de los canales FAM (*M. genitalium* resistente a macrólidos), y HEX, VIC o JOE (*M. genitalium* sensible a macrólidos) y Cy5 (Control Interno, CI). Dependiendo del equipo utilizado, seleccione el canal de detección adecuado (ver Adjunto II).

### Análisis e interpretación de resultados

El análisis de los resultados se realiza con el software propio del equipo de PCR en tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. Para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación compruebe la emisión de señal de control interno (CI).

Utilice la curva de amplificación del control positivo como punto de partida durante la validación de la reacción (antes de la interpretación de los resultados de las muestras), para garantizar que el *threshold* se sitúe dentro de la fase exponencial de las curvas de amplificación y por encima de cualquier señal de ruido de fondo. El valor de *threshold* puede variar entre distintos instrumentos debido a las diferentes intensidades de señal. Se recomienda establecer los valores de *threshold* para cada canal (diana) de forma independiente por el usuario final.

Antes de analizar el resultado de las muestras debe validarse el resultado de los controles:

#### Control positivo

El control positivo utilizado en cada serie debe mostrar una curva de amplificación (Ct  $\leq$ 40) en los canales FAM and HEX.

#### Control negativo

El control negativo incluido en cada serie debe mostrar la ausencia de señal (Ct  $>$ 40 o no señal) de FAM and HEX.

El control interno (CI) debe mostrar una señal de amplificación (Ct ≤40) en los pocillos de control positivo y negativo.

El experimento es inválido si hay señal de amplificación en el control negativo o ausencia de señal en el control positivo para cualquier canal. El ensayo se debe de repetir.

Una vez validado el resultado de los controles, con la ayuda de la siguiente tabla analizar los resultados de las muestras:

<i>M. genitalium</i> resistente a macrólidos (FAM)	<i>M. genitalium</i> sensible a macrólidos (HEX)	Control interno (Cy5)		Interpretación
+	-	+/- <sup>1</sup>	Válido	DNA de <i>M. genitalium</i> resistente a macrólidos detectado
-	+	+/- <sup>1</sup>	Válido	DNA de <i>M. genitalium</i> sensible a macrólidos detectado
+	+	+/- <sup>1</sup>	Válido	DNA de <i>M. genitalium</i> resistente a macrólidos y de <i>M. genitalium</i> sensible a macrólidos detectados
-	-	+ <sup>2</sup>	Válido	Dianas no detectadas
-	-	- <sup>2</sup>	Inválido	Test fallido <sup>2</sup>

**Positivo (+):** Señal de amplificación (Ct ≤40)

**Negativo (-):** No hay señal de amplificación (Ct >40 o no señal)

<sup>1</sup> En ocasiones, la detección del control interno no es necesaria, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última. El control interno (CI) muestra o no una señal de amplificación (Ct ≤40 o no señal).

<sup>2</sup> En el caso de que la detección de las regiones diana de *M. genitalium* resistente a macrólidos y de *M. genitalium* sensible a macrólidos resulte negativa, el CI debe mostrar una señal de amplificación con Ct ≤35. En el caso de ausencia de señal o valor de Ct > 35 del control interno, el resultado se considera "inválido" y se requiere repetir el ensayo. Se recomienda repetir la qPCR diluyendo la muestra de DNA 1:10 y/o 1:100, o repetir la extracción y el ensayo para verificar si hay un posible fallo en el procedimiento de extracción y/o problemas de inhibición.

Si el resultado obtenido resulta confuso o dudoso, es necesario comprobar que se han realizado correctamente todos los pasos, verificar el correcto rendimiento de cada etapa de la qPCR, revisar todos los parámetros, la forma sigmoidea de la curva y la intensidad de la fluorescencia. Se recomienda también repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado, en función del material disponible (obtener un nuevo espécimen y volver a testar, volver a extraer y testar otra alícuota de la misma muestra o, repetir qPCR con la misma muestra de DNA aislada).

Los resultados de la prueba deben ser evaluados por un profesional de la salud, juntamente con el historial médico, los síntomas clínicos y/o los resultados obtenidos en otras pruebas de diagnóstico.

## **Control de Calidad**

Con el fin de confirmar el correcto funcionamiento de la técnica de diagnóstico molecular, se incluye un Control Interno (CI) en cada reacción. Además, un control positivo y uno negativo se debe de incluir en cada ensayo para una correcta interpretación de los resultados.

## **Características técnicas**

### **Sensibilidad y especificidad clínica**

La evaluación clínica Vitassay qPCR Macrolide Res- 23S rRNA Mutations se realizó con un total de 169 muestras urogenitales (76 uretrales, 15 rectales, 60 endocervicales y 6 hisopos vaginales y 12 orinas uretrales), todas ellas positivas para *Mycoplasma genitalium*. Las extracciones de ADN se realizaron con el STARMag 96x4 Universal Cartridge Kit (Seegene Inc.), utilizando el sistema de extracción automática Microlab® STARlet (Hamilton) y el termociclador DTprime Real-Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology). Los resultados obtenidos se compararon con los de la caracterización inicial (ResistancePlus® MG Kit (SpeedX Pty Ltd) utilizado para la identificación de la resistencia a macrólidos en muestras positivas a *M. genitalium* y Allplex™ STI essential assay panel (Seegene Inc.) utilizado para los resultados discordantes).

El análisis comparativo entre la caracterización inicial y la qPCR de Vitassay, tras evaluar las discrepancias, mostró que Vitassay fue capaz de detectar 80 muestras verdaderas positivas y 87 verdaderas negativas para la mutación puntual-23S (es decir, la resistencia a los macrólidos).

Por otro lado, el kit Vitassay informó de 87 muestras verdaderas positivas y 80 verdaderas negativas para el gen de tipo salvaje (WT) (es decir, sensibilidad a los macrólidos). En ambos casos, se encontraron dos discrepancias: 2 valores falsos negativos para la mutación puntual 23S y 2 valores falsos positivos para WT. Por lo tanto, los valores de especificidad y sensibilidad para la mutación puntual 23S fueron 1 (0,96-1) y 0,98 (0,91-0,99), respectivamente, y para la WT fueron 0,98 (0,91-0,99) y 1 (0,96-1), respectivamente.

En conclusión, Vitassay qPCR Macrolide Res- 23S rRNA Mutations representa una herramienta eficiente para el diagnóstico de mutaciones asociadas a la resistencia a macrólidos en muestras urogenitales positivas de *M. genitalium*, ya que los resultados muestran una alta concordancia.

## Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica fue determinada a partir de diluciones seriadas (1:10) de *M. genitalium* ( $10^7$ - $10^1$  copias/reacción). Este ensayo tiene un límite de detección de 8 copias de DNA/ $\mu$ L de muestra para *M. genitalium* resistente a macrólidos, y 0,2 CFU/ $\mu$ L para *M. genitalium* sensible a macrólidos, en muestras de hisopos vaginales (tasa positividad  $\geq 95\%$ ).

## Especificidad analítica

La especificidad analítica para la detección de *M. genitalium* fue confirmada probando un panel compuesto por los siguientes microorganismos asociados a infecciones de transmisión sexual y a resistencia antibióticos, no observándose reacciones cruzadas con ninguna de las especies:

### Prueba de reactividad cruzada

Prueba de reactividad cruzada					
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i> resistente a vancomicina A	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL/ positivo a carbapenemasa (TEM-1(non-ESBL), SHV-1(no-ESBL), CTX-M-2(ESBL), KPC-2)	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i> resistente a vancomicina B (equivalente a ATCC® 51299™)*	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> serotipo Capsular 2	-
<i>Atopobium vaginae</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i> serotipo 11	-	<i>Listeria innocua</i> serotipo 6a	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i> resistente a vancomicina A (LMG16165)	-	<i>Listeria ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i> serovar 5	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i> resistente a vancomicina A (IOWA 1)	-	<i>Listeria monocytogenes</i> serovar 4b	-
<i>Candida dubliniensis</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i> resistente a vancomicina B (IOWA 2)	-	<i>Mycoplasma hominis</i>	-
<i>Candida glabrata</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i> S (MI12043391) resistente a vancomicina C	-	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> cepas St 49226 y Lvl Ng PorA	-
<i>Candida krusei</i> ( <i>Issatchenkia orientalis</i> )	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> (LMG16289) resistente a vancomicina C	-	<i>Neisseria meningitidis</i> serogrupo A	-
<i>Candida parapsilosis</i>	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> (ENT20120142) resistente a vancomicina B y C	-	<i>Proteus mirabilis</i>	-

**Prueba de reactividad cruzada**

<i>Candida tropicalis</i>	-	<i>Escherichia coli</i> positivo a carbapenemasa (OXA-244)	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Chlamydia trachomatis</i> cepa SW	-	<i>Escherichia coli</i> positivo a carbapenemasa (TEM-1(no-ESBL), IMP-1)	-	<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i>	-
<i>Chlamydia trachomatis</i> genovar F	-	<i>Escherichia coli</i> cepa 0.1285; O18:H7:K1	-	<i>Serratia marcescens</i> positivo a carbapenemasa (OXA-48)	-
<i>Chlamydia trachomatis</i> cepa LGV	-	<i>Gardnerella vaginalis</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (variedades N315, ST398 y mecC)	-
<i>Citrobacter brakii</i> positivo a carbapenemasa (VIM-1)	-	<i>Haemophilus ducreyi</i> cepa Class 1	-	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina adquirida en la comunidad (oxa <sup>R</sup> , PVL-positivo, spa:t 310)	-
Complejo <i>Citrobacter freundii</i> positivo a carbapenemasa (KPC-3, VIM-4)	-	<i>Haemophilus influenzae</i> cepa Minn A	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
Cytomegalovirus cepa AD-169	-	<i>Helicobacter pylori</i> resistente a claritromicina (A2146G y A2147G)	-	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> serotipo Cloaca B	-	Hepatitis A virus	-	<i>Streptococcus agalactiae</i> cepa Z019	-
<i>Enterobacter cloacae</i> ESBL/positivo a carbapenemasa (SHV-12 (ESBL), CTX-M-9 (ESBL), OXA-48)	-	Herpes Simplex Virus 1 cepa MacIntyre	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> cepa Z022	-
<i>Enterobacter cloacae</i> ESBL/positivo a carbapenemasa (TEM-1 (non ESBL), SHV-12 (ESBL), CTX-M-15 (ESBL), NDM-1)	-	Herpes Simplex Virus 2 cepa MS	-	<i>Treponema pallidum</i>	-
Complejo <i>Enterobacter cloacae</i> positivo a carbapenemasa (NDM-7)	-	Human Papillomavirus tipos 16 y 18	-	<i>Trichomonas vaginalis</i>	-
<i>Enterobacter cloacae</i> serotipo Cloaca A	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Ureaplasma parvum</i>	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> positivo a carbapenemasa (SHV-1(no-ESBL), KPC-3, OXA-48)	-	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	-

\*ATCC® 51299™: *Enterococcus faecalis* (Andrewes and Horder) Schleifer and Kilpper-Balz, strain NJ-3.

## Reactividad analítica

La reactividad de Vitassay qPCR Macrolide Res- 23S rRNA Mutations para *M. genitalium* sensible a macrólidos se evaluó frente al DNA extraído (como referencia) de:

*Mycoplasma genitalium* Tully et al., cepa M30

muestras clínicas simuladas positivas para *Mycoplasma genitalium*

muestras clínicas simuladas positivas para *Mycoplasma genitalium* cepa G37

mostrando resultados positivos.

La reactividad de Vitassay qPCR Macrolide Res- 23S rRNA Mutations para *M. genitalium* resistente a macrólidos se evaluó frente al DNA extraído (como referencia) de:

muestras clínicas

muestras clínicas simuladas positivas para *Mycoplasma genitalium* cepa M6303

muestras clínicas simuladas positivas para *Mycoplasma genitalium* cepa M6593

mostrando resultados positivos.

## Termocicladores compatibles

Vitassay qPCR Macrolide Res- 23S rRNA Mutations ha sido validado en los siguientes equipos:

- Cobas z480 Analyzer (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) <sup>I</sup>
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTPPrime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- CFX Opus 96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- MIC qPCR Cycler (Bio Molecular Systems)
- LightCycler 480 Instrument II (Roche)
- NEOS-96 Real Time PCR System (Linear)
- QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
- QuantGene 9600 (BioEr Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen) <sup>II</sup>

<sup>I</sup>: En el caso de utilizar el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para los tubos (Ref. PN 4388506).

II: Para los equipos Rotor-Gene® Q y MIC qPCR Cyler, el producto debe ser reconstituido y trasvasado a los tubos específicos de los equipos.

\*Si el resultado en el canal FAM no es el esperado, no hay amplificaciones o se observa elevado ruido de fondo, por favor, baje los valores de exposición indicados anteriormente hasta 150.

## Limitaciones

- Todos los resultados obtenidos deben ser interpretados por un especialista junto con la información clínica y los hallazgos de laboratorio disponibles.
- Este ensayo ha sido validado con DNA extraído de muestras de hisopos genitales (orinas uretrales, hisopos uretrales, hisopos rectales, hisopos endocervicales e hisopos vaginales) positivos a la infección por *M. genitalium* mediante ensayos moleculares. El uso de otras muestras no se ha establecido.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el DNA deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas.
- Esta prueba no proporciona valores cuantitativos ni indica el número de organismos presentes. Esta prueba es un ensayo cualitativo.
- Se puede detectar un bajo número de copias del DNA molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de resultados falsos positivos debido a la contaminación cruzada, ya sea por el Macrolide Res- 23S positive control durante su reconstitución, por muestras que contienen altas concentraciones de DNA molde diana o por productos de PCR de reacciones anteriores.
- La detección puede verse afectada por varios factores y sus combinaciones que pueden conducir a resultados falsos negativos, que incluyen: a) inadecuado muestreo, envío, almacenamiento y manipulación de las muestras; b) errores de procedimiento (incluido la extracción de DNA); c) Degradación del DNA durante el envío, almacenamiento y/o preparación de muestras; d) la carga de este patógeno esté por debajo del límite de detección del ensayo; e) presencia de inhibidores de la amplificación en tiempo real u otros tipos de interferencia (no se realizó un estudio de interferencia que evaluara el efecto de vacunas, terapias antivirales, antibióticos, quimioterapéuticos o fármacos inmunosupresores utilizados para prevenir la infección o durante el tratamiento de la misma); f) incumplimiento de las instrucciones y procedimientos sugeridos por el fabricante; g) mutaciones o polimorfismos en regiones de unión de cebadores o sondas que pueden afectar la detección de *M. genitalium* resistente a macrólidos y/o de *M. genitalium* sensible a macrólidos.
- La detección del DNA puede no indicar la presencia de bacterias viables y/o infecciosas o que *M. genitalium* resistente a macrólidos y/o *M. genitalium* sensible a macrólidos sea el agente causante de los síntomas clínicos.

- Los resultados negativos no impiden la infección por *M. genitalium* resistente a macrólidos y/o de *M. genitalium* sensible a macrólidos y no deben ser la única base de una decisión de tratamiento/manejo del paciente. Aún no se han establecido los tipos de muestras óptimos y/o la etapa de infección más adecuados para su recolección. Considere la recolección de múltiples muestras del mismo paciente en diferentes momentos, lo que puede aumentar la probabilidad de detectar la bacteria.
- Si los datos clínicos del paciente, las pruebas de laboratorio y los estudios epidemiológicos sugieren una posible infección con *M. genitalium* resistente a macrólidos y/o de *M. genitalium* sensible a macrólidos, y se han descartado otras enfermedades de transmisión sexual, la posibilidad de un resultado falso negativo no se debería descartar y se deberían realizar pruebas adicionales.
- Los valores de fluorescencia pueden variar debido a múltiples factores como el equipo de PCR, el sistema de extracción, el tipo de muestra y su tratamiento previo, entre otros.



## Adjunto I. Compatibilidad de los termocicladores a tiempo real más usuales

Los termocicladores más usuales se enumeran en la siguiente tabla separados por tipo de tubo. Si no encuentra su termociclador, póngase en contacto con su proveedor:

Termocicladores con bloque de bajo perfil
<b>Agilent Technologies</b>
AriaMx Real-Time PCR System
AriaDx Real-Time PCR System
<b>Applied Biosystems</b>
7500 Fast Real-Time PCR System <sup>(1) (2)</sup>
7500 Fast Dx Real-Time PCR System <sup>(1) (2)</sup>
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System <sup>(3)</sup>
StepOne Plus™ Real-Time PCR System <sup>(3)</sup>
StepOne™ Real-Time PCR System <sup>(4)</sup>
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
<b>Azure Biosystems</b>
Azure Cielo 3 <sup>(5)</sup>
Azure Cielo 6
<b>BIONEER</b>
Exicycler™ 96
<b>Bio-Rad</b>
CFX96™ Real-Time PCR Detection System
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System <sup>(5)</sup>
<b>Roche</b>
LightCycler® 480 Real-Time PCR System <sup>(1) (6)</sup>
LightCycler® 96 Real-Time PCR System <sup>(1)</sup>
Cobas z480 Analyzer <sup>(1) (6)</sup>

Formatos especiales <sup>(7)</sup>
<b>Bio Molecular Systems</b>
Mic Real Time PCR Cycler
<b>Cepheid</b>
SmartCycler®
<b>Precision System Science Co., Ltd.</b>
geneLEAD VIII System
<b>Qiagen</b>
Rotor-Gene® Q

Termocicladores con bloque de alto perfil
<b>Abbott</b>
Abbott m2000 <sup>(1)</sup>
<b>Applied Biosystems</b>
7300 Real-Time PCR System <sup>(3) (1)</sup>
7500 Real-Time PCR System <sup>(1)</sup>
7900 Real-Time PCR System <sup>(3)</sup>
ABI PRISM 7000 <sup>(3)</sup>
ABI PRISM 7700 <sup>(3)</sup>
QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 6 Flex 96-well
QuantStudio™ 7 Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System <sup>(3)</sup>
ViiA™ 7 Real-Time PCR System
<b>Agilent Technologies</b>
Mx3000P™ Real Time PCR System
Mx3005P™ Real Time PCR System
<b>Analytik Jena</b>
qTOWER
<b>BIONEER</b>
Exicycler™ 96
<b>BIOER</b>
QuantGene 9600
<b>Bio-Rad</b>
CFX96™ Deep Well Real-Time PCR
iCycler iQ™ Real-Time PCR
iCycler iQ™ 5 Real-Time PCR
My iQ™ Real-Time PCR Detection System <sup>(5)</sup>
My iQ™ 2 Real-Time PCR Detection System <sup>(5)</sup>
<b>DNA-Technology</b>
DTlite Real-Time PCR System <sup>(8)</sup>
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler <sup>(8)</sup>
<b>Eppendorf</b>
Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
<b>Qiagen</b>
QIAquant 96

- (1) Se necesita un soporte especial que ajuste con estos equipos de PCR a tiempo real.
- (2) Seleccionar Ramp Speed "Standard".
- (3) No lectura en canal ROX.
- (4) No lectura en canal Cy5.
- (5) Lectura solo en canales FAM y HEX.
- (6) Se requiere compensación de color específica.
- (7) El producto se debe reconstituir siguiendo el procedimiento adecuado (ver Procedimiento de la prueba) y transvasar a los tubos específicos Mic, SmartCycler®, Rotor-Gene® Q o geneLEAD VIII System.
- (8) Ver Adjunto III para configurar los valores de exposición.

## Adjunto II. Canales de detección de los equipos a tiempo real más comunes

Los canales de fluorescencia de algunos de los termocicladores a tiempo real más comunes se especifican en la siguiente tabla:

Termociclador	Canal Vitassay	Canal de Detección	Observaciones
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Applied Biosystems ABI 7500	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480 II	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Roche Cobas z 480	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	540/580	
	ROX	540/610	
	Cy5	610/670	
Cepheid Smartcycler®	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Agilent Technologies Mx3000P™ Mx 3005P™	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Bio Molecular Systems Mic Real Time PCR Cycler	FAM	Green	Introducir los parámetros correctos para "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) y el protocolo térmico (Menú "Run Profile"). Seleccionar "Acquire on" para todos los canales (haciendo click sobre ellos en ventana "Cycling"). Utilice los valores del "Gain" por defecto para cada canal (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10)
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Agilent Technologies AriaMx	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene® Q	FAM	Green	Al configurar los canales, presione el botón "Gain Optimisation" y después vaya a "Optimise Acquiring". La fluorescencia del apartado Target Sample Range tiene que estar entre 5 y 10 FI para cada canal. Además, marque la opción "Perform Optimisation Before 1st Acquisition"
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
BIONEER Exicycler™ 96	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

### Adjunto III. Configuración valores de exposición

Los valores de exposición de algunos termocicladores se deben ajustar para su correcto funcionamiento. Establecer los valores de exposición de la siguiente manera:

Termociclador	Canal Vitassay	Valor de exposición
<b>DTIite Real-Time PCR System (DNA-Technology)</b>	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
<b>DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)</b>	FAM	500*
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

\* En el caso de un resultado no esperado, sin amplificaciones o con un elevado ruido de fondo en el canal FAM, por favor, reduzca los valores de exposición indicados anteriormente hasta 150.



## Intended use

Vitassay qPCR Macrolide Res- 23S rRNA Mutations allows the qualitative detection and identification of specific point mutations (conferred by base substitutions in 23S rRNA) implicated in macrolide resistance of *M. genitalium* by Real-Time PCR in genital swabs from patients with confirmed *Mycoplasma genitalium* infection by molecular assays. This product is intended to aid in the potential resistances to macrolide diagnosis, alongside the patient's clinical data, epidemiological risk factors, and other laboratory tests outcomes.

## References

Vitassay qPCR Macrolide Res- 23S rRNA Mutations

4x8-well strip, low profile

7041077

Vitassay qPCR Macrolide Res- 23S rRNA Mutations

4x8-well strip, high profile

7042077

## Materials/reagents provided

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7041S077/ 7042S077	Macrolide Res- 23S strips low/high profile	-	4 x 8-well strip
7C077	Macrolide Res- 23S Positive Control	red	1 vial
7001A	PCR grade water	white	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension Buffer	green	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	yellow	1 vial x 1 mL
7004O	Optical caps	-	4 x 8-cap strip

## Transport and storage

- The reagents and the test can be shipped and stored at 2-40°C until expiration date stated on the label.
- The resuspended positive control should be stored at -20°C. To avoid repeated freeze/thaw cycles, it is recommended to distribute the content in different aliquots.
- Keep all reagents in the darkness.

## Additional equipment and material required

- Collection and transport system.

- Laboratory freezers (- 30°C to - 10°C and/or ≤ -70°C).
- DNA extraction kit
- Real-time PCR instrument (thermocycler) (Attached I)
- Centrifuge for 1.5 mL tubes
- Vortex
- Micropipettes (1-20 µL, 20-200 µL)
- Filter tips
- Powder-free disposal gloves

## Summary

Sexually transmitted diseases (STDs) are very common and are transmitted from one person to another through intimate physical contact and sexual activity that includes vaginal, oral, and anal sex. STDs can mostly be prevented by not having sex. STDs do not always cause symptoms, so it is possible to have an infection and not know it.

Over the past few decades, *Mycoplasma genitalium* has become a STD pathogen. The bacterium is a slow growing organism with a genome size of only 580 Kb coding for fewer than 500 genes.

*Mycoplasma* species are found in the mouth, the respiratory and genitourinary tract. *M. genitalium* specifically colonizes the male and female reproductive tract in organs such as the urethra, cervix and fallopian tubes.

Between 40 and 75% of female carriers of STDs lack of specific symptoms. On the other hand, this organism has been linked to a many severe diseases such as cervicitis (vaginal pruritus and discharge, dysuria, irregular bleeding, among others), pelvic inflammatory disease (abdominal and pelvic pain, and abnormal vaginal discharge/bleeding, among others) and urethritis (dysuria, urethral pruritus, and mucopurulent urethral discharge).

Its average prevalence is between 0.5 and 10% in the general population and between 20 and 40% in people with sexually transmitted infections.

Antimicrobial resistance in *M. genitalium* can develop as a result of selective pressure from antibiotic exposure of the organism leading to mutational changes during treatment, or of selection of pre-existing mutations already present. Since no cell wall exists in *Mycoplasmas*, including *M. genitalium*, β-lactam antibiotics and other antibiotics that react with this structure are ineffective. Only a select number of antibiotics such as macrolides are effective against *Mycoplasmas*.

The first-line therapy recommended against this pathogen has been the macrolide azithromycin. However, due to the widespread use of this antibiotic for the treatment of STIs, particularly as a single dose for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*, has probably led to the emergence of macrolide resistance in *M. genitalium* worldwide.

Macrolide resistance is a critical growing problem, with resistance rates currently estimated at 30-100% worldwide. Resistance can develop with a single base mutation, most frequently at position A2058 or A2059 (*Escherichia coli* numbering) of the 23S rRNA, without affecting the lifespan of the organism allowing its transmission.

The prevalence of macrolide resistance has increased rapidly in Europe, particularly in Northern countries (except Sweden) where estimates exceed 50%.

The polymerase chain reaction (PCR) is the method of choice for diagnosis due to the challenges involved in culturing the pathogen and the lack of standardized serological tests for *M. genitalium*. This technique also allows the detection of macrolide resistance due to mutation in the *M. genitalium* gene coding for 23S rRNA. *M. genitalium* and its most common mutations can be simultaneously detected using new gene amplification technologies.

### **Principle of the test**

Vitassay qPCR Macrolide Res- 23S rRNA Mutations is based on the real-time amplification of a conserved region of 23S rRNA gene in which specific point mutations could occur (conferred by base substitutions) implicated in macrolide resistance of *Mycoplasma genitalium*. After DNA extraction, the *M. genitalium* resistant/sensitive to macrolides presence is detected by an increase in observed fluorescence during the reaction, after hydrolysis of the fluorescent probe.

The assay is based on 5' exonuclease activity using two primers and a fluorogenic hydrolysis probe to detect accumulation of the amplified target sequence during the PCR reaction. When the polymerase begins to spread the primers, the probe is hydrolyzed by its exonuclease 5'-3' activity causing the spatial separation of the fluorophore and the quencher. The increase in the resulting fluorescent signal is proportional to the amount of amplified product in the sample and is detected by means of real-time PCR equipment.

Vitassay qPCR Macrolide Res- 23S rRNA Mutations is a ready-to-use test which contains in each well all the necessary reagents for real-time PCR assay in a stabilized format. In addition, an internal control allows the detection of a possible inhibition reaction. The amplification of the target sequence is detected through the FAM channel (*M. genitalium* resistant to macrolides) and HEX, VIC, or JOE channel, depending on the equipment used, (*M. genitalium* sensitive to macrolides), whereas the internal control (IC) is detected through the Cy5.

### **Precautions**

- For professional *in vitro* diagnostic use (use by qualified and trained clinical laboratory personnel).
- Do not use after expiration date.
- Do not mix components from different kits and/or lots.



- Do not use if package is open or damaged.
- Do not use the kit if the desiccant from the different reagents is not present or is broken or if the foil has been broken or damaged.
- Do not remove desiccant from reagent pouches once is open.
- Protect the kit against humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposal gloves, goggles, and mask.
- Do not eat, drink, or smoke in the working area.
- The laboratory process must be one-directional, it should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Areas. Do not return samples, equipment, and reagents to the area in which the previous step was performed. Use separate areas for the patient samples and controls preparation.
- Avoid microbial and ribonuclease (RNase)/deoxyribonuclease (DNase) contamination of reagents. The use of sterile disposable aerosol resistant pipette tips or RNase/DNase positive displacement pipette tips is recommended.
- An appearance of the reaction mixture in stabilized format, normally found at the tube bottom, different from the usual one (without conical shape, inhomogeneous, smaller/larger in size and/or color different from whitish) does not alter the test functionality.
- Specimens and reagents/materials that have been exposed to them must be treated as potentially infectious and they must be managed according to the national safety legislation and national health waste legislation. Take necessary precautions during the collection, transport, storage, treatment, and disposal of samples.
- Use personal protective equipment (PPE) and biological safety cabinet for handling of potentially infectious samples and reagents according to current recommendations.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.

## **Procedures**

### **Specimen collection, transport, and conservation**

For specimen collection, conservation, and transport, user-validated conditions must be followed. The Vitassay qPCR Macrolide Res- 23S rRNA Mutations has been tested in urethral, rectal, endocervical and vaginal swabs collected with a sterile single-use Copan Liquid Amies Elution Swab (ESwab®) with flocked nylon filled with 1 mL of Liquid Amies preservation medium (Copan), as well as in urethral urines collected in sterile tubes

(VACUETTE™, Greiner Bio-One) from patients with confirmed *Mycoplasma genitalium* infection. Other sample types must be validated by the user.

Overall, clinical samples should be collected appropriately in clean containers, correctly labelled and promptly processed to ensure the test's quality. It is recommended to use fresh specimens for the test. Transport must always be carried out in accordance with local and national regulations for the transport of biological samples. The urine specimens should be transported at room temperature for up to 1 hour, or at 2-8°C for up to 24 hours. For long term transport (more than 24 hours), we recommend shipping at -20°C or lower. Samples in ESwab® Collection and Preservation System should be transport at 20-25°C for up to 5 days, or at 4°C for up to 7 days. For long term transport (more than 7 days), we recommend shipping at -20°C or lower. The samples can be stored at 2-8°C for up to 24 hours or frozen at -20°C or lower (at -80°C ideally) for long-term conservation, if preservation medium permits. Repeated freeze-thaw cycles should be avoided to prevent sample and nucleic acids degradation.

The clinical specimens must be collected, transported, and stored according to appropriate laboratory guidelines. For more information, refer to the following guidelines:

- IDSA (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018). A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94)
- García-Lechuz Moya, J.M., González López, J.J., Orta Mira, N., Sánchez Romero, M.I. (2017). Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Sánchez Romero, M.I., (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla, E., Cantón Moreno, R., (editores). *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)*.

## DNA extraction

For nucleic acid isolation from clinical specimens, it is recommended to use your optimized manual or automatic system compatible with real-time PCR technology. For the sample's pretreatment follow the instructions for use of the extraction kit used. The assay has been validated with the following extraction kits:

- Invisorb® Spin Universal Kit (Invitex).
- DNA/RNA Extraction Kit (Vazyme).
- MagDEA Dx SV kit, empleando el equipo magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.).
- STARMag 96x4 Universal Cartridge Kit (Seegene®), empleando el Microlab® STARlet automatic extraction system (Hamilton).

## Positive control preparation

Reconstitute the lyophilized Macrolide Res- 23S Positive Control (red tube) with 100  $\mu$ L of PCR grade water (white tube). To ensure a complete resuspension, vortex the tube thoroughly. After first use, dispense into aliquots to avoid multiple freeze-thaw cycles, and store them at -20°C.

This component contains high copies number template and is a very significant contamination risk. Therefore, we recommend open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components and samples.

## Reaction setup

- Separate the number of required reactions including samples and controls. Remember that one positive and one negative control must be included in each run for each assay.
- Peel off protective aluminium seal from the strips.
- Pipette 15  $\mu$ L of Resuspension buffer (green tube) and add them into each well.
- Pipette 5  $\mu$ L of DNA sample, negative control (yellow tube) or reconstituted positive control (red tube) and add them into the corresponding wells.
- Cover the wells with the caps provided. Spin down briefly (optional).
- Place the strips in the Real-time PCR instrument.

## Programme your thermocycler

Set your thermocycler following the conditions below:

Step	Temperature	Time	Cycles
Polymerase activation	95°C	2 min	1
Denaturation	95°C	10 sec	45
Annealing/Extension (Data collection*)	60°C	50 sec	

Set the fluorescence data collection during the extension step (\*) through the FAM (*M. genitalium* macrolide resistant) and HEX, VIC, or JOE (*M. genitalium* macrolide sensitive) channels, and Cy5 (Internal Control, IC). Depending on the equipment used select the proper detection channel (Attached II).

## **Analysis and interpretation of results**

The results analysis is done by the software itself of the used real-time PCR system following manufacturer's instructions. To verify the correct operation of the amplification mix, check the internal control (IC) signal emission.

Use the positive control amplification curve as a starting point during reaction validation (prior to interpretation of sample results), to ensure that the threshold falls within the exponential phase of the amplification curves and above any background noise signals. The threshold value may vary between different instruments due to different signal intensities. It is recommended to set the threshold values for each channel (target) independently by the end user.

For a valid diagnostic test run, the following control conditions must be met:

### **Positive control**

The positive control used in each run must show an amplification curve ( $Ct \leq 40$ ) in FAM and HEX channel, which validates the reaction.

### **Negative control**

The negative control included in each run must show signal' absence ( $Ct > 40$  or no signal) in FAM and HEX channel, which validates the reaction.

The Internal Control (IC) should show an amplification signal ( $Ct \leq 40$ ) in positive and negative controls wells.

The experiment seems to be failed if there is amplification signal in negative control or signal absence in the positive control for any channel. The assay should be repeated.

The clinical samples test results assessment should be performed once controls' results have been validated. The result interpretation is summarized in the following table:

<i>M. genitalium</i> macrolide resistant (FAM)	<i>M. genitalium</i> macrolide sensitive (HEX)	Internal Control (Cy5)		Interpretation
+	-	+/- <sup>1</sup>	Valid	<i>M. genitalium</i> macrolide resistant DNA detected
-	+	+/- <sup>1</sup>	Valid	<i>M. genitalium</i> macrolide sensitive DNA detected
+	+	+/- <sup>1</sup>	Valid	<i>M. genitalium</i> macrolide resistant and <i>M. genitalium</i> macrolide sensitive DNA detected
-	-	+ <sup>2</sup>	Valid	Targets not detected
-	-	- <sup>2</sup>	Invalid	Test failed <sup>2</sup>

**(+) Positive:** Amplification signal (Ct ≤40)

**(-) Negative:** No amplification signal (Ct >40 or no signal)

<sup>1</sup> Sometimes, the Internal Control (IC) detection is not necessary since a high copies number of the target can cause a preferential amplification of target-specific nucleic acids. The Internal Control (IC) shows or not an amplification signal (Ct ≤40 or no signal).

<sup>2</sup> In the case of negative *M. genitalium* macrolide resistant and *M. genitalium* macrolide sensitive target genes detection, IC must show an amplification signal with Ct ≤35. If there is a signal absence or Ct value > 35 of Internal Control, the result is considered 'Invalid', and retesting is required. It is recommended to repeat the qPCR by diluting the DNA sample 1:10 and/or 1:100, or to re-extract and retest to check for possible failure in the extraction procedure and/or inhibition problems.

If the obtained result is confusing or doubtful, it is necessary to check that all the steps have been carried out correctly, to verify the correct performance of each qPCR steps and to review all the parameters, the sigmoid shape of the curve and the fluorescence intensity. It is also recommended to repeat the assay, preferably in duplicate, depending on the available material (repeat qPCR with the same isolated DNA sample, or re-extract and retest another aliquot of the same specimen or, obtain a new specimen and retest).

The test results must be evaluated by a health professional, together with the medical history, clinical symptoms and/or the results obtained in other diagnostic tests.

### Quality Control

To confirm the appropriate performance of the molecular diagnostic technique, an Internal Control (IC) is included in each reaction. Moreover, a positive and a negative control must be included in each assay to interpret the results correctly.

## Performance evaluation

### Clinical sensitivity and specificity

The Vitassay qPCR Macrolide Res- 23S rRNA Mutations clinical evaluation was performed using a total of 169 urogenital samples (76 urethral, 15 rectal, 60 endocervical, and 6 vaginal swabs and 12 urethral urines), all of which were positive for *Mycoplasma genitalium*. DNA extractions were performed with the STARMag 96x4 Universal Cartridge Kit (Seegene Inc.), using the Microlab® STARlet automatic extraction system (Hamilton) and the thermocycler used was DTprime Real-Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology). The obtained results were compared with the ones from the initial characterization (ResistancePlus® MG Kit (SpeeDx Pty Ltd) used for identification of macrolide resistance in *M. genitalium* positive samples and Allplex™ STI essential assay panel (Seegene Inc.) used for discordant results).

Comparative analysis between the initial characterization and Vitassay qPCR, and after assessing the discrepancies, showed that Vitassay was able to detect 80 true positive and 87 true negative samples for 23S-point mutation (i.e. macrolide resistance).

On the other hand, Vitassay kit reported 87 true positive and 80 true negative samples for wildtype gene (WT) (i.e macrolide sensitivity). In both cases, two discrepancies were found: 2 false negative values for the 23S point mutation and 2 false positive values for WT. Hence, specificity and sensitivity values for 23S point mutation were 1 (0.96-1) and 0.98 (0.91-0.99), respectively, and for WT were 0.98 (0.91-0.99) and 1 (0.96-1), respectively.

In conclusion, Vitassay qPCR Macrolide Res- 23S rRNA Mutations represents an efficient tool for the diagnostic of macrolide resistance-associated mutations in *M. genitalium* positive urogenital samples, as the results show high concordance.

### Analytical sensitivity

The analytical sensitivity was determined by analysis of 10-fold dilution series of *M. genitalium* ranging from  $10^7$  to  $10^1$  copies/reaction. This assay has a detection limit of 8 DNA copies/ $\mu$ L for *M. genitalium* resistant to macrolides and 0.2 CFU/ $\mu$ l for *M. genitalium* sensitive to macrolides on vaginal swabs samples (positive rate  $\geq 95\%$ ).

### Analytical specificity

The analytical specificity for the *M. genitalium* detection was tested within the panel of following microorganisms associated to sexually transmitted diseases and with antimicrobial resistance, where no cross-reactivity was observed with any of the species:

Cross-reactivity testing					
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i> resistente a vancomicina A	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL/ positivo a carbapenemasa (TEM-1(non-ESBL), SHV-1(no-ESBL), CTX-M-2(ESBL), KPC-2)	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i> resistente a vancomicina B (equivalente a ATCC® 51299™)*	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> serotipo <i>Capsular 2</i>	-
<i>Atopobium vaginae</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i> serotipo 11	-	<i>Listeria innocua</i> serotipo 6a	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i> resistente a vancomicina A (LMG16165)	-	<i>Listeria ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i> serovar 5	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i> resistente a vancomicina A (IOWA 1)	-	<i>Listeria monocytogenes</i> serovar 4b	-
<i>Candida dubliniensis</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i> resistente a vancomicina B (IOWA 2)	-	<i>Mycoplasma hominis</i>	-
<i>Candida glabrata</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i> S (MI12043391) resistente a vancomicina C	-	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> cepas <i>St 49226</i> y <i>Lvl Ng PorA</i>	-
<i>Candida krusei</i> ( <i>Issatchenkia orientalis</i> )	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> (LMG16289) resistente a vancomicina C	-	<i>Neisseria meningitidis</i> serogrupo A	-
<i>Candida parapsilosis</i>	-	<i>Enterococcus gallinarum</i> (ENT20120142) resistente a vancomicina B y C	-	<i>Proteus mirabilis</i>	-
<i>Candida tropicalis</i>	-	<i>Escherichia coli</i> positivo a carbapenemasa (OXA-244)	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Chlamydia trachomatis</i> cepa SW	-	<i>Escherichia coli</i> positivo a carbapenemasa (TEM-1(no-ESBL), IMP-1)	-	<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i>	-
<i>Chlamydia trachomatis</i> genovar F	-	<i>Escherichia coli</i> cepa 0.1285; O18:H7:K1	-	<i>Serratia marcescens</i> positivo a carbapenemasa (OXA-48)	-
<i>Chlamydia trachomatis</i> cepa LGV	-	<i>Gardnerella vaginalis</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a metilicina	-

Cross-reactivity testing				
				(variedades N315, ST398 y mecC)
<i>Citrobacter brakii</i> positivo a carbapenemasa (VIM-1)	-	<i>Haemophilus ducreyi</i> cepa Class 1	-	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina adquirida en la comunidad (oxa <sup>R</sup> , PVL-positivo, spa:t 310)
Complejo <i>Citrobacter freundii</i> positivo a carbapenemasa (KPC-3, VIM-4)	-	<i>Haemophilus influenzae</i> cepa Minn A	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>
Cytomegalovirus cepa AD-169	-	<i>Helicobacter pylori</i> resistente a claritromicina (A2146G y A2147G)	-	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i> serotipo Cloaca B	-	Hepatitis A virus	-	<i>Streptococcus agalactiae</i> cepa Z019
<i>Enterobacter cloacae</i> ESBL/ positivo a carbapenemasa (SHV-12 (ESBL), CTX-M-9 (ESBL), OXA-48)	-	Herpes Simplex Virus 1 cepa MacIntyre	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> cepa Z022
<i>Enterobacter cloacae</i> ESBL/ positivo a carbapenemasa (TEM-1 (non ESBL), SHV-12 (ESBL), CTX-M-15 (ESBL), NDM-1)	-	Herpes Simplex Virus 2 cepa MS	-	<i>Treponema pallidum</i>
Complejo <i>Enterobacter cloacae</i> positivo a carbapenemasa (NDM-7)	-	Human Papillomavirus tipos 16 y 18	-	<i>Trichomonas vaginalis</i>
<i>Enterobacter cloacae</i> serotipo Cloaca A	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Ureaplasma parvum</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> positivo a carbapenemasa (SHV-1(no-ESBL), KPC-3, OXA-48)	-	<i>Ureaplasma urealyticum</i>

\*ATCC® 51299™: *Enterococcus faecalis* (Andrewes and Horder) Schleifer and Klipper-Balz, strain NJ-3.

### Analytical reactivity

The Vitassay qPCR Macrolide Res- 23S rRNA Mutations kit's reactivity for *M. genitalium* macrolide-sensitive was evaluated against DNA extracted (as template) from:

*Mycoplasma genitalium* Tully et al., strain M30

Simulated clinical samples positive for *Mycoplasma genitalium*



Simulated clinical samples positive for *Mycoplasma genitalium* strain G37

showing positive results.

The Vitassay qPCR Macrolide Res- 23S rRNA Mutations kit's reactivity for *M. genitalium* macrolide-resistant was evaluated against DNA extracted (as template) from:

*Clinical samples*

Simulated clinical samples positive for *Mycoplasma genitalium* strain M6303

Simulated clinical samples positive for *Mycoplasma genitalium* strain G6593

showing positive results.

### **Compatibles real-time PCR equipment**

Vitassay qPCR Macrolide Res- 23S rRNA Mutations has been validated on the following equipment:

- Cobas z480 Analyzer (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) <sup>I</sup>
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTPPrime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- CFX Opus 96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- MIC qPCR Cyclor (Bio Molecular Systems)
- LightCycler 480 Instrument II (Roche)
- NEOS-96 Real Time PCR System (Linear)
- QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
- QuantGene 9600 (BioEr Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen) <sup>II</sup>

<sup>I</sup>: When using the Applied Biosystems 7500 Fast with strips it is recommend placing a plate holder for the tubes (Ref. PN 4388506).

<sup>II</sup>: For Rotor-Gene® Q and MIC qPCR Cyclor the product should be reconstituted following the procedure and transferred into specific tubes of the equipment.

\*If the result in channel FAM is not as expected, there are no amplifications or high background noise is observed, please lower the exposure values indicated above to 150.

## Limitations

- All obtained results must be interpreted by a specialist in conjunction with available clinical information and laboratory findings.
- This assay has been validated with DNA extracted from genital swabs (urethral urine, urethral swabs, endocervical swabs, rectal swabs, and vaginal swabs) positive for *M. genitalium* infection by molecular assays. The use of other samples has not been established.
- The correct test performance depends on the sample's quality; proper DNA from clinical specimens must be extracted.
- This test does not provide quantitative values nor indicate the number of organisms present. This is a qualitative test.
- Extremely low levels of target below the limit of detection might be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination either by Macrolide Res- 23S Control during its reconstitution, by samples containing high concentrations of target DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.
- Detection may be affected by several factors and their combinations which may lead to false negative results, including a) inadequate specimen sampling, shipping, storage, handling; b) procedural errors (including DNA extraction); c) DNA degradation during specimen shipping, storage, and/or preparation; d) pathogen load below the limit of detection for the assay; e) the presence of Real-Time amplification inhibitors or other types of interference (an interference study evaluating the effect of vaccines, antiviral therapeutics, antibiotics, chemotherapeutics or immunosuppressant drugs used to prevent the infection or used during the treatment of the infection was not performed); f) failure to follow the manufacturer's instructions and procedures; g) mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions may affect detection of *M. genitalium* resistant to macrolides and/or *M. genitalium* sensitive to macrolides.
- DNA detection may not indicate the presence of viable and/or infectious bacteria or that *M. genitalium* resistant to macrolides and/or *M. genitalium* sensitive to macrolides is the causative agent for clinical symptoms.
- The negative results do not preclude *M. genitalium* resistant to macrolides and/or *M. genitalium* sensitive to macrolides infection and should not be the sole basis of a patient treatment/management decision. Optimum specimen types for *M. genitalium* resistant to macrolides and/or *M. genitalium* sensitive to macrolides identification and/or stage of infection most suitable for its collection have not been established yet. Consider the collection of multiple specimens from the same patient at different time points, which may increase the probability of detecting the bacteria.

- If the patient clinical data, laboratory tests and epidemiological studies suggest possible *M. genitalium* resistant to macrolides and/or *M. genitalium* sensitive to macrolides infection, and other Sexually Transmitted Diseases (STD) have been discarded, a false negative result might not be discarded, and additional tests should be performed.
- Fluorescence values may vary due to multiple factors such as PCR equipment, extraction system, sample type, and its previous treatment, among others.

## Attached I. Compatibility of the most common real-time PCR equipment

The most common thermocyclers are listed in the following table separated by tube type. If you do not find your thermocycler, please contact with your supplier.

Low profile Block Thermocyclers	High profile Block Thermocyclers
<b>Agilent Technologies</b>	<b>Abbott</b>
AriaMx Real-Time PCR System	Abbott m2000 <sup>(1)</sup>
AriaDx Real-Time PCR System	<b>Applied Biosystems</b>
<b>Applied Biosystems</b>	7300 Real-Time PCR System <sup>(3) (1)</sup>
7500 Fast Real-Time PCR System <sup>(1) (2)</sup>	7500 Real-Time PCR System <sup>(1)</sup>
7500 Fast Dx Real-Time PCR System <sup>(1) (2)</sup>	7900 Real-Time PCR System <sup>(3)</sup>
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7000 <sup>(3)</sup>
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7700 <sup>(3)</sup>
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System <sup>(3)</sup>	QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
StepOne Plus™ Real-Time PCR System <sup>(3)</sup>	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
StepOne™ Real-Time PCR System <sup>(4)</sup>	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System <sup>(3)</sup>
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
<b>Azure Biosystems</b>	<b>Agilent Technologies</b>
Azure Cielo 3 <sup>(5)</sup>	Mx3000P™ Real Time PCR System
Azure Cielo 6	Mx3005P™ Real Time PCR System
<b>BIONEER</b>	<b>Analytik Jena</b>
Exicycler™ 96	qTOWER
<b>Bio-Rad</b>	<b>BIONEER</b>
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	Exicycler™ 96
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System <sup>(5)</sup>	<b>BIOER</b>
<b>Roche</b>	QuantGene 9600
LightCycler®480 Real-Time PCR System <sup>(1) (6)</sup>	<b>Bio-Rad</b>
LightCycler®96 Real-Time PCR System <sup>(1)</sup>	CFX96™ Deep Well Real-Time PCR
Cobas z480 Analyzer <sup>(1) (6)</sup>	iCycler iQ™ Real-Time PCR
	iCycler iQ™5 Real-Time PCR
	My iQ™ Real-Time PCR Detection System <sup>(5)</sup>
	My iQ™ 2 Real-Time PCR Detection System <sup>(5)</sup>
<b>Special Formats <sup>(7)</sup></b>	<b>DNA-Technology</b>
<b>Bio Molecular Systems</b>	DTlite Real-Time PCR System <sup>(8)</sup>
Mic Real Time PCR Cyclor	DTprime Real-time Detection Thermal Cyclor <sup>(8)</sup>
<b>Cepheid</b>	<b>Eppendorf</b>
SmartCycler®	Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
<b>Precision System Science Co., Ltd.</b>	<b>Qiagen</b>
geneLEAD VIII System	QIAquant 96
<b>Qiagen</b>	
Rotor-Gene® Q	

- (1) A special grid is needed to fit these real-time PCR kits.
- (2) Select Ramp Speed "Standard".
- (3) No ROX caption.
- (4) No Cy5 caption.
- (5) Only FAM and HEX caption.
- (6) Specific compensation color is required.
- (7) The product must be reconstituted following the appropriate procedure (see Test procedure) and transferred to the specific tubes for Mic, SmartCycler®, Rotor-Gene® Q or geneLEAD VIII System.
- (8) See Attached III to configure exposure settings.

## Attached II. Detection channels of most common real time PCR equipment

The fluorescence detection channels of some of most common Real Time PCR thermocyclers are specified in the following table:

Thermocycler	Vitassay Channel	Detection Channel	Observations
<b>Bio-Rad CFX96™</b>	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Applied Biosystems ABI 7500</b>	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Roche Lightcycler®480II</b>	FAM	465/510	Colour Compensation required
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
<b>Roche Cobas z 480</b>	FAM	465/510	Colour Compensation required
	HEX	540/580	
	ROX	540/610	
	Cy5	610/670	
<b>Cepheid Smartcycler®</b>	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
<b>Abbott m2000rt</b>	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Agilent Technologies Mx3000P™ Mx 3005P™</b>	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Bio Molecular Systems Mic Real Time PCR Cycler</b>	FAM	Green	In the "Run Profile" menu, introduce the correct parameters for "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) and the thermal profile. In the "Cycling" window, select the "Acquire on" option for all the channels by clicking on them. Use the default "Gain" values for each channel (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10).
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
<b>Agilent Technologies AriaMx</b>	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Qiagen Rotor-Gene® Q</b>	FAM	Green	In the Channel Setup, click on the "Gain Optimisation" button and then go to "Optimise Acquiring". The fluorescence Target Sample Range has to be between 5 and 10 FI for each channel. Also select the option "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
<b>BIONEER Exicycler™ 96</b>	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

### Attached III. Optical measurement exposure setting

The exposure values of some thermocyclers must be adjusted for proper operation. Set exposure values as follows:

Thermocycler	Vitassay channel	Exposure values
<b>DTIite Real-Time PCR System (DNA-Technology)</b>	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
<b>DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)</b>	FAM	500*
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

\*If result in FAM channel is not as expected, there are no amplifications or high background noise is observed, please lower the exposure values indicated above to 150.

## Bibliography/Bibliografía










1. Fernández-Huerta, M., Barberá, M. J., Serra-Pladevall, J., Esperalba, J., Martínez-Gómez, X., Centeno, C., Pich, O. Q., Pumarola, T., & Espasa, M. (2020). *Mycoplasma genitalium* and antimicrobial resistance in Europe: a comprehensive review. *International journal of STD & AIDS*, 31(3), 190–197.
2. Gnanadurai, R., & Fifer, H. (2020). *Mycoplasma genitalium*: A Review. *Microbiology (Reading, England)*, 166(1), 21–29.
3. Heavey E. (2017). *Mycoplasma genitalium*. *Nursing*, 47(7), 61–62.
4. De Carvalho, N. S., Palú, G., & Witkin, S. S. (2020). *Mycoplasma genitalium*, a stealth female reproductive tract. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 39(2), 229–234.



## Trademarks

All trademarks that may appear in this package insert are the property of their respective owners.

## Symbols for IVD components and reagents/ Símbolos utilizados para componentes y reactivos IVD

	Producto para diagnóstico <i>in vitro</i> For in vitro diagnostic use only		Almacenar en lugar seco Keep dry
	Consultar las instrucciones de uso Consult instructions for use		Limitación de temperatura Temperature limitation
	Fecha de caducidad Use by		Fabricante Manufacturer
	Número de lote Lot number		Contiene <n> test Contains sufficient for <n> test
			Número de referencia Catalogue number







**VA** Vitassay

Vitassay Healthcare S.L.U. Parque Tecnológico Walqa  
Ctra. N-330 Km. 566 • 22197 Huesca (Spain)

[www.vitassay.com](http://www.vitassay.com)