



Hybrid Capture[®] 2

GC-ID DNA Test

Gebruiksaanwijzing

digene[®] HC2 GC-ID DNA Test

Een *in-vitro* nucleïnezuur-hybridisatie-microtiterplaattest met signaalversterking, gebruikmakend van microtiterplaat-chemiluminescentie voor de kwalitatieve detectie van DNA van *Neisseria gonorrhoeae* (GC) in cervicale monsters.

Voor gebruik met:

digene[®] HC2 DNA Collection Device
digene[®] Female Swab Specimen Collection Kit
Hologic PreservCyt[®] Solution

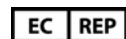
BELANGRIJKSTE VERANDERINGEN TEN OPZICHTE VAN DE VORIGE BIJGEWERKTE BIJSLUITER

1. Bijgewerkte product branding
2. Verwijderde reflex-test referenties en gegevens.

Uitsluitend voor professionele doeleinden. Te gebruiken door opgeleid en bevoegd laboratoriumpersoneel. Lees deze gebruiksaanwijzing zorgvuldig voordat u de test gebruikt.



QIAGEN Gaithersburg, Inc.
1201 Clopper Road
Gaithersburg, MD 20878 USA



QIAGEN GmbH
QIAGEN Str. 1
D-40724 Hilden
Germany

©2011 QIAGEN

IVD



REF 5140-1330



De CE-markering geeft aan dat de *digene* HC2 GC-ID DNA Test voldoet aan de eisen van Richtlijn 98/79/EG betreffende medische hulpmiddelen voor in-vitrodiagnostiek.

L2172NL Rev. 3

INHOUDSOPGAVE

NAAM EN BEOOGD GEBRUIK	1
SAMENVATTING EN UITLEG	1
PRINCIPE VAN DE PROCEDURE	1
BIJGELEVERDE REAGENTIA EN MATERIALEN	2
BENODIGDE, MAAR NIET BIJGELEVERDE MATERIALEN	4
WAARSCHUWINGEN EN VOORZORGSMATREGELEN	6
VEILIGHEIDSMATREGELEN	6
INFORMATIE OVER VEILIGHEIDS- EN GEZONDHEIDSRISICO'S	6
VOORZORGSMATREGELEN BIJ DE VERWERKING	7
BEREIDING EN OPSLAG VAN REAGENTIA	8
AFNAME EN BEHANDELING VAN MONSTERS	11
CERVICALE MONSTERS IN STM.....	11
CERVICALE MONSTERS IN HOLOGIC PRESERVCYT SOLUTION.....	11
TESTPROCEDURE	12
HOOGVOLUME-MONSTERVERWERKINGSTESTS MET BEHULP VAN HET RAPID CAPTURE SYSTEM	12
HANDMATIGE METHODE	12
DENATURATIE.....	13
BEREIDINGSPROCEDURE VAN KALIBRATORS, KWALITEITSCONTROLES EN STM-MONSTERS.....	13
BEREIDINGSPROCEDURE VOOR MONSTERS IN PRESERVCYT SOLUTION.....	15
Facultatief stoppunt.....	18
HYBRIDIZATIE	18
HYBRIDECAPTURE	19
HYBRIDEDETECTIE	20
WASSEN.....	21
Methode met de automatische plaatwasser	21
Methode voor handmatig wassen	21
SIGNAALAMPLIFICATIE	22
VERIFICATIECRITERIA VOOR DE TESTKALIBRATIE	22
GRENSWAARDEBEREKENING	24
KWALITEITSCONTROLE	24
INTERPRETATIE VAN MONSTERRESULTATEN	25
BEPERKINGEN VAN DE PROCEDURE	26
VERWACHTE RESULTATEN	26
PREVALENTIE	26
POSITIEF EN NEGATIEF VOORSPELLENDE WAARDEN	27
FREQUENTIEDISTRIBUTIE: <i>digene</i> HC2 GC-ID DNA TEST RLU/CO-RESULTATEN	27
WERKINGSEIGENSCHAPPEN	28
RESULTATEN VAN KLINISCH ONDERZOEK PER MONSTER.....	28
REPRODUCEERBAARHEID.....	32
NAUWKEURIGHEID.....	33
NAUWKEURIGHEID BIJ PRESERVCYT-MONSTERS	34
ANALYTISCHE GEVOELIGHEID.....	36
AANVULLENDE OPMERKINGEN BIJ PRESERVCYT-MONSTERS.....	37
ANALYTISCHE SPECIFICITEIT	39
HOMOLOGIE VAN PROBES OP TOTALE PLASMIDE EN GENOOM DNA.....	41
EFFECT VAN BLOED EN ANDERE STOFFEN OP STM-MONSTERS.....	41
EFFECT VAN BLOED EN ANDERE STOFFEN OP PRESERVCYT-MONSTERS.....	42
PRECISIE AAN DE ASSAYGRENS VAN DE <i>digene</i> HC2 GC-ID DNA TEST BEPAALD AAN KLINISCHE MONSTERS AFGENOMEN IN STM	42

HISTORISCHE INFORMATIE	43
EQUIVALENTIE TUSSEN MONSTERS IN STM EN PRESERVCYT SOLUTION	44
REFERENTIES	46
PROBLEMEN OPLOSSEN	47
CONTAMINATIECONTROLE	52
QIAGEN CONTACTINFORMATIE	53
SAMENVATTING VAN <i>digene</i> HC2 GC-ID DNA TEST	54

NAAM EN BEOOGD GEBRUIK

De *digene*[®] Hybrid Capture[®] 2 (HC2) GC-ID DNA Test is een *in-vitro*nucleïnezuur-hybridisatie-assay met signaalversterking door middel van microtiterplaat-chemiluminescentie voor de kwalitatieve detectie van DNA van *Neisseria gonorrhoeae* in cervicale monsters genomen met de *digene* HC2 DNA Collection Device (bestaande uit een cervicale borstel en *digene* Specimen Transport Medium (STM)) en in cervicale monsters genomen met de *digene* Female Swab Specimen Collection Kit (swab en STM) of monsters genomen met behulp van een spatelvormig hulpmiddel en in Hologic PreservCyt[®] Solution opgenomen. De *digene* HC2 GC-ID DNA Test is geïndiceerd voor het identificeren van symptomatische of asymptomatische vrouwen met infectie met *Neisseria gonorrhoeae*.

Voor hoogvolume-monsterverwerkingstests kan de *digene* HC2 GC-ID DNA Test worden uitgevoerd met behulp van de Rapid Capture[®] System (RCS) instrumentapplicatie.

Voor *in-vitro*diagnostiek

IVD

SAMENVATTING EN UITLEG

Neisseria gonorrhoeae zijn niet-mobiele, Gram-negatieve diplokokken met tamelijk complexe groeivereisten. Zij zijn aëroob, vertonen een optimale groei bij temperaturen binnen het bereik van 35-37 °C in aanwezigheid van 3-7% CO₂ en ≥ 70% relatieve vochtigheid. Presumptieve diagnose van *Neisseria gonorrhoeae* wordt traditioneel verkregen door het isoleren van organismen uit culturen van klinische monsters en het gebruik van Gram-kleuring voor morfologisch onderzoek. Definitieve diagnoses kunnen worden verkregen met een positieve oxidase- en/of catalasetest van de kweek. Extra bevestiging van resultaten omvat koolhydraatafbraak-, agglutinatie- en suikerfermentatietests. Definitievere, directe tests voor *Neisseria gonorrhoeae* betreffen antigeendetectie- en nucleïnezuur-probe tests. Een enzym-gebonden immunosorbentassay heeft aangetoond even gevoelig en even specifiek te zijn als de Gram-kleuring voor het detecteren van gonokokken in mannelijke uretrale en ochtend-urinemonsters, maar het heeft een verminderde gevoeligheid bij toepassing op endocervicale monsters.^{1,2} Daar de antigeendetectietest kruisreactie kan geven met commensale *Neisseria* en gerelateerde species³, kan deze test alleen worden gebruikt voor presumptieve diagnose.³

Recentelijker zijn nucleïnezuur-hybridisatietests gebruikt voor het evalueren van klinische monsters voor de detectie van *Neisseria gonorrhoeae* in hoogrisico-populaties waarbij zowel endocervicale als mannelijke ureterale monsters werden gebruikt.

PRINCIPE VAN DE PROCEDURE

De *digene* HC2 GC-ID DNA Test, met gebruikmaking van *digene* Hybrid Capture 2-technologie, is een nucleïnezuur-hybridisatie-assay met signaalversterking, waarbij detectie plaatsvindt met behulp van microtiterplaat- chemiluminescentie. Monsters die het target-DNA bevatten, hybridiseren met een specifieke GC RNA-probe. De resulterende RNA:DNA-hybriden worden gevangen op het oppervlak van een microtiterplaatwell gecoat met antilichamen specifiek voor RNA:DNA-hybriden. De geïmmobiliseerde hybriden worden vervolgens blootgesteld aan specifiek voor RNA:DNA-hybriden alkalische fosfatase geconjugeerde antilichamen en gedetecteerd met een chemiluminescent substraat. Verscheidene alkalische fosfatase-moleculen worden geconjugeerd aan elk antilichaam. Meerdere geconjugeerde antilichamen binden aan elk gevangen hybride, wat resulteert in een aanmerkelijke signaalversterking. Wanneer het substraat door de gebonden alkalische fosfatase is gesplitst wordt er licht uitgezonden, dat gemeten wordt als relatieve lichteenheden (RLU's) met behulp van een luminometer. De intensiteit van het uitgezonden licht duidt op de aanwezigheid of het ontbreken van target-DNA in het monster.

Een RLU-meting gelijk aan of groter dan een specifieke verhouding ten opzichte van de positieve grenswaarde wijst op de aanwezigheid van DNA van GC in het monster. Een RLU-meting kleiner dan de specifieke verhouding ten opzichte van de positieve grenswaarde wijst op het ontbreken van het specifiek geteste DNA van GC of GC DNA-spiegels die onder de detectiegrens van de test vallen.

De GC probe bevat een specifiek gekozen probemengsel waarmee kruisreactiviteit met DNA-sequenties van humane cellen, andere bacteriële species of *Neisseria*-species met uitzondering van *Neisseria gonorrhoeae* wordt geëlimineerd of geminimaliseerd. De GC probe die bij de *digene* HC2 GC-ID DNA Test is geleverd, is complementair aan ongeveer 9.700 bp of 0,5% van het genoom-DNA van *Neisseria gonorrhoeae* ($1,9 \times 10^6$ bp).⁴ Eén probe is complementair aan 100% van de cryptoplasmide van 4200 bp.

Hoogvolume-monsterverwerkingstests met de *digene* HC2 GC-ID DNA Test kunnen worden uitgevoerd gebruikmakend van een geautomatiseerd pipetterings- en verdunningssysteem dat het Rapid Capture System (RCS) wordt genoemd. Dit instrument dat een toepassing gebruikt die specifiek is voor de *digene* HC2 GC-ID DNA Test, verwerkt tot 352 monsters in acht uur. Om hoogvolume-monsterverwerkingstests mogelijk te maken worden alle procedurele stappen van de assay uitgevoerd door het RCS, met uitzondering van monsterdenaturatie, chemiluminescente signaaldetectie, en resultaatrapportage.

BIJGELEVERDE REAGENTIA EN MATERIALEN

Er zitten 96 tests in één *digene* HC2 GC-ID DNA Test-kit (REF 5140-1330). Het aantal patiëntenresultaten zal verschillen, afhankelijk van het aantal keren dat een kit wordt gebruikt:

- 1 maal gebruikt = 88 patiëntenresultaten
- 2 maal gebruikt = 80 patiëntenresultaten
- 3 maal gebruikt = 72 patiëntenresultaten
- 4 maal gebruikt = 64 patiëntenresultaten

Indicatorkleurstof INDIC Bevat 0,05% g/v natriumazide.	1 x 0,35 ml
Denaturatiereagens* REAG DENAT Verdunde oplossing van natriumhydroxide (NaOH).	1 x 50 ml
Probe-verdunningsmiddel* DIL PROBE Gebufferde oplossing met 0,05% g/v natriumazide.	1 x 5 ml
GC-probe PROBE GC GC RNA-probe in gebufferde oplossing.	1 x 200 µl
Negatieve kalibrator CAL - Carrier-DNA in Monster Transport Medium (STM) met 0,05% g/v natriumazide.	1 x 2 ml
GC positieve kalibrator (PC) CAL GC + 1,0 pg/ml gekloond GC DNA en carrier-DNA in STM met 0,05% g/v natriumazide.	1 x 1 ml
Kwaliteitscontrole CT (QC CT) QC CT 5,0 pg/ml gekloond CT DNA en carrier-DNA in STM met 0,05% g/v natriumazide.	1 x 1 ml
Kwaliteitscontrole GC (QC GC) QC GC 5,0 pg/ml gekloond GC DNA en carrier-DNA in STM met 0,05% g/v natriumazide.	1 x 1 ml
Capture microtiter PLATE CAPTURE Gecoat met geiten- polykloonaal anti-RNA:DNA hybrideantilichamen.	1 elk
Detectiereagens 1 REAG DET 1 Alkalische fosfatase-geconjugeerde antilichamen tegen RNA:DNA hybriden in gebufferde oplossing met 0,05% g/v natriumazide.	1 x 12 ml
Detectiereagens 2 REAG DET 2 CDP-Star [®] met Emerald II (chemiluminescent substraat).	1 x 12 ml
Wasbufferconcentraat* BUF WASH X 30 Bevat 1,5% g/v natriumazide.	1 x 100 ml

*Zie rubriek *Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen* van deze bijsluiter voor informatie m.b.t. gezondheid en veiligheid

BENODIGDE, MAAR NIET BIJGELEVERDE MATERIALEN

In-vitro diagnostische apparatuur en accessoires voor Hybrid Capture System^A

digene Hybrid Capture 2 systeem ("digene HC2 systeem"), samengesteld uit een door QIAGEN goedgekeurde luminometer ("luminometer"), door QIAGEN goedgekeurde persoonlijke computer en computer-randapparatuur (monitor, klavier, muis, printer en printerkabel), *digene* HC2 systeemsoftware ("digene assay analys software"), *digene* HC2 systeem assay protocollen voor CT/GC, LumiCheck Plate software, en *digene* HC2 systeemsoftware gebruikershandleiding

Hybrid Capture System Rotary Shaker I (Hybrid Capture System roterend schudapparaat I)

Hybrid Capture System Microplate Heater I (Hybrid Capture System microtiterplaatverwarmer I)

Hybrid Capture System Automated Plate Washer (Hybrid Capture System automatische plaatwasser)

Hybrid Capture System Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2 (optioneel)^B

Conversierek en rekdeksel (optioneel voor handmatig gebruik: vereist bij gebruik van het Rapid Capture systeem met de *digene* HC2 GC-ID DNA test en PreservCyt monsters)

digene monsterrek en rekdeksel (optioneel voor handmatig gebruik (vereist bij gebruik van het Rapid Capture systeem met de *digene* HC2 GC-ID DNA test en *digene* HC2 monsters afgenomen met het *digene* HC2 DNA Collection Device)

EXPAND-4 Pipettor en standaard (optioneel)^C

digene HC2 DNA Collection Device^D

digene Female Swab Specimen Collection Kit (bestaat uit 2 swabs en *digene* Specimen Transport Medium)^D

Tube Sealer dispenser en snij-apparaat (optioneel, wordt gebruikt bij de MST Vortexer 2)

Rapid Capture[®] System (optioneel voor hoogvolume-monsterverwerkingstests)^E

Wasapparaat

Hybridisatie-microtiterplaten

Deksels voor microtiterplaten

Lege microtiterplaatstrips (verkrijgbaar bij Costar, Model #2581); optioneel voor gebruik met de automatische plaatwasser I

Extra lange pipetpunten voor het verwijderen van monsters

Monsterafnamebuizen

Rek voor monsterafnamebuizen

Schroefdoppen voor monsterafnamebuizen

Wegwerpreservoirs voor reagentia

DuraSeal[®] Tube Sealer-afdekkfolie

Algemene laboratoriumapparatuur en accessoires

65 ± 2 °C waterbad dat groot genoeg is voor 1 conversierek (36 x 21 x 9 cm) of twee *digene* monsterrekken (elk 31,7 x 15,2 x 6,4 cm)

Microcentrifuge (optioneel voor het centrifugeren van probe buizen om een maximaal probe volume te verkrijgen)

Vortex Mixer met cupbevestiging

Enkelkanaalsmicropipet; variabele instellingen voor volumes van 20-200 µl en 200-1000 µl

Repeterende positieve verplaatsingspipet, zoals de Eppendorf Repeater[®] Pipette of gelijkwaardig

8-kanaalspipet: variabele instellingen voor volumes van 25-200 µl

Timer

Natriumhypochlorietoplossing, 0,5% finale concentratie (van huishoudchlor)

Parafilm[®] of gelijkwaardig

Wegwerp aerosol-beschermingspipetpunten voor enkelkanaalspipet (20 tot 200 µl en 200-1000 µl)

Wegwerptips voor Eppendorf Repeater[®] Pipette (25 en 500 µl)

Wegwerptips voor 8-kanaalspipet (25 tot 200 µl)

Kimtowels[®] tissues of gelijkwaardig pluisarm keukenpapier

Wegwerptafelfiltreerpapier

Poedervrije handschoenen

5 ml en/of 15 ml polypropyleenbuisjes met ronde bodem en snap-cap (voor probe-verdunning)

2,0 ml polypropyleen microcentrifugebuizen met dop

Aanvullende apparatuur en accessoires voor de verwerking van monsters in PreservCyt Solution

Centrifuge met uitzwaairotor met een capaciteit van 2900 ± 150 x g, waarin conische polypropyleen centrifugebuizen van 10 ml of 15 ml passen

Serologische pipetten of transferpipetten van 5 ml

digene HC2 Sample Conversion Kit^A

Wegwerptips voor Eppendorf Repeater[®] Pipette (50 en 100 µl)

Handmatige vortexprocedure:

digene HC2 Sample Conversion Tubes (15 ml conisch)^F, conische buizen met dop van het merk Sarstedt[®] van 10 ml of centrifugebuizen van 15 ml van het merk VWR[®] of Corning[®] van polypropyleen met conische bodem en dop
Buisrek voor conische buizen van 10 ml of 15 ml

Voor Multi-Specimen Tube Vortexer 2 Procedure

digene HC2 Sample Conversion Tubes (15 ml conisch)^F

Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2

Conversierek en -deksel (speciaal voor conische buizen van 15 ml)

Tube Sealer dispenser en snij-apparaat

DuraSeal[®] Tube Sealer afdekkfolie (wordt gebruikt bij de MST Vortexer 2)

^A Bij QIAGEN zijn alleen apparatuur en accessoires gevalideerd met *digene* HC2 CT/GC DNA Tests verkrijgbaar.

^B Ook noodzakelijk voor gebruik bij uitvoeren van de semi-automatische RCS-toepassing.

- ^C Custom-made artikel. Andere custom-made expandeerbare meerkanaalspipetten kunnen worden gebruikt mits er in geëxpandeerde stand een tussenruimte van 3,2 cm tussen de punten mogelijk is. Als alternatief kan een enkelkanaalspipet worden gebruikt die geschikt is voor het pipetteren van 75 µl.
- ^D De werkingseigenschappen van de *digene* HC2 GC-ID DNA Test zijn alleen bepaald met de twee vermelde afnamekits.
- ^E Raadpleeg de *gebruikshandleiding van het Rapid Capture System* voor instructies die specifiek bedoeld zijn voor gebruik van dit systeem bij hoogvolume-monsterverwerkingstests met deze test.
- ^F De *digene* HC2 Sample Conversion Tubes (merk VWR of Corning®) zijn verkrijgbaar bij QIAGEN en moeten worden gebruikt voor een juiste uitvoering van de assays als de Multi-Specimen Tube Vortexer 2 procedure wordt toegepast.

WAARSCHUWINGEN EN VOORZORGSMAATREGELEN

LEES DE GEHELE GEBRUIKSAANWIJZING NAUWKEURIG VOORDAT U DE TEST GAAT VERRICHTEN.

VEILIGHEIDSMATREGELEN

ALLE MONSTERS dienen als potentieel besmettelijk te worden beschouwd. Er bestaat geen enkele testmethode die volledige garantie kan bieden dat een monster geen infectie kan overbrengen. Het verdient aanbeveling om monsters van menselijke oorsprong te behandelen overeenkomstig de toepasselijke nationale/plaatselijke werkpraktijk betreffende de bioveiligheid.^{5,6,7,8} Pas deze werkwijze met het oog op bioveiligheid toe bij materialen die besmettelijke stoffen bevatten of waarvan vermoed wordt dat zij die bevatten. Deze voorzorgsmaatregelen omvatten, maar zijn niet beperkt tot, de volgende punten:

1. Niet met de mond pipetteren.
2. Rook, eet of drink niet in ruimten waar reagentia of monsters worden gehanteerd.
3. Draag poedervrije wegwerphandschoenen bij het hanteren van reagentia of monsters. Was uw handen grondig na het verrichten van de test.
4. Reinig en desinfecteer alle gemorste hoeveelheden met behulp van een tuberculocide desinfectans zoals 0,5% v/v natriumhypochloriet of een ander geschikt desinfectans.^{9,10}
5. Ontsmet alle monsters, reagentia en andere potentieel verontreinigde materialen en voer ze af volgens nationale en plaatselijke voorschriften.^{11,12}

Sommige reagentia bevatten natriumazide. Van natriumazide is gerapporteerd dat het lood- of koperazide vormt in laboratoriumleidingen. Deze azides kunnen exploderen na stoten, bv. hameren. Om de vorming van lood- of koperazide te voorkomen, moeten de afvoerbuizen grondig met water worden gespoeld na het verwijderen van natriumazide bevattende oplossingen. Om verontreinigingen te verwijderen uit oude afvoerbuizen waarin een azide-ophoping wordt vermoed, adviseert de Amerikaanse National Institute for Occupational Safety and Health het volgende: (1) vloeistof uit de opvanginrichting hevelen met behulp van een rubberen of plastic slang, (2) vullen met 10% v/v natriumhydroxide-oplossing, (3) 16 uur laten inwerken en (4) grondig naspoelen met water.

INFORMATIE OVER VEILIGHEIDS- EN GEZONDHEIDSRISICO'S

De hieronder vermelde materialen zijn beoordeeld conform de eisen van EG Richtlijnen 2001/59/EG en 99/45/EG .



T

Wasbufferconcentraat. Bevat natriumazide: Giftig (Toxic - T)

R25: Giftig bij opname door de mond.

R52/53: Schadelijk voor in het water levende organismen; kan in het aquatisch milieu op lange termijn schadelijke effecten veroorzaken.

S36/37/39: Draag geschikte beschermende kleding, handschoenen en een beschermingsmiddel voor de ogen / voor het gezicht.

S45: In geval van ongeval of indien men zich onwel voelt, onmiddellijk een arts raadplegen (indien mogelijk dit etiket tonen).



C

Denaturatiereagens. Bevat natriumhydroxide: Bijtend (Corrosive - C)

R35: Veroorzaakt ernstige brandwonden.

S26: Bij aanraking met de ogen onmiddellijk met overvloedig water afspoelen en deskundig medisch advies inwinnen.

S36/37/39: Draag geschikte beschermende kleding, handschoenen en een beschermingsmiddel voor de ogen / voor het gezicht.

S45: In geval van ongeval of indien men zich onwel voelt, onmiddellijk een arts raadplegen (indien mogelijk dit etiket tonen).



Probe-verdunningsmiddel. Bevat BES en azijnzuur: Irriterend (Xi)

R36/38: Irriterend voor de ogen en de huid.

S26: Bij aanraking met de ogen onmiddellijk met overvloedig water afspoelen en deskundig medisch advies inwinnen.

S36/37/39: Draag geschikte beschermende kleding, handschoenen en een beschermingsmiddel voor de ogen / voor het gezicht.

24-UUR INFORMATIE VOOR NOODGEVALLEN


MEDISCHE INFORMATIE VOOR NOODGEVALLEN IN HET ENGELS, FRANS EN DUIJS KAN 24 UUR PER DAG WORDEN VERKREGEN BIJ:

ANTIGIFCENTRUM MAINZ, DUISLAND

TEL: +49-6131-19240


Raadpleeg de *gebruikshandleiding van het Rapid Capture System* voor aanvullende waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen specifiek voor het gebruik van dat systeem voor hoogvolume-monsterverwerkingstests bij deze assay.

VOORZORGSMATREGELEN BIJ DE VERWERKING

1. Alleen voor *in-vitro*diagnostiek
2. Cervicale borstel uitsluitend voor gebruik bij niet-zwangere vrouwen.
3. De reagentia mogen niet worden gebruikt na de op het etiket van de buitenverpakking naast het symbool  vermelde houdbaarheidsdatum.
4. Het verrichten van de test buiten de vastgestelde tijd- en temperatuurbereiken kan ongeldige resultaten opleveren. Assays die niet binnen de vastgestelde tijd- en temperatuurbereiken vallen zijn ongeldig en moeten worden herhaald.
5. Om betrouwbare testresultaten te verkrijgen moeten de *digene* HC2 GC-ID DNA Test-procedure, verificatiecriteria voor de testkalibratie, kwaliteitscontrole en de interpretatie van de testresultaten nauwgezet worden gevolgd.
6. Het is belangrijk om exact het aangegeven volume reagens te pipetteren en na toevoeging van elk reagens goed te mengen. Het nalaten hiervan zou kunnen leiden tot onjuiste testresultaten. Door te controleren of de gemelde kleurveranderingen optreden, kan men bevestigen dat aan deze voorwaarden is voldaan.
7. Deze componenten zijn als eenheid getest. **De onderdelen mogen niet worden** verwisseld met die van andere bronnen of van andere partijen.
8. Nucleïnezuren zijn zeer gevoelig voor nuclease-afbraak in het milieu. Nucleases komen voor op de menselijke huid en op oppervlakken of materialen die door mensen zijn aangeraakt. Reinig werkoppervlakken en dek ze af met wegwerptafelfiltreerpapier **en draag bij het verrichten van alle assaystappen poedervrije handschoenen.**
9. Voorzichtigheid is geboden om contaminatie van de gecoate microtiterplaat en detectiereagens 2 met exogene alkalische fosfatase te voorkomen tijdens het uitvoeren van de test. Stoffen die alkalische fosfatase kunnen bevatten zijn o.a. detectiereagens 1, bacteriën, speeksel, haar en huidoliën. **Het afdekken van de gecoate microtiterplaat is vooral belangrijk na de wasfase en tijdens de incubatie met detectiereagens 2, aangezien exogene alkalische fosfatase kan reageren met detectiereagens 2 hetgeen fout-positieve resultaten kan opleveren.**
10. Bescherm detectiereagens 2 tegen langdurige blootstelling aan direct licht. Gebruik het reagens onmiddellijk na de aliquotverdeling en vermijd direct zonlicht.

11. De herhalingspipet moet vóór het toedienen van reagens worden gevuld en periodiek op grote luchtbellen worden gecontroleerd. Excessieve hoeveelheden grote luchtbellen in de punt van de herhalingspipet kunnen onnauwkeurige afgifte veroorzaken, wat kan worden vermeden door de pipet te vullen, alle vloeistof uit te pipetteren en opnieuw te vullen. Raadpleeg de gebruikshandleidingen voor de pipet voor specifieke richtlijnen voor gebruik.
12. Pipetteren met de meerkanaalspipet moet geschieden met de “reverse” pipetteertechniek (zie *Hybridedetectie*) voor het doseren van detectiereagens 1 en 2. Controleer of alle pipetpunten van de meerkanaalspipet goed zitten en goed gevuld zijn.
13. Zorg dat alle microwells grondig gespoeld worden volgens de aanbevelingen in de instructies voor het wassen met de hand. Een ontoereikende spoeling zal leiden tot een verhoogde achtergrond en kan fout-positieve resultaten opleveren. Restanten van wasbuffer in de wells kunnen leiden tot een verminderd signaal of een slechte reproduceerbaarheid.
14. Wacht ten minste 60 minuten totdat Microplate Heater I vanuit een koude start op een temperatuur is gekomen van $65\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Als deze opwarmperiode wordt overgeslagen zou de hybridisatie-microtiterplaat kunnen smelten. Zie de gebruikshandleiding van Microplate Heater I voor bijzonderheden.

BEREIDING EN OPSLAG VAN REAGENTIA

1. Na ontvangst moet de kit bij $2\text{-}8\text{ °C}$ worden bewaard. Het wasbufferconcentraat, het denaturatiereagens en de indicatorkleurstof kunnen desgewenst worden bewaard bij $2\text{-}30\text{ °C}$.
2. Niet gebruiken na de op het etiket van de buitenverpakking naast het symbool  vermelde houdbaarheidsdatum van de bereide reagentia (zie hierna).
3. Alle geleverde reagentia zijn gereed voor gebruik, behalve het denaturatiereagens, de GC Probe Mix en de wasbuffer.

Zie de gebruikshandleiding van het *Rapid Capture System* voor het bereiden van de GC Probe Mix, de wasbuffer, detectiereagens 1 en detectiereagens 2 daar deze instructies specifiek zijn voor het gebruik van dat systeem voor hoogvolume-monsterverwerkingstests.

Methode voor het bereiden van reagens

<p>Denaturatiereagens</p>	<p>EERST BEREIDEN: Voeg 5 druppels indicatorkleurstof toe aan het flesje denaturatiereagens en meng grondig. Het denaturatiereagens moet een uniforme, donkerpaarse kleur hebben.</p> <p>Na het bereiden blijft het denaturatiereagens gedurende drie maanden stabiel als het wordt bewaard bij een temperatuur van 2-8 °C. Label het met de nieuwe houdbaarheidsdatum. Als de kleur verbleekt, 5 druppels indicatorvloeistof toevoegen en grondig mengen vóór gebruik.</p> <p>Waarschuwing: Het denaturatiereagens is bijtend. Draag geschikte beschermende kleding, handschoenen, oog-/gezichtsbescherming. Wees voorzichtig bij hantering.</p>																		
<p>GC Probe Mix (bereid uit GC Probe en Probe-verdunningsmiddel reagentia)</p>	<p>BEREIDEN TIJDENS DE INCUBATIE VAN DE MONSTERDENATURATIE:</p> <p>BELANGRIJK: SOMS KAN DE PROBE ZICH IN HET DEKSEL BEVINDEN.</p> <p>N.B.: Deze stap vereist grote voorzichtigheid om contaminatie van de probe en de Probe Mix met RNase te voorkomen. Gebruik aerosol-beschermende pipetpunten om de probe te pipetteren. Het probe-verdunningsmiddel is stroperig. Zorg voor een grondige menging bij het bereiden van de GC Probe Mix. Tijdens de mengstap moet er in de vloeistof een zichtbare vortex ontstaan. Een onvolledige menging kan leiden tot een verminderd signaal.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Centrifugeer de buis van de GC Probe kort om de vloeistof onderin de buis te krijgen. Tik voorzichtig tegen de buis om te mengen. • Bepaal de benodigde hoeveelheid Probe Mix (25 µl/test). Geadviseerd wordt om extra Probe Mix te maken ter compensatie van het volume dat eventueel verloren gaat in de pipetpunten of aan de zijkanten van de buis. Raadpleeg de hieronder vermelde aanbevolen hoeveelheden. Het kleinste aantal wells dat per gebruik wordt aanbevolen is 24. Indien minder dan 24 wells per assay gewenst zijn, kan het totaal aantal tests per kit zijn verminderd in verband met de beperkte hoeveelheden probe en probe-verdunningsmiddel. • Breng de benodigde hoeveelheid probe-verdunningsmiddel over naar een nieuwe wegwerpcontainer. Afhankelijk van het aantal tests wordt een polypropyleen buisje met ronde bodem en snap-cap van 5 ml of van 15 ml aanbevolen. Maak een 1:25 verdunning van GC probe in probe-verdunningsmiddel om de Probe Mix te bereiden. <table border="1" data-bbox="548 1102 1274 1304"> <thead> <tr> <th><u>Aantal tests/strips</u></th> <th><u>Volume probe-verdunningsmiddel*</u></th> <th><u>Volume probe*</u></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>96/12</td> <td>4,0 ml</td> <td>160,0 µl</td> </tr> <tr> <td>72/9</td> <td>3,0 ml</td> <td>120,0 µl</td> </tr> <tr> <td>48/6</td> <td>2,0 ml</td> <td>80,0 µl</td> </tr> <tr> <td>24/3</td> <td>1,0 ml</td> <td>40,0 µl</td> </tr> <tr> <td>Per well</td> <td>0,045 ml</td> <td>1,8 µl</td> </tr> </tbody> </table> <p>*Deze waarden zijn inclusief het aanbevolen extra volume.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pipetteer de probe in probe-verdunningsmiddel door de pipetpunt tegen de binnenwand van de buis vlak boven de meniscus te plaatsen. De punt mag niet in het probe-verdunningsmiddel worden ondergedompeld. • Vortex gedurende tenminste 5 seconden bij maximum snelheid om grondig te mengen. Er moet een zichtbare vortex ontstaan. Label als GC Probe Mix en bewaar in een gesloten container tot het klaar is voor gebruik. Ongebruikte hoeveelheden Probe Mix moeten worden weggegooid. 	<u>Aantal tests/strips</u>	<u>Volume probe-verdunningsmiddel*</u>	<u>Volume probe*</u>	96/12	4,0 ml	160,0 µl	72/9	3,0 ml	120,0 µl	48/6	2,0 ml	80,0 µl	24/3	1,0 ml	40,0 µl	Per well	0,045 ml	1,8 µl
<u>Aantal tests/strips</u>	<u>Volume probe-verdunningsmiddel*</u>	<u>Volume probe*</u>																	
96/12	4,0 ml	160,0 µl																	
72/9	3,0 ml	120,0 µl																	
48/6	2,0 ml	80,0 µl																	
24/3	1,0 ml	40,0 µl																	
Per well	0,045 ml	1,8 µl																	
<p>Wasbuffer</p>	<p>BEREIDEN TIJDENS DE CAPTURE-STAP: Voor de automatische plaatwasser kan de wasbuffer volgens de onderstaande beschrijving worden bereid en in een schone, gesloten container worden bewaard of er kan telkens 1 liter tegelijk worden bereid en in de reservoirs van automatische plaatwasser worden geplaatst. Zie de onderstaande tabel voor de mengvolumes.</p>																		

Zie de gebruikshandleiding van de automatische plaatwasser voor aanvullende verzorgings- en onderhoudsinstructies.

Waarschuwing: Wasbufferconcentraat is giftig bij inname. Draag geschikte beschermende kleding, handschoenen, oog-/gezichtsbescherming. Om blootstelling tot een minimum te beperken water toevoegen aan wasbufferconcentraat tijdens het bereiden.

Hoeveelheid wasbufferconcentraat	Hoeveelheid gedestilleerd of gedeïoniseerd water	Uiteindelijk volume Wasbuffer
33,3 ml	966,7 ml	1 L
66,6 ml	1.933,4 ml	2 L
100,0 ml	2.900,0 ml	3 L

N.B.: Het is bijzonder belangrijk dat de stroom naar de automatische plaatwasser altijd ingeschakeld blijft. Hierdoor kan de onderhoudsspoeling plaatsvinden nadat het apparaat acht uur niet is gebruikt.

Vóór elke assay moet worden gecontroleerd of het afvalreservoir van de automatische plaatwasser leeg is en het spoelreservoir gevuld is met gedestilleerd of gedeïoniseerd water.

Zie de gebruikshandleiding van de automatische plaatwasser voor aanvullende verzorgings- en onderhoudsinstructies.

Voor het handmatig wassen met de plaatwasser:

- Meng het wasbufferconcentraat goed.
- Verdun 100 ml wasbufferconcentraat met 2,9 L gedestilleerd of gedeïoniseerd water en meng goed (uiteindelijk volume moet 3 L zijn).
- Sluit de container af om verontreiniging of verdamping te voorkomen.

Na het bereiden blijft de wasbuffer gedurende drie maanden stabiel bij 2-30 °C. Label het met de nieuwe houdbaarheidsdatum. Indien de wasbuffer gekoeld is bewaard, moet deze vóór gebruik tot 20-25 °C worden verwarmd.

Geadviseerd wordt om het wasapparaat en de leidingen eenmaal per drie maanden met 0,5% natriumhypochloriet oplossing te reinigen en grondig te spoelen met gedestilleerd of gedeïoniseerd water ter voorkoming van mogelijke contaminatie door alkalische fosfatase die aanwezig is in bacteriën en schimmels.

Volumes voor gebruiksklare reagentia

**Detectiereagens
1 en
detectiereagens
2**

VLAK VÓÓR GEBRUIK:

Meng het reagens grondig en meet daarna zorgvuldig het gewenste volume detectiereagens 1 of detectiereagens 2 af in een schoon reagensreservoir volgens de onderstaande richtlijnen. Ter voorkoming van contaminatie mogen deze reagentia **NIET** in de originele flessen worden teruggegoten: **Ongebruikt materiaal moet na afloop als afval worden verwijderd.** Indien er geen 8-kanaalspipet wordt gebruikt mag er in plaats daarvan een geschikte repeterende pipet worden gebruikt. In dit geval moeten er aliquots van het reagens worden gemaakt in een polypropyleenbuisje van een geschikt formaat voor het vereiste volume zoals hieronder is aangegeven.

Aantal <u>tests/strips</u>	Volume detectiereagens <u>1 of 2</u>
96/12	inhoud flesje
72/9	7,0 ml
48/6	5,0 ml
24/3	3,0 ml
1 test	0,125 ml

AFNAME EN BEHANDELING VAN MONSTERS

Cervicale monsters die zijn afgenomen en getransporteerd met de *digene* HC2 DNA Collection Device (bestaande uit een cervicale borstel en *digene* Specimen Transport Medium) en de HC Female Swab Specimen Collection Kit (swab en *digene* Specimen Transport Medium) of monsters genomen met behulp van een spatelvormig hulpmiddel en in Hologic PreservCyt Solution opgenomen, zijn de enige monsters die worden aanbevolen voor gebruik met de *digene* HC2 GC-ID DNA Test. Monsters die zijn afgenomen met andere afnamehulpmiddelen of die vervoerd zijn in andere transportmedia komen niet in aanmerking voor gebruik van deze test. De werkingseigenschappen van deze kit werden alleen bepaald met de aangegeven afnamekits. Cervicale monsters moeten worden afgenomen voordat er azijnzuur of jodium wordt gebruikt indien er een colposcopisch onderzoek verricht moet worden. Raadpleeg de gebruikshandleiding van het *digene* HC2 DNA Collection Device voor overige procedures voor monsterafname en -verwerking.

CERVICALE MONSTERS IN STM

STM-monsters kunnen maximaal twee weken bij kamertemperatuur worden bewaard en zonder koeling naar het onderzoekslaboratorium worden verzonden. De monsters moeten in een geïsoleerde container per nacht- of 2-daagse zending worden verzonden. In het onderzoekslaboratorium moeten de monsters bij 2-8 °C worden bewaard indien de test binnen een week wordt verricht. Indien de test later dan 1 week wordt verricht kunnen de monsters maximaal 3 maanden bij -20 °C worden bewaard. Aan het *digene* Specimen Transport Medium is een conserveringsmiddel toegevoegd om de bacteriële groei te vertragen en de integriteit van DNA te behouden. Dit is **niet bedoeld** voor het in stand houden van de levensvatbaarheid van organismen of cellen. In *digene* Specimen Transport Medium afgenomen monsters kunnen niet worden gebruikt voor kweek- of andere testmethoden.

De stabiliteit van STM-monsters gedurende 2 weken bij kamertemperatuur en een extra week bij 2-8 °C is gebaseerd op interne tests met 90 gesimuleerde klinische monsters. Bij deze 90 monsters zaten er 40 die lage concentraties van GC organismen bevatten [op of bij de detectielimiet (LOD van de assay)], 35 die matig positief waren (ongeveer 2-5 keer de LOD), en 5 hoog-positieve monsters die de LOD 10 keer overschreden. De resterende 10 monsters waren negatief voor GC, waarvan er 5 echter een hoog niveau aan *Chlamydia trachomatis* (CT) bevatten. Prestatieramingen voor de test zijn gebaseerd op monsters die worden bewaard bij 2-8 °C of ingevroren en getest zijn binnen 1-2 weken na afname.

Opmerkingen:

1. Een niet-gedenatureerde hoeveelheid van elk van de 90 monsters werd onderworpen aan extreme temperaturen waarmee getracht werd transportomstandigheden te simuleren (opslag bij -20 °C gedurende 3 dagen, dan bij 50 °C gedurende 5 dagen en nog eens 2 weken bij kamertemperatuur). Hoewel na 8 dagen onder deze omstandigheden signaalverlies (RLU/CO) werd waargenomen, werd de kwalitatieve interpretatie van de resultaten hierdoor niet beïnvloed. Na de extra incubatieperiode van twee weken bij kamertemperatuur werden kwalitatieve verschillen waargenomen in de monsters met lage gehalten aan organismen.
2. Om te voorkomen dat doppen van monsters die worden verzonden of ingevroren losraken:
 - Dek de doppen af met Parafilm® voordat van tevoren ingevroren monsters worden vervoerd. Monsters kunnen worden ingevroren of bij een temperatuur van 20-25 °C worden vervoerd.
 - Bij het verwijderen van monsters uit de vriezer voor de test moeten de doppen onmiddellijk worden vervangen door schroefdoppen voor monsterafnamebuizen.
3. Het *digene* HC2 DNA Collection Device mag niet bij zwangere vrouwen worden gebruikt. Neem monsters bij zwangere vrouwen alleen af met behulp van *digene* Female Swab Specimen Collection Kit.

CERVICALE MONSTERS IN HOLOGIC PRESERVCYT SOLUTION

Monsters genomen met behulp van een spatelvormig hulpmiddel en in Hologic PreservCyt Solution opgenomen voor het maken van Hologic ThinPrep Pap Test objectglasjes, kunnen worden gebruikt voor

de *digene* HC2 GC-ID DNA Test. Monsters moeten op de standaardmanier worden afgenomen en de ThinPrep Pap Test objectglaasjes moeten overeenkomstig de instructies van Hologic worden geprepareerd.

Monsters in PreservCyt Solution blijven bij kamertemperatuur (20-25 °C) tot een maand ná afname en vóór verwerking in de *digene* HC2 GC-ID DNA Test goed. Monsters in PreservCyt Solution kunnen niet worden ingevroren. Raadpleeg *Bereidingsprocedure voor PreservCyt-monsters* voor de verwerking van deze monsters.

TESTPROCEDURE

Monsters kunnen besmettelijke stoffen bevatten en moeten dienovereenkomstig worden behandeld. De *digene* HC2 GC-ID DNA Test kan met de hand worden uitgevoerd (zoals vermeld in deze gebruikshandleiding) of met behulp van het Rapid Capture System instrument voor hoogvolume-monsterverwerkingstests.

HOOGVOLUME-MONSTERVERWERKINGSTESTS MET BEHULP VAN HET RAPID CAPTURE SYSTEM

Het Rapid Capture System is een algemeen automatisch pipetterings- en verdunningsstelsel dat kan worden gebruikt met de *digene* HC2 GC-ID DNA Test voor hoogvolume-monsterverwerkingstests. Met dit systeem kunnen in acht uur maximaal 352 monsters worden verwerkt, inclusief een periode van 3,5 uur gedurende welke een gebruikersinterventie niet nodig is; tot 704 monsterresultaten kunnen binnen 13 uur worden gegenereerd. Denaturatie van de monsters ter voorbereiding van het testen wordt onafhankelijk van het RCS verricht, in de primaire afnamebuis, net als bij de handmatige methode van de hieronder beschreven *digene* HC2 GC-ID DNA Test, voordat deze op het RCS-platform worden geplaatst. Daarnaast worden chemiluminescent signaaldetectie en resultaatrapportage uitgevoerd met behulp van het offline door QIAGEN goedgekeurde luminometersysteem, algemeen bekend voor zowel handmatige als RCS-methoden. Alle procedurestappen van de *digene* HC2 GC-ID DNA Test worden verricht in exact dezelfde volgorde als bij de handmatige testprocedure. De RCS-toepassing maakt de getrapte verwerking mogelijk van maximaal 4 microtiterplaten, waarbij elke plaat monsters bevat en de vereiste kalibrators en kwaliteitscontroles.

Raadpleeg bij gebruik van het Rapid Capture System de met het instrument geleverde gebruikshandleiding voor het Rapid Capture System naast deze gebruikshandleiding, voor noodzakelijke procedurele en beschrijvende informatie.

Handmatige methode

Opstelling

1. Wacht ten minste 60 minuten totdat Microplate Heater I vanuit een koude start op een temperatuur is gekomen van 65 ± 2 °C. Zie de *gebruikshandleiding van Microplate Heater I* voor bijzonderheden.
2. Controleer of een waterbad op 65 °C is en of het waterniveau hoog genoeg is om het volledige volume onder te dompelen in de monsterbuizen.
3. Neem de monsters en **alle vereiste** reagentia uit de koelkast **voorafgaand aan het begin van de test**. Laat ze gedurende 15 tot 30 minuten 20-25 °C bereiken.
4. Creëer een testplaat-layout met behulp van de *digene* assay analyse software met *digene* assay protocollen voor GC. Raadpleeg de toepasselijke gebruikshandleiding van de software voor meer bijzonderheden.
5. Negatieve kalibrator, positieve kalibrator en kwaliteitscontroles moeten voor elke assay **opnieuw** worden geprepareerd. Meng de kalibrator en de kwaliteitscontroles goed. Verwijder als de MST Vortexer 2 wordt gebruikt, 500 µl van elk in correct gelabelde lege monsterafnamebuisjes. Als alternatief kunt u 200 µl van elk verwijderen in correct gelabelde 2 ml polypropyleen microcentrifuge buisjes.

6. **De negatieve en positieve kalibrator moeten EERST (in triplo) worden getest** voor elke serie te testen monsters. De kwaliteitscontroles en monsters moeten afzonderlijk worden getest. Kalibrator, kwaliteitscontroles en monsters moeten worden verwerkt in een 8-microwell kolomconfiguratie, op zodanige wijze dat de negatieve kalibrator (NC) in drievoud wordt geplaatst in A1, B1, C1; de positieve kalibrator (PC) in D1, E1, F1; QC CT in G1; QC GC in H1; daarna monsters beginnend in A2. Zie voorbeeld lay-out hieronder. Raadpleeg de toepasselijke gebruikshandleiding van de door QIAGEN goedgekeurde luminometer en de toepasselijke gebruikshandleiding van de *digene* assay analyse software voor de juiste instelling van kalibrator/kwaliteitscontrole/monster in de software.

VOORBEELDINDELING VOOR EEN TEST MET 24 MICROWELLS:

Rij	Kolom		
	1	2	3
A	NC	Spec. 1	Spec. 9
B	NC	Spec. 2	Spec. 10
C	NC	Spec. 3	Spec. 11
D	PC	Spec. 4	Spec. 12
E	PC	Spec. 5	Spec. 13
F	PC	Spec. 6	Spec. 14
G	QC CT	Spec. 7	Spec. 15
H	QC GC	Spec. 8	Spec. 16

DENATURATIE

Opmerkingen:

- **Let op:** Het denaturatiereagens is bijtend. Draag geschikte beschermende kleding, handschoenen, oog-/gezichtsbescherming. Wees voorzichtig en draag poedervrije handschoenen bij het hanteren hiervan.
- **Belangrijk:** Sommige monsters kunnen bloed of ander biologisch materiaal bevatten die de kleurveranderingen na toevoeging van het denaturatiereagens kunnen maskeren. Het is mogelijk dat monsters die vóór de toevoeging van het denaturatiereagens een donkere kleur tonen niet de juiste kleurveranderingen aangeven tijdens deze stappen. In zulke gevallen zal het niet tonen van de juiste kleurveranderingen geen invloed hebben op de resultaten van de test. De juiste menging kan worden vastgesteld door de kleurverandering van de kalibrators en kwaliteitscontroles.
- Tijdens de denaturatiestap moet het waterniveau in het waterbad toereikend zijn, zodat het gehele monstervolume in de buis ondergedompeld is.
- Monsters kunnen tijdens de hele denaturatiestap worden bereid en 's nachts bij 2-8 °C worden bewaard of gedurende maximaal 3 maanden bij -20 °C. Er mogen maximaal 3 invries-ontdooicycli worden uitgevoerd met elke ontdooicyclus maximaal 2 uur bij kamertemperatuur. Vóór gebruik goed mengen.
- Kalibrators en kwaliteitscontroles kunnen tijdens de gehele denaturatiestap worden bereid en 's nachts bij 2-8 °C worden bewaard, **maar zij mogen niet ingevroren worden**. Wanneer kalibrators en kwaliteitscontroles bevroren zijn, moeten zij worden weggegooid.
- Na denaturatie en incubatie worden de monsters als niet meer besmettelijk beschouwd.¹³; niettemin moet laboratoriummedewerkers zich houden aan de nationale/plaatselijke voorzorgsmaatregelen.

BEREIDINGSPROCEDURE VAN KALIBRATORS, KWALITEITSCONTROLES EN STM-MONSTERS

Opmerkingen:

- Verwijder het hulpmiddel voor monsterafname niet vóór denaturatie.
- Ter voorkoming van fout-positieve resultaten is het essentieel dat alle materialen voor kalibrator, kwaliteitscontrole en STM-monster in contact komen met denaturatiereagens. Menging na toevoeging van het denaturatiereagens is een essentiële stap: **Zorg ervoor dat de Multi-Specimen Tube Vortexer 2 op 100 (maximumtoerental) staat en er tijdens het mengen een zichtbare vortex van vloeistof wordt waargenomen, zodat de gehele binnenzijde van de**

buis door de vloeistof wordt gewassen. Zorg ervoor dat alle kalibrators, kwaliteitscontroles en monsters elk afzonderlijk worden gemengd als handmatig gevortext wordt, door ze gedurende minstens 5 seconden op volle snelheid te vortexen, zodat de gehele binnenzijde van de buis door de vloeistofvortex wordt gewassen, en keer de buis daarna eenmaal om.

1. Verwijder de doppen van de kalibrator-, kwaliteitscontrole- en STM-monsterbuizen en gooi ze weg.

Opmerking: De doppen van de monsterbuizen worden als potentieel besmettelijk beschouwd. Verwerk dit afval conform nationale/lokale richtlijnen.

2. Pipetteer denaturatiereagens met indicatorkleurstof in elke kalibrator, kwaliteitscontrole of STM-monster met behulp van een repeterende of verstelbare pipet. Zorg dat de zijkanten van de buis niet worden aangeraakt, omdat er anders kruiscontaminatie van de monsters kan optreden. Het benodigde volume denaturatiereagens is gelijk aan de helft van het monstervolume. Het exacte volume voor elk type kalibrator, kwaliteitscontrole en monster staat vermeld in de onderstaande tabel.

- **Het overige denaturatiereagens moet in het flesje worden verdund voordat het volgens de nationale/plaatselijke laboratoriumprocedures wordt afgevoerd.**

Kalibrator, kwaliteitscontrole of monster	Vereiste volumes denaturatiereagens
Negatieve kalibrator, positieve kalibrator en kwaliteitscontrole, 200 µl	100 µl
Negatieve kalibrator, positieve kalibrator en kwaliteitscontrole, 500 µl	250 µl
Cervicaal monster, 1 ml	500 µl

3. Meng de monsters volgens één van de twee onderstaande methoden.

Methode met de Multi-Specimen Tube Vortexer 2

Opmerking: QIAGEN monsters die worden gemengd door middel van de MST Vortexer 2 moeten worden gehybridiseerd door middel van de hybridisatie-microtiterplaat en Microplate Heater I-methode. Raadpleeg de gebruikshandleiding van de MST Vortexer 2 voor verdere instructies, indien nodig.

- a) Dek de kalibrator-/kwaliteitscontrole-/STM-monsterbuizen af met DuraSeal[®] Tube Sealer Film door de afdekfolie over de buizen in het rek te trekken.
- b) Plaats het rekdeksel op de met folie afgedekte buizen en vergrendel het met de twee zijklemmen aan het rek. Snij de folie af met het snij-apparaat.
- c) Zet het rek op de Multi-Specimen Tube Vortexer 2 en klem het vast. Controleer of het toerental op 100 (maximumsnelheid) staat en draai de stroomschakelaar van de vortexer in de "ON"-stand. Vortex de buizen gedurende 10 seconden.

Methode voor handmatig vortexen van afzonderlijke buizen

- a) Sluit de kalibrator-, kwaliteitscontrole- en STM-monsterbuizen met schone schroefdoppen voor afnamebuizen.
 - b) Meng alle buizen grondig door ze afzonderlijk gedurende 5 seconden bij hoge snelheid te vortexen.
 - c) Keer elke monsterbuis eenmaal om, om de binnenkant van de buis, dop en rand te wassen.
 - d) Zet de buis terug in het rek.
4. Onafhankelijk van de toegepaste vortexmethode **moet er tijdens het mengen in elke buis een zichtbare vortex van vloeistof zijn, zodat de vloeistof het gehele binnenoppervlak van de buis bereikt.** De kalibrators, kwaliteitscontroles en monsters moeten paars kleuren.
 5. Incubeer de buizen in het rek gedurende 45 ± 5 minuten in een waterbad van 65 ± 2 °C (gedenatureerde kalibrators, kwaliteitscontroles en monsters moeten onmiddellijk worden getest. Kalibrators en kwaliteitscontroles mogen een nacht worden opgeslagen bij 2-8 °C, zoals bij de **Opmerkingen** hierboven is beschreven). Raadpleeg voor de opslag van monsters *Facultatief stoppunt*. GC Probe Mix moeten tijdens deze incubatie worden bereid. Zie het onderdeel *Bereiding en opslag van reagentia*.

BEREIDINGSPROCEDURE VOOR MONSTERS IN PRESERVCYT SOLUTION

Opmerkingen:

- Raadpleeg de gebruikshandleiding van de *digene* HC2 Sample Conversion Kit voor nadere details.
- Het verwerken van een hoeveelheid onderzoeksmateriaal in 4 ml PreservCyt Solution levert bij handmatig testen genoeg materiaal op voor 2 tests. Het minimale volume dat verwerkt kan worden, is 4 ml. Raadpleeg de paragraaf “*Equivalentie Tussen Monsters in STM en PreservCyt Solution*” voor details aangaande het minimum restvolume.
- Bereid charges met maximaal 36 monsters in PreservCyt Solution; anders kunnen de pellets losraken als het supernatant wordt afgegoten. Dit is van belang, omdat de integriteit van de celpellets zo wordt gewaarborgd tijdens het afgieten. Wacht met de bereiding van andere buizen met PreservCyt Solution, totdat de bereiding van de eerste serie is voltooid.

Gebruik het denaturatiereagens (DNR) van de *digene* HC2 GC-ID DNA Test (zie *Bereiding en opslag van reagentia*) of het DNR van de *digene* HC2 Sample Conversion Kit. Voeg voor de bereiding van het DNR van de *digene* HC2 Sample Conversion Kit, 3 druppels indicatorkleurstof toe aan de fles met DNR en meng het goed. De oplossing moet dan een uniforme, donkerpaarse kleur hebben. Raadpleeg tabel 1 om het benodigde volume te bepalen.

Tabel 1. Benodigde volume: Bereiding van reagens.

Aantal tests	Volume PreservCyt Solution	Volume conversiebuffer
1-2	4 ml	0,4 ml
3	6 ml	0,6 ml
4	8 ml	0,8 ml
5	10 ml	1,0 ml
6	12 ml	1,2 ml

1. Voorzie een *digene* HC2 Sample Conversion Tube (een conisch buisje van Sarstedt van 10 ml of een conisch buisje van VWR of Corning van 15 ml) van een etiket met het identificatienummer van het monster in kwestie.
2. De verwerking van één monster:
 - a. Schud elke buis met PreservCyt goed, totdat de cellen homogeen verdeeld zijn.
 - b. Pipetteer onmiddellijk, aangezien de cellen zeer snel bezinken, het toepasselijke volume van het PreservCyt-monster in de gelabelde buis. Laat de oplossing met PreservCyt naar de bodem van de conische buis zinken om te voorkomen dat celmateriaal aan de binnenkant van de buis blijft kleven.
3. Voeg het toepasselijke volume monsterconversiebuffer toe aan elke buis (zie tabel 1).
4. Haal de dop eraf en meng de inhoud van elke buis grondig met een vortex mixer met cupbevestiging.

Opmerking: De MST Vortexer 2 procedure is niet goedgekeurd voor het vortexen van monsters in PreservCyt Solution met de monsterconversiebuffer voorafgaand aan centrifuge, en kan daarom niet worden toegepast.
5. Centrifugeer de buisjes in een centrifuge met uitzwaairotor bij $2.900 \pm 150 \times g$ gedurende 15 ± 2 minuten.
6. Bereid tijdens centrifuge het mengsel van het *digene* Specimen Transport Medium en het denaturatiereagens (STM/DNR) in de verhouding 2:1 volgens tabel 2.

Opmerking: Het STM/DNR-mengsel moet altijd vers worden bereid op de dag waarop de test wordt uitgevoerd.

- a. Gebruik om het totale volume van het STM/DNR-mengsel te bepalen, het startvolume van het monster in de PreservCyt Solution als richtlijn en vermenigvuldig het STM en DNR dan “per buisje” volume met het aantal te verwerken monsters (zie tabel 2).

Tabel 2. Benodigde volume: STM/DNR.

Aantal tests	Volume PreservCyt Solution	STM-volume per buis voor uiteindelijk STM/DNR-mengsel*	DNR-volume per buis voor uiteindelijk STM/DNR-mengsel*	toegevoegd STM/DNR-mengsel per buis
1-2	4 ml	120 µl	60 µl	150 µl
3	6 ml	170 µl	85 µl	225 µl
4	8 ml	220 µl	110 µl	300 µl
5	10 ml	270 µl	135 µl	375 µl
6	12 ml	320 µl	160 µl	450 µl

* De volumes in deze tabel mogen niet direct aan het monsterbuisje worden toegevoegd.

- b. Meng de oplossing grondig door te vortexen.
7. Verwijder de buisjes één voor één uit de centrifuge en zet ze in een rek of conversierek. Op de bodem van elk buisje moet een roze/oranje pellet zitten.

Opmerking: Monsters die geen zichtbare pellet bevatten na centrifuge, zijn niet geschikt voor de test en moeten worden weggegooid.

8. Een afzonderlijk buisje verwerken:
- a. Verwijder de dop en leg deze apart op schoon pluisarm keukenpapier.
- b. Giet het supernatant zorgvuldig af.
- c. Houd het buisje omgekeerd en laat het voorzichtig afvloeien (ongeveer 6 keer) op absorberend pluisarm keukenpapier, totdat geen vloeistof meer uit het buisje drupt. Gebruik telkens een schoon stuk van het keukenpapier. Zorg ervoor dat het celpellet **niet** uit het buisje glijdt tijdens het afvloeien.

Opmerkingen:

- Laat het buisje niet meer dan eens per keer op hetzelfde stuk van het absorberend pluisarm keukenpapier afvloeien.
- Het is belangrijk om zoveel mogelijk PreservCyt Solution te verwijderen door het te laten afvloeien. Het is niettemin normaal dat ook na het afvloeien een restant PreservCyt Solution achterblijft.

- d. Zet het buisje in een rek of in het conversierek.

Vortexen en denaturatie

Handmatige vortexprocedure

1. Voeg het toepasselijke volume STM/DNR-mengsel toe aan elke pellet (zie tabel 2). Haal de dop van elk buisje af en resuspendeer de pellets afzonderlijk door elk buisje ten minste 30 seconden op de hoogste stand te vortexen. Als een pellet moeilijk te resuspenderen is, vortex dan 10-30 seconden langer of totdat het pellet van de bodem van het buisje loskomt en rondzweeft. Als een pellet ongeresuspendeerd blijft na langer vortexen (in totaal maximaal 2 minuten), noteer dan het identificatienummer van het monster en ga verder met de volgende stap.
2. Zet de buisjes in een rek.
3. Zet het rek gedurende 15 ± 2 minuten in een waterbad van 65 ± 2 °C. Zorg ervoor dat er voldoende water in zit, zodat de vloeistof in de buisjes onder het waterniveau blijft.
4. Haal het rek met monsters uit het waterbad en vortex de afzonderlijke monsters gedurende 15-30 seconden.
Opmerking: Zorg ervoor dat alle pellets in deze fase volledig geresuspendeerd zijn. Monsters die nog zichtbare pellets bevatten, zijn niet geschikt voor de test en moeten worden weggegooid.
5. Zet het rek terug in het waterbad van 65 ± 2 °C en ga nog eens 30 ± 3 minuten door met denaturatie.
6. Ga verder met de *Hybridisatiestap* hieronder of raadpleeg *Facultatief stoppunt* over opslag en behandeling van gedenatureerde monsters.

Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2 Procedure

Opmerkingen:

- De Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2 methode is goedgekeurd voor het verwerken van monsters in PreservCyt Solution na centrifuge en het afgieten van het supernatant.
 - Alleen de MST Vortexer 2 is ontworpen voor de verwerking van monsters in PreservCyt Solution.
 - Het conversierek en deksel zijn speciaal ontworpen voor de *digene* HC2 Sample Conversion Tubes (conische buisjes van 15 ml van het merk VWR of Corning). De gebruiker mag per keer slechts één type buis in het conversierek gebruiken. Andere merken zijn niet goedgekeurd voor gebruik.
 - Het is noodzakelijk dat de gespecificeerde vortextijden van het conversierek en deksel strikt in acht worden genomen.
 - Het conversierek en deksel kunnen niet worden gebruikt voor het vortexen voor kalibrators of kwaliteitscontroles van de *digene* HC2 DNA Test Kit. Door de hoogte van de STM-buisjes kan niet goed gevortext worden als het conversierek en deksel gebruikt worden.
1. Plaats elke gelabelde conische buis van 15 ml, nadat deze is afgevoerd, op de juiste plaats in het conversierek.
 2. Voeg het toepasselijke volume STM/DNR-mengsel toe aan elke pellet (zie tabel 2).
 3. Bedek de conische buisjes van 15 ml met DuraSeal Tube Sealer afdekfolie door de folie over de buisjes in het rek te trekken.
 4. Plaats het deksel van het rek over de met afdekfolie bedekte buisjes en klik het deksel dicht met de twee klembeugels. Snij de afdekfolie met het snij-apparaat af, nadat het deksel stevig vastgezet is.
 5. Beweeg de rode hendel van de klembeugel omhoog, zodat deze horizontaal komt te staan.
 6. Plaats het conversierek en deksel zodanig op de MST Vortexer 2 dat de grootste diagonale hoek van het conversierek zich op de rechterhoek aan de voorzijde bevindt. Plaats het rek met deksel zodanig op het platform van de MST Vortexer 2 dat het goed tussen de geleiders past. Zet het rek stevig op zijn plaats vast door de rode hendel van de klembeugel naar beneden in verticale stand te duwen. Hierdoor wordt het rek vastgezet.

7. Controleer of de motorsnelheid op 100 (maximale snelheid) staat en of de tuimelschakelaar Pulser op OFF staat.
8. Zet de stroomschakelaar van de Vortexer op ON. **Vortex de buisjes gedurende 30 seconden.**
9. Zet de stroomschakelaar van de Vortexer op OFF.
10. Verwijder het conversierek en deksel van de MST Vortexer 2 door de rode hendel van de klembeugel omhoog te duwen.
11. Zet het rek gedurende 15 ± 2 minuten in een waterbad van 65 ± 2 °C. Zorg ervoor dat de vloeistof in de buisjes onder het waterniveau blijft.
12. Haal het rek met monsters na een incubatietijd van 15 minuten uit het waterbad.
13. Verwijder het overtollige water van het rek om spatten te voorkomen voordat u het op de MST Vortexer 2 zet.
14. Zet het conversierek en deksel stevig op de MST Vortexer 2 vast, zoals bij *Stap 6* is beschreven.
15. Controleer of de snelheid op 100 is ingesteld en zet de stroomschakelaar van de vortexer op ON. **Vortex de buisjes gedurende 1 minuut.**
16. Zet de stroomschakelaar van de Vortexer op OFF.

Opmerking: Met de MST Vortexer 2 Procedure worden de mengsnelheid, de tijden en het proces gestandaardiseerd, waardoor het niet meer nodig is om celpellets met het blote oog op te sporen, zoals noodzakelijk is bij de handmatige vortexprocedure.
17. Zet het rek terug in het waterbad van 65 ± 2 °C en ga nog eens 30 ± 3 minuten door met denaturatie.
18. Haal het rek uit het waterbad, droog het rek en zet het vast op de vortexer.
19. Zet de stroomschakelaar van de Vortexer op ON. **Vortex gedurende 10 seconden bij de maximale instelling.**
20. Zet de stroomschakelaar van de Vortexer op OFF. Verwijder het rek.
21. Verwijder onmiddellijk het deksel en het DuraSeal Tube Sealer afdekfolie van de monsters.
22. Ga verder met de *Hybridisatiestap* hieronder of raadpleeg *Facultatief stoppunt* over opslag en behandeling van gedenatureerde monsters.

FACULTATIEF STOPPUNT

Na denaturatie kunnen STM-monsters en omgezette PreservCyt-monsters gedurende een nacht worden opgeslagen bij 2-8 °C of gedurende maximaal 3 maanden bij -20 °C. Als de monsters voor een nacht worden gekoeld, mogen de monsters in het conversierek blijven staan met nieuwe DuraSeal afdekfolie eroverheen en een ander deksel erop. Voordat de monsters bij -20 °C worden opgeslagen, moeten het deksel en het DuraSeal afdekfolie worden verwijderd en moeten de buisjes worden voorzien van doppen. In beide gevallen moeten de monsters op een temperatuur van 20 – 25 °C komen en grondig gevortext voordat met de Hybridisatiestap wordt verder gegaan.

Opmerking: Bewaar of vervoer gedenatureerde monsters niet op droog ijs.

Er mogen maximaal 3 invries/ontdooicycli worden uitgevoerd met tijdens elke ontdooicyclus een incubatiestap van maximaal 2 uur bij kamertemperatuur.

HYBRIDIZATIE

Opmerkingen:

- De GC Probe Mix is stroperig. Zorg voor een grondige menging en let op dat de vereiste hoeveelheid volledig in elke well van de hybridisatie-microtiterplaat is gedoseerd. Zie het onderdeel Bereiding en opslag van reagentia.
- Indien het gedenatureerde monster bij -20 °C is bewaard, moet men het monster tot 20-25 °C laten ontdooien en grondig vortexen voordat men met de hybridisatie begint.
- Vóór het gebruik moet de Microplate Heater I gedurende ten minste 60 minuten tot 65 ± 2 °C worden voorverwarmd. Zie de *gebruikshandleiding van de Microplate Heater* voor verdere instructies.

1. Neem en label een hybridisatie-microtiterplaat.
2. Verwijder de kalibrators, kwaliteitscontroles en monsters na de incubatie uit het waterbad. Vortex het gehele rek met STM-monsters gedurende minimaal 5 seconden op maximale snelheid als de Multi-Specimen Tube Vortexer 2 wordt gebruikt. Vortex het gehele conversierek gedurende minimaal 10 seconden op maximale snelheid bij monsters in PreservCyt Solution. In andere gevallen moet elke buis minstens 5 seconden afzonderlijk worden gevortext.
3. Pipetteer 75 μ l van elke kalibrator, kwaliteitscontrole of monster op de **bodem** van een lege well van een hybridisatie-microtiterplaat volgens de plaatindeling die onder *Opstelling* is gemaakt. Raak de zijkanten van de wells niet aan en beperk de vorming van luchtbelletjes. Gebruik voor elke transfer een schone extra lange pipetpunt om kruiscontaminatie van kalibrators, kwaliteitscontroles of monsters te voorkomen. Verwijder bij STM-monsters het hulpmiddel voor monsterafname niet uit de monstertransportbuis. Gedenatureerde monsters mogen met schroefdoppen voor afnamebuizen worden afgesloten en met de overige hulpmiddelen voor monsterafname in de buizen worden bewaard. Gedenatureerde PreservCyt-monsters mogen weer worden voorzien van de originele doppen.

Opmerkingen:

- **Er kunnen fout-positieve resultaten optreden indien het monster niet zorgvuldig wordt overgebracht. Tijdens het overbrengen van het monster mag de pipetpunt de binnenkant van de buis niet aanraken bij het verwijderen van het aliquot van 75- μ l.**

4. Bedek de plaat met een deksel na het overbrengen van het laatste monster en **incubeer de hybridisatie-microtiterplaat gedurende 10 minuten bij 20-25 °C**.
5. Breng de bereide en grondig gevortexte Probe Mix over naar een wegwerp reagensreservoir. Pipetteer telkens zorgvuldig 25 μ l van de Probe Mix in alle wells die kalibrators, kwaliteitscontroles en monsters bevatten met behulp van een 8-kanaalspipet en verse punten voor iedere rij. Doseer het volume probe in elke hybridisatiewell, waarbij opspatten moet worden voorkomen. Raak de zijkanten van de wells niet aan.

Opmerking: Gebruik voor bovenstaande stap een 8-kanaalspipet die voorzien is van 25-200 μ l-tips en waarmee 25-75 μ l kan worden overgebracht. Gebruik voor een klein aantal wells een enkelkanaalspipet (voorzien van 25-200 μ l-tip) in plaats van een 8-kanaals pipet.

6. Dek de hybridisatie-microtiterplaat af met een deksel. Schud de hybridisatie-microtiterplaat gedurende 3 ± 2 minuten op 1100 ± 100 omw/min in het roterend schudapparaat I. *De kalibrators, kwaliteitscontroles en monsters moeten na het schudden geel worden.* Wells die paars blijven hebben wellicht niet de juiste hoeveelheid Probe Mix gehad. Voeg nog 25 μ l Probe Mix toe aan monsters die paars blijven en schud opnieuw. Indien er na deze procedure nog steeds wells paars blijven, test de monsters opnieuw.
7. Incubeer gedurende 60 ± 5 minuten in een voorverwarmde en tot 65 ± 2 °C verwarmde Microplate Heater I.

Opmerkingen:

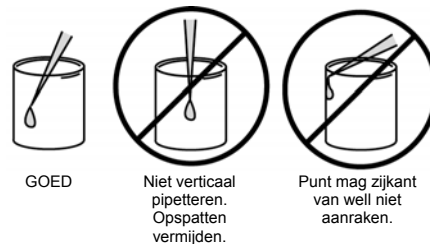
- Wanneer de hybridisatie-microtiterplaat in de Microplate Heater I wordt geplaatst moet men ervoor zorgen dat er niet gespat wordt.
- Na het schudden moeten de monsters in PreservCyt Solution roze kleuren in plaats van geel.

HYBRIDECAPTURE

1. Verwijder alle gecoate microtiterplaatwells van de voorgebouwde plaat behalve het vereiste aantal voor de run. Plaats de ongebruikte microwells terug in de oorspronkelijke zak en hersluit deze. Gebruik een marker om elke kolom 1, 2, 3... te nummeren en label de microtiterplaat met een geschikte identificatie. De monsters worden aan de wells toegevoegd volgens de voorbeeldindeling die eerder onder *Opstelling* aan de orde is gesteld.
2. Verwijder zorgvuldig de hybridisatie-microtiterplaat met de kalibrators, kwaliteitscontroles en monsters uit Microplate Heater I. Verwijder onmiddellijk het deksel van de plaat en leg hem op een schoon oppervlak.

- Breng de gehele inhoud (circa 100 µl) van de kalibrators, kwaliteitscontroles en monsters van de wells van de hybridisatie-microtiterplaat met behulp van een 8-kanaalspipet over naar de bodem van de overeenkomstig gecoate microwell. Gebruik voor elke overgebrachte kolom nieuwe pipetpunten op de 8-kanaalspipet en laat elke pipetpunt goed leeglopen om te zorgen voor een volledige transfer van het monster. Desgewenst kan de pipet worden gestabiliseerd door het **midden van de** pipetpunten op de bovenste rand van de gecoate microwells te laten rusten (zie diagram 1).

DIAGRAM 1: JUISTE WIJZE VAN PIPETTEREN



- Dek de microtiterplaat met het plaatdeksel af en schud hem gedurende 60 ± 5 minuten bij $20-25$ °C op 1100 ± 100 omw/min in het roterend schudapparaat I.
- Bereid de wasbuffer en controleer tijdens incubatie en, indien van toepassing, de spoel- en afvalreservoirs van de automatische plaatwasser I. Zie het onderdeel Bereiding en opslag van reagentia.
- Wanneer de capturestap voltooid is moet de gecoate microtiterplaat uit het roterend schudapparaat I worden verwijderd en moet het plaatdeksel zorgvuldig worden verwijderd. Verwijder de vloeistof uit de wells door deze in een gootsteen weg te gieten: Keer de plaat helemaal om boven de gootsteen en schud hem stevig met een neerwaartse beweging. Doe dit voorzichtig zodat de vloeistof niet opspat wanneer deze te dicht bij de bodem van de gootsteen wordt afgegoten. **Keer de plaat niet opnieuw om**; vloeï af door hem 2-3 maal stevig op schone Kimtowels[®] tissues of gelijkwaardig pluisarm keukenpapier te kloppen. Zorg dat alle vloeistof uit de wells is verwijderd en dat de bovenkant van de plaat droog is.

HYBRIDEDETECTIE

Opmerkingen:

- Toevoegingen aan de plaat moeten van links naar rechts plaatsvinden met behulp van een 8-kanaalspipet.
 - Geadviseerd wordt om de “reverse” pipetteertechniek toe te passen om de consistentie van de afgifte van het reagens te verbeteren. Met deze techniek worden de pipetpunten aanvankelijk overvuld door de tweede stop op de aspiratie/doseercontrole (zuiger) van de pipet te gebruiken. Zie de onderstaande procedure. Veeg de punten af in het reagensreservoir of op schoon pluisarm keukenpapier om overtollig reagens te verwijderen voor het op de plaat wordt gebracht.
 - Desgewenst kan de pipet worden gestabiliseerd door het midden van de pipetpunten op de bovenste rand van de microwells te laten rusten. Zorg dat de zijkanten van de microwells niet worden aangeraakt, omdat er anders kruiscontaminatie van de monsters kan optreden. Raadpleeg het hiervoor afgebeelde diagram 1.
- Breng het vereiste volume detectiereagens 1 over naar een reagensreservoir (zie het onderdeel *Bereiding en opslag van reagentia* voor instructies). Pipetteer telkens zorgvuldig 75 µl van het detectiereagens 1 in elke well van de gecoate microtiterplaat met behulp van een 8-kanaalspipet en toepassing van de hieronder beschreven “reverse” pipetteertechniek.

“Reverse” pipetteertechniek:

 - Bevestig punten aan een 8-kanaalspipet; zorg dat alle punten goed vastzitten.
 - Duw de zuiger van de pipet voorbij de eerste stop tot aan de tweede stop.
 - Dompel de punten onder in de detectiereagens 1-oplossing.
 - Laat de zuiger langzaam los en laat de oplossing in de punten vloeien.

- e) Doseer de oplossing in de microwells (75 µl) door de zuiger tot de eerste stop in te drukken. Laat de zuiger pas los wanneer de pipetpunten in de detectiereagens 1-oplossing zijn ondergedompeld.
- f) Vul de punten opnieuw en herhaal totdat alle wells zijn gevuld. Vul de wells van de microtiterplaat van links naar rechts. *Controleer of alle wells gevuld zijn door de intensiteit van de roze kleur te observeren. Alle wells moeten een soortgelijke intensiteit hebben.*

2. Dek de plaat af met een plaatdeksel en incubeer gedurende 30-45 minuten bij 20-25 °C.

WASSEN

Was de gecoate plaat aan de hand van één van de twee onderstaande methoden.

METHODE MET DE AUTOMATISCHE PLAATWASSER

Opmerking: Laat de automatische plaatwasser altijd aan staan. Zorg dat het spoelreservoir gevuld en het afvalreservoir leeg is. De automatische plaatwasser zal het systeem routinematig spoelen voor de reiniging. *Zie de gebruikshandleiding van automatische plaatwasser voor verdere instructies, indien nodig.*

VÓÓR ELK GEBRUIK:

- Controleer of het waterreservoir minimaal tot het 1L-streepje is gevuld met wasbufferoplossing. Bereid de wasbufferoplossing als dat niet het geval is. *Zie het onderdeel *Bereiding en opslag van reagentia*.*
- Controleer of het spoelreservoir gevuld is met gedestilleerd of gedeïoniseerd water.
- Controleer of het afvalreservoir leeg is en de dop stevig vast zit.
- De automatische plaatwasser zal zich automatisch vóór elke wassing primen en na elke wassing spoelen.

1. Verwijder het plaatdeksel en leg de plaat op het platform van de automatische plaatwasser.

2. Controleer of de stroom is ingeschakeld en of de display “Digene Wash Ready” of “P1” aangeeft.

Opmerking: Als er alleen een gedeeltelijke strip gecoate wells wordt gebruikt, moeten er lege microtiterplaatwells in de gecoate plaat worden geplaatst om de kolom aan te vullen voordat het wassen begint. *Zie het deel Accessoires voor bestelinformatie.*

3. Kies het aantal te wassen strips door op de “Rows” toets te drukken en daarna op “+” of “-” om af te stellen. Druk op de “Rows” toets om terug te keren naar “Digene Wash Ready” of “P1”.

4. Druk op “Start/Stop” om te beginnen.

5. De automatische plaatwasser verricht zes vul- en aspiratiecycli wat ongeveer 10 minuten duurt. Tijdens het programma is er sprake van een korte pauze, zorg dus dat u de plaat niet te vroeg verwijdert. Wanneer de automatische plaatwasser klaar is met wassen geeft hij “Digene Wash Ready” of “P1” aan.

6. Verwijder de microtiterplaat uit de wasser wanneer het programma is afgelopen. De plaat moet er wit uitzien en er mag geen roze vloeistof in de microwells achterblijven.

METHODE VOOR HANDMATIG WASSE

Opmerking: Inadequaat wassen kan een verhoogde achtergrond en fout-positieve resultaten veroorzaken (als gevolg van achtergebleven alkalische fosfatase). Gebruik wasapparatuur om efficiënt wassen zeker te stellen. Wasapparatuur moet op ten minste 61 cm en niet meer dan 91 cm boven het wasgebied worden geplaatst, zodat de plaat zich tussen 61 cm en 91 cm onder het wasapparaat bevindt tijdens het wassen. De afsluiter van het wasapparaat moet tijdens gebruik naar de volledig “open” stand worden gedraaid en in de “off” (uit) stand worden gezet wanneer deze niet in gebruik is. Tijdens gebruik moet het wasapparaat tenminste 1,0 L wasbuffer bevatten om adequate druk zeker te stellen.

1. Verwijder detectiereagens 1 uit de wells door schone Kimtowels tissues of gelijkwaardig pluisarm keukenpapier boven op de plaat te plaatsen en deze voorzichtig om te keren. Zorg voordat u gaat omkeren dat het papier met het gehele oppervlak van de plaat in aanraking komt. Laat de plaat gedurende 1-2 minuten afdruipe. Vloei goed af met schone Kimtowels tissues of gelijkwaardig

pluisarm keukenpapier. Werp het gebruikte keukenpapier voorzichtig weg om contaminatie met alkalische fosfatase tijdens de latere stappen te voorkomen.

2. Was de plaat 6 keer met de hand met behulp van het wasapparaat. Elke well wordt overstroomd met wasbufferoplossing om conjugaat vanaf de bovenkant van de wells te verwijderen. Het wassen begint bij well A1 en gaat daarna kronkelend naar rechts en naar beneden. Nadat alle wells gevuld zijn moet de vloeistof met een sterke neerwaartse beweging in de gootsteen worden afgegoten. De tweede was begint bij well H12 en volgt een kronkelbeweging naar links en naar boven. Deze volgorde van 2 wasbeurten wordt nog 2 keer herhaald tot in totaal 6 wasbeurten per well.
3. Na het wassen moet de plaat worden afgevoerd door hem om te keren op schone Kimtowels tissues of gelijkwaardig pluisarm keukenpapier en 3-4 keer stevig te kloppen. Vervang het keukenpapier en vloeit opnieuw af. Laat de plaat omgekeerd liggen en gedurende 5 minuten afdruipten. Vloeit de plaat nog een keer af.
4. De plaat moet er wit uitzien en er mag geen roze vloeistof in de microwells achterblijven.

SIGNAALAMPLIFICATIE

Opmerkingen:

- Gebruik een paar nieuwe poedervrije handschoenen voor het hanteren van detectiereagens 2.
 - Breng **alleen de hoeveelheid** reagens over naar het reagensreservoir die nodig is om de test te verrichten om contaminatie van detectiereagens 2 te voorkomen. Zie het onderdeel Bereiding en opslag van reagentia. **Detectiereagens 2 mag NIET in het oorspronkelijke flesje worden teruggegoten. Ongebruikt materiaal moet na afloop worden weggeworpen.**
 - Toevoeging van detectiereagens 2 moet zonder onderbreking geschieden. De incubatietijd van alle wells moet zo aansluitend mogelijk zijn.
 - Raak de zijanten van de microwell niet aan en voorkom opspatten van reagens op de punten omdat dit kruiscontaminatie van monsters zou kunnen veroorzaken (Zie diagram 1).
1. Pipetteer telkens zorgvuldig 75 µl van het detectiereagens 2 in elke well van de gecoate microtiterplaat met behulp van een 8-kanaalspipet en toepassing van de eerder beschreven "reverse" pipetteertechniek. *Alle microwells moeten een gele kleur krijgen.* Controleer of alle wells gevuld zijn door de intensiteit van de kleur te observeren. Alle wells moeten een soortgelijke intensiteit hebben.
 2. Dek de microtiterplaat af met een plaatdeksel of schoon Parafilm (of gelijkwaardig) en incubeer gedurende 15 minuten bij 20-25 °C. Vermijd direct zonlicht.
 3. Lees de microtiterplaat op de door QIAGEN goedgekeurde luminometer af na 15 minuten incubatie af (en niet langer dan na 30 minuten incubatie).
 4. De *digene* assay analyse software staat het rechtstreeks invoeren van relevante informatie over de assays in de software toe.
 5. Als een volle microtiterplaat niet is gebruikt, moeten de gebruikte microwells uit de microtiterplaathouder worden verwijderd en moet de houder grondig met gedeïoniseerd water worden gespoeld, gedroogd en voor de volgende test worden gereserveerd.

VERIFICATIECRITERIA VOOR DE TESTKALIBRATIE

De testkalibratieverificatie wordt verricht om te zorgen dat de reagentia en geleverde kalibrator- en kwaliteitscontrolematerialen goed functioneren, waardoor een nauwkeurige bepaling van de grenswaarde van de test mogelijk is. De verificatiecriteria worden automatisch berekend en als geldig of ongeldig bekrachtigd door de *digene* assay analyse software. Voor de *digene* HC2 GC-ID DNA Test is kalibratie nodig bij elke assay. Daarom is het noodzakelijk om elke assay te verifiëren aan de hand van de volgende criteria. Deze verificatieprocedure is niet bedoeld ter vervanging van een interne kwaliteitscontroletest.

1. Negatieve kalibrator

De negatieve kalibrator moet bij elke assay in drievoud worden getest. De gemiddelde RLU-waarde van de negatieve kalibrator moet ≥ 10 en ≤ 150 RLU zijn om verder te gaan. De resultaten van de negatieve kalibrator moeten een variatiecoëfficiënt (%CV) van $\leq 25\%$ tonen. Als de %CV $> 25\%$ is, zal de software de controlewaarde met een RLU-waarde die het verst van het gemiddelde ligt als uitschieter negeren en het gemiddelde opnieuw berekenen aan de hand van de twee overige controlewaarden. De opnieuw berekende %CV moet $\leq 25\%$ zijn; anders **is de testkalibratieverificatie ongeldig en moet de assay voor alle patiëntenmonsters worden herhaald. Daarom mogen de resultaten van patiëntenmonsters niet worden gerapporteerd.**

2. Positieve kalibrator

De positieve kalibrator moet bij elke assay in drievoud worden getest. De %CV voor de positieve kalibrator triplo's moet $\leq 20\%$ zijn. Wanneer de %CV $> 20\%$ is zal de software met de zich het verst van het gemiddelde bevindende RLU als uitschieter negeren en het gemiddelde en %CV opnieuw berekenen met behulp van de resterende twee kalibratiewaarden. De opnieuw berekende %CV moet $\leq 20\%$ zijn; anders **is de testkalibratieverificatie ongeldig en moet de assay voor alle patiëntenmonsters worden herhaald. In dergelijke gevallen mogen de resultaten van patiëntenmonsters niet worden gerapporteerd.**

3. Gemiddelde PC/Gemiddelde NC-verhouding

Het gemiddelde van de positieve kalibrator-triplo's (gemiddelde PC) en het gemiddelde van de negatieve kalibrators (gemiddelde NC) worden gebruikt voor het berekenen van de gemiddelde PC/gemiddelde NC-verhouding. De software zal de gemiddelde PC/gemiddelde NC-verhouding berekenen. Deze verhouding moet aan de volgende criteria voldoen om de testkalibratie te verifiëren **vóór de resultaten van de monsters kunnen worden geïnterpreteerd.** Wanneer de verhouding $\geq 2,0$ en ≤ 20 is, zal de software doorgaan naar de grensberekening. Als de verhouding $< 2,0$ of > 20 is, **is de testkalibratieverificatie ongeldig en moet de assay voor alle patiëntenmonsters worden herhaald. In dergelijke gevallen mogen de resultaten van patiëntenmonsters niet worden gerapporteerd.**

Opmerking: Voor het bepalen van de reproduceerbaarheid van de kalibrators voor de *digene* HC2 GC-ID DNA Test werden de resultaten van de *digene* Microplate Luminometer 2000 (DML 2000) gecompileerd (tabel 3) uit interne studies waarbij 62 assays uitgevoerd werden met het Rapid Capture System en 43 assays met behulp van de handmatige methode. Uit de resultaten bleek dat de gemiddelde %CV bij de positieve kalibrator voor deze 105 assays gelijk was aan of lager dan 6,5% en het gemiddelde %CV bij de negatieve kalibrator gelijk was aan of lager dan 14,6%. Zoals uit de gemiddelde negatieve kalibrator blijkt, worden met de RCS-toepassing NC RLU-waarden bereikt die iets hoger liggen in verhouding tot de handmatige methode - gemiddelde RLU-waarde van 43 bij handmatige assays vergeleken met een gemiddelde van 54 bij de RCS-toepassing. Dit bleek geen invloed te hebben op de testresultaten geproduceerd met behulp van een van de optionele methoden. De gemiddelde RLU-drempel voor de negatieve kalibrator is gedefinieerd als 250 RLU's op basis van een statistische berekening van $\pm 3SD$ van de gemiddelde RLU-waarde voor de negatieve kalibrator gecheckt voor het *digene* HC2 CT/GC DNA Test-systeem tijdens uitgebreide tests die hebben plaatsgevonden bij de ontwikkeling van de RCS-toepassing. De bovengrens van dit $\pm 3SD$ bereik werd met nog eens 20% verhoogd om zeker te stellen dat de NC RLU-drempel tijdens een klinische routine-bepaling bereikt kan worden.

De gemiddelde RLU-waarde van de NC moet routinematig worden gecheckt op ≤ 150 en de CV op $\leq 25\%$. Elk laboratorium moet de werking van kwaliteitscontrole en kalibratie checken overeenkomstig het National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) document C24-2A. De gemiddelde RLU kan met behulp van de RCS-toepassing van tijd tot tijd hoger zijn dan 150, mogelijk met een overeenkomstige verlaging in de PC/NC, die, volgens tabel 3 heeft aangetoond een gemiddelde waarde na kalibratie van 7,11 te leveren. In dit geval zijn de resultaten acceptabel op voorwaarde dat de NC RLU lager dan of gelijk blijft aan 250 en de PC/NC-ratio $\geq 2,0$ en ≤ 20 is. Wanneer de NC RLU hoger is dan 250 of de PC/NC daalt tot onder de 2,0 of groter is dan 20, is de test ongeldig.

Tabel 3. Statistische samenvatting van negatieve en positieve kalibratorwaarden voor de RCS-toepassing en handmatige assays.

Methode	Aantal platen	PC/NC berekende gemiddelden				Testkit kwaliteitscontroles (Gemiddeld RLU/CO)	
		Gemiddeld	Mediaan	Min	Max	QC CT	QC GC
RCS	62	8,29	8,99	3,95	12,72	0,22	4,73
Handmatig	43	8,22	8,83	2,59	12,88	0,23	4,07

Methode	Kalibrator	RLU Berekende gemiddelden				Gemiddelde van het berekende %CV
		Gemiddeld	Mediaan	Min	Max	
RCS	Negatief	54	46	24	127	14,4
	Positief	399	405	179	606	6,5
Handmatig	Negatief	43	36	16	120	14,6
	Positief	295	309	167	415	4,7

GRENSWAARDEBEREKENING

Zodra een assay overeenkomstig de hierboven vermelde criteria is gevalideerd, worden de geldige positieve kalibratorwaarden gebruikt voor het bepalen van de RLU-grenswaarden voor het onderscheiden van positieve monsters. De RLU-grenswaarden worden als volgt berekend:
 RLU-grenswaarde = gemiddelde positieve kalibrator/RLU

Voorbeeld van grenswaardeberekening:

	NC RLU-waarden	PC RLU-waarden
	97	312
	101	335
	91	307
Gemiddelde waarde	96	318
%CV	4,9	4,7
Gemiddelde PC/Gemiddelde NC	NVT	3,31

De RLU-grenswaarde is derhalve (gemiddelde PC) = 318

Alle RLU-waarden van de monsters worden omgerekend naar de ratio volgens de toepasselijke RLU-grenswaarde (CO) door de *digene* assay analyse software. Alle assays moeten bijvoorbeeld worden uitgedrukt als monster RLU/CO.

Opmerking: RLU/CO-waarden en positieve/ negatieve resultaten voor alle monsters worden vermeld in het *digene* assay analyse software data-analyserapport.

KWALITEITSCONTROLE

Monsters voor kwaliteitscontrole worden met de *digene* HC2 GC-ID DNA Test meegeleverd. Raadpleeg de toepasselijke gebruikshandleiding van de *digene* assay analyse software voor instructies over hoe de lotnummers en uiterste gebruiksdata van de kwaliteitscontroles ingevoerd moeten worden. Deze controles moeten in iedere assay worden vermeld en de RLU/CO van elke kwaliteitscontrole moet binnen het volgende aandoerbare bereik liggen voor een als geldig beschouwde assay. **Als de kwaliteitscontroles niet binnen dit bereik liggen, is de assay ongeldig en moet deze worden herhaald.** Daarom mogen voor ongeldige assays geen patiëntenresultaten worden gerapporteerd.

	QC CT	QC GC
Minimum RLU/CO	0	1,0
Maximum RLU/CO	0,9999	20,00
Maximum %CV	20,00	20,00

1. De met de kit meegeleverde kwaliteitscontroles zijn gekloonde CT- en GC DNA-targets, samengesteld uit dezelfde plasmideconstructie voor elk afzonderlijk organisme (één voor CT en één voor GC), evenals de positieve kalibrator meegeleverd met de *digene* HC2 GC-ID DNA Test.
2. Dit kwaliteitscontrole materiaal is niet hetzelfde als GC-organisme in het monster en zal geen dienst doen als geschikte kwaliteitscontrole voor de verwerking van *digene* Specimen Transport Medium of PreservCyt Solution.
3. De positieve kalibrator wordt gebruikt om de monsterresultaten te normaliseren door de RLU-grenswaarde vast te stellen. De in de kit geleverde kwaliteitscontroles moeten worden gebruikt voor interne kwaliteitscontrole. Aanvullende kwaliteitscontroles kunnen worden getest volgens richtlijnen of vereisten van plaatselijke, provinciale en/of landelijke voorschriften of bevoegde organisaties.
4. Om de effectiviteit te testen van monsterlyse en denaturatie moeten laboratoria periodiek controles van de bereiding van monsters creëren door het toevoegen van ≥ 5000 CFU/ml *Neisseria gonorrhoeae* (auxotype 1, 5 of type stam van ATCC) aan een vers bereide buis STM. Incubeer het monster gedurende tenminste 1 uur op kamertemperatuur vóór het testen op dezelfde manier als een klinisch monster. Wanneer het monster goed is verwerkt moet een RLU/CO $\geq 2,50$ worden verkregen. Als alternatief kunnen ook in de handel verkrijgbare monstertestpanels met CT-organisme worden gebruikt voor dit doel.
5. Acceptabele bereiken voor de negatieve en positieve kalibrators en kwaliteitscontroles zijn alleen voor de door QIAGEN goedgekeurde luminometers bepaald. De negatieve en positieve kalibrators dienen voor het aantonen van aanzienlijk falen van reagentia en zullen geen precisie van de testgrens garanderen.

INTERPRETATIE VAN MONSTERRESULTATEN

Door middel van de criteria van de *digene* HC2 GC-ID DNA Test:

1. Monsters met RLU/CO-ratio's van $\geq 2,50$ worden beschouwd als "Positief voor *Neisseria gonorrhoeae* DNA." Levensvatbaarheid en/of infectiviteit van organisme kan niet geconcludeerd worden daar target DNA aanwezig kan zijn bij afwezigheid van levensvatbare organismen.
 2. Monsters met RLU/CO-ratio's van $< 1,00$ bevatten geen DNA van *Neisseria gonorrhoeae* danwel DNA-hoeveelheden onder de detectielimiet van de assay. Deze moeten worden geïnterpreteerd als "Geen DNA van *Neisseria gonorrhoeae* gevonden". Een negatief resultaat sluit geen infectie met *Neisseria gonorrhoeae* uit omdat resultaten afhankelijk zijn van adequate monsterafname en voldoende DNA dat aangetoond kan worden.
 3. Monsters met RLU/CO-ratio's van $\geq 1,00$ en $< 2,50$ worden beschouwd als twijfelachtig. De resultaten kunnen vermoedelijk beschouwd worden als positief voor DNA van *C. Neisseria gonorrhoeae*. Herhaald testen van een nieuw monster van de patiënt of aanvullend testen door middel van een alternatieve testprocedure wordt geadviseerd in verband met de verlaagde voorspellende waarde van een positief resultaat met deze RLU/CO-waarden.*
 4. Geadviseerd wordt de positieve resultaten te bevestigen door middel van een andere methode wanneer de waarschijnlijkheid van infectie met *Neisseria gonorrhoeae* onzeker is of in twijfel wordt getrokken bij het beoordelen van andere laboratoriumbevindingen. Analytische studies met deze test hebben beperkte kruisreactiviteit met bepaalde andere DNA- sequenties getoond die een fout-positief resultaat kunnen veroorzaken. Zie Analytische specificiteit voor aanvullende informatie.
- * Tijdens de klinische evaluatie van de *digene* HC2 GC-ID DNA Test, werden 3/17 resultaten in dit twijfelachtige bereik bevestigd als positief door middel van GC-kweek; de overige 14 waren blijkbaar fout-positieven. Tijdens een verdere evaluatie bleken 5 van deze oorspronkelijk positieve monsters een eerste RLU/CO tussen 1,00 en 2,50 te hebben, waarvan er drie GCkweek positief waren. Herhaalde duplicaattests van deze drie monsters met de *digene* HC2 GC-ID DNA Test leverden

resultaten op van $\geq 1,00$ RLU/CO. De resterende 2 monsters waren negatief in de kweek en beide waren ook negatief na twee keer herhalen van de *digene* HC2 GC-ID DNA Test.

BEPERKINGEN VAN DE PROCEDURE

Raadpleeg de *Handleiding voor het Rapid Capture System* voor aanvullende beperkingen van de procedure specifiek voor het gebruik van dat systeem voor hoogvolume-monsterverwerkingstests.

- Alleen voor *in-vitro*diagnostiek
- Om betrouwbare testresultaten te krijgen moeten de *digene* HC2 GC-ID DNA Test-procedure, kwaliteitscontrole en interpretatie van monsterresultaten nauwlettend worden gevolgd.
- De *digene* HC2 GC-ID DNA Test kan alleen worden gebruikt voor cervicale monsters die zijn genomen met het *digene* HC2 DNA Collection Device en in het STM opgenomen; met cervicale monsters genomen met de HC Female Swab Specimen Collection Kit en in het STM opgenomen; of met monsters genomen met behulp van een spatelvormig hulpmiddel en in Hologic PreservCyt Solution opgenomen.
- De resultaten van deze test mogen alleen worden geïnterpreteerd in combinatie met informatie die is verkregen uit klinische evaluatie van de patiënt en uit andere procedures.
- De *digene* HC2 GC-ID DNA Test geeft kwalitatieve resultaten. De numerieke waarde (ratio) boven de voor het patiëntenmonster bepaalde grenswaarde bleek niet overeen te komen met de hoeveelheid GC DNA aanwezig in het patiëntenmonster.
- Een negatief resultaat sluit de mogelijkheid van infectie met *Neisseria gonorrhoeae* niet uit omdat detectie afhangt van het aantal organismen in het monster en kan worden beïnvloed door monsterafnamemethoden, patiëntfactoren, infectiefase en/of stam van *Neisseria gonorrhoeae*.
- De *digene* HC2 GC-ID DNA Test is niet bedoeld voor het bepalen van een geslaagde therapie.
- De *digene* HC2 GC-ID DNA Test is alleen gevalideerd voor gebruik met de automatische plaatwasser I met behulp van de in de testinstructies gespecificeerde instellingen. Dit validatieonderzoek werd intern verricht en de gegevens ter ondersteuning van het gebruik ervan staan in een bestand bij QIAGEN. Andere plaatwassers of andere plaatwasserinstellingen zijn niet acceptabel voor gebruik met de *digene* HC2 GC-ID DNA Test.
- Om de variabiliteit van de met de *digene* HC2 GC-ID DNA Test verkregen resultaten tot een minimum te beperken, is het noodzakelijk dat de test wordt verricht door laboratoriummedewerkers die een acceptabel niveau van technisch vakmanschap hebben bereikt. Elk laboratorium moet ook technische vakkundigheid met de test laten zien. Om dit te bereiken wordt voorgesteld dat in de handel verkrijgbare monstertestpanels met GC-organisme of GC DNA periodiek worden getest, in overeenstemming met de kwaliteitsprocedures.

VERWACHTE RESULTATEN

PREVALENTIE

De prevalentie van monsters positief voor *Neisseria gonorrhoeae* varieert afhankelijk van populatiekenmerken zoals leeftijd, geslacht en risicofactoren. De prevalentie van *Neisseria gonorrhoeae* verkregen in de klinische onderzoekspopulatie met behulp van de *digene* HC2 GC-ID DNA Test varieerde van 1,1% tot 13,0%. De prevalentie werd berekend op basis van de veronderstelling dat 17 monsters met twijfelachtige resultaten in het onderzoek positief waren voor GC DNA (Tabel 4). Acht van deze 17 monsters werden als positief geverifieerd door middel van GC-kweek of Polymerase Chain Reaction (PCR).

Tabel 4. Prevalentie van positieve resultaten van de *digene* HC2 GC-ID DNA Test per testlocatie.

Test-loc.	Aant. positief/Aant. getest	% Prevalentie
1	60/460	13,0
2	34/302	11,3
3	23/324	7,1
4	10/390	2,6
5	4/349	1,1
Totaal	131/1825	7,2

POSITIEF EN NEGATIEF VOORSPELLENDE WAARDEN

De hypothetische positief en negatief voorspellende waarden (PPV en NPV) voor verschillende prevalentiepercentages met behulp van de *digene* HC2 GC-ID DNA Test werden berekend met behulp van totale gevoeligheid en specificiteit afzonderlijk bepaald voor monsters afgenomen met het *digene* HC2 DNA Collection Device (cervicale borstel) en voor monsters afgenomen met de *digene* Female Swab Specimen Collection Kit (swab). Tabel 5 toont de hypothetische PPV en NPV voor borstelmonsters (totale gevoeligheid 92,6% en specificiteit 98,5%) en tabel 6 toont de hypothetische PPV en NPV voor swab-monsters (totale gevoeligheid 93,0% en specificiteit 98,8%).

Table 5. *digene* HC2 GC-ID DNA Test hypothetische voorspellende waarden bij verschillende prevalentiepercentages (Borstel).

Prevalentie-percentage (%)	Gevoeligheid (%)	Specificiteit (%)	PPV (%)	NPV (%)
5	92,6	98,5	76,5	99,6
10	92,6	98,5	87,3	99,2
15	92,6	98,5	91,6	98,7
20	92,6	98,5	76,3	99,6

Tabel 6. *digene* HC2 GC-ID Test hypothetische voorspellende waarden bij verschillende Prevalentiepercentages (Swab).

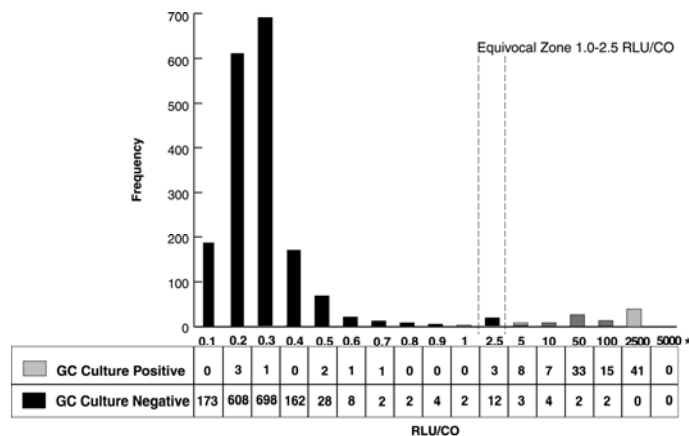
Prevalentie-percentage (%)	Gevoeligheid (%)	Specificiteit (%)	PPV (%)	NPV (%)
5	93,0	98,8	79,8	99,7
10	93,0	98,8	88,3	99,4
15	93,0	98,8	91,6	99,1
20	93,0	98,8	93,3	98,7

FREQUENTIEDISTRIBUTIE: *digene* HC2 GC-ID DNA TEST RLU/CO-RESULTATEN

De distributie van de *digene* HC2 GC-ID DNA Test RLU/CO-verhoudingen verkregen tijdens het multicentrum klinische onderzoek wordt hieronder getoond (Figuur 1). Deze gegevens hebben betrekking op alle monsters waarvoor de *digene* HC2 GC-ID DNA Test werd uitgevoerd en de GC-kweekresultaten beschikbaar waren (n = 1826). Interpretatie van resultaten werd uitgevoerd volgens de volgende criteria. Monsters met RLU/CO-waarden < 1,00 werden geacht negatief te zijn. Monsters met RLU/CO waarden \geq 2,50 werden geacht positief te zijn. Monsters met RLU/CO-waarden van \geq 1,00 en < 2,50 werden geacht twijfelachtig te zijn.

Er werd een duidelijk verschil in de RLU/CO-ratio's waargenomen tussen de positieve en negatieve resultaten van de *digene* HC2 GC-ID DNA Test. Negenennegentig procent (1676/1690) van de negatieve *digene* HC2 GC-ID DNA Test-resultaten hebben RLU/CO-waarden tussen een RLU/CO-waarde van 0,0 en 0,5. Vijf (5/1690) van de negatieve *digene* HC2 GC-ID DNA Test-resultaten hadden een RLU/CO-waarde tussen de 0,6 en 0,8. Over het geheel genomen valt minder dan één procent (< 0,9%, 17/1825) van de monsterresultaten in de twijfelachtige zone, waarvan 47% (8/17) positief waren in de GC-kweek of PCR. Negenentachtig procent (93/104) van de positieve resultaten van de *digene* HC2 GC-ID DNA Test betreft RLU/CO-waarden tussen 10 en 2500.

Figuur 1. Frequentiedistributie van de *digene* HC2 GC-ID DNA Test RLU/CO-resultaten.



*Geeft de bovenkant van het bereik aan, inclusief de vermelde waarde.

WERKINGSEIGENSCHAPPEN

RESULTATEN VAN KLINISCH ONDERZOEK PER MONSTER

digene HC2 GC-ID DNA Test-werkingseigenschappen werden bepaald door het vergelijken van de resultaten van de assay met de resultaten van Gonorrhoea-kweek. Er zijn achttien honderd vijftintig (1825) monsters getest bij patiënten op 5 verschillende locaties inclusief STD, gezinsplannings- en OB/GYN klinieken. Daarna werden PCR-tests uitgevoerd op *digene* HC2 GC-ID DNA Test-positieve/kweek-negatieve monsters. *digene* HC2 GC-ID DNA Test-resultaten werden NIET vergeleken met PCR-testresultaten en daarom had PCR geen invloed op de berekeningen van de *digene* HC2 GC-ID DNA Test-werkingseigenschappen. De resultaten van het klinisch onderzoek voor monsters afgenomen met het *digene* HC2 DNA Collection Device (cervicale borstel) worden getoond in tabel 7 en monsters afgenomen met de HC Female Swab Specimen Collection Kit (Dacron-swab) in tabel 8.

De werkingseigenschappen van de *digene* HC2 GC-ID DNA Test werden berekend met behulp van zowel een 1,0 als een 2.5 grens zonder overweging van de vermoedelijke positieve monsters die in de twijfelachtige zone vallen die wordt beschreven in het deel *Interpretatie van resultaten* van deze gebruikshandleiding. Daardoor kan de prestatie van de *digene* HC2 GC-ID DNA Test variëren in uw laboratorium afhankelijk van de distributie van waarden die binnen de twijfelachtige zone vallen en de resultaten na herhaalde tests van de vermoedelijk positieve (twijfelachtige zone) monsters. Als referentiepunt viel minder dan 0.9% van de monsters (17/1825) die werden getest tijdens het klinische multicentrum onderzoek met de *digene* HC2 GC-ID DNA Test binnen deze twijfelachtige zone. Zie de *frequentieverdeling van RLU/CO-resultaten* in het deel *verwachte resultaten van deze gebruiksaanwijzing* voor verdere informatie.

Er zijn niet voldoende gegevens verzameld om nauwkeurig te bepalen of de gevoeligheid en positief voorspelbare waarde van de *digene* HC2 GC-ID DNA Test met behulp van de *digene* Female Swab Specimen Collection Kit gelijk zijn aan die van monsters afgenomen met behulp van het *digene* HC2 DNA Collection Device. Aangezien het gebruik van het *digene* HC2 DNA Collection Device gecontra-indiceerd is bij het afnemen van cervicale monsters bij zwangere vrouwen, kan de mogelijkheid van de test om de aanwezigheid van GC DNA te bepalen verminderd zijn deze groep patiënten of wanneer een swab wordt gebruikt voor het afnemen van monsters. Prestatieramingen voor de test zijn gebaseerd op monsters bewaard bij 2-8 °C of bevroren en getest binnen 1-2 weken na het afnemen.

De klinische gevoeligheid en specificiteit van de *digene* HC2 GC-ID DNA Test voor het aantonen van die patiënten met klinisch actieve infectie die kan worden overgedragen op partners of GC-gerelateerde gevolgen is niet vergeleken met alle in de handel verkrijgbare Nucleïnezuuramplificatie (NAA)-methoden voor het opsporen van GC DNA. In klinische onderzoeken, hebben tests met een aangepaste in de handel verkrijgbare NAA-assay positiviteit aangetoond bij *digene* HC2 GC-ID DNA Test-positieve monsters verkregen uit negatieve kweek-patiënten. De geschatte gevoeligheid is gebaseerd op het aantal positieve *digene* HC2 GC-ID DNA Testresultaten gevonden bij patiënten die kweekpositief waren voor *Neisseria gonorrhoeae*. De *digene* HC2 GC-ID DNA Test-gevoeligheid kan daarom alleen worden gerelateerd aan kweek/DFA positiviteit , waarvan de gevoeligheid ligt tussen 60% en 85%.

Tabel 7. *digene* HC2 GC-ID DNA Test versus GC-kweekresultaten voor borstelmonsters. Werkingseigenschappen berekend met behulp van RLU/CO-grenswaarden van 1,0 en 2,5 worden hieronder getoond. De tussen haakjes aangegeven waarden geven de prestatie weer waarbij rekening werd gehouden met de 2,5 RLU/CO-grens. De 95% betrouwbaarheidsintervallen zijn inclusief beide bereiken waarbij de puntschattingen verschilden op elk van de geëvalueerde RLU/CO-grenswaarden.

	Loc. ²	<i>digene</i> HC2 GC-ID: Kweek: n=	POS POS	POS NEG	NEG POS	NEG NEG	Gevoeligheid	PPV	Specificiteit	NPV	<i>digene</i> HC2 GC-ID+ Culture- PCR ¹⁺
Symptomatisch											
	1	351	39 (38)	7 (3)	1 (2)	304 (308)	97,50 (95,00) 83,1-99,9	84,78 (92,68) 80,1-98,5	97,75 (99,04) 97,2-99,8	99,67 (99,35) 98,2-100	5/7 (2/3)
95% CI	2	188	13	2	4	169	76,47 50,1-93,2	86,67 59,5-98,3	98,83 95,8-99,9	97,69 94,2-99,4	1/2
95% CI	3	233	14	6 (3)	1	212 (215)	93,33 68,1-99,8	70,00 (82,5) 56,6-96,2	97,25 (98,62) 96,0-99,7	99,54 97,4-100	0 ³ /6
95% CI	4	163	4	0	0	159	100,00 39,8-100	100,00 39,8-100	100,00 97,7-100	100,00 97,7-100	NVT
	Alle	935	70 (69)	15 (8)	6 (7)	844 (851)	92,11 (90,79) 83,6-97,1	82,35 (89,61) 80,1-95,4	98,25 (99,07) 98,2-99,6	99,29 (99,18) 98,5-99,7	6³/15
95% CI											
Asymptomatisch											
	1	101	10 (9)	2	0 (1)	89	100,00 (90,00) 69,2-100	83,33 (81,82) 51,6-97,9	97,80 92,3-99,7	100,00 (98,89) 95,9-100	2/2
95% CI	2	12	2	0	0	10	100,00 15,8-100	100,00 15,8-100	100,00 69,2-100	100,00 69,2-100	NVT
95% CI	3	84	1 (0)	0	0 (1)	83	100,00 (0,00) 2,5-100	100,00 2,5-100	100,00 95,7-100	100,00 (98,81) 95,7-100	NVT
95% CI	4	226	4	2 (0)	1	219 (221)	80,00 28,4-99,5	66,67 (100,00) 39,8-100	99,10 (100,00) 98,3-100	99,55 97,5-100	1/2 NVT
95% CI	5	1	0	0	0	1	NVT NVT	NVT NVT	100,00 100,0	100,0 100,0	NVT NVT
	Alle	424	17 (15)	4 (2)	1 (3)	402 (404)	94,44 (83,33) 72,7-99,9	80,95 (88,24) 63,6-98,5	99,01 (99,51) 98,2-99,9	99,75 (99,26) 98,6-100	3/4 (2/2)
95% CI											
ALLE											
	1	452	49 (47)	9 (5)	1 (3)	393 (397)	98,00 (94,00) 89,4-100	84,48 (90,38) 79,0-96,8	97,76 (98,76) 97,1-99,6	99,75 (99,25) 98,6-100	7/9 (4/5)
95% CI	2	200	15	2	4	179	78,95 54,4-94,0	88,24 63,6-98,5	98,90 96,1-99,9	97,81 94,5-99,4	1/2
95% CI	3	317	15 (14)	6 (3)	1 (2)	295 (298)	93,75 (87,50) 69,8-99,8	71,43 (82,35) 56,6-96,2	98,01 (99,00) 97,1-99,8	99,66 (99,33) 98,1-100	0 ³ /6
95% CI	4	389	8	2 (0)	1	378 (380)	88,89 51,8-99,7	80,00 (100,00) 63,1-100	99,47 (100,00) 99,0-100	99,74 98,5-100	1/2 (NVT)
95% CI	5	1	0	0	0	1	NVT NVT	NVT NVT	100,00 2,5-100	100,00 2,5-100	NVT
	Alle	1359	87 (84)	19 (10)	7 (10)	1246 (1255)	92,55 (89,36) 85,3-97,0	82,08 (89,36) 81,3-94,8	98,50 (99,21) 98,6-99,6	99,44 (99,21) 98,9-99,8	9³/19
95% CI											

¹ Deze informatie dient alleen ter informatie; monsterresultaten werden niet verklaard met behulp van PCR.

² Locatie nummer 5 had geen borstelmonsters van symptomatische patiënten.

³ In twee gevallen werd geen PCR gedaan.

NVT = Niet van toepassing

Tabel 8. *digene* HC2 GC-ID DNA Test versus GC-kweek-resultaten voor swab-monsters. Werkingseigenschappen berekend met behulp van RLU/CO-grenswaarden van 1,0 en 2,5 worden hieronder getoond. De tussen haakjes aangegeven waarden geven de prestatie weer waarbij rekening werd gehouden met de 2,5 RLU/CO-grens. De 95% betrouwbaarheidsintervallen zijn inclusief beide bereiken waarbij de puntschattingen verschilden op elk van de geëvalueerde RLU/CO-grenswaarden.

	Loc. ²	<i>digene</i> HC2 GC-ID: Kweek: n=	POS POS	POS NEG	NEG POS	NEG NEG	Gevoeligheid	PPV	Specificiteit	NPV	<i>digene</i> HC2 GC-ID+ Culture- PCR ¹⁺
Symptomatisch											
	1	354	34 (31)	2 (3)	2 (5)	316 (315)	94,44 (87,18) 81,34-99,32	94,44 (91,18) 81,34-99,32	99,37 (99,06) 97,75-99,92	99,37 (98,44) 97,75-99,92	NVT
95% CI	2	92	13	2 (0)	1	76 (78)	92,86 66,1-99,8	86,67 (100) 75,3-100	97,44 (100) 95,4-100	98,70 (98,73) 93,2-100	0/2
95% CI	3	5	2	0	0	3	100 15,8-100	100 15,8-100	100 29,2-100	100 29,2-100	NVT
95% CI	5	162	0	3 (1)	0	159 (161)	NVT 2,5-100	0,00 2,5-100	98,15 (99,38) 96,6-100	100 97,7-100	1 ³ /3
	Alle	613	49 (46)	7 (4)	3 (6)	554 (557)	94,23 (88,46) 84,05-98,79	87,50 (92,00) 75,93-94,82	98,75 (99,29) 97,45-99,50	99,46 (98,93) 98,43-99,89	1³/5
95% CI											
Asymptomatisch											
	1	61	1	0	1	59	50,00 1,26-98,74	100 2,50-100	100 93,94-100	98,33 91,06-99,96	NVT
95% CI	2	10	2	0	0	8	100 15,8-100	100 15,8-100	100 63,1-100	100 63,1-100	NVT
95% CI	3	2	0	0	0	2	NVT NVT	NVT NVT	100 15,8-100	100 15,8-100	NVT
95% CI	4	1	0	0	0	1	NVT NVT	NVT NVT	100 2,5-100	100 2,5-100	NVT
95% CI	5	186	1	0	0	185	100 2,5-100	100 2,5-100	100 98,0-100	100 98,0-100	NVT
	Alle	260	4	0	1	255	80,00 28,36-99,49	100 39,76-100	100 98,56-100	99,61 97,84-99,89	NVT
95% CI											
ALLE											
	1	415	35 (32)	5 (3)	3 (6)	372 (374)	92,11 (84,21) 78,62-98,34	87,50 (91,43) 73,20-95,81	98,67 (99,20) 96,93-99,57	99,20 (98,42) 97,68-99,83	NVT
95% CI	2	102	15	2 (0)	1	84 (86)	93,75 69,8-99,8	88,24 (100) 63,6-100	97,67 (100) 91,9-100	98,82 (98,85) 93,6-100	0/2
95% CI	3	7	2	0	0	5	100 15,8-100	100 15,8-100	100 47,8-100	100 47,8-100	NVT
95% CI	4	1	0	0	0	1	NVT NVT	NVT NVT	100 2,5-100	100 2,5-100	NVT
95% CI	5	348	1	3 (1)	0	344 (346)	100 2,5-100	25,00 (50,00) 1,3-98,7	99,14 (99,71) 98,4-100	100 98,9-100	1 ³ /3
	Alle	873	53 (50)	10 (4)	4 (7)	806 (812)	92,98 (87,72) 83,00-98,05	84,13 (92,59) 72,75-92,12	98,77 (99,51) 97,76-99,41	99,51 (92,59) 98,74-99,87	1³/5
95% CI											

¹ Deze gegevens dienen uitsluitend ter informatie; de monsterresultaten werden niet bepaald met behulp van PCR.

² Locatie nummer 4 had geen swabmonsters van symptomatische patiënten.

³ In twee gevallen werd geen PCR gedaan.

NVA = Niet van toepassing

REPRODUCEERBAARHEID

Als onderdeel van de klinische multicentrum trial werd een reproduceerbaarheidsonderzoek uitgevoerd voor het bepalen van de assay-tot-assay, dag-tot-dag, locatie-tot-locatie en totale reproduceerbaarheid van de *digene* HC2 GC-ID DNA Test met behulp van een panel samengesteld uit *Neisseria gonorrhoeae* DNA-targets en *digene* HC2 GC-ID DNA Test-positieve en *digene* HC2 GC-ID DNA Test-negatieve klinische monsters.

Een uit 10 monsters bestaand panel van gedenatureerde klinische en niet-klinische monsters, samengesteld uit 8 positieve monsters en 2 negatieve monsters, werd getest in zesvoud, tweemaal daags gedurende een periode van drie dagen op elk van vier locaties (3 externe locaties en QIAGEN). Elke locatie leverde 36 gegevenspunten voor elk geteste monster. Alle monsters werden gedenatureerd en bevroren bewaard voorafgaand aan het testen. 100% overeenkomst werd gevonden voor de 1152 verwachte positieve resultaten (1152/1152) en 100% overeenkomst voor de 288 verwachte negatieve resultaten (288/288). De algehele overeenkomst was 100% (1440/1440), met een 95% betrouwbaarheidsinterval van 99,7-100 en een kappa van 1,00. Er werd geen significante assay-tot-assay, dag-tot-dag of locatie-tot-locatie variabiliteit waargenomen; daarom werden de gegevens van alle assays op elke locatie gecombineerd, zoals hieronder weergegeven (tabel 9).

Tabel 9. Reproduceerbaarheid van de *digene* HC2 GC-ID DNA Test in een multicentrum trial.

Target Nummer	Loc. 1		Loc. 2		Loc. 3		Loc. 4		Totaal		
	\bar{X} RLU /CO	% Over-eenk.	\bar{X} RLU /CO	% Over-eenk.	\bar{X} RLU /CO	% Over-eenk.	\bar{X} RLU /CO	% Over-eenk.	\bar{X} RLU /CO	Opgemerkt/ verwacht	% Over-eenk.
1	2,5	100	2,1	100	2,7	100	2,6	100	2,5	144/144	100
2	4,8	100	4,2	100	5,0	100	5,2	100	4,8	144/144	100
3	29,4	100	23,3	100	30,1	100	30,4	100	28,3	144/144	100
4	51,5	100	43,0	100	52,1	100	54,1	100	50,2	144/144	100
5	2,5	100	2,0	100	2,5	100	2,5	100	2,4	144/144	100
6	4,7	100	3,5	100	4,9	100	4,8	100	4,5	144/144	100
7	14,0	100	10,6	100	13,9	100	14,1	100	13,2	144/144	100
8	16,7	100	12,7	100	17,4	100	18,2	100	16,3	144/144	100
9	0,2	100	0,2	100	0,2	100	0,2	100	0,2	144/144	100
10	0,2	100	0,2	100	0,2	100	0,2	100	0,2	144/144	100
TOTAAL										1440/1440	100

Op drie externe locaties werd een tweede vakkundigheids-/reproduceerbaarheidsonderzoek uitgevoerd met behulp van het volledige *Neisseria gonorrhoeae* (GC) organisme verdund in een gesimuleerde klinische monstrematrix van epitheliale cellen. De 25 geteste monsters bevatten vertegenwoordigers van negatieve, lage (op of in de buurt van de detectielimiet) en gemiddelde positieven met 2 GC-stammen, gemengde infecties met *Chlamydia trachomatis* (CT) en monsters die bloed bevatten. Van twaalf monsters werd verwacht dat ze positief zouden zijn en van dertien monsters werd verwacht dat ze negatief zouden zijn. De procentuele overeenkomst tussen gevonden en verwachte resultaten van de *digene* HC2 GC-ID DNA Test op de drie afzonderlijke locaties en voor alle locaties gezamenlijk worden getoond in tabel 10. Gevoeligheid, specificiteit, overeenkomst en kappa-waarden voor elke locatie zijn opgenomen in tabel 11.

Tabel 10. *digene* HC2 GC-ID DNA Test % overeenkomst per locatie.

Loc.	Geobserveerd vs. Verwacht	% Overeenkomst*
1	25/25	100% (86,28%-100%)
2	25/25	100% (86,28%-100%)
3	25/25	100% (86,28%-100%)
Combineer locaties	75/75	100% (95,20%-100%)

* Cijfers tussen haakjes tonen 95% betrouwbaarheidsintervals.

Tabel 11. Resultaten van de *digene* HC2 GC-ID DNA Test-samenvattingsstatistiek (Grens 1,0).

Statistische meting	Loc. 1	Loc. 2	Loc. 3	Totaal
Gevoeligheid	100% (73,54%-100%)*	100% (73,54%-100%)	100% (73,54%-100%)	100% (90,26%-100%)
Specificiteit	100% (75,29%-100%)	100% (75,29%-100%)	100% (75,29%-100%)	100% (90,97%-100%)
Overeenkomst	100% (86,28%-100%)	100% (86,28%-100%)	100% (86,28%-100%)	100% (95,20%-100%)
K	1,0	1,0	1,0	1,0

*Cijfers tussen haakjes gaven 95% betrouwbaarheidsintervallen aan.

Bij routinevakbekwaamheidstest zouden de 12 twijfelachtige monsters gepresenteerd in Tabel 10, die allemaal lage concentraties van GC-organismen ($\sim 5 \times 10^4$ organismen/ml) bevatten, worden geïnterpreteerd volgens het deel *Interpretatie van resultaten* van deze gebruikshandleiding als vermoedelijk positief. De assay heeft daarom het vermogen aangetoond GC DNA op te sporen in monsters met organismeconcentraties op of bij de detectiegrens van de assay. Aanvullend bewijs hiervoor werd verkregen na het testen van een beschikbaar panel dat monsters bevatte met lage aantallen organismen in een bereik bedoeld om opgemerkt te worden door nucleïnezuuramplificatie-assays. De Test uitgevoerd op drie externe locaties en bij QIAGEN leverde 100% positieve (of vermoedelijk positieve) resultaten voor het monster in het panel dat GC-organisme bevatte. In twee gevallen vielen de RLU/CO-waarden in de twijfelachtige zone van de assay (zie onderstaande Tabel 12).

Tabel 12. Resultaten van CT en GC monsterpanel.

<i>digene</i> HC2 GC-ID DNA Test-resultaat			
Loc.	RLU/CO	Interpretatie	Verwacht resultaat
1	0,12	NEG	NEG
	10,45	POS	POS
	10,26	POS	POS
	9,74	POS	POS
	0,14	NEG	NEG
2	0,09	NEG	NEG
	9,31	POS	POS
	9,93	POS	POS
	9,69	POS	POS
	0,09	NEG	NEG
3	0,11	NEG	NEG
	11,00	POS	POS
	12,08	POS	POS
	9,45	POS	POS
	0,10	NEG	NEG
4	0,07	NEG	NEG
	8,54	POS	POS
	7,27	POS	POS
	8,09	POS	POS
	0,08	NEG	NEG

Nauwkeurigheid

Op drie locaties werd een nauwkeurigheidsonderzoek verricht om de binnen-assay en volledige nauwkeurigheid van de *digene* HC2 GC-ID DNA Test te bepalen met behulp van een panel van positieve en negatieve gemaskeerde, gesimuleerde klinische monsters. Daarnaast werd met behulp van hetzelfde panel de intra- en inter-instrumentnauwkeurigheid gecheckt met twee afzonderlijke luminometers. De twee luminometermodellen omvatten de DML 2000, die één van de aanbevolen luminometers is voor gebruik met de *digene* HC2 CT/GC DNA Test en de MLX-luminometer; de MLX, die niet meer verkrijgbaar is, was een van de luminometermodellen die werd gebruikt tijdens de klinische evaluatie. Eén van de drie locaties ondervond problemen met andere *digene* HC2 DNA Tests die werden uitgevoerd als onderdeel van dit onderzoek die toe te schrijven waren aan assay-techniek zeer waarschijnlijk door verkeerde of onvoldoende training. Hoewel de resultaten van de nauwkeurigheidstest van de *digene* HC2 GC-ID DNA niet beïnvloed werden, kreeg de analist die de tests uitvoerde een nieuwe training in de juiste assay-techniek.

Tabel 13 toont de prestatie van de *digene* HC2 GC-ID DNA Test voor alle locaties bij elkaar (inclusief de locatie waar technische problemen waren, voordat de analist opnieuw opgeleid werd in de juiste assay-techniek). De assay toonde equivalente precisie na hertraining van de analist. Voor panellid 3 (dat lage concentraties van CT-organisme bevatte), bevonden de RLU/CO-waarden zich binnen of bij de twijfelachtige zone van de assay van 1,0 - 2,5. Ten behoeve van deze gegevensanalyses, werden alle RLU/CO-waarden die binnen de twijfelachtige zone vielen of 2,5 overschreden geïnterpreteerd als positief. Hoewel niet duidelijk in deze tabel waren de kwalitatieve resultaten voor 100% (54/54) (93,4%-100% 95%CI) in overeenstemming met de verwachte resultaten op de drie locaties.

Tabel 13. Binnen-instrument, tussen-instrument, binnen-assay, totale nauwkeurigheidsschattingen voor RLU/CO per test en target.

Panel-lid	n.	Gemiddeld RLU/C O	Binnen instrument		Tussen instrument		Binnen Assay		Totaal	
			Stan-daard afwijking (SD)	(%CV)	(SD)	(%CV)	(SD)	(%CV)	(SD)	(%CV)
1	54	0,0974	0,0104	10,6818	0,0017	1,7328	0,0275	28,2556	0,0275	28,1978
2	54	0,0967	0,0111	11,5031	0,0015	1,5618	0,0338	34,9362	0,0342	35,4230
3	54	3,2335	0,1502	4,6462	0,0356	1,0997	0,3520	10,8869	0,3866	11,9551
4	54	3,8407	0,2078	5,4092	0,0525	1,3671	0,3401	8,8541	0,3487	9,0802
5	54	16,1676	1,0507	6,4986	0,1122	0,6940	2,1788	13,4766	2,1437	13,2589
6	54	18,0704	1,0539	5,8321	0,3456	1,9124	2,3701	13,1158	2,3316	12,9027

Ten behoeve van deze gegevensanalyses, werden alle RLU/CO-waarden die binnen de twijfelachtige zone vielen of 2,5 overschreden geïnterpreteerd als positief. Een extra nauwkeurigheidsonderzoek werd uitgevoerd bij QIAGEN om de totale nauwkeurigheid van de *digene* HC2 GC-ID DNA Test te bepalen met behulp van de DML 2000. Een uit zes monsters bestaand nauwkeurigheidspanel werd bereid met behulp van een gesimuleerde klinische monstermatrix samengesteld uit epitheliale cellen op kweek gesuspenseerd in *digene* Specimen Transport Medium (STM) en bestaand uit twee negatieve monsters, twee laagpositieve monsters en twee middenniveaumonters, allemaal een hulpmiddel voor borstelafname bevattend. Elk panel werd in de loop van 5 dagen drie keer getest, twee panels per plaat, door twee technici. Per plaat werd een pas gedenatureerd panel gebruikt. De totale nauwkeurigheidresultaten voor de *digene* HC2 GC-ID DNA Test samengesteld voor alle vijf de testdagen worden getoond in Tabel 14. Hoewel niet duidelijk in deze tabellen, was de kwalitatieve interpretatie van resultaten 100% in overeenstemming met het verwachte resultaat (120/120; 96,97-100% 95% CI), bij gebruik van een RLU/CO van 1,0.

Tabel 14. Totale precisie voor *digene* HC2 GT-ID DNA Test.

Panel-lid	n.	Gemiddelde RLU/CO	SD	CV%	Gemiddelde - 2xSD	Gemiddelde +2xSD
1	120	0,11	0,0361	32,28	0,04	0,18
2	120	0,11	0,0283	26,45	0,05	0,16
3	120	3,03	0,3212	10,62	2,38	3,67
4	120	4,06	0,4151	10,23	3,23	4,89
5	120	14,41	2,2239	15,44	9,96	18,85
6	120	13,34	1,7298	12,97	9,88	16,80

NAUWKEURIGHEID BIJ PRESERVCYT-MONSTERS

Een multicentrum studie werd uitgevoerd om de nauwkeurigheid van de assay per laboratorium en per dag te bepalen als PreservCyt Solution-monsters worden getest. Op twee locaties buiten QIAGEN werd een twaalfdelig panel getest bestaande uit gesimuleerde patiëntenmonsters die in PreservCyt Solution waren afgenomen. In elk laboratorium werd het panel in drievoud getest, tweemaal per dag gedurende drie dagen waarbij reagentia uit dezelfde productieserie werden gebruikt. Het twaalfdelig panel bestaande uit gesimuleerde monsters in PreservCyt Solution werd bereid met variërende hoeveelheden GC (auxotype 22; ATCC 27631) om een panel tot stand te brengen zoals in tabel 15 wordt getoond.

Tabel 15. Gesimuleerde nauwkeurigheidspanel van monsters in PreservCyt Solution voor het testen met *digene* HC2 GC-ID DNA.

Bulk monster	Panelleden*	Verwacht resultaat <i>digene</i> HC2 GC-ID DNA Test	Geschatte RLU/CO
A	1P, 2P, 7P, 8P	Laag GC-positief	~5
B	3P, 4P, 9P, 10P	Middel GC-positief	~10
C	5N, 11N	Negatief	~0.20
D	6N, 12N	Negatief	~0.20

*Aanduiding van het monster geeft bekende status *Neisseria gonorrhoeae* aan [positief (P) of negatief (N)]

Voor de data-analyse werden de panelleden die van hetzelfde bulk monster afkomstig waren, gecombineerd.

Tabel 16. Kwalitatieve resultaten uit procedure met bulk monster - *digene* HC2 GC-ID DNA Test

Pool bulk monster	GC-positief n (%)	Twijfelachtig N (%)	Negatief n (%)	Totaal
Negatief (5N, 11N)	0 (0,0)	0 (0,0)	108 (100)	108
Negatief (6N, 12N)	0 (0,0)	0 (0,0)	108 (100)	108
Totaal negatief	0 (0,0)	0 (0,0)	216 (100)	216
Laag positief (1P, 2P, 7P, 8P)	216 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	216
Middel positief (3P, 4P, 9P, 10P)	216 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	216
Totaal positief	432 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	432

Tabel 17. Standaarddeviaties (SD) en variatiecoëfficiënten (CV) voor nauwkeurigheid per laboratorium en per dag: *digene* HC2 GC-ID DNA Test in PreservCyt

Monster	N	Gemiddelde RLU/CO	SD binnen-run	SD tussen-run	SD tussen-dag	SD tussen-locatie	Totaal SD	%CV
Negatief (5N, 11N)	108	0,201	0,037	0,019	0*	0,032	0,052	25,9
Negatief (6N, 12N)	108	0,198	0,055	0,016	0,019	0,021	0,064	32,3
GC Middel positief (3P, 4P, 9P, 10P)	216	7,981	0,906	1,203	0	0,243	1,526	19,1
GC Laag positief (1P, 2P 7P, 8P)	216	4,648	0,675	0,478	0,308	0	0,883	19,0

*Negatieve variantiecomponenten waren op nul ingesteld.

ANALYTISCHE GEVOELIGHEID

De analytische gevoeligheid (detectielimiet) van de *digene* HC2 GC-ID DNA Test werd bepaald door het direct testen van verdunningen van een monsterpanel dat bestond uit 114 afzonderlijke isolaten van *Neisseria gonorrhoeae*. De 114 isolaten vertegenwoordigden 13 auxotypes, 5 serovars, 10 antibiotica-resistente stammen, 6 plasmideloze stamisolaten en 2 niet-gekenmerkte isolaten die in tegenstrijd bleken te zijn in de multicentrum trial. Vierpuntsverdunningsseries van elk van de isolaten werden eenmaal getest met behulp van de *digene* HC2 GC-ID DNA Test voor het bepalen van de detectielimieten voor de test. De detectielimiet voor elk *Neisseria auxotype* is samengevat in tabel 18. Het vermelde waarneembare limietbereik was de verdunning van elk auxotype dat een signaal; gaf binnen of in de buurt van de twijfelachtige zone van 1,0-2,5 RLU/CO.

De analytische gevoeligheid van de *digene* HC2 GC-ID DNA Test varieerde van 25 tot 50.000 CFU/assay voor de 114 geteste *Neisseria*-isolaten, inclusief auxotypes, serovars, plasmideloze en antibiotica-resistente stammen. Slechts één van de zes plasmideloze stammen en één van de vijf geteste *Neisseria gonorrhoeae* IA-5 serovars werden waargenomen bij 50.000 CFU/assay; geen van de andere 112 isolaten werden waargenomen in concentraties van meer dan 5000 CFU/assay. De gemiddelde detectielimiet voor alle 114 isolaten varieerde van 974 tot 2887 CFU/assay wanneer rekening wordt gehouden met isolaatverdunningen die zowel binnen de twijfelachtige zone van de assay als boven 2,5 RLU/CO vielen. De totale gemiddelde detectielimiet was 1931 CFU/assay ($3,8 \times 10^4$ CFU/ml). Klinische monsters die organismen bevatten op of in de buurt van de detectielimiet moeten mogelijk opnieuw worden getest door middel van een andere testprocedure of op een nieuw monster van de patiënt zoals beschreven in het deel Interpretatie van resultaten van deze gebruikshandleiding.

Tabel 18. Samenvatting van opmerkbare gevoeligheidslimieten voor GC Auxotypes, serovars, plasmideloze en antibiotica-resistente stammen.

Auxotype	Waarneembare concentratie	
	CFU/ml	CFU's/assay
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotype 1	1000	50
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotype 12	500-5000	25 - 250
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotype 16	10 ³ -10 ⁴	50 - 500
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotype 22	10 ⁴ -10 ⁵	500 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotype 5	500-5000	25 - 250
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotype 9	5 x10 ⁴	2500
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotype AHU (5 isolaten)	10 ⁴ -10 ⁵	500 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotype AHU (5 isolaten)	10 ⁴ -10 ⁵	500 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotype AHU (5 isolaten)	10 ³ -10 ⁴	50 - 500
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotype AHU (5 isolaten)	10 ³ -10 ⁵	50 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotype AHU (5 isolaten)	10 ⁴ -10 ⁵	500 - 500
<i>N. gonorrhoeae</i> Auxotype Proto (5 isolaten)	10 ³ -10 ⁴	50 - 500
<i>N. gonorrhoeae</i> Ciprofloxacin Tussenproduct (Cipl) (5 isolaten)	10 ³ -10 ⁵	50 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Ciprofloxacin-resistent (Cip R) (4 isolaten)	10 ³ -10 ⁴	50 - 500
<i>N. gonorrhoeae</i> CMRNG (5 isolaten)	10 ⁴ -10 ⁵	50 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Ander -5423	10 ⁴ -10 ⁵	50 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Ander -5658	10 ³ -10 ⁴	50 - 500
<i>N. gonorrhoeae</i> PenR (5 isolaten)	10 ⁴ -10 ⁵	500 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> PenR (5 isolaten)	10 ³ -10 ⁶	50 - 50 000
<i>N. gonorrhoeae</i> Plasmideloze stammen (6 isolaten)	10 ⁴ -10 ⁵	500 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> PPNG 3.05 (5 isolaten)	10 ⁴ -10 ⁵	500 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> PPNG 3.2	10 ³ -10 ⁵	50 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> PPNG 4.4 (4 isolaten)	10 ⁴ -10 ⁵	500 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Serovar I A-1 of IA-2 (5 isolaten)	10 ⁴ -10 ⁶	500 - 50 000
<i>N. gonorrhoeae</i> Serovar I A-5 (4 isolaten)	10 ³ -10 ⁴	50 - 500
<i>N. gonorrhoeae</i> Serovar I B-1 (5 isolaten)	10 ³ -10 ⁵	50 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Serovar I B-4 of IB-15 (5 isolaten)	10 ³ -10 ⁵	50 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Spectinomycine-resistent (SpecR)	10 ⁵	5000
<i>N. gonorrhoeae</i> TetR (5 isolaten)	10 ³ -10 ⁵	50 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> TRNG Amerikaans (5 isolaten)	10 ⁴ -10 ⁵	500 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> TRNG Nederlands (5 isolaten)	10 ⁴ -10 ⁵	500 - 5000
<i>N. gonorrhoeae</i> Type Stam	500-5000	25 - 250

AANVULLENDE OPMERKINGEN BIJ PRESERVCYT-MONSTERS

De studies naar detectielimieten die in het voorgaande zijn beschreven voor STM, zijn niet herhaald met monsters in PreservCyt Solution, omdat wordt verwacht dat de analytische gevoeligheid van de assay geen verband houdt met het monstertype in STM of PreservCyt Solution, met name omdat monsters in PreservCyt Solution onderhevig zijn aan een conversieprocedure (raadpleeg de gebruiksaanwijzing bij de Sample Conversion Kit van *digene* HC2 voor details) waardoor monsters in PreservCyt Solution qua samenstelling op STM-monsters gaan lijken, voordat deze worden gebruikt in de *digene* HC2 GC-ID DNA Test.

Omdat een monster in PreservCyt Solution tijdens de conversieprocedure gecentrifugeerd moet worden, was het niettemin noodzakelijk om alle mogelijke invloeden van de centrifuge op de analytische gevoeligheid van de *digene* HC2 GC-ID DNA Test te evalueren. Om de mogelijke invloed van de centrifuge op de analytische gevoeligheid te bepalen, werden achtentachtig (88) sets bereid met *Neisseria gonorrhoeae*-DNA-negatieve monsters in STM en PreservCyt Solution met gelijke hoeveelheden *N. gonorrhoeae*-organisme (plasmideloze stam NRL 33151). De gepaarde monsters werden getest en de analytische gevoeligheid werd bepaald door de verkregen gemiddelde RLU/CO-waarden te vergelijken [(PreservCyt:STM) x 100].

Tabel 19. Vergelijking van analytische gevoeligheid - *digene* HC2 GC-ID DNA Test – gepaarde monsters in PreservCyt Solution (PC) en STM.

	<i>digene</i> HC2 GC-ID DNA Test		PC:STM RLU/CO
	STM	PreservCyt	
Aantal monsters	88	88	-
Gemiddelde RLU/CO	3,97	4,91	1,24
RLU/CO Mediaan	4,01	4,93	1,23
Standaarddeviatie	0,34	1,00	-
Minimum RLU/CO	3,06	2,30	-
Maximum RLU/CO	4,77	7,10	-

In een aanvullende studie werd een vergelijkbare vergelijking gemaakt met gepaarde, gesimuleerde patiëntenmonsters. Patiëntenmonsters in PreservCyt-oplossing werden verkregen van een externe locatie van QIAGEN en gescreend met de *digene* HC2 GC-ID DNA Test om positieve monsters te identificeren. Deze positieve patiëntenmonsters werden vervolgens gecombineerd om in totaal 10 geconcentreerde PreservCyt-monster pools te vormen. Uit deze pools werden twee aliquots bereid en verwerkt om cellpellets te vormen. De cellpellets werden geresuspendeerd in phosphate buffered saline (PBS). Aliquot A werd bereid door het geresuspendeerde pellet toe te voegen aan STM en aliquot B werd bereid door het geresuspendeerde pellet toe te voegen aan PreservCyt. Beide aliquots werden getest met de *digene* HC2 GC-ID DNA Test en leverden de volgende resultaten op:

Tabel 20. Vergelijking van analytische gevoeligheid - *digene* HC2 GC-ID DNA Test – gesimuleerde (gepoolde) patiëntenmonsters in PreservCyt Solution (PC) gepaard aan STM.

	<i>digene</i> HC2 GC-ID DNA Test		PC: STM RLU/CO
	STM	PreservCyt	
Aantal monsters	10	10	-
Gemiddelde RLU/CO	4,80	4,32	0,90
RLU/CO Mediaan	2,66	2,47	0,93
Standaarddeviatie	5,44	5,08	-
Minimum RLU/CO	1,16	1,02	-
Maximum RLU/CO	18,97	17,26	-

ANALYTISCHE SPECIFICITEIT

Een panel van bacteriën, virussen, plasmiden en humaan celmateriaal of bloedproducten die aangetroffen kunnen worden in het vrouwelijke anogenitale kanaal werd getest op kruisreactiviteit met de *digene* HC2 GC-ID DNA Test. Alle micro-organismen werden getest in concentraties van 10^5 en 10^7 organismen of CFU per ml en indien mogelijk met 10^9 organismen of CFU per ml, tenzij hieronder anders aangegeven. Gezuiverd DNA van virussen en plasmiden werd getest in een verscheidenheid aan concentraties zoals hieronder aangegeven.

Hieronder volgt een lijst met de geteste bacteriën.

<i>Acinetobacter anitratus</i>	<i>Neisseria caviae</i> (2 isolaten) ^e
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Neisseria cuniculi</i> (3 isolaten) ^f
<i>Acinetobacter Iwoffii</i>	<i>Neisseria cinera</i> (6 isolaten)
<i>Achromobacter xerosis</i>	<i>Neisseria flavescens</i> (4 isolaten)
<i>Actinomyces israelii</i>	<i>Neisseria species</i> ^g *
<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Neisseria lactamica</i> (6 isolaten) ^d
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i> (Groep A, B, C, W135, Y)
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Neisseria mucosa</i> (6 isolaten) ^d
<i>Bacteroides melaninogenicus</i>	<i>Neisseria polysaccharea</i>
<i>Branhamella catarrhalis</i> (6 isolaten)	<i>Neisseria sicca</i> (6 isolaten)
<i>Candida albicans</i>	<i>Neisseria subflava</i>
<i>Candida glabrata</i>	<i>Neisseria subflava biovar flava</i> (5 isolaten)
<i>Chlamydia pneumoniae</i> ^b	<i>Neisseria subflava biovar perflava</i> (4 isolaten) ^h
<i>Chlamydia psittaci</i> ^e (2 stammen)	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i> ^b (serovar B, Ba, E, J, L3) ^c	<i>Peptostreptococcus asaccharalyticus</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Peptostreptococcus productus</i>
<i>Enterococcus avium</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>Escherichia coli</i> (Clinisch isolaat) [†]	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^a
<i>Escherichia coli</i> (HB101) [†]	<i>Salmonella minnesota</i>
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Gemella heamolysans</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (ProtA +)
<i>Haemophilus ducreyi</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i> (Grp B)
<i>Kingella denitrificans</i> ^d	<i>Streptococcus pyogenes</i> (grp A)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Streptomyces griseus</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Treponema pallidum</i>
<i>Mobiluncus curtisii</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i> ⁱ
<i>Mobiluncus mulieris</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
<i>Moraxella lacunata</i>	
<i>Mycoplasma hominis</i>	
<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	

Geteste concentraties (organismen/ml of CFU/ml voor *Neisseria* species):

^a 5×10^6 , 5×10^7 , 5×10^8 , 8×10^4 , 8×10^6 , 8×10^8 , 9×10^4 , 9×10^6 , 9×10^8

^b 2×10^5 , 2×10^7 en 2×10^8

^c 1×10^5 , 1×10^7 en 1×10^8

^d 5×10^6 , 5×10^7 , 5×10^8

^e $1,1 \times 10^5$, $1,1 \times 10^7$, $1,1 \times 10^9$

^f $9,7 \times 10^5$, $9,7 \times 10^6$, $9,7 \times 10^8$

^g 2×10^7 , 2×10^8 en 2×10^9

^h $4,8 \times 10^4$, $4,8 \times 10^6$, $4,8 \times 10^8$

ⁱ 1×10^5 en 1×10^6

† Zowel de *E. coli* stam gebruikt voor het kweken van plasmiden (HB101) als een klinisch isolaat van *E. coli* werden getest.

*ATCC *Neisseria* stam die kenmerken heeft van zowel *Neisseria gonorrhoeae* als *Neisseria meningitidis* (ATCC #43831).

Alle andere bacteriën dan *Neisseria gonorrhoeae* die men kan aantreffen in het urogenitale kanaal, met uitzondering van de drie commensale *Neisseria*-stammen en *Chlamydia psittaci*, testten negatief bij de *digene* HC2 GC-ID DNA Test. Alleen matige kruisreactiviteit die geïnterpreteerd zou worden als vermoedelijk positief werd opgemerkt bij *Chlamydia psittaci* en *Neisseria lactamica*. Een dergelijke kruisreactiviteit mag niet van invloed zijn op de interpretatie van *digene* HC2 GC-ID DNA Test-resultaten van urogenitale monsters. Organismen die enige mate van kruisreactiviteit hebben getoond zijn:

	Interpretatie	Concentratie waarop kruisreactiviteit werd opgemerkt
<i>Chlamydia psittaci</i> (1 van 2 isolaten)	Vermoedelijk positief*	1 x 10 ⁷ organismen/ml
<i>Neisseria lactamica</i> (1 van 6 isolaten)	Vermoedelijk positief*	1 x 10 ⁹ CFU/ml
<i>Neisseria meningitidis</i> (Groep Y, 1 van 2 isolaten)	Positief	1 x 10 ⁷ CFU/ml
<i>Neisseria mucosa</i> (1 van 6 isolaten)	Positief	5 x 10 ⁵ CFU/ml

* RLU/CO viel binnen de twijfelachtige zone van de assay van 1,00 tot 2,50.

De drie commensale *Neisseria* stammen, *N. lactamica*, *N. meningitidis* en *N. mucosa*, worden allemaal primair aangetroffen in de nasofarynx en het bovenste luchtwegstelsel. Zij worden zelden, of helemaal niet, geïsoleerd uit het urogenitale systeem.^{13,14} Bovendien werd het kruisreactieve groep Y *Neisseria meningitidis* isolaat bepaald als lipopolysaccharide niet-typeerbaar en wordt zelden aangetroffen bij de algemene populatie. *Chlamydia psittaci* kan worden gevonden op de huid van mensen die met vogels werken of ze hanteren, maar is niet waargenomen in het anogenitale kanaal.¹⁵

Bovendien waren niet alle isolaten van de specifieke stam kruisreactief met de *digene* HC2 GC-ID DNA Test, waardoor de waarschijnlijkheid op een fout-positief resultaat wanneer die stam aanwezig is, uiterst klein is. Vijf van de zes geanalyseerde *N. lactamica* of *N. mucosa* isolaten testten bijvoorbeeld negatief in de *digene* HC2 CT/GC DNA Test evenals één van de twee geteste *Chlamydia psittaci* stammen. Daarom wordt niet verwacht dat de kruisreactiviteit van de *digene* HC2 GC-ID DNA Test opgemerkt bij de drie commensale *Neisseria* stammen en *Chlamydia psittaci* zouden leiden tot een verkeerde klinische interpretatie van een positief resultaat bij het testen van anogenitale monsters.

Hieronder volgt een lijst met de geteste virale DNA, plasmide-DNA en humaan celmateriaal of bloedproducten:

Cytomegalovirus ^a	Humaan Papillomavirus type 6 ^f
Epstein-barr-virus ^b	Humaan Papillomavirus type 11 ^f
Hepatitis B Oppervlakte-antigeen-positief serum ^c	Humaan Papillomavirus type 16 ^f
Herpes Simplex I ^d	Humaan Papillomavirus type 18 ^f
Herpes Simplex II ^d	pBR322 ⁱ
Humaan immunodeficiëntievirus (HIV) ^{b,g}	SV40 ^j
Humaan genoom DNA ^e	PGEM [®] 3Z ⁱ
Humaan placentair DNA ^e	PGEM [®] 3Zf(-) ⁱ
Humaan volledig bloed ^h	Humane epitheliale cellen ^k

Geteste concentraties:

^a 1 x 10⁵, 1 x 10⁷, 1 x 10⁹ virale deeltjes/ml

^b 1 x 10⁵, 1 x 10⁷, 1 x 10⁸ virale deeltjes/ml

^c 2,9 x 10⁸, 1,1 x 10⁹ virale deeltjes/ml

^d 6,1 x 10⁶, 2,4 x 10⁷ virale deeltjes/ml

^e 2,7 x 10², 1,1 x 10³ kopieën/ml

^f 1,1 x 10⁸, 4,6 x 10⁸ virale deeltjes/ml

^g 2 x 10⁶, 2 x 10⁷, 2 x 10⁸ virale deeltjes/ml

^h 5%, 10%, 50%

ⁱ 2,1 x 10⁸, 8,3 x 10⁸ kopieën/ml

^j 1 ng/ml, 4 ng/ml

^k 1 x 10⁵, 1 x 10⁶, 1 x 10⁷ cellen/ml

Geen van de geteste virussen toonde kruisreactiviteit met de *digene* HC2 GC-ID DNA Test; kruisreactiviteit werd echter opgemerkt met plasmiden pBR322, pGEM[®] 3Z, en pGEM[®] 3Zf(-). Alle andere geteste DNA-preparaten, inclusief humaan DNA, waren negatief. Humaan bloed en epitheliale cellen vertoonden geen kruisreactie met de *digene* HC2 GC-ID DNA Test. Als gevolg van de wijze waarop de GC probe wordt geprepareerd is kruisreactiviteit tussen pBR322 en de *digene* HC2 GC-ID DNA Test niet onverwacht. De aanwezigheid van pBR322 homologe sequenties is gemeld in humane genitale monsters en er kunnen fout-positieve resultaten optreden in aanwezigheid van hoge bacteriële plasmidenspiegels. Geen van de monsters uit de 103 geteste uit een Amerikaans multicentrum klinisch onderzoek die positief bleken voor *Neisseria gonorrhoeae* met de *digene* HC2 GC-ID DNA Test werd echter geïdentificeerd als foutpositief als gevolg van kruisreactieve pBR322 sequenties. Daardoor lijkt de waarschijnlijkheid van foutnegatieve resultaten van de *digene* HC2 GC-ID DNA Test bij klinische monsters veroorzaakt door kruisreactiviteit met homologe pBR322 sequenties laag te zijn. Hoewel de *digene* HC2 GC-ID DNA Test het vermogen heeft een kruisreactie te tonen met *Chlamydia psittaci*, pBR322, pGEM en verschillende commensale *Neisseria* *monsters* species, is de waarschijnlijkheid dat deze organismen de interpretatie van de test beïnvloeden klein, zoals aangetoond in het multicentrum klinische onderzoek.

HOMOLOGIE VAN PROBES OP TOTALE PLASMIDE EN GENOOM DNA

De genome probes zijn homoloog tot ongeveer 0,5% van het *Neisseria gonorrhoeae* genoom. Een specificatie voor elke probe in de *digene* HC2 GC-ID DNA Test volgt:

Probe	Type	Ong. insertie Maat (bp)	% Genoom
pGC1	Genoom	6.400	0,34%
pGC2		3.300	0,17%
		9.700 (Totaal)	0,51%
pGC3	Cryptische plasmide	4.200	NVT*

*Dit vertegenwoordigt de volledige sequentie van de probe.

EFFECT VAN BLOED EN ANDERE STOFFEN OP STM-MONSTERS

Het effect van bloed en andere mogelijk storende gedefinieerde stoffen werd geëvalueerd in de *digene* HC2 GC-ID DNA Test. Volledig bloed en één commercieel merk douche, antischimmelcrème en anticonceptiegel (stoffen die gewoonlijk worden aangetroffen in cervicale monsters) werden aan positieve monsters toegevoegd (klinische monster-pools) in concentraties die men kan aantreffen in cervicale monsters (zie tabel 21). Bij geen van de vier stoffen werden in geen enkele concentratie foutpositieve resultaten waargenomen. Een onderzoek van niet-geïdentificeerde stoffen aanwezig bij een populatie van 100 negatieve klinische monsters heeft aangetoond dat niet-gedefinieerde stoffen het produceren van een positief signaal binnen de *digene* HC2 GC-ID DNA Test niet lijken te hinderen in vergelijking met het signaal dat wordt geproduceerd bij het testen op GC organisme in STM.

Tabel 21. Effect van storende stoffen op testresultaten.

		<i>digene</i> HC2 GC-ID DNA Test-resultaat				Specimen Transport Media	
Raakvlak Stof	Conc.	Gepoolde klinische monsters		Positief*		Positief*	
		RLU/CO	Opgemerkt	RLU/CO	Opgemerkt	RLU/CO	Opgemerkt
Geen (Kwaliteitscontrole)		0,15	NVT	3,41	NVT	2,70	NVT
Bloed	1%	0,21	+37%	3,17	-7%	3,21	+19%
	5%	0,19	+22%	3,11	-9%	3,05	+13%
Douche	1%	0,21	+37%	3,48	+2%	2,80	+4%
	5%	0,18	+20%	3,47	+2%	3,20	+18%
Antischimmel- crème	1%	0,19	+20%	3,60	+5%	2,95	+9%
	5%	0,20	+30%	3,52	+3%	3,09	+14%
Anticonceptiegel	1%	0,08	-54%	3,18	-7%	2,98	+10%
	5%	0,08	-54%	3,24	+5%	3,10	+15%

*Ingespoten met 10^3 CFU/ml auxotype 1 *Neisseria gonorrhoeae* organisme.

EFFECT VAN BLOED EN ANDERE STOFFEN OP PRESERVCYT-MONSTERS

Er heeft geen evaluatie plaatsgevonden, zoals in de voorgaande sectie over STM-monsters is beschreven, van specifiek storende substanties met monsters in PreservCyt Solution. Van monsters in PreservCyt Solution wordt echter niet verwacht dat zij andere interferentieprofielen hebben dan STM-monsters, omdat de anatomische locatie voor de afname van endocervicale monsters voor zowel PreservCyt Solution als voor STM-monsters dezelfde is, en omdat een monster in PreservCyt Solution onderworpen wordt aan een conversieprocedure (zoals wordt uitgelegd in de gebruikshandleiding van de *digene* HC2 Sample Conversion Kit) waardoor het qua samenstelling vergelijkbaar is met een STM-monster.

Resterend monsterconversiebuffer (SCB)¹ kan in sporehoeveelheden achterblijven in volledig geconverteerde monsters in PreservCyt Solution. Daarom werd een analyserende studie uitgevoerd om de analytische werking van de *digene* HC2 GC-ID DNA Test te onderzoeken met wisselende hoeveelheden SCB. Wisselende concentraties plasmide GC DNA werden bereid in STM. Overvloedige volumes aan SCB werden vervolgens toegevoegd aan de monsters en drie aliquots van elk monster werden getest om een gemiddelde RLU/CO voor elk monster te verkrijgen bij ofwel PreservCyt Solution ofwel SCB. Vergelijking van deze gemiddelde RLU/CO-waarden van elk monster met de gemiddelde RLU/CO-waarden van elk STM-controlemonster leidden tot geen vals-positieve of vals-negatieve resultaten.

PRECISIE AAN DE ASSAYGRENS VAN DE *digene* HC2 GC-ID DNA TEST BEPAALD AAN KLINISCHE MONSTERS AFGENOMEN IN STM

De reproduceerbaarheid van de *digene* HC2 GC-ID DNA Test met klinische monsters afgenomen in STM werd bepaald in een onderzoek met behulp van 30 klinische pools (15 positieve en 15 negatieve) bereid door het combineren van eerder gedenatureerde en geteste cervicale borstelmonsters afgenomen in STM. Monsters werden in viervoud getest op elk van de vijf dagen voor een totaal van 20 waarden per monster. De tests werden uitgevoerd met behulp van de *digene* HC2 GC-ID DNA Test. De gemiddelde RLU/CO-waarde, 95% betrouwbaarheidsintervallen over de gemiddelde (95% CI) en procent positieve resultaten werden berekend voor elk monster gedurende vijf dagen en worden getoond in Tabel 22.

¹ Monsterconversiebuffer is een gebufferde oplossing met eosine Y en 0,05% (g/v) natriumazide, noodzakelijk voor de conversie van een PC-monster. Raadpleeg de *digene* HC2 Sample Conversion Kit van QIAGEN voor nadere details.

Tabel 22. Gemiddelde RLU/CO met betrouwbaarheidsintervallen en procent *digene* HC2 GC-ID DNA Test-positieven (Dalende volgorde bij gemiddelde RLU/CO).

Nr.	RLU/CO	95% CI	%Positief
1	1,92	1,31-2,00	100 (20/20)
2	1,22	1,16-1,29	100 (20/20)
3	1,21	1,16-1,25	100 (20/20)
4	1,21	1,16-1,25	90 (18/20)
5	1,17	1,03-1,28	100 (20/20)
6	1,14	1,09-1,18	90 (18/20)
7	1,08	1,04-1,12	80 (16/20)
8	1,05	1,00-1,09	70 (14/20)
9	1,05	1,01-1,09	70 (14/20)
10	1,02	0,98-1,06	65 (13/20)
11	1,00	0,96-1,03	65 (13/20)
12	1,00	0,97-1,03	45 (9/20)
13	1,00	0,96-1,03	40 (8/20)
14	0,98	0,95-1,02	45 (9/20)
15	0,91	0,89-0,94	10 (2/20)
16	0,90	0,87-0,92	0 (0/20)
17	0,87	0,84-0,91	5 (1/20)
18	0,86	0,83-0,89	0 (0/20)
19	0,84	0,82-0,85	0 (0/20)
20	0,82	0,79-0,85	0 (0/20)
21	0,79	0,75-0,82	0 (0/20)
22	0,77	0,78-0,80	0 (0/20)
23	0,76	0,74-0,79	0 (0/20)
24	0,75	0,78-0,79	0 (0/20)
25	0,73	0,70-0,75	0 (0/20)
26	0,56	0,54-0,59	0 (0/20)
27	0,56	0,54-0,59	0 (0/20)
28	0,56	0,53-0,59	0 (0/20)
29	0,54	0,52-0,56	0 (0/20)
30	0,12	0,11-0,13	0 (0/20)

Monsters met een gemiddelde RLU/CO van 20% of meer boven de grens waren 97% van de tijd positief of vermoedelijk 97% van de tijd, terwijl monsters met een gemiddelde RLU/CO van 20% of meer onder de grens 100% van de tijd negatief waren. Deze resultaten geven aan dat van monsters op 20% of meer verwijderd van de grens constante resultaten kunnen worden verwacht met de *digene* HC2 GC-ID DNA Test.

Monsters met waarden in de buurt van de assaygrens bleven grotendeels positief of negatief; monsters die zich boven de assaygrens bevonden maar binnen 20% daarvan bleven 69,4% van de tijd positief of vermoedelijk positief. Monsters onder de grens maar binnen 20% daarvan bleven 91,4% van de tijd negatief.

Deze resultaten tonen aan dat de *digene* HC2 GC-ID DNA Test reproduceerbare resultaten levert met klinische monsters afgenomen in STM waarvan de RLU/CO-waarden binnen de 20% van de assaygrens liggen.

HISTORISCHE INFORMATIE

In het verleden werd de Dynex Model MLX luminometer naast de DML 2000 gebruikt voor het produceren van gegevens en het bepalen van de werkingseigenschappen van de *digene* HC2 GC-ID DNA Test. De MLX luminometer is niet meer verkrijgbaar en alleen de DML 2000 wordt nog gebruikt om resultaten te produceren. De volgende gegevens werden geproduceerd uit de klinische multicentrum trial voor het bepalen van de reproduceerbaarheid van de positieve en negatieve kalibrator en worden hieronder gegeven als historische informatie.

Voor het bepalen van de reproduceerbaarheid van de positieve en negatieve kalibrator en het schatten van de frequentie waarin handmatige herberekeningen noodzakelijk kunnen zijn, werden de resultaten van de klinische evaluatie van de *digene* HC2 GC-ID DNA Test gecombineerd. Hierbij waren 79 assays betrokken (tabel 23). De resultaten toonden aan dat het gemiddelde %CV van deze 79 assays 5,79% was en dat geen enkele assay gemiddelde negatieve kalibratorwaarden van meer dan 150 RLU's had. Alle triplo's van de positieve kalibrator per assay in aanmerking genomen, werd een kalibratorreproduceerbaarheid van meer dan 20% CV waargenomen voor slechts 1 van de 79 assays (1,3%) en werd de %CV opnieuw berekend. Na herberekening bleef het %CV van de assay onder de 15%, wat erop wees dat alle assays geldig waren.

Tabel 23. Prestatie van de positieve en negatieve kalibrator. Gecombineerde gegevens uit de klinische multicentrum trial en het nauwkeurigheidsonderzoek. (n = 79 assays)

Instrument	Aant. assay's	Gem. van S/N ratio's	Kalibrator type	Gemiddelde van berekende gemiddelden (RLU)		Gemiddelde van de berekende %CV's	
				Drie replica's	Bijgesteld voor afwijkende waarden	Drie replica's	Bijgesteld voor afwijkende waarden
DML2000	9	7,71	Negatief	40,300	34,470	18,960	12,240
			Positief	292,370	292,370	6,670	6,670
MLX*	70	4,52	Negatief	0,076	0,070	13,830	12,360
			Positief	0,292	0,292	5,674	5,674

*Niet langer verkrijgbaar voor gebruik.

EQUIVALENTIE TUSSEN MONSTERS IN STM EN PRESERV CYT SOLUTION

Equivalentie tussen monsters in STM en PreservCyt Solution werd onderzocht in een klinische evaluatie van 1252 gepaarde cervicale monsters. Een monster in PreservCyt Solution werd verwerkt volgens de gebruikshandleiding van de *digene* HC2 Sample Conversion Kit en tezamen met een gepaard STM-monster met de *digene* HC2 GC-ID DNA Test getest. De resultaten van deze evaluatie zijn weergegeven in tabel 24. De klinische werking werd vastgesteld met behulp van PreservCyt Solution monsters met een restvolume van meer dan 6,5 ml. Het testen van monsters met een restvolume tussen 4,0 – 6,5 ml moet door het laboratorium worden gevalideerd.

Tabel 24. Samenvatting van statistische data van de overeenkomsten in de *digene* HC2 GC-ID DNA Test tussen gepaarde cervicale monsters afgenomen in STM en PreservCyt Solution.

Cohort	Kappa 95% CI	Positieve Overeenkomst (n/N) 95% CI	Negatieve Overeenkomst (n/N) 95% CI	Totaal overeenkomst (n/N) 95% CI
Twijfelzone exclusie-data	0,96	98,00 (49/50)	99,75 (1181/1184)	99,68 (1230/1234)
	0,92, 0,99	89,35, 99,95	99,26, 99,95	99,17, 99,91
Twijfelzone hertest algoritme*	0,93	91,80 (56/61)	99,75 (1188/1191)	99,36 (1244/1252)
	0,88, 0,98	81,90, 97,28	99,27, 99,95	98,74, 99,72

*Monsters in het RLU/CO-bereik van 1,0 tot 2,5 werden in tweevoud hertest. Vervolgens werd monsterclassificatie bepaald volgens een *two of three rule*.

De reproduceerbaarheid van de *digene* HC2 GC-ID DNA Test werd beoordeeld als onderdeel van een klinische evaluatie om aan te tonen dat equivalente resultaten uit de *digene* HC2 GC-ID DNA Test werden verkregen toen een panel van 20 monsters in PreservCyt Solution werd getest gedurende 3 dagen in drie laboratoria. De resultaten van deze reproduceerbaarheidsstudie zijn hieronder weergegeven in tabel 25.

Tabel 25. Percentage overeenkomst in *digene* HC2 GC-ID DNA Test – per locatie.

Locatie	Waargenomen vs. Verwacht*	% Overeenkomst (95% CI)
1	60/60	100 (94,04, 100)
2	60/60	100 (94,04, 100)
3	59/60	98,33 (91,06, 99,96)
Alle locaties gezamenlijk	179/180	99,44 (96,94, 99,99)

*20 leden x 3 dagen x 3 locaties.

REFERENTIES

1. Roongpisuthipong A, Lewis JS, Kraus SJ, Morse SA. Gonococcal urethritis diagnosed from enzyme immunoassay of urine sediment. *Sex Transm Dis* 1988;15(4):192-5.
2. Schachter J, McCormack WM, Smith RF, Parks RM, Bailey R, Ohlin AC. Enzyme immunoassay for diagnosis of gonorrhea. *J Clin Microbiol* 1984;19(1):57-9.
3. Knapp JS, Rice RJ. *Neisseria* and *Branhamella*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 6 ed. Washington,DC: ASM Press; 1995. p 324-40.
4. Kingsbury DT. Estimate of the genome size of various microorganisms. *J Bacteriol* 1969 Jun;98(3):1400-1.
5. U.S.Department of Labor OSHA. Occupational exposure to bloodborne pathogens; final rule. *Federal Register* 1991;56(235):64175-82.
6. Centers for Disease Control, National Institutes of Health. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*. 3rd ed. Washington: U.S. Government Printing Office; 1993.
7. World Health Organization. *Laboratory biosafety manual*. Geneva: World Health Organization; 1993.
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Protection of laboratory workers from instrument biohazards and infectious disease transmitted by blood, body fluids, and tissue; approved guideline*. Wayne,PA: NCCLS; 1997.
9. Centers for Disease Control. Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings. *MMWR* 1987 Aug;36(suppl. 2S):3S-17S.
10. Sehulster LM, Hollinger FB, Dreesman GR, Melnick JL. Immunological and biophysical alteration of hepatitis B virus antigens by sodium hypochlorite disinfection. *Appl Environ Microbiol* 1981 Nov;42(5):762-7.
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Clinical laboratory waste management: approved guideline*. Villanova,PA: NCCLS; 1993. 1;-29-42 p.
12. U.S.Environmental Protection Agency. *EPA guide for infectious waste management*. Washington,DC: U.S. Environmental Protection Agency; 1986. 1-5-5, R1-R3, A1-A24 p.
13. [Anonymous]. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1994.
14. [Anonymous]. *Textbook of diagnostic microbiology*. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1995.
15. Schachter J. Chlamydiae. in: Balows A, Hausler WJ, Jr., Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 5th ed. Washington,D.C.: American Society for Microbiology; 1991. p 1045-53.

PROBLEMEN OPLOSSEN

<i>digene</i> HC2 GC-ID DNA Test		
WAARNEMING	WAARSCHIJNLIJKE OORZAKEN	OPLOSSINGEN
Onjuiste of geen kleurverandering waargenomen tijdens denaturatie.	Denaturatiereagens niet toegevoegd of denaturatiereagens niet goed bereid.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Controleer of het denaturatiereagens de indicatorkleurstof bevat en een donkerpaarse kleur heeft. 2. Controleer of denaturatiereagens aan het monster is toegevoegd door het monstervolume te meten (1,5 ml wordt verwacht). Als uit het volume blijkt dat geen denaturatiereagens is toegevoegd, bereid en meng dan de juiste toe te voegen hoeveelheid en ga door met de assay als de juiste kleurverandering vervolgens wordt waargenomen.
	Bloederig monster kan de kleurverandering maskeren.	De exacte kleurverandering die is beschreven, wordt niet verwacht bij deze monstertypes; assaytestresultaten mogen niet negatief worden beïnvloed.
	pH van het monster kan ongewoon zuur zijn.	Het monster kan ongewoon zuur zijn, waardoor de verwachte kleurverandering niet zal optreden. Neem een nieuw monster af <u>vóór</u> het aanbrengen van azijnzuur op de cervix, omdat een onjuiste pH van het monster de testresultaten negatief zal beïnvloeden.
Kwaliteitscontrole levert incorrecte resultaten op	Verkeerd softwareprotocol gekozen voor de test.	Als het softwareprotocol incorrect blijkt voor de test die wordt uitgevoerd, moet de plaat binnen 30 minuten nadat detectiereagens 2 is toegevoegd en het correcte protocol is toegepast, opnieuw worden gelezen.
	Omgekeerde plaatsing van QC CT en QC GC	Run monsters opnieuw.
Onjuiste kleurverandering waargenomen tijdens hybridisatie.	<ul style="list-style-type: none"> • Ontoereikende menging van Probe Mix met gedensureerde kalibrator, kwaliteitscontrole en/of monsters. • Probe mix niet toegevoegd. • Onjuist volume of reagens toegevoegd. 	Schud de hybridisatie-microtiterplaat gedurende nog eens 2 minuten. Voeg nog eens 25 µl probe toe wanneer er wells zijn die nog paars of grijs blijven en meng goed. Test het monster opnieuw wanneer na het toevoegen en opnieuw mengen van probe de juiste kleurverandering niet optreedt en het monster geen bloed of andere materialen bevatte.
	Bloederig monster kan de kleurverandering maskeren.	De beschreven exacte kleurverandering wordt niet verwacht bij deze monstertypes; assaytestresultaten mogen niet nadelig worden beïnvloed.
	Het monster bevatte < 1000 µl <i>digene</i> Specimen Transport Medium (STM).	Controleer het volume van het oorspronkelijke monster. Het volume moet 1425 µl ± 20 µl zijn (na verwijdering van 75 µl). Wanneer het volume < 1405 µl is, bevatte het oorspronkelijke monster < 1000 µl STM. Neem een nieuw monster.
Assay voldoet niet aan kalibratieverificatiecriteria. Geen signaal waargenomen in positieve kalibrator, kwaliteitscontroles of monsters.	Geen probe toegevoegd aan probe-verdunningsmiddel.	Bereid GC Probe Mix als beschreven in het deel Bereiden en opslag van reagens van deze gebruikshandleiding. Goed mengen. Label de buis correct. Herhaal assay met behulp van vers bereid Probe Mix.
	Probe tijdens bereiding verontreinigd met RNase.	Gebruik aërosol-beschermende pipetpunten bij het pipetteren van probe en draag poedervrije handschoenen. Verdun probe in steriele container. Gebruik alleen schone, nieuwe wegwerp reagensreservoirs.
	Ontoereikende menging van Probe Mix en probe-verdunningsmiddel.	Na toevoeging van probe aan probe-verdunningsmiddel, meng gedurende 5 seconden zeer grondig door middel van vortexen bij hoge snelheid. Er moet een zichtbare vortex ontstaan.

digene HC2 GC-ID DNA Test

WAARNEMING	WAARSCHIJNLIJKE OORZAKEN	OPLOSSINGEN
	Ontoereikende menging van verdund probe en gedenateerd monster.	Dek nadat Probe Mix aan het gedenateerd monster is toegevoegd, de hybridisatie-microtiterplaat af en schud het gedurende 3 ± 2 minuten op roterend schudapparaat I bij 1100 ± 100 omw/min, zoals is beschreven in de testprocedure onder het kopje Hybridisatie, stap 6 van deze gebruikshandleiding. Controleer op kleurverandering van paars tot geel in elke well.
	Verkeerde tijd of temperatuur tijdens hybridisatiestap.	Hybridiseer gedurende 60 ± 5 minuten bij 65 ± 2 °C, zoals is beschreven in de testprocedure onder het kopje Hybridisatie, stap 7 van deze gebruikshandleiding. Controleer de temperatuur van de Microplate Heater I. Controleer of de verwarming is ingesteld op het verwarmen van monsters tot de juiste temperatuur en gedurende 1 uur vóór gebruik werd voorverwarmd.
	Ontoereikende menging tijdens capture-stap.	Schud gedurende 60 ± 5 minuten bij 20-25 °C met 1100 ± 100 omw/min op het roterend schudapparaat I, zoals is beschreven in de testprocedure onder het kopje Hybridisatie, stap 7 van deze gebruikshandleiding. Controleer de snelheid van het roterend schudapparaat I door middel van kalibratie als omschreven in het onderdeel Schudsnelheidskalibratie van de gebruikshandleiding voor het roterend schudapparaat I.
	<ul style="list-style-type: none"> Niet de juiste hoeveelheid detectiereagens 1 toegevoegd. Niet gedurende de aangegeven tijd geïncubeerd. 	<p>Pipetteer 75 µl detectiereagens 1 in elke well met behulp van een 8-kanaalspipet.</p> <p>Incubeer gedurende 30-45 minuten bij 20-25 °C.</p>
	<ul style="list-style-type: none"> Niet de juiste hoeveelheid detectiereagens 2 toegevoegd. Niet gedurende de aangegeven tijd geïncubeerd. 	<p>Pipetteer 75 µl detectiereagens 2 in elke well met behulp van een 8-kanaalspipet. Incubeer gedurende 15 tot 30 minuten bij 20-25 °C.</p>
	Luminometer defect of verkeerde programmering.	Raadpleeg de onderdelen onderhoud/service en probleemoplossing in de gebruikshandleiding van de toepasselijke <i>digene</i> assay analyse software voor verdere instructies, of neem contact op met de technische dienst van QIAGEN ..
<p>Verhoogde RLU-waarden in kalibrators, kwaliteitscontroles en/of monsters (≥ 150 RLU's in veel of alle wells). Assay voldoet mogelijk niet aan validatiecriteria.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Geen denaturatiereagens toegevoegd; of verkeerd volume reagens toegevoegd; of inadequate menging van denaturatiereagens met kalibrator, kwaliteitscontrole of monster. Te lage temperatuur waterbad en te laag waterniveau. 	<ul style="list-style-type: none"> Controleer voorafgaand aan het toevoegen van denaturatiereagens of het herhalingspipet nauwkeurig afgeeft. Gekalibreerde pipetten zijn uitermate belangrijk. Voeg een half volume denaturatiereagens toe aan elke buis en meng goed. Controleer om fout-positieve resultaten te vermijden of de vloeistof het gehele binnenvlak van de buis wast (keer de buis op tijd om wanneer u met de hand mengt). Kalibrators, kwaliteitscontroles en monsters moeten paars worden na toevoeging van denaturatiereagens. Controleer snelheidskalibratie van Multi-Specimen Tube Vortexer 2. Controleer het waterniveau en de temperatuur van het waterbad.
	<ul style="list-style-type: none"> Lichtlek in de luminometer. Afdichting is verbroken. Deur niet afgedicht. 	<p>Voer een achtergrondaflezing uit (ruwe gegevensmeting) van de luminometer door het lezen van lege microtiterplaat. Een aflezing van meer dan 50 RLU's geeft aan dat er lichtlek kan bestaan. Raadpleeg de rubrieken onderhoud/service en probleemoplossing in de toepasselijke <i>digene</i> assay analyse software gebruikshandleiding voor verdere instructies, of neem contact op met de technische dienst van QIAGEN.</p>

digene HC2 GC-ID DNA Test

WAARNEMING	WAARSCHIJNLIJKE OORZAKEN	OPLOSSINGEN
	Contaminatie van detectiereagens 2 of gecoate microtiterplaatwells door detectiereagens 1 of exogene alkalische fosfatase.	Raadpleeg 'Contaminatiecontrole' in dit hoofdstuk 'Problemen oplossen'.
	Wasbuffer verontreinigd.	Raadpleeg 'Contaminatiecontrole' in dit hoofdstuk 'Problemen oplossen'.
	Automatische plaatwasser verontreinigd.	Raadpleeg 'Contaminatiecontrole' in dit hoofdstuk 'Problemen oplossen'.
	Ontoereikende reiniging van gecoate microtiterplaatwells na incubatie van detectiereagens 1.	Was de microtiterplaatwells 6 keer grondig met wasbuffer, het vullen van wells tot overstroming na elke keer of met behulp van de automatische plaatwasser. Na het wassen mag er geen achtergebleven roze vloeistof zichtbaar zijn in de wells. Zie het onderdeel Problemen oplossen van de <i>Gebruikshandleiding van de automatisch plaatwasser</i> voor instructies over het testen op contaminatie of defecten.
	Contaminatie van microtiterplaatwells met detectiereagens 1.	Controleer of alle werkvlakken schoon en droog zijn. Wees voorzichtig bij het gebruik van detectiereagens 1. Vermijd aerosolen.
	Vloeien van hybridisatieoplossing op dezelfde plek van Kimtowels tissues of gelijkwaardige pluisarme papieren handdoeken. Gebruik van verkeerde vloeihanddoeken.	Niet opnieuw vloeien op dezelfde plek van de Kimtowels tissues of gelijkwaardige pluisarme papieren handdoeken. Gebruik Kimtowels tissues of gelijkwaardig pluisarm keukenpapier om te vloeien.
	Materiaal van GC kwaliteitscontrole gebruikt als positieve kalibrator. Validatie assay mislukt.	Controleer of de positieve kalibrators en kwaliteitscontroles correct geplaatst zijn.
<p>Lage PC/NC ratio's of hoog aantal laagpositieve monsters (> 20% van het totaal aantal monsters) met een RLU/CO ratio < 2,0. Assay voldoet mogelijk niet aan validatiecriteria.</p>	Ontoereikende monsterbereiding.	Voeg het juiste volume denaturatiereagens toe en meng grondig door middel van vortexen. Let er ter voorkoming van fout-positieve resultaten op dat de vloeistof het volledige binnenoppervlak van de buis door middel van vortexen met de Multi-Specimen Tube Vortexer 2 methode gedurende 5 seconden wast (voor de handmatige vortex-methode, vortex gedurende tenminste 5 seconden en keer de buis op tijd om). Er moet een duidelijke kleurverandering van transparant naar donkerpaars waarneembaar zijn. Incubeer gedurende 45 ± 5 minuten bij 65 ± 2 °C. Bij gebruikmaking van PreservCyt Solution-monsters verschijnen deze hybriden waarschijnlijk op de binnenwanden van de monsterconversiebuis. Om vermenging van dit niet-gedenatureerde celmateriaal te voorkomen, mag de pipetpunt de zijkanten van de monsterconversiebuis tijdens het overbrengen van het gedenatureerde monster naar de microtiterplaatwell voor het hybridiseren van de GC-probe niet aanraken. Raadpleeg voor een gedetailleerde procedurebeschrijving de gebruikshandleiding van de <i>digene HC2 Sample Conversion Kit</i> .
	Probe ontoereikend gemengd of onvoldoende probe toegevoegd aan assays.	Bereid Probe Mix volgens beschrijving. Meng grondig door middel van vortexen en let op dat een zichtbare vortex tot stand komt. Probe Mix moet aan wells worden toegevoegd met een multikanaals- of repeterende pipet om nauwkeurige afgifte te garanderen.
	Onvoldoende volume Probe Mix toegevoegd aan elke hybridisatie-microtiterplaatwell.	Controleer of het 8-kanaalspipet nauwkeurig vult alvorens Probe Mix toe te voegen aan de hybridisatie-microtiterplaat. Op de bodem van elke microwell moet 25 µl Probe Mix aan het gedenatureerde monster worden toegevoegd. Controleer of de 8-kanaalspipet goed werkt voordat u de Probe Mix toevoegt aan de hybridisatiewells. De kleurverandering moet van donkerpaars naar geel zijn na toevoeging en grondig mengen van Probe Mix.

digene HC2 GC-ID DNA Test

WAARNEMING	WAARSCHIJNLIJKE OORZAKEN	OPLOSSINGEN
	Verlies van detectiereagens 1 activiteit.	Bewaar detectiereagens 1 bij 2-8 °C. Niet gebruiken na de uiterste gebruiksdatum op het label van de buitenverpakking van de kit.
	Onvoldoende capture van RNA: DNA-hybriden.	De capturestap moet worden verricht met behulp van het roterend schudapparaat I ingesteld op 1100 ± 100 omw/min. Controleer de snelheid van het schudapparaat als omschreven in het onderdeel Shakersnelheidskalibratie van de gebruikshandleiding voor het roterend schudapparaat I.
	Ontoereikend wassen.	Was microtiterplaatwells 6 keer grondig met wasbuffer, vul de wells telkens tot ze overstromen bij gebruik van automatische plaatwasser .
	Wasbuffer verontreinigd.	Raadpleeg 'Contaminatiecontrole' in dit hoofdstuk 'Problemen oplossen'.
Series positieve monsters met RLU-waarden die ongeveer overeenkomen.	Contaminatie van gecoate microtiterplaatwells tijdens assay-manipulatie.	Dek de gecoate microtiterplaatwells af tijdens alle incubaties. Vermijd blootstelling van microtiterplaatwells aan contaminatie door aërosol tijdens het verrichten van de assay. Draag poedervrije handschoenen tijdens handelingen.
	Contaminatie van detectiereagens 2.	Pas op dat de voorraad niet wordt verontreinigd tijdens het pipetteren van detectiereagens 2 in gecoate microtiterplaatwells. Vermijd contaminatie van detectiereagens 2 door middel van aërosols uit detectiereagens 1 of uit laboratoriumstof, enz.
	Defect in de automatische plaatwasser	Raadpleeg 'Contaminatiecontrole' in dit hoofdstuk 'Problemen oplossen' of zie het onderdeel Problemen oplossen van de gebruikshandleiding van de automatisch plaatwasser voor instructies over testen op contaminatie of het vaststellen van defecten.
Brede % CV's tussen replicaten.	Onnauwkeurige pipettering (d.w.z., luchtbellens, pipet niet gekalibreerd).	Controleer pipet om zeker te stellen dat reproduceerbare volumes worden geleverd. Kalibreer pipetten routinematig.
	Onvoldoende menging.	Bij alle stappen grondig mengen. Vortex vóór en na denaturatie-incubatie. Controleer of een zichtbare vortex tot stand komt.
	Onvolledig overbrengen van vloeistof uit hybridisatie-microtiterplaat op gecoate microtiterplaatwells.	Let tijdens transferstap van hybridisatie-microtiterplaat naar gecoate microtiterplaat op om zeker te stellen dat reproduceerbare volumes worden overgebracht.
	Verkeerde wasomstandigheden.	Was microtiterplaatwells 6 keer grondig met wasbuffer, vul de wells telkens tot ze overstromen bij gebruik van automatische plaatwasser en de juiste automatische plaatwasser protocols.
	Contaminatie van microtiterplaatwells met detectiereagens 1.	Controleer of alle werkvlakken schoon en droog zijn. Wees voorzichtig bij het gebruik van detectiereagens 1. Vermijd aërosols.
	Verontreinigde pipetpunt met ongedenatureerd materiaal bij de verdeling van gedenatureerd monster op de microtiterplaatwell die voor GC probe-hybridisatie wordt gebruikt.	De denaturatiestap bij de monsterverwerkingsprocedure moet overeenkomstig de instructies worden uitgevoerd. Onjuist vortexen van een monster, inversie van de buis en agitatie kunnen leiden tot onvolledige denaturatie of niet-specifieke RNA:DNA-hybriden uit cervicale monsters. Met name bij monsters in PreservCyt Solution is de kans groot dat dergelijke hybriden zich aan de binnenzijde van de monsterconversiebuis bevinden. Om mogelijke vermenging met dit ongedenatureerde celmateriaal te voorkomen mag de pipetpunt de zijkanten van de monsterconversiebuis niet raken tijdens de transfer van het gedenatureerd monster naar de microbuis of microplaatwell die voor GC probe-hybridisatie wordt gebruikt.

digene HC2 GC-ID DNA Test

WAARNEMING	WAARSCHIJNLIJKE OORZAKEN	OPLOSSINGEN
	Vloeien op dezelfde plek van Kimtowels Tissues over diverse rijen.	Niet opnieuw vloeien op dezelfde plek van de Kimtowels tissues.
Fout-positieve resultaten verkregen uit bekende negatieve monsters.	Detectiereagens 2 verontreinigd.	Pas op voor kruiscontaminatie van monsters bij het toevoegen van detectiereagens 2 tussen monsters. Wanneer alleen een deel van een kit wordt gebruikt, doe dan het volume noodzakelijk voor die assay in een schoon reagensreservoir alvorens de pipet te vullen.
	Contaminatie van microtiterplaatwells met detectiereagens 1.	Was de microtiterplaatwells 6 keer grondig met wasbuffer, vul tot overstrooming na elke keer of met behulp van de automatische plaatwasser. Na het wassen mag er geen achtergebleven roze vloeistof zichtbaar zijn in de microtiterplaatwells.
	Verontreinigde pipetpunt met ongedenatureerd materiaal bij de verdeling van gedenatureerd monster op de microplaatwell die voor GC probe-hybridisatie wordt gebruikt.	De denaturatiestap bij de monsterverwerkingsprocedure moet overeenkomstig de instructies worden uitgevoerd. Onjuist vortexen van een monster, inversie van de buis en agitatie kunnen leiden tot onvolledige denaturatie of niet-specifieke RNA:DNA-hybriden uit cervicale monsters. Met name bij monsters in PreservCyt Solution is de kans groot dat dergelijke hybriden zich aan de binnenzijde van de monsterconversiebuis bevinden. Om mogelijke vermenging met dit ongedenatureerde celmateriaal te voorkomen mag de pipetpunt de zijanten van de monsterconversiebuis niet raken tijdens de transfer van het gedenatureerd monster naar de microbuis of microplaatwell die voor GC probe-hybridisatie wordt gebruikt.
	Ontoereikende monsterbereiding.	Voeg het juiste volume denaturatiereagens toe en meng grondig door middel van vortexen. Let ter voorkoming van fout-positieve resultaten op dat de vloeistof het volledige binnenoppervlak van de buis door middel van vortexen met de Multi-Specimen Tube Vortexer 2 methode gedurende 5 seconden wast (voor de handmatige vortex-methode, keer de buis op tijd om). Er moet een duidelijke kleurverandering van transparant naar donkerpaars waarneembaar zijn. Incubeer gedurende 45 ± 5 minuten bij 65 ± 2 °C. Bij gebruikmaking van PreservCyt Solution-monsters verschijnen deze hybriden waarschijnlijk op de binnenwanden van de monsterconversiebuis. Om vermenging van dit niet-gedenatureerde celmateriaal te voorkomen mag de pipetpunt de zijanten van de monsterconversiebuis tijdens het overbrengen van het gedenatureerde monster naar de microtiterplaatwell voor het hybridiseren van de GC-probe niet aanraken. Raadpleeg voor een gedetailleerde procedurebeschrijving de gebruikshandleiding van de <i>digene</i> HC2 Sample Conversion Kit.
	Verkeerde wasomstandigheden.	Was microtiterplaatwells 6 keer grondig met wasbuffer, vul de wells telkens tot ze overstroomen bij gebruik van automatische plaatwasser en de juiste automatische plaatwasser protocols.
Verhoogde RLU-waarden negatieve kalibrator (> 150 RLU's). Restant van assay presteert naar verwachting.	Detectiereagens 2 werd bij een hogere temperatuur geïncubeerd dan 20-25 °C.	Test is ongeldig als gevolg van hoog-negatieve kalibratorwaarden. Doe de test opnieuw en controleer of bij de absorbtie- en detectiestappen geïncubeerd wordt bij 20-25 °C.
	Detectiereagens 2 werd langer geïncubeerd dan 30 minuten.	Lees de plaat af na een incubatietijd van 15 minuten (en niet langer dan 30 minuten incubatie) bij 20-25 °C.
	Detectiereagens 2 of wasbuffer was verontreinigd met alkalische fosfatase of detectiereagens 1.	Raadpleeg 'Contaminatiecontrole' in dit hoofdstuk 'Problemen oplossen'.

CONTAMINATIECONTROLE

Beoordeeld reagens	Contaminatiecontroleprocedure	Resultatenbeoordeling
<p>NB: Ga bij het pipetteren van detectiereagens 2 voorzichtig te werk om contaminatie te voorkomen. Draag handschoenen en vermijd aanraking van werkoppervlakken met de pipet.</p>		
<p>Detectiereagens 2</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Pipetteer 75 µl uit de aangebroken of nieuwe flacon detectiereagens 2 in een lege capture-microtiterplaatwell. • Incubeer 15 minuten bij 20-25 °C. Vermijd direct zonlicht. • Lees de microtiterplaatwells in de luminometer in. <p>NB: Analyse van detectiereagens 2 in 3 replicaten levert een optimale werkingsbeoordeling op.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • De controle van detectiereagens 2 moet < 50 RLU zijn. • Als de waarden van detectiereagens 2 < 50 RLU zijn, kan de assay met detectiereagens 2 worden herhaald. • Neem bij contaminatie (> 50 RLU) een nieuwe kit in gebruik en herhaal de assay.
<p>Wasapparaat en/of waterbron</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Pipetteer 75 µl detectiereagens 2 in 4 afzonderlijke capture-microtiterplaatwells. • Etiketeer de wells 1-4. • Well 1 dient als controle voor detectiereagens 2. Pipetteer 10 µl wasbuffer uit de wasfles in well 2. • Laat wasbuffer door de wasleidingen stromen. • Pipetteer 10 µl wasbuffer uit de leidingen in well 3. • Bereid de wasbuffer met een deel van het gebruikte water. Pipetteer 10 µl van het water in well 4. • Incubeer 15 minuten bij 20-25 °C. Vermijd direct zonlicht. • Lees de microtiterplaatwells in de luminometer in. 	<ul style="list-style-type: none"> • De controle van detectiereagens 2 (well 1) moet < 50 RLU zijn. • Vergelijk de RLU-waarden van de wells 2, 3 en 4 met de RLU-waarde van de detectiereagens 2-controle (well 1). De afzonderlijke RLU-waarden van de wells 2, 3 en 4 mogen niet hoger zijn dan de 50 RLU van de detectiereagens 2-controle (well 1). • Overschrijding van de waarde van 50 RLU van de detectiereagens 2-controle is een teken van contaminatie. Zie paragraaf <i>Bereiding en opslag van reagens</i> voor aanwijzingen over reiniging en onderhoud van het wasapparaat.
<p>Automatische latenwasser</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Pipetteer 75 µl detectiereagens 2 in 5 afzonderlijke capture-microtiterplaatwells. • Etiketeer de wells 1-5. • Well 1 dient als controle voor detectiereagens 2. • Pipetteer 10 µl wasbuffer uit de plaatwasfles met het etiket <i>Wash</i> in well 2. • Pipetteer 10 µl spoelvloeistof uit de plaatwasfles met het etiket <i>Rinse</i> in well 3. • Druk op de toets Prime op het toetsenpaneel van de plaatwasser, zodat er wasbuffer door de leidingen stroomt. • Pipetteer 10 µl wasbuffer uit de bak in well 4. • Druk op de toets Rinse op het toetsenpaneel van de plaatwasser, zodat er spoelvloeistof door de leidingen stroomt. • Pipetteer 10 µl wasbuffer uit de bak in well 5. • Dek het preparaat af en incubeer 15 minuten bij 20-25 °C. Vermijd direct zonlicht. • Lees de microtiterplaatwells in de luminometer in. 	<ul style="list-style-type: none"> • De controle van detectiereagens 2 (well 1) moet < 50 RLU zijn. • Vergelijk de RLU-waarden van de wells 2, 3, 4 en 5 met de RLU-waarde van de detectiereagens 2-controle (well 1). De afzonderlijke RLU-waarden van de wells 2, 3, 4 en 5 mogen niet hoger zijn dan de 50 RLU van de detectiereagens 2-controle (well 1). • Overschrijding van de waarde van 50 RLU van de detectiereagens 2-controle is een teken van contaminatie van de plaatwasser. • Zie de <i>gebruikshandleiding bij de automatische plaatwasser, paragraaf Decontaminatieprocedure</i>.

QIAGEN CONTACTINFORMATIE

Gebruik het bij dit product gevoegde contactinformatieblad om contact op te nemen met uw plaatselijke vertegenwoordiger van QIAGEN.

QIAGEN[®], *digene*[®], Hybrid Capture[®] en Rapid Capture[®] zijn gedeponeerde handelsmerken van QIAGEN

Hybrid Capture technology valt onder octrooinr. 0 667 918 geregistreerd in Oostenrijk, België, Zwitserland, Lichtenstein, Duitsland, Denemarken, Spanje, Frankrijk, Verenigd Koninkrijk, Griekenland, Ierland, Italië, Luxemburg, Nederland en Zweden.

V.S. Hybrid Capture Octrooinr.: 6.228.578B1

Handelsmerkvermeldingen:

ThinPrep[®] en PreservCyt[®]: Hologic Corporation
Kimtowels[®]: Kimberly-Clark Corporation
Eppendorf[®] en Repeater[®]: Eppendorf-Netheler-Hinz
CDP-Star[®]: Tropix, Inc.
Parafilm[®]: American Can Co.
DuraSeal[®]: Diversified Biotech, Inc.
Sarstedt[®]: SARSTEDT AG & Co.
pGEM[®]: Promega Corporation
VWR[®]: VWR International, Inc.
Corning[®]: Corning, Inc

SAMENVATTING VAN *digene* HC2 GC-ID DNA TEST

Belangrijk: Het is belangrijk de gedetailleerde procedure grondig te kennen alvorens de samenvatting te gebruiken.

	PROCEDURE	
Denaturatie (Voor monsters in PreservCyt Solution, zie Bereidingsprocedure voor monsters in PreservCyt Solution)	<p style="text-align: center;">Handmatige vortex-Method</p> <p style="text-align: center;">Creëer plaatopzet Label hybridisatieplaat. Bereid denaturatiereagens.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Pipetteer denaturatiereagens (volume komt overeen met de helft van het volume) in kalibrators, kwaliteitscontroles en monsters. Vortex elk monster en controle afzonderlijk gedurende 5 seconden bij hoge snelheid en keer om (zie deze gebruikshandleiding voor bijzonderheden).</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Controleer of alle buizen een paarse kleur hebben.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Incubeer gedurende 45 ± 5 minuten bij 65 ± 2 °C.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Bereid GC Probe mix</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">↓</p>	<p style="text-align: center;">Methode met de Multi-Specimen Tube Vortexer 2</p> <p style="text-align: center;">Creëer plaat-opzet. Label hybridisatieplaat. Bereid denaturatiereagens.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Pipetteer denaturatiereagens (volume komt overeen met de helft van het volume) in kalibrators, kwaliteitscontroles en monsters.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Controleer of alle buizen een paarse kleur hebben.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Dek rek af met folie en deksel.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Vortex gedurende 10 seconden op maximumsnelheid.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Incubeer gedurende 45 ± 5 minuten bij 65 ± 2 °C.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Bereid GC Probe mix</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">↓</p>
Hybridizatie	<p>Meng de gedenaatureerde monsters goed en pipetteer 75 µl gedenaatureerd monster, kalibrator of kwaliteitscontrole in de microplaatwell.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Incubeer gedurende 10 minuten bij 20-25 °C.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Pipetteer 25 µl GC Probe mix in microplaatwells.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Dek microtiterplaat af met een plaatdeksel en schud gedurende 3 ± 2 minuten op roterend schudapparaat I bij 1100 ± 100 omw/min. <i>Controleer of alle wells een gele kleur hebben.</i> (De monsters in PreservCyt Solution worden roze.)</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Incubeer gedurende 60 ± 5 minuten bij 65 ± 2 °C.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Bereid capture-microtiterplaat.</p> <p style="text-align: center;">↓</p>	
Hybridecapture	<p>Breng de inhoud vanuit elke hybridisatieplaatwell over in overeenkomstige well in capture-microtiterplaat met behulp van een 8-kanaals pipet.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Bedek met een plaat of afdekfolie.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Schud gedurende 60 ± 5 minuten bij 1100 ± 100 omw/min bij 20-25 °C. Bereid wasbuffer.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Schenk de gecoate microtiterplaat leeg en vloe af (zie deze gebruikshandleiding voor bijzonderheden).</p> <p style="text-align: center;">↓</p>	
Hybridedetectie	<p>Pipetteer 75 µl detectiereagens 1 in elke well van gecoate microtiterplaat. Bedek de capture-microtiterplaat met plaatdeksel, Parafilm of dergelijke. Incubeer gedurende 30-45 minuten bij 20-25 °C. Was de plaat volgens de gewenste methode.</p> <p style="text-align: center;">↓</p>	
Wassen	<p style="text-align: center;">Methode voor handmatig wassen</p> <p>Schenk de gecoate microtiterplaat leeg en vloe af (zie bijsluiters voor bijzonderheden).</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Was 6 keer.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Vloe af op niet-pluizende papieren handdoeken.</p> <p style="text-align: center;">↓</p>	<p style="text-align: center;">Methode met de automatische plaatwasser</p> <p>Plaats de plaat op de wasmachine en druk op "START/STOP" om te beginnen.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">↓</p>
Signaalamplificatie	<p>Pipetteer 75 µl detectiereagens 2 in elke well van gecoate microtiterplaat. Bedek met plaatdeksel. Incubeer gedurende 15-30 minuten bij 20-25 °C.</p> <p style="text-align: center;">↓</p>	
Aflezing	<p>Lees de capture-microtiterplaat af op de door QIAGEN goedgekeurde luminometer.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Valideer assay en interpreteer monsterresultaten.</p>	