



ResistancePlus[®] MG

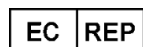
Realtime multiplex-PCR-assay voor de identificatie van *Mycoplasma genitalium* en de detectie van mutaties die met resistentie tegen azitromycine worden geassocieerd



Product	Platform	Aantal (reacties)	Catalogusnr.
ResistancePlus [®] MG	LC480 II z 480	100	REF 20001L-01
ResistancePlus [®] MG	LC480 II z 480	25	REF 2000125
ResistancePlus [®] MG ₍₅₅₀₎	ABI 7500 Fast ABI 7500 Fast Dx	100	REF 2000201
ResistancePlus [®] MG ₍₅₅₀₎	ABI 7500 Fast ABI 7500 Fast Dx	25	REF 2000225
ResistancePlus [®] MG ₍₆₇₅₎	CFX96 [™] Dx CFX96 [™] Touch	100	REF 2000301
ResistancePlus [®] MG ₍₆₇₅₎	CFX96 [™] Dx CFX96 [™] Touch	25	REF 2000325

Bijbehorende producten – Analysesoftware

ResistancePlus [®] MG (LC480)	REF 99003
ResistancePlus [®] MG (z480)	REF 99018
ResistancePlus [®] MG (7500)	REF 99002
ResistancePlus [®] MG (CFX)	REF 99008
REFLEX ResistancePlus [®] MG (LC480)	REF 99023
REFLEX ResistancePlus [®] MG (z480)	REF 99024
REFLEX ResistancePlus [®] MG (7500)	REF 99026
REFLEX ResistancePlus [®] MG (CFX)	REF 99025



MedEnvoy
Prinses Margrietplantsoen 33 – Suite 123
2595 AM Den Haag
Nederland



SpeedX Pty Ltd
Suite 102, National Innovation Centre
4 Cornwallis Street, Eveleigh
NSW 2015, Australië
Tel.: +61 2 9209 4170, E-mail: tech@speedx.com.au

UITSLUITEND VOOR PROFESSIONEEL GEBRUIK

Niet te koop in de VS

Inhoud

1	Productbeschrijving.....	5
2	Beoogd gebruik.....	5
3	Informatie over de pathogenen.....	5
4	Inhoud van de kit.....	6
5	Vervoer en opslag.....	7
6	Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen.....	7
6.1	Algemeen.....	7
6.2	Laboratorium.....	7
6.3	Verwerking van specimen.....	8
6.4	Assay.....	8
6.5	Veiligheidsvoorzorgsmaatregelen.....	8
6.6	Test-plug-ins: waarschuwingen/voorzorgsmaatregelen/beperkingen.....	8
7	Bijbehorende producten en verbruiksmaterialen.....	8
8	Principe van de technologie.....	11
9	Overzicht procedure.....	13
10	Gedetailleerde procedure.....	14
10.1	Monsterafname, transport en opslag.....	14
10.1.1	Gevalideerde hulpmiddelen voor monsterverzameling.....	14
10.1.2	Correct verzamelen, transporten en opslaan van urine.....	14
10.1.3	Met een droog wattenstaafje afgenomen monsters - afname, transport en opslag.....	14
10.1.4	Multi-Collect-monsterkit (Abbott, Cat. nr. 9K12-01) - afname, transport en opslag.....	14
10.1.5	Aptima® urinemonsterkit (Hologic, Cat. nr. 301040) – afname, transport en opslag.....	15
10.1.6	Aptima® uniseks monsterkit met wattenstaafje (Hologic, Cat. nr. 301041) - afname, transport en opslag.....	15
10.1.7	DeltaSwab ViCUM® 2 ml + standaard wattenstaafje (Deltalab, Cat. nr. 304278) - afname, transport en opslag.....	16
10.1.8	Vacumed® urine zonder conserveringsmiddel (FL medical, Cat. nr. 44950) – afname, transport en opslag.....	16
10.1.9	Regular FLOQSwab™ in 1 ml UTM™-medium (Copan, Cat. nr. 359C) - afname, transport en opslag.....	16
10.1.10	cobas® PCR-medium (Roche, Cat. nr. 06466281190) - afname, transport en opslag.....	17
10.1.11	Gevalideerde monsterextracten.....	17
10.2	Monsterverwerking.....	17
10.3	Internal Control (IC) (interne controle [IC]).....	18
10.3.1	Internal Control (interne controle) op de MagNA Pure 96.....	18
10.3.2	Internal Control (interne controle) op de MICROLAB STARlet IVD.....	18
10.3.3	Interne controle op de QIASymphony® SP.....	18
10.3.4	Internal Control (interne controle) op de easyMAG®.....	19
10.4	Vorbereiding van real-time PCR.....	20
10.4.1	Vorbereiding mastermix.....	20
10.4.2	Stabiliteit mastermix.....	21
10.5	Vorbereiding van PCR met geëxtraheerde nucleïnezuren (reflex-workflow).....	21
11	Programmering en analyse.....	21
12	Interpretatie van de resultaten.....	22
13	Beperkingen.....	23
14	Kwaliteitscontrole.....	23
15	Instructies voor de ResistancePlus® MG Positive Control.....	24

15.1	Gebruiksaanwijzing	24
16	Prestatiekarakteristieken	25
16.1	Klinische prestaties	25
16.1.1	Klinisch onderzoek 1	25
16.1.2	Klinisch onderzoek 2	27
16.1.3	Klinisch onderzoek 3	27
16.1.4	Klinisch onderzoek 4	29
16.1.5	Klinisch onderzoek 5	30
16.1.6	Klinisch onderzoek 6	31
16.1.7	Klinisch onderzoek 7	34
16.2	Analytische prestaties	35
16.2.1	Reproduceerbaarheid en herhaalbaarheid	35
16.2.2	Analytische gevoeligheid	38
16.2.3	Analytische specificiteit	38
16.2.4	Potentieel interfererende substanties	39
17	Klantondersteuning en technische ondersteuning	41
18	Referenties	42
19	Bijlage 1: LightCycler® 480 instrument II	43
19.1	Het LightCycler® 480 Instrument II (LC480 II) programmeren	43
19.2	Colour Compensation (kleurcompensatie) voor LightCycler® 480 Instrument II	47
19.3	Interpretatie van de resultaten	48
20	Bijlage 2: cobas z 480 analyser	49
20.1	De cobas z 480 analyser programmeren	49
20.2	Colour Compensation (kleurcompensatie) voor cobas z 480 analyser	53
20.3	Interpretatie van de resultaten	54
21	Bijlage 3: Applied Biosystems® 7500 Fast	55
21.1	De Applied Biosystems® 7500 Fast programmeren	55
21.2	Interpretatie van de resultaten	58
22	Bijlage 4: Applied Biosystems 7500 Fast Dx	59
22.1	De Applied Biosystems® 7500 Fast Dx programmeren	59
22.2	Interpretatie van de resultaten	63
23	Bijlage 5: Bio-Rad CFX96™ Dx en CFX96 Touch™ Real-Time PCR System	64
23.1	De Bio-Rad CFX96™ Dx en CFX96 Touch™ Real-Time PCR System programmeren	64
23.2	Interpretatie van de resultaten	67
24	Bijlage A: Interpretatie van de resultaten	68
24.1	FastFinder-platform - Minimum IT-vereisten	68
24.2	Device set up (instellingen apparaat) (nieuwe gebruiker of nieuw apparaat)	69
24.2.1	Colour Compensation (kleurcompensatie)	69
24.3	Plug-in voor assays (nieuwe gebruiker)	70
24.4	Monsternaamgeving	71
24.5	Mixpartijnummers toevoegen	71
24.6	Analyse	71
24.7	Resultaten	73

24.8	Referentiecurve.....	74
24.9	Overzicht van de resultaten.....	75
24.10	Resultaten exporteren.....	75
24.11	Voorbeeldgrafieken controles.....	76
24.11.1	<i>M. genitalium</i> , 23S rRNA-mutantcontrole (Pa).....	76
24.11.2	<i>M. genitalium</i> , 23S rRNA-wildtypecontrole (Pb).....	76
24.11.3	<i>M. genitalium</i> -negatieve controle (N) (negatief monster).....	77
24.12	Voorbeelden.....	77
24.12.1	Voorbeeld 1. High copy <i>M. genitalium</i> , 23S rRNA-wildtype monster.....	77
24.12.2	Voorbeeld 2. Low copy <i>M. genitalium</i> , 23S rRNA-wildtype monster.....	78
24.12.3	Voorbeeld 3. High copy <i>M. genitalium</i> , 23S rRNA-mutantmonster.....	78
24.12.4	Voorbeeld 4. Low copy <i>M. genitalium</i> , 23S rRNA-mutantmonster.....	78
24.12.5	Voorbeeld 5. Negatief monster.....	79
24.12.6	Voorbeeld 6. Ongeldig monster.....	79
24.12.7	Voorbeeld 7. Op te schonen monsters – Negatief signaal.....	79
24.12.8	Voorbeeld 8. Op te schonen monsters – Onzeker signaal.....	81
25	Woordenlijst.....	82

1 Productbeschrijving

De **ResistancePlus**[®] MG-kit detecteert tegelijkertijd *M. genitalium* en 5 mutaties op positie 2058 en positie 2059 in het 23S rRNA-gen (*E. coli*-nummering) die worden geassocieerd met resistentie tegen azitromycine (macrolide-antibioticum). De **ResistancePlus**[®] MG-kit is een 1-well realtime PCR-multiplex met 3 aflezingen. Aflezing 1 wijst op de aanwezigheid of afwezigheid van *M. genitalium* via detectie van het MgPa-gen; Aflezing 2 wijst op de aanwezigheid van een A2058G-, A2059G-, A2058T-, A2058C- of A2059C-mutatie in het 23S rRNA-gen; en Aflezing 3 is een interne controle om de extractie-efficiëntie en qPCR-remming te bepalen. De **ResistancePlus**[®] MG-kit gebruikt **PlexZyme**[®] en **PlexPrime**[®] met het oog op specificiteit en superieure multiplexcapaciteit. De assay is gevalideerd op monsters die geëxtraheerd zijn met het MagNA Pure 96 System (Roche), MICROLAB STARlet IVD (Hamilton), QIASymphony[®] SP (QIAGEN), NUCLISENS[®] easyMAG[®] (Biomérieux) en realtime detectie op het Roche LightCycler[®] 480 Instrument II (LC480 II), cobas z 480 analyser (z480), de Applied Biosystems[®] 7500 Fast (7500 Fast), Applied Biosystems[®] 7500 Fast Dx (7500 Fast Dx) en de Bio-Rad CFX96[™] Dx (CFX96 Dx) en CFX96 Touch[™] (CFX96 Touch) realtime PCR-detectiesystemen.

2 Beoogd gebruik

De **ResistancePlus**[®] MG-kit is een kwalitatieve, diagnostische, realtime multiplex PCR *in-vitro*test voor de identificatie van *M. genitalium* en de detectie van 5 mutaties in het 23S rRNA-gen (A2058G, A2059G, A2058T, A2058C en A2059C, *Escherichia coli*-nummering) die worden geassocieerd met resistentie tegen azitromycine (macrolide-antibioticum). De kit is bedoeld als hulpmiddel bij de diagnose van *M. genitalium* en detecteert mutaties geassocieerd met resistentie tegen azitromycine bij *M. genitalium*. De kit dient samen met klinische en andere laboratoriuminformatie te worden gebruikt.

De **ResistancePlus**[®] MG-kit mag worden gebruikt met de volgende soorten specimens: mannelijke en vrouwelijke urine, en anale, rectale, cervicale, endocervicale, vaginale, urethrale, penis-, meatus penis- en faryngeale uitstrijkjes, van symptomatische en asymptomatische patiënten.

Negatieve resultaten sluiten infecties met *M. genitalium* niet uit en zijn geen bevestiging van gevoeligheid voor azitromycine, aangezien er andere mechanismen kunnen zijn waardoor de behandeling mislukt.

De **ResistancePlus**[®] MG-kit is bedoeld voor gebruik in een professionele omgeving, zoals in ziekenhuizen, referentie- en overheidslaboratoria. De kit is niet bedoeld voor zelftests, thuisgebruik of point-of-care-gebruik.

3 Informatie over de pathogenen

M. genitalium is een kleine bacterie die in het urogenitale stelsel van de mens wordt aangetroffen. *M. genitalium* wordt geassocieerd met een reeks seksueel overdraagbare infecties (SOI's). Bij mannen is het de op één na meest voorkomende oorzaak van niet-gonorroïsche urethritis (NGU), die ook wordt geassocieerd met prostatitis, epididymitis en balanoposthitis, ontsteking van de eikel van de penis en de voorhuid¹. Bij vrouwen wordt het geassocieerd met cervicitis, bekkenontstekingsziekte (PID), en ook endometritis (ontsteking van de binnenkant van het endometrium) en salpingitis (ontsteking van de eileiders)^{1,2,3}.

Azitromycine wordt gewoonlijk gebruikt voor de behandeling van infecties met *M. genitalium* en voor de syndroombeheersing van SOI's zoals NGU en cervicitis. Azitromycine behoort tot de macrolidenklasse van antibiotica en werkt door binding aan 23S rRNA om de eiwitsynthese te remmen. Puntmutaties in het 23S rRNA-gen van *M. genitalium*, A2058G, A2059G, A2058T, A2058C en A2059C (*E. coli*-nummering) zijn in verband gebracht met het falen van de behandeling en/of de *in-vitro*resistentie tegen azitromycine^{4,5}. De meest voorkomende mutaties zijn A2058G en A2059G, die in een recente studie 89% van de macrolidenresistente mutaties bedroegen⁶.

4 Inhoud van de kit

Tabel 1. Inhoud van <i>ResistancePlus</i> [®] MG-kits				
Kleur dop	Inhoud	Beschrijving	Catalogusnr. 20001L-01 (100 reacties)	Catalogusnr. 2000125 (25 reacties)
Blauw	Plex Mastermix, 2x	Mastermix met de benodigde componenten voor qPCR inclusief dNTP's, MgCl ₂ , DNA-polymerase en -buffer	1 x 1 mL	1 x 250 µL
Bruin	MG+23S Mix, 20x (MG+23S-mix, 20x)	Mix met oligonucleotiden [^] voor amplificatie en detectie van <i>M. genitalium</i> en 23S rRNA-mutations	1 x 100 µL	1 x 25 µL
Wit	Control Mix 1 (controlemix 1), 20x	Mix met oligonucleotiden [^] voor amplificatie en detectie van de interne-controle-assay voor LC480 II en z 480	1 x 100 µL	1 x 25 µL
Rood	Internal Control cells (interne controlecellen) [#]	Interne controlecellen met DNA-matrijs voor interne controle voor het bepalen van de extractie- en amplificatie-efficiëntie	1 x 500 µL	1 x 100 µL
Neutraal	Nuclease Free Water (nucleasevrij water)	Water van PCR-kwaliteit	1 x 1 mL	1 x 1 mL

Bewaar buisjes met matrijzen gescheiden van oligomixen, bijvoorbeeld in een ruimte voor het hanteren van matrijzen of nucleïnezuren

[^] Oligonucleotiden zijn PCR-primerparen (inclusief **PlexPrime**[®]-primers), **PlexZyme**[®]-enzymen en fluorescerende sondes

Tabel 2. Inhoud van <i>ResistancePlus</i> [®] MG ₍₅₅₀₎ -kits				
Kleur dop	Inhoud	Beschrijving	Catalogusnr. 2000201 (100 reacties)	Catalogusnr. 2000225 (25 reacties)
Blauw	Plex Mastermix, 2x	Mastermix met de benodigde componenten voor qPCR inclusief dNTP's, MgCl ₂ , DNA-polymerase en -buffer	1 x 1 mL	1 x 250 µL
Bruin	MG+23S Mix, 20x (MG+23S-mix, 20x)	Mix met oligonucleotiden [^] voor amplificatie en detectie van <i>M. genitalium</i> en 23S rRNA-mutations	1 x 100 µL	1 x 25 µL
Wit	Control Mix 2 (controlemix 2), 20x	Mix met oligonucleotiden [^] voor amplificatie en detectie van de interne-controle-assay voor 7500 Fast en 7500 Fast Dx	1 x 100 µL	1 x 25 µL
Rood	Internal Control cells (interne controlecellen) [#]	Interne controlecellen met DNA-matrijs voor interne controle voor het bepalen van de extractie- en amplificatie-efficiëntie	1 x 500 µL	1 x 100 µL
Neutraal	Nuclease Free Water (nucleasevrij water)	Water van PCR-kwaliteit	1 x 1 mL	1 x 1 mL

Bewaar buisjes met matrijzen gescheiden van oligomixen, bijvoorbeeld in een ruimte voor het hanteren van matrijzen of nucleïnezuren

[^] Oligonucleotiden zijn PCR-primerparen (inclusief **PlexPrime**[®]-primers), **PlexZyme**[®]-enzymen en fluorescerende sondes

Tabel 3. Inhoud van *ResistancePlus*[®] MG₍₆₇₅₎-kits

Kleur dop	Inhoud	Beschrijving	Catalogusnr. 2000301 (100 reacties)	Catalogusnr. 2000325 (25 reacties)
Blauw	<i>Plex</i> Mastermix, 2x	Mastermix met de benodigde componenten voor qPCR inclusief dNTP's, MgCl ₂ , DNA-polymerase en -buffer	1 x 1 mL	1 x 250 µL
Bruin	MG+23S Mix, 20x (MG+23S-mix, 20x)	Mix met oligonucleotiden [^] voor amplificatie en detectie van <i>M. genitalium</i> en 23S rRNA-mutations	1 x 100 µL	1 x 25 µL
Wit	Control Mix 3 (controlemix 3), 20x	Mix met oligonucleotiden [^] voor amplificatie en detectie van de interne controle-assay voor CFX96 Dx en CFX96 Touch	1 x 100 µL	1 x 25 µL
Rood	Internal Control cells (interne controlecellen) [#]	Interne controlecellen met DNA-matrijs voor interne controle voor het bepalen van de extractie- en amplificatie-efficiëntie	1 x 500 µL	1 x 100 µL
Neutraal	Nuclease Free Water (nucleasevrij water)	Water van PCR-kwaliteit	1 x 1 mL	1 x 1 mL

Bewaar buisjes met matrijzen gescheiden van oligomixen, bijvoorbeeld in een ruimte voor het hanteren van matrijzen of nucleïnezuren

[^] Oligonucleotiden zijn PCR-primerparen (inclusief *PlexPrime*[®]-primers), *PlexZyme*[®]-enzymen en fluorescerende sondes

5 Vervoer en opslag

- De onderdelen van de *ResistancePlus*[®] MG-kits worden verzonden op droogijs of zakken met ijsgel. Alle onderdelen moeten na ontvangst worden bewaard bij -25°C tot -15°C. Geadviseerd wordt om het aantal vries/doocycli te beperken tot 15.
- Als de kit wordt opgeslagen onder de aanbevolen omstandigheden en er op de juiste wijze mee wordt omgegaan, blijft de werking van de kit behouden tot de op het etiket vermelde houdbaarheidsdatum. Niet gebruiken na de houdbaarheidsdatum.
- Alle ernstige incidenten dienen te worden gemeld aan SpeedX via tech@speedx.com.au

6 Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen

6.1 Algemeen

- Uitsluitend gebruiken voor *in-vitro*diagnostiek.
- Lees deze instructies zorgvuldig voor het gebruik. Volg nauwkeurig de beschreven procedures om te zorgen voor betrouwbare testresultaten. Elke afwijking van deze procedures kan de testresultaten beïnvloeden.
- Gebruikers moeten goed getraind zijn in het gebruik van de *ResistancePlus*[®] MG-assay.
- Elk ernstig incident moet worden gemeld aan de fabrikant en de bevoegde autoriteit van de lidstaat waar de gebruiker en/of de patiënt is gevestigd.

6.2 Laboratorium

- Het verdient aanbeveling om monsterbereiding/-extractie, mastermixbereiding, monstertoevoeging en de temperatuercycli op ruimtelijk gescheiden plaatsen uit te voeren. Het PCR-instrument moet zich bij voorkeur in een kamer bevinden die gescheiden is van ruimten waar reacties worden voorbereid.
- Het verdient aanbeveling om routinematige laboratoriumvoorzorgsmaatregelen te nemen. Draag geschikte persoonlijke beschermingsmiddelen, zoals handschoenen, een beschermende bril en een laboratoriumjas bij het hanteren van de reagentia.
- Er kunnen pathogene organismen aanwezig zijn in klinische specimens. Behandel alle biologische specimens als potentieel infecterend en volg de veiligheidsprocedures van uw instelling bij de verwerking van chemicaliën en biologische monsters.
- Volg de procedures voor het afvoeren van gevaarlijk afval van uw instelling voor de juiste afvoer van specimens, reagentia en andere potentieel vervuilde materialen.

6.3 Verwerking van specimens

- Specimens moeten worden verzameld, vervoerd en opgeslagen met standaard laboratoriumtechnieken of volgens de gebruiksaanwijzingen van de verzamelkit.

6.4 Assay

- Elementaire voorzorgsmaatregelen ter voorkoming van verontreiniging van PCR-reacties zijn onder meer het gebruik van steriele filterpipetpunten, het gebruik van een nieuwe pipetpunt voor elke pipettering en scheiding van de workflow.
- PCR-tests zijn gevoelig voor verontreiniging afkomstig van eerder gebruikte PCR-producten. Open reactievaten nooit na afloop van PCR.
- Het testreagens bevat een IDTE-buffer die ernstige oogirritatie kan veroorzaken. Het wordt aanbevolen om de reagentia in een goed geventileerde ruimte te gebruiken en de juiste persoonlijke beschermingsmiddelen te dragen bij het hanteren van de reagentia, zoals handschoenen, oogbescherming en een laboratoriumjas.

6.5 Veiligheidsvoorzorgsmaatregelen

- Veiligheidsgegevensbladen (SDS) zijn op aanvraag verkrijgbaar. Neem voor meer informatie contact op met tech@speedx.com.au.

6.6 Test-plug-ins: waarschuwingen/voorzorgsmaatregelen/beperkingen

- SpeedX-software kan alleen de analyse van ruwe data afkomstig uit de testkit uitvoeren wanneer deze wordt gebruikt met het bijbehorende PCR-instrument. De software heeft geen controle over de bereiding van monsters, reacties, programmering van de apparatuur of het uitvoeren van de behandeling.
- Gebruikers moeten voldoende getraind zijn in het gebruik van de **ResistancePlus**[®] MG-analysesoftware en de toegang moet worden beperkt tot elke aangewezen afzonderlijke gebruiker.
- Het wordt aanbevolen om gebruikersverificatie en cyberbeveiliging, zoals antivirussoftware, of het gebruik van een firewall binnen het IT-systeem en de infrastructuur die de software gebruikt, te implementeren.
- Neem bij detectie van een cybersecurityincident, zoals onbevoegde toegang en ransomware-aanvallen, contact op met tech@speedx.com.au voor verdere ondersteuning.

7 Bijbehorende producten en verbruiksmaterialen

Positief controlemonster

- **ResistancePlus**[®] MG positieve controlekit (SpeedX, Cat. nr. 95001)

Algemene verbruiksartikelen voor lab

- Handschoenen en schone laboratoriumjassen
- Vortexmixer
- Tafelcentrifuge voor buisjes van 0,5 mL en 1,5 mL
- Micropipetten
- Steriele aerosolbestendige pipetpunten
- Buisjes van 0,5 mL en 1,5 mL (PCR-kwaliteit)
- Buisjes van 2,0 mL (voor voorverdunding van de interne-controlecellen)

Voor MagNA Pure 96 Instrument

- 1x Phosphate Buffered Saline (PBS - 1x met fosfaat gebufferde zoutoplossing)
- MagNA Pure 96 Internal Control Tube (buisje voor interne controle) (Roche, catalogusnr. 06374905001)
- MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit (klein volume-kit) (Roche, catalogusnr. 06543588001)
- MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Large Volume Kit (groot volume-kit) (Roche, catalogusnr. 06374891001)

- MagNA Pure 96 System Fluid (external) (vloeistof voor externe controle) (Roche, catalogusnr. 06640729001)
- MagNA Pure 96 Processing Cartridge (verwerkingspatroon) (Roche, catalogusnr. 06241603001)
- MagNA Pure 96 Pure tip 1000uL (Zuivere tip 1000uL) (Roche, catalogusnr. 6241620001)
- MagNA Pure 96 Resultatenplaat (Roche, catalogusnr. 06241611001)
- MagNA Pure Sealing Foil (Zuivere afdichtfolie) (Roche, Catalogusnr. 06241638001)

Voor MICROLAB STARlet Instrument

- 1x Phosphate Buffered Saline (PBS - 1x met fosfaat gebufferde zoutoplossing)
- STARMag 96 X 4 Universal Cartridge (384T)-kit (Seegene, catalogusnr. 744300.4.UC384)
- 2,0 mL buisjes

Voor het QIASymphony® SP-instrument

- 1x Phosphate Buffered Saline (PBS - 1x met fosfaat gebufferde zoutoplossing)
- Monsterpreparaatpatronen, 8-wells (Qiagen, catalogusnr. 997002)
- 8-draadsafdekkingen (Qiagen, catalogusnr. 997004)
- Filtertips, 200 µL en 1500 µL (Qiagen, catalogusnr. 990332 en 997024)
- 2 mL buisjes (Sarstedt, catalogusnr. 72.639 of 72.694)
- 14 mL polystyreenbuisjes (Corning, catalogusnr. 352051)
- DSP Virus/Pathogen Mini-kit (QIAGEN, catalogusnr. 937036)

Voor NucliSENS® easyMAG®-instrument

- 1x Phosphate Buffered Saline (PBS - 1x met fosfaat gebufferde zoutoplossing)
- NucliSENS® easyMAG® lysis-buffer 4X1L (Biomerieux, catalogusnr. 280134)
- NucliSENS® easyMAG® lysis-buffer 2ML 48T (Biomerieux, catalogusnr. 200292)
- NucliSENS® easyMAG® magnetisch silica (Biomerieux, catalogusnr. 280133)
- NucliSENS® easyMAG® extractiebuffer 1 (Biomerieux, catalogusnr. 280130)
- NucliSENS® easyMAG® extractiebuffer 2 (Biomerieux, catalogusnr. 280131)
- NucliSENS® easyMAG® extractiebuffer 3 (Biomerieux, catalogusnr. 280132)
- NucliSENS® easyMAG® artikelen voor eenmalig gebruik (Biomerieux, catalogusnr. 280135)

Voor het LightCycler® 480 Instrument II en de cobas z 480 analyser

- **PlexPCR®** Colour Compensation (CC)-kit (kleurcompensatiekit) (SpeedX, catalogusnr. 90001)
- LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 (96-wells plaat) (Roche, catalogusnr. 04729692001)
- LightCycler® 480 Sealing Foil (afdichtfolie) (Roche, catalogusnr. 04729757001)

Voor Applied Biosystems® 7500 Fast en 7500 Fast Dx

- MicroAmp® optische 96-well reactieplaten (ThermoFisher Scientific, catalogusnr. 4316813)
- MicroAmp® Optical Adhesive Film (optisch hechtfolie) (ThermoFisher Scientific, catalogusnr. 4360954)

Voor Bio-Rad CFX96™ Dx en CFX96 Touch™ real-time PCR-detectiesysteem

- Multiplate™ 96-well PCR plates (96-wells-platen) (Bio-Rad, catalogusnr. MLP9601)
- Microseal® 'B' PCR Plate Sealing Film (afdichtfilm), zelfklevend, optisch (Bio-Rad, catalogusnr. MSB1001)

Hulpmiddelen voor monsterverzameling

- Multi-Collect-monsterkit (Abbott, Cat. nr. 9K12-01)
- Aptima[®] urinemonsterkit (Hologic, Cat. nr. 301040)
- Aptima[®] uniseks monsterkit met wattenstaafje (Hologic, Cat. nr. 301041)
- DeltaSwab ViCUM[®] 2 mL + standaard wattenstaafje (Deltalab, Cat. nr. 304278)
- Vacumed[®] urine zonder conserveringsmiddel (FL medical, Cat. nr. 44950)
- Regular FLOQSwab[™] in 1 mL UTM[™]-medium (Copan Cat. nr. 359C)
- cobas[®] PCR-medium (Roche, Cat. nr. 06466281190)

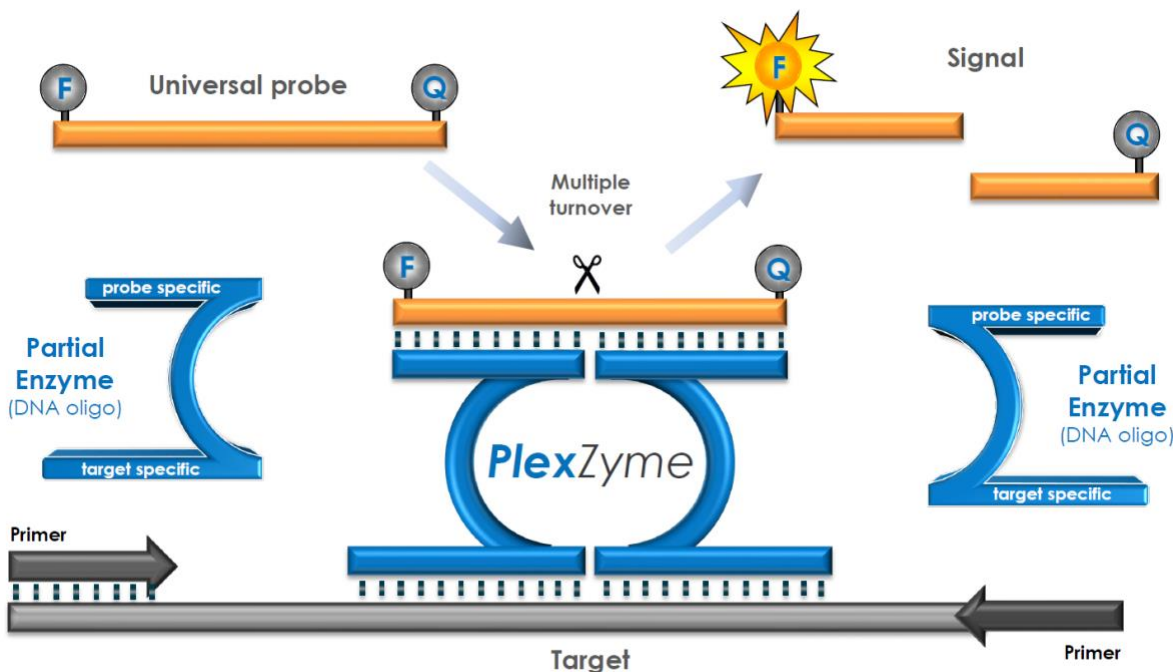
8 Principe van de technologie

Realtime-PCR (qPCR) kan worden gebruikt voor de amplificatie en detectie van specifieke doel-nucleïnezuren van pathogenen. **PlexPCR[®]** is een qPCR-technologie waarbij gebruik wordt gemaakt van **PlexZyme[®]**-enzymen, die het geamplificeerde product detecteren en melden door het genereren van een fluorescentiesignaal (**Afbeelding 1**). **PlexPrime[®]**-primers voor specifieke amplificatie van mutantereksen die gekoppeld zijn aan mutantspecifieke **PlexZyme[®]**-detectie (**Afbeelding 2**).

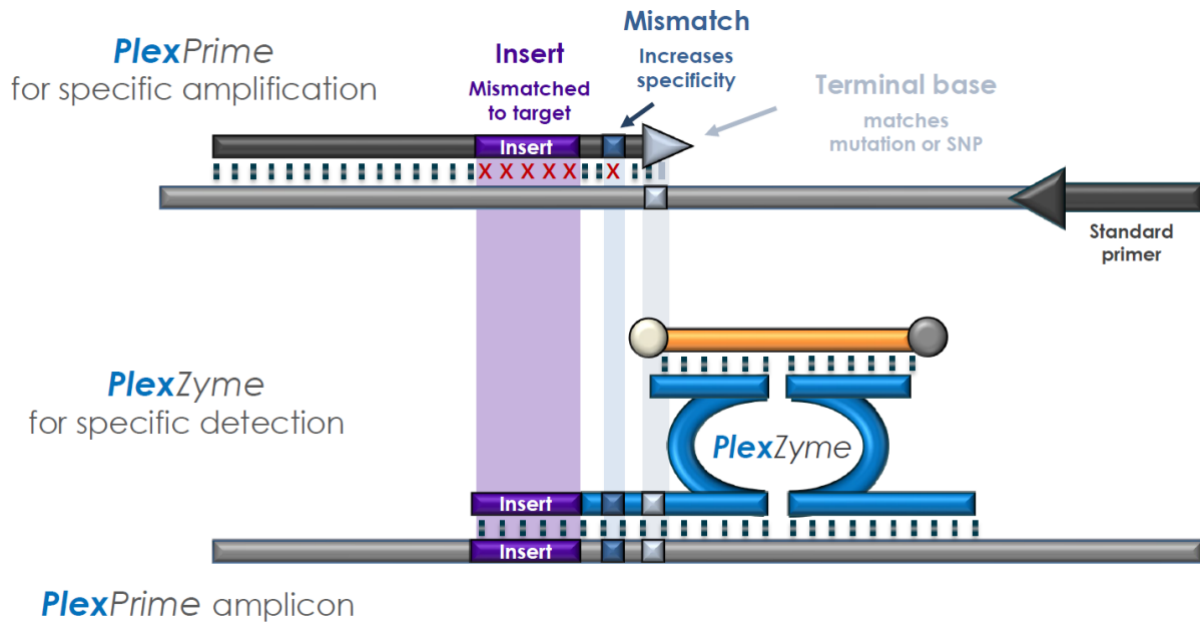
PlexZyme[®]-enzymen zijn katalytische DNA-complexen die bestaan uit twee DNA-oligo's die 'partiële enzymen' worden genoemd. Elk partieel enzym heeft een doelspecifiek gebied, een katalytische kern en een gebied dat aan een universele sonde bindt. Als het doelproduct aanwezig is, binden de twee partiële enzymen naast elkaar en vormen zo het actieve **PlexZyme[®]** dat de katalytische activiteit bezit om een gelabelde sonde te splitsen. Door deze splitsing worden de fluorofoor- en quencherkleurstof van elkaar gescheiden, waardoor een fluorescentiesignaal wordt geproduceerd dat realtime kan worden gevolgd. **PlexZyme[®]**-enzymen hebben in vergelijking met andere detectietechnologieën extra specificiteit, omdat er binding van twee partiële enzymen nodig is voor detectie. Bovendien zijn **PlexZyme[®]**-enzymen 'multiple-turnover'-enzymen, zodat in elke PCR-cyclus meerdere sondes kunnen worden gesplitst, wat tot een sterk en gevoelig signaal leidt. **PlexZyme[®]**-assays zijn zeer gevoelig en specifiek en uitermate geschikt voor multiplexdetectie van pathogenen.

PlexPrime[®]-primers hebben drie functionele gebieden. Het lange 5'-gebied verankert de primer op een specifieke locatie en het korte 3'-gebied richt zich selectief op de extensie van de mutantbase. Er ligt een insertiesequentie tussen de 5'- en 3'-gebieden die als een brugstructuur fungeert en een target-onafhankelijke sequentie in het resulterende amplicon invoegt om de selectieve druk van het 3'-gebied verhogen. Bij multiplex is iedere **PlexPrime[®]**-primer ontworpen om zich op een specifieke mutantbase te richten en omvat een unieke insertiesequentie, waardoor onderscheiden gemuteerde ampliconsequenties worden geproduceerd. In tegenstelling tot andere sonde-gebaseerde detectietechnologieën kan het **PlexZyme[®]**-enzyme worden overlapt door de **PlexPrime[®]**-primer om zich te richten op het specifieke gemuteerde amplicon dat de mutantbase en de erin opgenomen insertiesequentie bevat. De unieke combinatie van **PlexPrime[®]**-primers gekoppeld met **PlexZyme[®]**-enzymen maakt de specifieke amplificatie van gemuteerde sequenties en de gevoelige en specifieke detectie bij multiplex mogelijk.

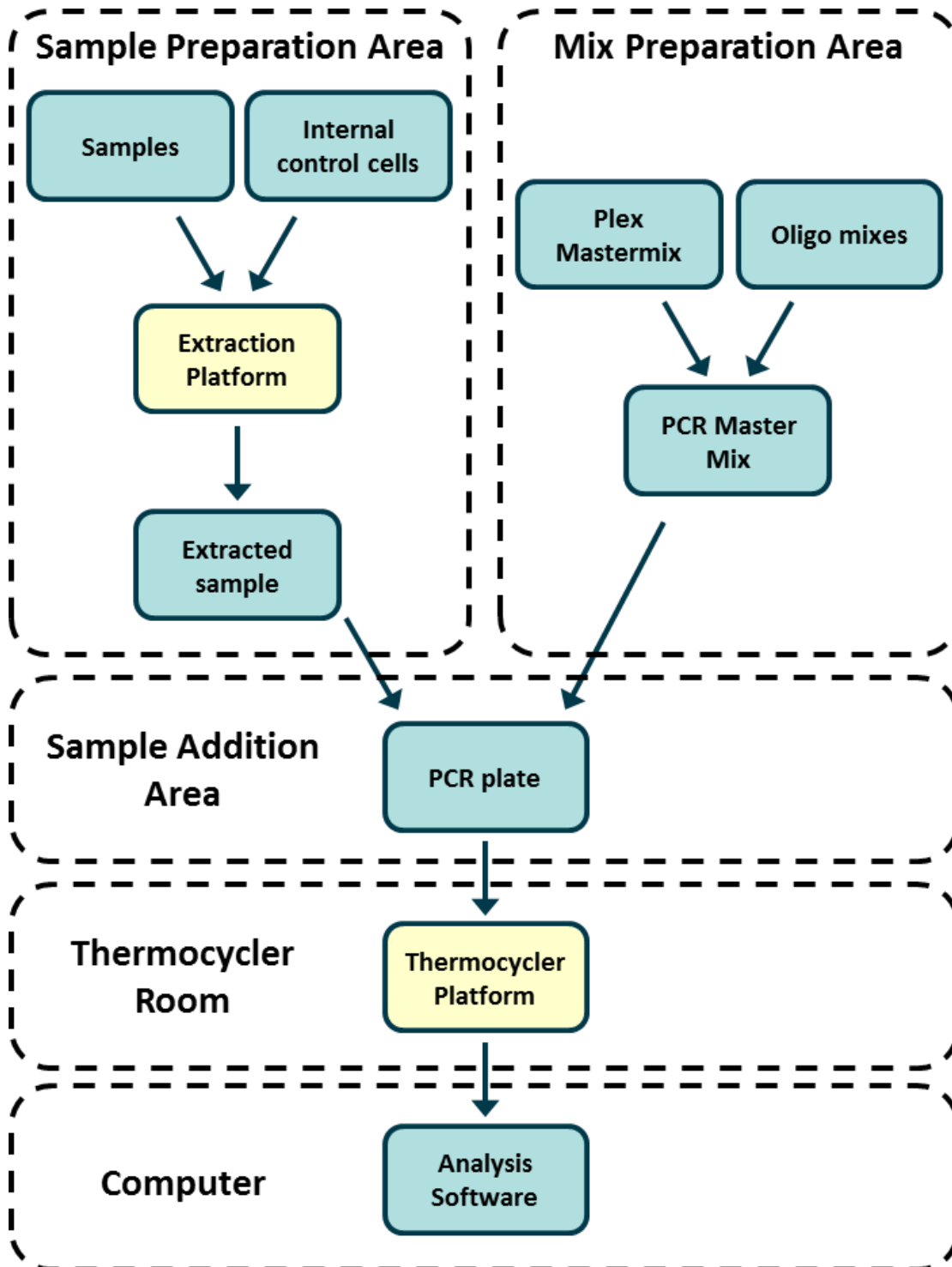
Afbeelding 1. Schematische voorstelling van **PlexZyme[®]**-detectie en universele signalering



Afbeelding 2. Schematische weergave van de *PlexPrime*[®]-primer gekoppeld aan *PlexZyme*[®]-detectie. De *PlexPrime*[®]-primer amplificeert specifiek de gemuteerde sequentie en *PlexZyme*[®]-enzymen detecteren specifiek het amplicon.



9 Overzicht procedure



10 Gedetailleerde procedure

NB: Geleverde reagentia zijn cursief weergegeven, met daarachter tussen haakjes de kleur van de deksel van het buisje.

10.1 Monsterafname, transport en opslag

Mannelijke urine, vrouwelijke urine, en urethrale, anale, rectale, faryngeale, penis-, meatus penis-, cervicale, endocervicale en vaginale uitstrijkjes van symptomatische en asymptomatische patiënten moeten worden afgenomen, vervoerd en opgeslagen volgens standaard laboratoriumtechnieken of conform de gebruiksaanwijzing van de afnamekit.

10.1.1 Gevalideerde hulpmiddelen voor monsterverzameling

Het niet correct verzamelen, opslaan en transporten van monsters zal waarschijnlijk resulteren in onjuiste testresultaten. Een goede training in het verzamelen van monsters wordt sterk aangeraden, om de kwaliteit en stabiliteit van de monsters te garanderen.

Hulpmiddelen voor monsterverzameling, die zijn gevalideerd voor het gebruik met de **ResistancePlus**[®] MG-kit, worden hieronder beschreven met een korte handleiding gebaseerd op de gebruikersinstructies voor verzameling, hanteren en transport van de producent. Deze instructies zijn niet bedoeld om de door de producent verstrekte instructies te vervangen of teniet te doen. Raadpleeg altijd de gebruikersinstructies van de producent voor het correct verzamelen van monsters.

Voorafgaand aan het gebruik van elke verzamelmethode dienen getrainde medewerkers het hulpmiddel voor monsterverzameling en de methodologie goed te begrijpen. Raadpleeg ten minste de testbeschrijving voor het volgende: aanduiding van het monstertype, voldoende volume, procedure(s), benodigde verzamelmaterialen, voorbereiding patiënt, en het juist hanteren en bewaren van monsters.

10.1.2 Correct verzamelen, transporten en opslaan van urine

1. Voor het zelf verzamelen van urine door de patiënt wordt het gebruik van een doorzichtige steriele verzamelbeker, zonder conserveringsmiddelen of transportmedia, aanbevolen.
2. De patiënt dient 20-50 mL te verzamelen van de eerst uitgeplaste urine en de verzamelbeker vervolgens stevig te sluiten.
3. Geadviseerd wordt om urinemonsters in dubbele zakken met absorberend materiaal te verzenden. De bewaartemperatuur van urinemonsters is afhankelijk van de beoogde tijd tot de analyse.

10.1.3 Met een droog wattenstaafje afgenomen monsters - afname, transport en opslag

Droge wattenstaafjes kunnen gebruikt worden voor afname van verschillende medische patiëntmonsters. Raadpleeg, vanwege de grote variatie, de bijsluiters van de producent voor de betreffende monstertypes en afnamemethoden.

10.1.4 Multi-Collect-monsterkit (Abbott, Cat. nr. 9K12-01) - afname, transport en opslag

Hieronder zijn de aanwijzingen samengevat voor afname, transport en opslag van urine, vagina-uitstrijkjes en mannelijke urethra-uitstrijkjes met de Multi-Collect-monsterkit (Abbott, Cat. nr. 9K12-01).

10.1.4.1 Verzamelen, transporten en opslaan van een urinemonster

1. De patiënt dient gedurende minimaal een uur voorafgaand aan het verzamelen van de urine niet geplast te hebben.
2. Gooi het wattenstaafje voor monsterafname weg; dit is niet nodig bij het verzamelen van urinemonsters.
3. Gebruik een urinemonsterbeker. De patiënt dient 20 tot 30 mL op te vangen van de eerst uitgeplaste urine (het eerste deel van de urinestroom).
4. Schroef de dop van het transportbuisje, zonder de in de buis aanwezige transportbuffer te morsen.
5. Hanteer de dop en de buis voorzichtig om contaminatie te voorkomen.
6. Gebruik de plastic pipet om urine over te brengen van de verzamelbeker naar het transportbuisje tot het vloeistofniveau in het buisje binnen het heldere venster valt van het etiket op het transportbuisje. Vul het buisje niet tot de rand. Bij te weinig urine moet er een nieuw monster worden verzameld. Mogelijk is voor het benodigde volume iets meer urine nodig dan de pipet in een keer kan opnemen.
7. Sluit het transportbuisje zorgvuldig af met de dop. Zorg ervoor dat de dop het buisje goed afsluit.
8. Label het transportbuisje met een zelfklevend etiket met daarop de identificatie van het monster, inclusief de verzameldatum. Let op dat u het vulvenster op het transportbuisje niet afplakt.
9. Na het verzamelen kan het transportbuisje gedurende maximaal 14 dagen worden getransporteerd en bewaard bij 2°C tot 30°C. Indien langere opslag vereist is, kan het transportbuisje tot 90 dagen bewaard worden bij -10°C of kouder.

10.1.4.2 Vagina-uitstrijkje - afname, transport en opslag

1. Gooi de wegwerppipet weg; deze is niet nodig voor de afname van een vagina-uitstrijkje.

2. Verwijder het steriele wattenstaafje uit de verpakking, zonder hierbij het wattengedeelte aan te raken. Leg het wattenstaafje nergens neer.
3. Breng het witte wattengedeelte van het wattenstaafje ongeveer 5 cm in de opening van de vagina.
4. Roteer het wattengedeelte van het wattenstaafje gedurende 15 tot 30 seconden voorzichtig tegen de wanden van de vagina.
5. Neem het wattenstaafje voorzichtig uit de vagina.
6. Hanteer de dop en het transportbuisje voorzichtig om contaminatie te voorkomen.
7. Schroef de dop van het transportbuisje en plaats het wattenstaafje met het uitstrijkje direct in het transportbuisje met het witte wattengedeelte naar beneden.
8. Breek de steel van het wattenstaafje voorzichtig af bij de markering op de steel; doe dit voorzichtig om morsen van de inhoud te voorkomen.
9. Sluit het transportbuisje af met de dop. Zorg ervoor dat de dop het busje goed afsluit.
10. Label het transportbuisje met een zelfklevend etiket met daarop de identificatie van het monster, inclusief de afnamedatum.
11. Na afname kan het transportbuisje gedurende maximaal 14 dagen worden getransporteerd en bewaard bij 2°C tot 30°C. Indien langere opslag vereist is, dan kan het transportbuisje tot 90 dagen bewaard worden bij -10°C of kouder.

10.1.4.3 Urethra-uitstrijkje bij mannen - afname, transport en opslag

1. De patiënt moet gedurende minimaal een uur voorafgaand aan het verzamelen van het monster niet hebben geplast.
2. Gooi de wegwerppipet weg; deze is niet nodig voor de afname van een urethra-uitstrijkje.
3. Verwijder het steriele wattenstaafje uit de verpakking, zonder hierbij het wattengedeelte aan te raken. Leg het wattenstaafje nergens neer.
4. Breng het witte wattengedeelte van het wattenstaafje 2 tot 4 cm in de urethra.
5. Roteer het wattengedeelte van het wattenstaafje voorzichtig gedurende 2 tot 3 seconden om een adequate monsterafname te garanderen.
6. Neem het wattenstaafje voorzichtig uit de urethra.
7. Hanteer de dop en het transportbuisje voorzichtig om contaminatie te voorkomen.
8. Schroef de dop van het transportbuisje en plaats het wattenstaafje met het uitstrijkje direct in het transportbuisje met het witte wattengedeelte naar beneden.
9. Breek de steel van het wattenstaafje voorzichtig af bij de markering op de steel; doe dit voorzichtig om morsen van de inhoud te voorkomen.
10. Sluit het transportbuisje af met de dop. Zorg ervoor dat de dop het busje goed afsluit.
11. Label het transportbuisje met een zelfklevend etiket met daarop de identificatie van het monster, inclusief de afnamedatum.
12. Na afname kan het transportbuisje gedurende maximaal 14 dagen worden getransporteerd en bewaard bij 2°C tot 30°C. Indien langere opslag vereist is, kan het transportbuisje tot 90 dagen bewaard worden bij -10°C of kouder.

10.1.5 Aptima® urinemonsterkit (Hologic, Cat. nr. 301040) – afname, transport en opslag

Hieronder worden de instructies samengevat voor het verzamelen, het transport en de opslag van een urinemonster bij mannen en vrouwen met behulp van de Aptima® urinemonsterkit.

1. Voor het zelf verzamelen van urine door de patiënt wordt het gebruik van een doorzichtige steriele verzamelbeker, zonder conserveringsmiddelen of transportmedia, aanbevolen.
2. De patiënt wordt gevraagd om 20-30 mL van de eerst uitgeplaste urine te verzamelen in de verzamelbeker. Vrouwelijke patiënten dienen de schaamlippen niet eerst schoon te maken.
3. Gebruik de meegeleverde pipet en het transportbuisje in de Aptima® urinemonsterkit om met de pipet 2 mL urine over te brengen in het transportbuisje waarvan de dop eerst is verwijderd. Het juiste volume valt binnen de zwarte vullijnen op het transportbuisje. De urine moet binnen 24 uur na het verzamelen, worden overgebracht van de doorzichtige steriele verzamelbeker naar het Aptima-transportbuisje.
4. Sluit het transportbuisje zorgvuldig af met de dop.
5. Na het verzamelen kunnen de urinemonsters in het Aptima-transportbuisje getransporteerd en bewaard worden bij 2°C tot 30°C tot ze getest worden. Raadpleeg de instructies van de producent voor gedetailleerde informatie over het optimaliseren van de opslag.

10.1.6 Aptima® uniseks monsterkit met wattenstaafje (Hologic, Cat. nr. 301041) - afname, transport en opslag

Hieronder worden de instructies samengevat voor afname, transport en opslag van een endocervicaal uitstrijkje bij vrouwen en van een urethra-uitstrijkje bij mannen met behulp van de Aptima® uniseks monsterkit met wattenstaafje (Hologic, Cat. nr. 301041).

10.1.6.1 Endocervicaal uitstrijkje - afname, transport en opslag

1. Verwijder overtollig mucus van de baarmoederhals en de omliggende slijmvliezen met behulp van het schoonmaakwattenstaafje (wattenstaafje met witte steel in de verpakking met de rode opdruk). Gooi dit wattenstaafje weg. Let op: voor het verwijderen van overtollig mucus van de baarmoederhals kan ook een wattenstaaf met grote tip (niet meegeleverd) worden gebruikt.
2. Breng het wattenstaafje voor monsterafname (blauwe steel in de verpakking met de groene opdruk) in de baarmoederhals.
3. Roteer het wattenstaafje voorzichtig met de klok mee in de baarmoederhals, gedurende 10 tot 30 seconden, om een adequate monsterafname te garanderen.

4. Neem het wattenstaafje voorzichtig uit de baarmoederhals: voorkom elk contact met het slijmvlies van de vagina.
5. Verwijder de dop van het transportbuisje en plaats het wattenstaafje met het monster direct in het transportbuisje.
6. Breek de steel van het wattenstaafje voorzichtig af tegen de wand van het busje, bij de markering op de steel, en gooi het bovenste deel van de steel weg; doe dit voorzichtig om morsen van de inhoud te voorkomen.
7. Sluit het transportbuisje stevig af met de dop. Na het verzamelen kan het transportbuisje met het uitstrijkje worden getransporteerd en bewaard bij 2°C tot 30°C tot het uitstrijkje getest wordt.

10.1.6.2 Urethra-uitstrijkje bij mannen - afname, transport en opslag

1. De patiënt moet gedurende minimaal een uur voorafgaand aan het verzamelen van het monster niet hebben geplast.
2. Breng het wattenstaafje voor monsterafname (blauwe steel in de verpakking met de groene opdruk) 2 tot 4 cm in de urethra.
3. Roteer het wattenstaafje voorzichtig met de klok mee in de urethra, gedurende 2 tot 3 seconden, om een adequate monsterafname te garanderen.
4. Neem het wattenstaafje voorzichtig uit de urethra.
5. Verwijder de dop van het transportbuisje en plaats het wattenstaafje met het monster direct in het transportbuisje.
6. Breek de steel van het wattenstaafje voorzichtig af tegen de wand van het busje, bij de markering op de steel, en gooi het bovenste deel van de steel weg; doe dit voorzichtig om morsen van de inhoud te voorkomen.
7. Sluit het transportbuisje stevig af met de dop. Na het verzamelen kan het transportbuisje met het uitstrijkje worden getransporteerd en bewaard bij 2°C tot 30°C tot het uitstrijkje getest wordt.

10.1.7 DeltaSwab ViCUM® 2 mL + standaard wattenstaafje (Deltalab, Cat. nr. 304278) - afname, transport en opslag

Hieronder worden de instructies samengevat voor afname, transport en opslag van vaginale, cervicale, urethrale, faryngale en rectale uitstrijkjes met behulp van de DeltaSwab ViCUM® 2 mL + standaard wattenstaafje (Deltalab, Cat. nr. 304278)

1. Open de verpakking met het busje door de losse uiteinden met beide handen in tegengestelde richting te trekken.
2. Schud het busje voorzichtig.
3. Neem het wattenstaafje uit de open verpakking en neem het monster af.
4. Open het busje met de andere hand en plaats het wattenstaafje zo in het busje dat het wattengedeelte in het medium steekt.
5. Zorg ervoor dat het breekpunt van het wattenstaafje tegen de bovenrand van het busje ligt door het wattenstaafje licht naar beneden te duwen. Breek het wattenstaafje af bij het breekpunt door dit tegen de binnenzijde van het busje te duwen.
6. Gooi het afgebroken bovenste deel weg, schroef de dop stevig vast en schud om het monster in het medium op te lossen.
7. Na het verzamelen kan het transportbuisje met het uitstrijkje worden getransporteerd en bewaard bij 4°C tot 25°C tot het uitstrijkje getest wordt.

10.1.8 Vacumed® urine zonder conserveringsmiddel (FL medical, Cat. nr. 44950) – afname, transport en opslag

Hieronder worden de instructies samengevat voor het verzamelen, het transport en de opslag van een urinemonster bij mannen en vrouwen met behulp van de Vacumed® urine zonder conserveringsmiddel (FL medical, Cat. nr. 44950).

1. Neem het deksel van de urineverzamelbeker en leg dit op de kop op een schoon oppervlak.
2. Raak de binnenzijde van de verzamelbeker of het deksel niet aan.
3. Verzamel het urinemonster. Vul de verzamelbeker daarbij tot ongeveer driekwart.
4. Schroef het deksel met de klok mee op de beker tot deze goed afsluit.
5. Schud de inhoud voorzichtig.
6. Verwijder het beschermingsetiket op het deksel van de verzamelbeker gedeeltelijk (niet volledig).
7. Breng het monsterbuisje in de daarvoor bestemde opening en duw het zachtjes naar beneden. Wacht tot het monsterbuisje gevuld is (tot het instromen stopt).
8. Verwijder het monsterbuisje en plak het beschermingsetiket volledig terug op het deksel.
9. Bewaar het monsterbuisje bij 4°C tot 25°C tot het monster getest wordt.

10.1.9 Regular FLOQSwab™ in 1 mL UTM™-medium (Copan, Cat. nr. 359C) - afname, transport en opslag

Hieronder worden de instructies samengevat voor afname, transport en opslag van vaginale uitstrijkjes met behulp van de Regular FLOQSwab™ in 1 mL UTM™-medium (Copan, Cat. nr. 359C).

1. Open de verpakking van de UTM-kit en verwijder het monsterbuisje en het zakje met het steriele wattenstaafje.
2. Neem het steriele wattenstaafje uit het zakje en neem het medische monster af. Voorkom contaminatie door ervoor te zorgen dat het wattengedeelte alleen in contact komt met de verzamellocatie.
3. Na afname van het monster, schroef de dop van het monsterbuisje; doe dit voorzichtig om morsen van de inhoud te voorkomen.
4. Plaats het uitstrijkje in het monsterbuisje tot het breekpunt van het wattenstaafje op gelijke hoogte is met de rand van het monsterbuisje.
5. Houd het geheel niet te dicht bij uw gezicht en buig en breek het wattenstaafje bij het breekpunt. Gooi het afgebroken bovenste deel van de steel weg.
6. Schroef de dop terug op het monsterbuisje en sluit dit hermetisch af.

7. Bewaar het monsterbuisje tussen 2 en 25°C en test het uitstrijkje binnen 48 uur.
8. Voorafgaand aan het testen, vortex het monsterbuisje gedurende 20 seconden om het monster uit het wattenstaafje vrij te maken en homogeen in het medium op te lossen.

10.1.10 cobas® PCR-medium (Roche, Cat. nr. 06466281190) - afname, transport en opslag

Hieronder worden de instructies samengevat voor het verzamelen, het transport en de opslag van een urinemonster bij mannen en vrouwen in cobas® PCR-medium (Roche, Cat. nr. 06466281190).

1. Meng de urine en vul met behulp van een wegwerppipet (niet meegeleverd) het cobas® monsterbuisje met PCR-medium. Let op: urine kan tot 24 uur bewaard worden bij 2°C tot 30°C alvorens deze over te brengen in het cobas® monsterbuisje met PCR-medium.
2. Het juiste volume urine voor in het monsterbuisje wordt aangeduid met twee zwarte lijnen op het etiket.
3. Draai de dop stevig terug op het cobas® monsterbuisje met PCR-medium.
4. Meng de inhoud van het buisje door dit 5 keer met de onderzijde naar boven te keren. Het monster is nu klaar voor transport en testen.
5. Transporteer en bewaar het cobas® monsterbuisje met PCR-medium met de gestabiliseerde urine bij 2°C tot 30°C.

10.1.11 Gevalideerde monsterextracten

Voor gebruik gevalideerde monsterextracten omvatten:

- cobas® x480 (van het CT/NG-protocol)

Zie **paragraaf 10.5** voor instructies voor het voorbereiden van de PCR met geëxtraheerde nucleïne-zuren (reflex-workflow).

10.2 **Monsterverwerking**

De **ResistancePlus®** MG-kit is gevalideerd op de volgende extractie-instrumenten die in **Tabel 4** worden vermeld.

Zie **paragraaf 10.3** voor instructies over het gebruik van de Internal Control (interne controle).

Tabel 4. Gevalideerde extractieprotocollen				
Instrument	Extractiekit	Monstervolume	Protocol	Elutievolume
MagNA Pure 96 ^a	MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit	200 µL	Pathogen Universal 200	50 µL of 100 µL
MagNA Pure 96 ^a	MagNA Pure 96 DNA en Viral NA Large Volume Kit	1000 µL [^]	Viral NA Universal LV 1000 3.1	100 µL
MICROLAB STARlet IVD ^b	STARMag 96 x 4 universele cartridgekit (Seegene)	300 µL	10 µL verdunde Internal Control Cells (interne controlecellen) toegevoegd per monster Selecteer 'Pause before PCR setup' (pauze vóór opstellen PCR) om alleen monsterextractie uit te voeren	100 µL
QIASymphony SP ^c	DSP Virus/Pathogen Mini-kit	200 µL	Complex200_V6_DSP	110 µL
NucliSENS® easyMAG ^{®d}	NucliSENS® easyMAG [®] reagentia	200 µL uitstrijkje	Generic 2.01; "On-board" workflow	100 µL
		1000 µL urine	Generic 2.01; "Off-board" workflow	100 µL

^a Zie 10.3.1 voor instructies over het gebruik van de interne controle met de MagNA Pure 96

^b Zie 10.3.2 voor instructies over het gebruik van de interne controle met de STARlet IVD

^c Zie 10.3.3 voor instructies over het gebruik van de interne controle met de QIASymphony SP

^d Zie 10.3.4 voor instructies over het gebruik van de interne controle met de NucliSENS® easyMAG[®]

[^] Verhoog de monstervolume-invoer voor monsters die zijn afgenomen in een medium (bijv. Aptima Collection Kits (verzamelingssets))

10.3 Internal Control (IC) (interne controle [IC])

De kit bevat een interne controle om de extractie-efficiëntie en qPCR-remming te bepalen. De interne controle-assay wordt geleverd als een *Control Mix* (controlemix) (**WIT**) en *Internal Control cells* (interne controlecellen) (**ROOD**). De *Control Mix* (controlemix) wordt toegevoegd aan de PCR Master Mix (PCR-mastermix) (**Tabel 11**). De *Internal Control Cells* (interne controlecellen) bevatten de DNA-matrijs voor interne controle. De *Internal Control Cells* (interne controlecellen) worden verdund en verwerkt zoals hieronder beschreven voor specifieke extractie-instrumenten. De interne-controle-DNA-matrijs wordt dus met het monster meegeëxtraheerd en in de reactie meegeamplificeerd.

10.3.1 Internal Control (interne controle) op de MagNA Pure 96

Verdun de *Interne Controlecellen* (**ROOD**) 1 op 200 in 1x PBS (**Tabel 5**). Pas het volume zoals vereist aan met dezelfde verdunningsfactor (zie de handleiding van de extractiekit voor het minimumvolume voor het vereiste aantal monsters). De verdunde interne-controlecellen worden overgebracht in het interne-controlebuisje op de MagNA Pure 96:

- Voor de MagNA Pure 96 DNA en de Viral NA Small Volume Kit (Pathogen Universal 200 protocol) wordt automatisch 20 μL aan elk monster toegevoegd (standaard).
- Voor de MagNA Pure 96 DNA en de Viral NA Large Volume Kit (Viral NA Universal LV 1000 3.1 protocol) wordt het monstervolume verdeeld en verwerkt in twee afzonderlijke wells van de MagNA Pure 96 Processing Cartridge. Aan elk monster wordt automatisch in totaal 40 μL verdunde interne controlecellen toegevoegd (20 μL per well van de processing cartridge).

NB: Verdunde Internal Control Cells (interne controlecellen) NIET bewaren

Tabel 5. Verdunning van Internal Control Cells (interne controlecellen) voor de MagNA Pure 96 (verdunning 1:200)			
<i>Internal Control Cells</i> (interne controlecellen) (ROOD) (μL)	1x PBS (μL)	Totaal volume (μL)	Volume toegevoegd aan monster (μL)
18	3582	3600	20

10.3.2 Internal Control (interne controle) op de MICROLAB STARlet IVD

Verdun de *Internal Control Cells* (interne controlecellen) (**ROOD**) 1 op 20 in 1x PBS (**Tabel 6**). Pas het volume zo nodig aan en houd daarbij dezelfde verdunningsfactor aan (zie de handleiding van de extractiekit voor het minimale volume voor het vereiste aantal monsters). De verdunde Internal Control cells (interne controlecellen) worden in een buisje van 2 mL geladen en op het reagenssteunrek geplaatst, waarbij automatisch 10 μL wordt toegevoegd aan elk monster.

NB: Verdunde Internal Control Cells (interne controlecellen) NIET bewaren

Tabel 6. Verdunning van Internal Control Cells (interne controlecellen) voor de MICROLAB STARlet IVD (verdunning 1:20)			
<i>Internal Control Cells</i> (interne controlecellen) (ROOD) (μL)	1x PBS (μL)	Totaal volume (μL)	Volume toegevoegd aan monster (μL)
50	950	1000	10

10.3.3 Interne controle op de QIASymphony® SP

Verdun de *Internal Control Cells* (interne controlecellen) (**ROOD**) 1 op 50 in 1x PBS (**Tabel 7**). Pas het volume naar behoefte aan met dezelfde verdunningsfactor conform het aantal vereiste monsters.

NB: Verdunde Internal Control Cells (interne controlecellen) NIET bewaren

Tabel 7. Verdunning van Internal Control Cells (interne controlecellen) voor de QIASymphony® SP (verdunning 1:50)

<i>Internal Control Cells</i> (interne controlecellen) (ROOD) (µL)	1x PBS (µL)	Totaal volume (µL)
40	1950	2000

De verdunde *Internal Control Cells* (interne controlecellen) worden vervolgens gebruikt om een Internal Control-carrier RNA-buffer AVE-mengsel te maken, zoals hieronder weergegeven in **Tabel 8**. Pas het volume zo nodig aan en houd daarbij dezelfde verdunningsfactor aan voor het aantal vereiste monsters (zie de handleiding van de extractiekit voor het minimale volume voor het vereiste aantal monsters). Het Internal Control-carrier RNA-buffer AVE-mengsel moet direct voor uitvoering worden aangemaakt.

Het Internal Control-carrier RNA-buffer AVE-mengsel wordt toegevoegd aan een buis, die in een buisdrager wordt geplaatst en in gleuf A van de monsterlade in de QIASymphony® SP wordt geladen. 120 µL (standaard) van het mengsel wordt aan elk monster toegevoegd.

Tabel 8. Voorbereiding van Internal Control-carrier RNA-buffer AVE-mengsel voor de QIASymphony SP

Soort buisje	Aantal monsters	Volume van verdunde IC-cellen (µL)	Vorraadddrager RNA (µL)	Buffer AVE (µL)	Totaal volume (µL)
-	1	10	3	107	120
2 mL	1 + leeg volume [^]	40	12	428	480
14 mL	1 + leeg volume [#]	60	18	642	720

[^] 2 mL buisje vereist 3 aanvullende monsters (360 µL) om het lege volume te compenseren

[#] 14 mL buisje vereist 5 aanvullende monsters (600 µL) om het lege volume te compenseren

10.3.4 Internal Control (interne controle) op de easyMAG®

Verdun de *Internal Control Cells* (interne controlecellen) (ROOD) 1 op 200 in 1x PBS (**Tabel 9**). Pas het volume naar wens aan met dezelfde verdunningsfactor. Bereid een 'pre-mix' voor van verdunde Internal Control Cells (interne controlecellen) en NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica (magnetische silica) voor het vereiste aantal monsters (**Tabel 10**). 100 µL pre-mix silica is vereist per monster.

NB: Verdunde Internal Control Cells (interne controlecellen) NIET bewaren

Tabel 9. Verdunning van Internal Control Cells (interne controlecellen) voor de NucliSENS® easyMAG® (verdunning 1:200)

<i>Internal Control Cells</i> (interne controlecellen) (ROOD) (µL)	1x PBS (µL)	Totaal volume (µL)	Verdunningsfactor
10	1990	2000	200

Tabel 10. Pre-mix van NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica (magnetisch silica) en verdunde Internal Control Cells (interne controlecellen)

Aantal monsters	Volume van verdunde IC-cellen (µL)	Volume van magnetisch silica (µL)	Volume toegevoegd aan monster (µL)
1	50	50	100

Afhankelijk van het type specimen wordt "on-board" of "off-board" workflow gebruikt. "Off-board" workflow wordt gebruikt voor optimale recuperatie van nucleïnezuren uit urinemonsters. Raadpleeg de gebruikershandleiding van de NucliSENS® easyMAG® voor meer informatie.

"On-board" workflow (uitstrijkjes)

Breng specimens over naar het monstervat.

Laad monstervaten in de easyMAG.

Programmeer de volgende extractie-aanvragen:

Protocol: Generic 2.0.1 (voor softwareversie 2.0)

Matrix: Overige

Volume (mL): 0,200

Eluaat (µL): 100 µL

Type: Primair

Voeg na on-board lysis, 100 µL pre-mix silica aan elk monster toe.

Vervolg het extractieproces.

"Off-board" workflow (urine)

Open de NucliSENS Lysis Buffer-buis en voeg 1000 µL urine toe. Vortexbuis.

Laat het mengsel 10 minuten bij kamertemperatuur staan.

Breng na de lysis de lysaten over naar de monstervaten en laad deze in de easyMAG.

Voeg 100 µL pre-mix silica aan elk monster toe.

Programmeer de volgende extractie-aanvragen:

Protocol: Generic 2.0.1 (voor softwareversie 2.0)

Matrix: Overige

Volume (mL): 1,000

Eluaat (µL): 100 µL

Type: Gelyseerd

Vervolg het extractieproces.

10.4 Voorbereiding van real-time PCR

NB: Alvorens de reagentia te gebruiken, dient u ze volledig te ontdooien en gedurende korte tijd goed te mengen in de vortexmixer

Raadpleeg **Tabel 1 - Tabel 3** voor een beschrijving van de inhoud van de kit.

10.4.1 Vorbereiding mastermix

Maak de mastermix zoals aangegeven in **Tabel 11**.

Voor een reactievolume van 20 µL is 15 µL mastermix en 5 µL monster nodig. Pipetteer de mastermix in de PCR-plaat en voeg vervolgens geëxtraheerd monster aan de reactie toe.

In elke run moet een controle zonder matrijs (no template control, NTC) worden opgenomen. Voeg voor de NTC-reactie *Nuclease Free Water* (nucleasevrij water) (**NEUTRAAL**) toe in plaats van monster.

Dicht de plaat af, centrifugeer en breng over naar de thermocycler.

Tabel 11. Mastermix		
Reagens	Concentratie	Volume per 20 μ L reactie (μ L)
Nuclease Free Water (nucleasevrij water) (NEUTRAAL)	n.v.t.	3,0
Plex Mastermix (BLAUW)	2x	10,0
MG+23S-mix (BRUIN)	20x	1,0
Control Mix (controlemix) [†] (WIT)	20x	1,0
Totaal volume (μ L)		15,0
Voeg 5 μ L monster toe zodat het eindvolume op 20 μ L komt		

[†] De Control Mix (controlemix) die in elke kit is opgenomen is specifiek voor het gebruikte PCR-instrument; raadpleeg **Tabel 1 - Tabel 3** voor de juiste te gebruiken Control Mix (controlemix)

10.4.2 Stabiliteit mastermix

De mastermix kan in bulk worden gemaakt en maximaal 4 weken worden bewaard bij -20 °C of maximaal 1 week bij 4 °C.

10.5 **Vorbereiding van PCR met geëxtraheerde nucleïnezuren (reflex-workflow)**

Nucleïnezuurextracten die zijn verkregen zonder *Internal Control Cells* (interne controlecellen) (ROOD) aan de monsters toe te voegen kunnen worden getest met behulp van de **ResistancePlus**[®] MG-kit.

Deze procedure moet alleen worden gevolgd voor extracten die:

eerder getest zijn op een alternatief assay-platform volgens de gebruiksaanwijzing van de fabrikant en waarvoor met de eerder uitgevoerde test een geldig resultaat is gegenereerd.

De mastermix moet worden bereid zoals beschreven in **paragraaf 10.4.1**. In het kader van reflextesten is de Internal Control (interne controle) niet aanwezig in het monsterextract. De controlemix moet echter worden opgenomen zoals beschreven in **paragraaf 10.4.1**.

Raadpleeg **Tabel 1 - Tabel 3** voor een beschrijving van de inhoud van de kit.

Maak de reactiemix zoals aangegeven in **Tabel 11**. Voor een reactievolume van 20 μ L is 15 μ L mastermix en 5 μ L monster nodig. Pipetteer de mastermix in de PCR-plaat en voeg vervolgens geëxtraheerd monster aan de reactie toe.

In elke run moet een controle zonder matrix (no template control, NTC) worden opgenomen. Voeg voor de NTC-reactie *Nuclease Free Water* (nucleasevrij water) (NEUTRAAL) toe in plaats van monster. Dicht de plaat af, centrifugeer het en breng het over naar de thermocycler.

11 Programmering en analyse

Details voor programmering en analyse worden in **paragraaf 19 - paragraaf 23** beschreven.

De **ResistancePlus**[®] MG-kit maakt gebruik van drie kanalen voor de detectie van *M. genitalium*, 23S rRNA-mutatie en Internal Control (interne controle) (**Tabel 12**).

De **ResistancePlus**[®] MG-software is beperkt tot de analyse van resultaten die overeenkomen met nucleïnezuurextracten die zijn verkregen met toevoeging van *Internal Control Cells* (interne controlecellen) (ROOD) aan monsters.

Voor nucleïnezuurextracten die zijn verkregen zonder *Internal Control Cells* (interne controlecellen) (ROOD) aan de monsters toe te voegen moet de REFLEX **ResistancePlus**[®] MG-software worden gebruikt. De REFLEX **ResistancePlus**[®] MG-software heeft twee kanalen voor de detectie van *M. genitalium* en 23S rRNA-mutatie (**Tabel 13**).

Deze procedure moet alleen worden gevolgd voor extracten die:

eerder getest zijn op een alternatief assay-platform volgens de gebruiksaanwijzing van de fabrikant en waarvoor met de eerder uitgevoerde test een geldig resultaat is gegenereerd.

Tabel 12. Kanalen voor <i>ResistancePlus</i> [®] MG-targets			
Instrument	Kanaal A	Kanaal B	Kanaal C
	<i>M. genitalium</i> -detectie (MgPa)	23S rRNA-mutatie	Internal Control (interne controle)
LC480 II	465-510	533-580	533-640
z 480	465-510	540-580	540-645
7500 Fast en 7500 Fast Dx	FAM	JOE	TAMRA
CFX96 Dx en CFX Touch	FAM	HEX	Quasar 705

Tabel 13. Kanalen voor <i>ResistancePlus</i> [®] MG-targets voor reflex-workflow		
Instrument	Kanaal A	Kanaal B
	<i>M. genitalium</i> -detectie (MgPa)	23S rRNA-mutatie
LC480 II	465-510	533-580
z 480	465-510	540-580
7500 Fast en 7500 Fast Dx	FAM	JOE
CFX96 Dx en CFX Touch	FAM	HEX

12 Interpretatie van de resultaten

Voor de interpretatie van de gegevens is de *ResistancePlus*[®] MG-analysesoftware nodig. Hoewel *PlexPrime*[®]-primers een grotere specificiteit bieden dan andere allel-specifieke primers kan niet-specifieke versterking van de 23S rRNA mutant-assay worden waargenomen in monsters die hoge concentraties aan *M. genitalium*-wildtype 23S rRNA bevatten. De *ResistancePlus*[®] MG-analysesoftware automatiseert de gegevensinterpretatie van de amplificatieresultaten en stroomlijnt de workflow. Instructies voor het gebruik van de analysesoftware vindt u in **paragraaf 24**.

Zie **Tabel 14** voor de juiste analysesoftware voor elk instrument voor realtime PCR. De analysesoftware is op aanvraag leverbaar. Neem voor meer informatie contact op met tech@speedx.com.au.

Tabel 14. <i>ResistancePlus</i> [®] MG analysesoftware		
Catalogusnr.	Analysesoftware*	Instrument voor realtime PCR
99003	<i>ResistancePlus</i> [®] MG (LC480)	LC480 II
99018	<i>ResistancePlus</i> [®] MG (z 480)	z 480
99002	<i>ResistancePlus</i> [®] MG (7500)	7500 Fast en 7500 Fast Dx
99008	<i>ResistancePlus</i> [®] MG (CFX)	CFX96 Dx en CFX96 Touch
99023	REFLEX <i>ResistancePlus</i> [®] MG (LC480)	LC480 II
99024	REFLEX <i>ResistancePlus</i> [®] MG (z480)	z 480
99026	REFLEX <i>ResistancePlus</i> [®] MG (7500)	7500 Fast en 7500 Fast Dx
99025	REFLEX <i>ResistancePlus</i> [®] MG (CFX)	CFX96 Dx en CFX96 Touch

* Raadpleeg de website <https://plexpcr.com/products/sexually-transmitted-infections/resistanceplus-mg/#resources> om te controleren of u de meest recente versie van de analysesoftware gebruikt

13 Beperkingen

- De **ResistancePlus**[®] MG-assay richt zich tegelijkertijd op het *MgPa*-gen voor *M. genitalium* en op mutaties op posities 2058 en 2059 in het 23S rRNA-gen (A2058G, A2059G, A2058T, A2058C, A2059C *E. coli*-nummering) die worden geassocieerd met resistentie tegen azitromycine (macrolide-antibioticum).
- De **ResistancePlus**[®] MG-assay dient uitsluitend te worden uitgevoerd door personeel dat getraind is in de procedure. De procedure moet overeenkomstig deze gebruiksaanwijzing worden uitgevoerd.
- Betrouwbare resultaten zijn afhankelijk van afdoende verzameling, vervoer, opslag en verwerking van de specimen. Het niet volgen van de juiste procedures in een van deze stappen kan tot onjuiste resultaten leiden.
- De **ResistancePlus**[®] MG-assay is een kwalitatieve assay en verstrekt geen kwantitatieve waarden of informatie over de hoeveelheid organismen.
- Resultaten van de test moeten gecorreleerd worden met de klinische geschiedenis, epidemiologische gegevens, laboratoriumgegevens en alle andere gegevens waarover de arts beschikt.
- De prevalentie van *M. genitalium* en resistentie tegen macroliden zal de positieve en negatieve voorspellende waarden voor de assay beïnvloeden.
- Detectie van aanwijzingen voor resistentie tegen antibiotica correleren mogelijk niet met de fenotypische genexpressie.
- Het welslagen of mislukken van de behandeling kan niet worden bepaald aan de hand van assay-resultaten, omdat er nog steeds nucleïnezuren aanwezig kunnen zijn na een passende antimicrobiële behandeling.
- Negatieve resultaten sluiten de mogelijkheid van infectie als gevolg van de onjuiste verzameling van monsters, technische fouten, de aanwezigheid van inhibitoren, vermenging van specimen, of kleine aantallen organismen in het klinische specimen niet uit.
- Negatieve resultaten voor de resistentie-aanwijzingen duiden niet op gevoeligheid voor gedetecteerde micro-organismen, omdat resistentie-aanwijzingen die door de assay niet zijn gemeten of andere potentiële mechanismen van resistentie tegen antibiotica aanwezig kunnen zijn.
- Onjuiste positieve resultaten kunnen optreden als gevolg van kruisbesmetting door doelorganismen, de nucleïnezuren daarvan of een versterkt product.

14 Kwaliteitscontrole

De **ResistancePlus**[®] MG-kit bevat een interne controle om de extractie-efficiëntie en qPCR-remming te bepalen (**paragraaf 10.3**).

Bij het uitvoeren van reflextesten zijn de interne controlecellen van de **ResistancePlus**[®] MG-kit niet toegevoegd tijdens het extractieproces. Reflextesten kunnen alleen worden uitgevoerd op monsters die eerder met een ander systeem geldig zijn bevonden, waarbij erop moet worden toegezien dat de extractie-efficiëntie en qPCR-remming zijn gecontroleerd.

De **ResistancePlus**[®] MG Positive Controle-kit (catalogusnr. 95001) wordt aangeraden als positief controlemateriaal voor de amplificatie van nucleïnezuur. Zie **paragraaf 15** voor instructies over het gebruik van de **ResistancePlus**[®] MG Positive Control. Aanbevolen wordt om een bekend negatief specimen als negatieve controle te gebruiken.

15 Instructies voor de ResistancePlus® MG Positive Control

De **ResistancePlus®** MG Positive Control-kit bevat positief controlemateriaal voor *M. genitalium* 23S rRNA-mutanten en een *M. genitalium*-wildtype 23S rRNA (**Tabel 15**).

Tabel 15. Inhoud van ResistancePlus® MG Positive Control-kit (catalogusnr. 95001)			
Kleur dop	Inhoud	Beschrijving	Hoeveelheid (10 reacties)
Neutraal	MG, 23S rRNA-wildtype	Positieve controlesjabloon voor de detectie van <i>M. genitalium</i> , 23S rRNA-wildtype	1 x 50 µL
Groen	MG, 23S rRNA A2058G	Positieve controlesjabloon voor de detectie van <i>M. genitalium</i> , 23S rRNA A2058G-mutatie	1 x 50 µL
Rood	MG, 23S rRNA A2059G	Positieve controlesjabloon voor de detectie van <i>M. genitalium</i> , 23S rRNA A2059G-mutatie	1 x 50 µL
Blauw	MG, 23S rRNA A2058T	Positieve controlesjabloon voor de detectie van <i>M. genitalium</i> , 23S rRNA A2058T-mutatie	1 x 50 µL
Geel	MG, 23S rRNA A2058C	Positieve controlesjabloon voor de detectie van <i>M. genitalium</i> , 23S rRNA A2058C-mutatie	1 x 50 µL
Paars	MG, 23S rRNA A2059C	Positieve controlesjabloon voor de detectie van <i>M. genitalium</i> , 23S rRNA A2059C-mutatie	1 x 50 µL

15.1 Gebruiksaanwijzing

Bereid qPCR-reacties voor als beschreven in **paragraaf 10.4** met positieve controle als monster.

Voor de interpretatie van de gegevens is de **ResistancePlus®** MG-analysesoftware nodig, zie **paragraaf 24.11** voor voorbeeldresultaten.

16 Prestatiekarakteristieken

16.1 Klinische prestaties

16.1.1 Klinisch onderzoek 1

Er werd een prospectief-retrospectief klinisch onderzoek uitgevoerd in het Royal Women's Hospital (RWH), Melbourne, Australië. De monsters werden verzameld van mei 2016 tot juni 2016 en op basis van de klinische laboratoriumresultaten werden 111 *M. genitalium*-positieve en 100 opeenvolgende *M. genitalium*-negatieve monsters geselecteerd om in het onderzoek te worden opgenomen. De 211 monsters bestonden uit 84 urinemonsters, 7 anale uitstrijkjes, 1 urogenitaal uitstrijkje (geen plaats gespecificeerd (gpg)), 1 rectaal uitstrijkje en 1 urethraal uitstrijkje van mannen, en 33 urinemonsters, 33 cervicale uitstrijkjes, 16 endocervicale uitstrijkjes, 14 vaginale uitstrijkjes, 13 hoog-vaginale uitstrijkjes en 8 urogenitale uitstrijkjes (gpg) van vrouwen. Om de prestaties van de **ResistancePlus**[®] MG-kit te bepalen, werd *M. genitalium*-detectie vergeleken met het klinische laboratoriumresultaat van een erkende 16S rRNA qPCR die in het RWH wordt gebruikt voor routinediagnostiek², en werd 23S rRNA-mutantdetectie vergeleken met het resultaat van Sanger-sequencing³. De **ResistancePlus**[®] MG-kit werd uitgevoerd op de LC480 II, na monsterextractie op het MagNA Pure 96 Instrument met behulp van de MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit volgens het Universal Pathogen 200-protocol. Voor de detectie van *M. genitalium* werd een samengestelde referentie gebruikt voor discordante monsters met behulp van een derde qPCR-reactie met als target het MgPa-gen³. Voor 23S rRNA-mutantdetectie werd het resultaat van Sanger sequencing als waar beschouwd. De opgeschoonde resultaten en de gevoeligheid en specificiteit van de **ResistancePlus**[®] MG-kit voor detectie van *M. genitalium* en detectie van 23S rRNA-mutanten worden in **Tabel 16** weergegeven. Twee specimens werden uitgesloten omdat het resultaat van de Internal Control (interne controle) ongeldig was (1 urinemonster vrouw en 1 urinemonster man). Voor analyse van 23S rRNA-mutatiedetectie werden alleen monsters gebruikt waarvan de mutantstatus kon worden vastgesteld. De analyse van de resultaten volgens specimen type wordt in **Tabel 17** weergegeven. De 23S rRNA-mutatieanalyse wordt in **Tabel 18** weergegeven.

Tabel 16. Klinische evaluatie van de ResistancePlus [®] MG-kit (klinisch onderzoek 1)							
		<i>M. genitalium</i> -detectie 16S rRNA qPCR		Detectie van 23S rRNA- mutanten Sequencing			
		Positief	Negatief	Mutant	Wildtype		
ResistancePlus [®] MG	Positief	106	0	Mutant gedetecteerd	68	2	
	Negatief	4	99 [^]	Mutant niet gedetecteerd	2	31	
Gevoeligheid		96,4% (95% BI 91,0-99,0%)		Gevoeligheid			97,1% (95% CI 90,1-99,7%)
Specificiteit		100,0% (95% CI 96,3-100,0%)		Specificiteit			93,8% (95% CI 79,2-99,2%)

95% CI – 95% betrouwbaarheidsinterval; Mutant – 23S rRNA-mutatie op posities A2058G, A2059G, A2058T, A2058C, en A2059C (*E. coli*-nummering); Wildtype – afwezigheid van mutatie op deze posities

[^] De **ResistancePlus**[®] MG-kit detecteerde 1 monster terecht als *M. genitalium*-negatief op basis van een samengestelde referentie; in de tabel staan opgeschoonde resultaten

Tabel 17. Analyse van de klinische resultaten volgens specimen[^] (klinisch onderzoek 1)

Specimen	Verwacht <i>M. genitalium</i> -negatief	Verwacht <i>M. genitalium</i> 23S rRNA-wildtype	Verwacht <i>M. genitalium</i> 23S rRNA-mutant
Urine man	28/28	8/10 ¹	41/42 ¹
Urine vrouw	12/13	11/11	4/6 ²
Cervicaal uitstrijkje	21/21	5/5	7/7 ³
Endocervicaal uitstrijkje	10/10	3/3	3/3 ⁴
Vaginaal uitstrijkje	8/8	1/1	2/2 ⁵
Hoog-vaginaal uitstrijkje	9/9	1/1	4/4 ⁶
Anaal uitstrijkje man	3/3	0/0	5/5 ⁷
Uitstrijkje vrouw (gpg)	5/5	2/2	1/1 ⁸
Uitstrijkje man (gpg)	0/0	0/0	1/1 ⁹
Rectaal uitstrijkje man	1/1	0/0	0/0
Urethraal uitstrijkje man	1/1	0/0	0/0

Mutant – 23S rRNA-mutatie op posities A2058G, A2059G, A2058T, A2058C en A2059C (*E. coli*-nummering); Wildtype – afwezigheid van mutatie op deze posities

[^] 2 urinemonsters vrouw, 3 urinemonsters man en 1 vaginaal uitstrijkje werden uitgesloten omdat de sequencing mislukte en de mutantstatus niet kon worden vastgesteld

¹ urinemonster man: 2 *M. genitalium* wildtype foutief aangeduid als *M. genitalium*-mutant gedetecteerd, 18 A2058G, 20 A2059G, 3 A2058T correct gedetecteerd; 1 A2058G foutief aangeduid als *M. genitalium* niet gedetecteerd

² urinemonster vrouw: 1 A2058G, 3 A2059G correct gedetecteerd; 2 A2059G foutief aangeduid als *M. genitalium* gedetecteerd, mutant niet gedetecteerd

³ vaginaal uitstrijkje: 1 A2058G, 6 A2059G correct gedetecteerd

⁴ endocervicaal uitstrijkje: 2 A2059G, 1 A2058T correct gedetecteerd

⁵ vaginaal uitstrijkje: 3 A2058G, 1 A2059G correct gedetecteerd

⁶ hoog-vaginaal uitstrijkje: 2 A2059G correct gedetecteerd

⁷ anaal uitstrijkje man: 1 A2058G, 3 A2059G, 1 A2058T correct gedetecteerd.

⁸ uitstrijkje vrouw (locatie niet gespecificeerd (gpg)): 1 A2059G correct gedetecteerd

⁹ uitstrijkje man (gpg): 1 A2059G correct gedetecteerd

Tabel 18. *M. genitalium* 23S rRNA-mutatieanalyse (klinisch onderzoek 1)

Referentieresultaat [^]	Resultaat <i>ResistancePlus</i> [®] MG
Wildtype	31/33 ¹
A2058G	24/25 ²
A2059G	39/41 ³
A2058T	5/5

[^] Alleen voor *M. genitalium*-positieve monsters

¹ Wildtype: 2 urinemonsters man foutief aangeduid als *M. genitalium*-mutant gedetecteerd

² A2058G: 1 urinemonster man foutief aangeduid als *M. genitalium* niet gedetecteerd

³ A2059G: 2 urinemonsters vrouw foutief aangeduid als *M. genitalium*-mutant niet gedetecteerd

16.1.2 Klinisch onderzoek 2

Een subset van de geëxtraheerde monsters uit onderzoek 1 werd getest op de 7500 Fast. De resultaten werden vergeleken met het klinisch resultaat van de 16S rRNA qPCR (Twin 2011) en Sanger sequencing (Twin 2012). Discordante monsters voor *M. genitalium*-detectie werden opnieuw getest met de 16S rRNA qPCR (Twin 2011) vanwege vermoedelijke veroudering van de monsters. De opgeschoonde resultaten en de gevoeligheid en specificiteit van de **ResistancePlus[®] MG₍₅₅₀₎**-kit voor detectie van *M. genitalium* en detectie van 23S rRNA-mutanten zijn weergegeven in **Tabel 19**. Voor analyse van 23S rRNA-mutatiedetectie werden alleen monsters gebruikt waarvan de mutantstatus kon worden vastgesteld.

Tabel 19. Klinische evaluatie van de ResistancePlus[®] MG₍₅₅₀₎ -kit (klinisch onderzoek 2)							
		<i>M. genitalium</i> -detectie 16S rRNA qPCR		Detectie van 23S rRNA-mutanten Sequencing			
		Positief	Negatief	Mutant	Wildtype		
ResistancePlus[®] MG	Positief	99	0 [^]	Mutant gedetecteerd	62	0	
	Negatief	2	81 [#]	Mutant niet gedetecteerd	5	30	
Gevoeligheid		98,0% (95% CI 93,0-99,8%)		Gevoeligheid			92,5% (95% CI 83,4-97,5%)
Specificiteit		100,0% (95% CI 95,6-100,0%)		Specificiteit			100,0% (95% CI 88,4-100,0%)

95% CI – 95% betrouwbaarheidsinterval; Mutant – 23S rRNA-mutatie op posities A2058G, A2059G, A2058T, A2058C, en A2059C (*E. coli*-nummering); Wildtype – afwezigheid van mutatie op deze posities

[^] De **ResistancePlus[®] MG₍₅₅₀₎**-kit detecteerde 1 monster terecht als *M. genitalium*-positief op basis van een referentietest. In de tabel staan opgeschoonde resultaten

[#] De **ResistancePlus[®] MG₍₅₅₀₎**-kit detecteerde 10 monsters terecht als *M. genitalium*-negatief op basis van een referentietest. In de tabel staan de opgeschoonde resultaten

16.1.3 Klinisch onderzoek 3

Een retrospectief klinisch onderzoek werd uitgevoerd in Canterbury Health Laboratories (CHL), Christchurch, Nieuw-Zeeland, op gekarakteriseerde, gearchiveerde monsters van 2010-2016, bestaande uit 103 *M. genitalium*-positieve en 61 *M. genitalium*-negatieve monsters, afgenomen met de multi-Collect Specimen Collection Kit (Abbott). De 164 monsters bestonden uit 110 urinemonsters en 4 rectale uitstrijkjes van mannen, en 11 urinemonsters, 17 cervicale uitstrijkjes, 15 vaginale uitstrijkjes, 1 urethraal uitstrijkje, 1 urethraal/vaginaal uitstrijkje, 1 vaginaal/cervicaal uitstrijkje en 4 monsters van een onbekende plaats van vrouwen. Om de prestaties van de **ResistancePlus[®] MG**-kit te bepalen, werd *M. genitalium*-detectie vergeleken met het klinische laboratoriumresultaat van een erkende MgPa qPCR, die ook wordt gebruikt voor routinediagnostiek in het CHL (Jensen 2004), en werd 23S rRNA-mutantdetectie vergeleken met het resultaat van Sanger-sequencing (Jensen 2008). De **ResistancePlus[®] MG**-kit werd uitgevoerd op de LC480 II, na monsterextractie op het MagNA Pure 96 Instrument met behulp van de MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit volgens het Universal Pathogen 200-protocol. Voor de detectie van *M. genitalium*-detectie werd de MgPA-routinetest voor discordante monsters herhaald. Voor 23S rRNA-mutantdetectie werd het resultaat van Sanger sequencing als waar beschouwd. De gevoeligheid en specificiteit van de **ResistancePlus[®] MG**-kit wat betreft *M. genitalium*-detectie en detectie van 23S rRNA-mutanten worden in **Tabel 20** weergegeven. Vijf monsters werden uitgesloten omdat het resultaat van de Internal Control (interne controle) ongeldig was. Voor analyse van 23S rRNA-mutatiedetectie werden alleen monsters gebruikt waarvan de mutantstatus kon worden vastgesteld. De analyse van de resultaten volgens specimentype wordt in **Tabel 21** weergegeven. De 23S rRNA-mutatieanalyse wordt in **Tabel 22** weergegeven.

Tabel 20. Klinische evaluatie van de <i>ResistancePlus</i> [®] MG-kit (klinisch onderzoek 3)						
		<i>M. genitalium</i> -detectie 16S rRNA qPCR		Detectie van 23S rRNA- mutanten Sequencing		
		Positief	Negatief	Mutant	Wildtype	
<i>ResistancePlus</i> [®] MG	Positief	90	0	Mutant gedetecteerd	61	1
	Negatief	7	67 [^]	Mutant niet gedetecteerd	6	22
Gevoeligheid		92,8% (95% CI 85,7-97,1%)		Gevoeligheid		91,0% (95% CI 81,5-96,6%)
Specificiteit		100,0% (95% CI 94,6-100,0%)		Specificiteit		95,6% (95% CI 79,7-99,9%)

95% CI – 95% betrouwbaarheidsinterval; Mutant – 23S rRNA-mutatie op posities A2058G, A2059G, A2058T, A2058C, en A2059C (*E. coli*-nummering); Wildtype – afwezigheid van mutatie op deze posities

[^] De *ResistancePlus*[®] MG-kit detecteerde 7 monsters terecht als *M. genitalium*-negatief. In de tabel staan opgeschoonde resultaten

Tabel 21. Analyse van de klinische resultaten volgens specimen (klinisch onderzoek 3)			
Specimen	Verwacht <i>M. genitalium</i> - negatief	Verwacht <i>M. genitalium</i> - wildtype	Verwacht <i>M. genitalium</i> 23S rRNA-mutant
Urine man	45/45	17/18 ¹	38/47 ¹
Urine vrouw	4/4	1/1	6/6 ²
Cervicaal uitstrijkje	5/5	3/3	8/9 ³
Vaginaal uitstrijkje	6/6	1/1	8/8 ⁴
Rectaal uitstrijkje man	3/3	0/0	0/1 ⁵
Vrouw (onbekende plaats)	1/1	1/1	1/2 ⁶
Urethraal uitstrijkje vrouw	1/1	0/0	0/0
Urethraal/vaginaal uitstrijkje	1/1	0/0	0/0
Vaginaal/cervicaal uitstrijkje	1/1	0/0	0/0

Mutant – 23S rRNA-mutatie op posities A2058G, A2059G, A2058T, A2058C en A2059C (*E. coli*-nummering); Wildtype – afwezigheid van mutatie op deze posities

¹ urinemonster man: 1 *M. genitalium*-wildtype foutief aangeduid als *M. genitalium*-mutant gedetecteerd, 4 A2058G, 32 A2059G, 1 A2058T, 1 A2058C, 1 A2059C, correct gedetecteerd; 1 A2058G, 1 A2059G en 1 A2059C foutief aangeduid als *M. genitalium* niet gedetecteerd, 3 A2058G en 2 A2059G foutief aangeduid als *M. genitalium*-mutant niet gedetecteerd

² urine vrouw: 2 A2058G, 4 A2059G correct gedetecteerd

³ cervicaal uitstrijkje: 3 A2058G, 4 A2059G, 1 A2058C correct gedetecteerd; 1 A2059G foutief aangeduid als *M. genitalium* niet gedetecteerd

⁴ vaginaal uitstrijkje: 1 A2058G, 7 A2059G correct gedetecteerd

⁵ rectaal uitstrijkje man: 1 A2059G foutief aangeduid als *M. genitalium* niet gedetecteerd

⁶ Vrouw (onbekende plaats): 1 A2059G correct gedetecteerd; 1 A2059G foutief aangeduid als *M. genitalium*-mutant niet gedetecteerd

Tabel 22. *M. genitalium* 23S rRNA-mutatieanalyse (klinisch onderzoek 3)

Referentieresultaat [^]	Resultaat <i>ResistancePlus</i> [®] MG
Wildtype	22/23 ¹
A2058G	10/13 ²
A2059G	47/50 ³
A2058T	1/1
A2058C	2/2
A2059C	1/1

[^] Alleen voor *M. genitalium*-positieve monsters

¹ Wildtype: 1 urinemonster man foutief aangeduid als *M. genitalium*-mutant gedetecteerd

² A2058G: 3 urinemonsters man foutief aangeduid als *M. genitalium*-mutant niet gedetecteerd

³ A2059G: 2 urinemonsters man foutief aangeduid als *M. genitalium*-mutant niet gedetecteerd, 1 monster vrouw (onbekende plaats) foutief aangeduid als *M. genitalium*-mutant niet gedetecteerd

16.1.4 Klinisch onderzoek 4

Er werd een retrospectief klinisch onderzoek uitgevoerd in het Vall d'Hebron University Hospital (HUVH), Barcelona, Spanje, ter evaluatie van de prestaties van de *ResistancePlus*[®] MG₍₆₇₅₎-kit wat betreft de detectie van *M. genitalium* en met resistentie tegen azitromycine geassocieerde mutaties in retrospectieve monsters afgenomen tussen december 2017 en april 2018. De monsters omvatten 92 *M. genitalium*-positieve en 108 consecutieve *M. genitalium*-negatieve specimens, afgenomen met de DeltaSwab ViCUM[®] (Deltalab, Spanje) voor uitstrijkjes of Vacumed[®] Urine (FL medical, Italië) voor urine van mannen en vrouwen. De 200 monsters bestonden uit 46 urinemonsters en 30 vaginale uitstrijkjes, 30 urethrale uitstrijkjes, 40 cervicale uitstrijkjes, 8 faryngeale uitstrijkjes en 46 rectale uitstrijkjes. De monsters werden geëxtraheerd met de STARlet IVD (Hamilton) en getest op het CFX96 Dx (Bio-Rad)-instrument. Ter beoordeling van de prestaties werd de detectie van *M. genitalium* vergeleken met de Allplex[™] STI Essential (Seegene) en met de *ResistancePlus*[®] MG-kit (SpeedX) op de LC480 II voor zowel detectie van *M. genitalium* als 23S rRNA-status. De gevoeligheid en specificiteit van de *ResistancePlus*[®] MG₍₆₇₅₎-kit wat betreft *M. genitalium*-detectie in vergelijking met Allplex[™] STI Essential (Seegene) wordt in **Tabel 23** weergegeven. De gevoeligheid en specificiteit van de *ResistancePlus*[®] MG₍₆₇₅₎-kit wat betreft *M. genitalium*-detectie was 100,0% (95% CI 95,9-100,0%) en 97,4% (95% CI 92,4-99,5%), respectievelijk en voor 23S rRNA mutantendetectie zoals weergegeven in **Tabel 24**. De analyse van de resultaten volgens specimen type wordt in **Tabel 25** weergegeven.

Tabel 23. Vergelijking van *ResistancePlus*[®] MG₍₆₇₅₎-kit met Allplex[™] STI Essential (klinisch onderzoek 4)

		<i>M. genitalium</i> -detectie Allplex [™] STI Essential	
		Positief	Negatief
<i>ResistancePlus</i> [®] MG ₍₆₇₅₎	Positief	89	1
	Negatief	3	107
Gevoeligheid		96,7% (95% BI 90,8-99,3%)	
Specificiteit		99,1% (95% CI 94,95-100,0%)	

Tabel 24. Klinische evaluatie van de *ResistancePlus*[®] MG₍₆₇₅₎-kit (klinisch onderzoek 4)

		<i>M. genitalium</i> -detectie <i>ResistancePlus</i> [®] MG (LC480 II)		Detectie van 23S rRNA-mutanten [#] <i>ResistancePlus</i> [®] MG (LC480 II)	
		Positief	Negatief	Mutant gedetecteerd	Mutant niet gedetecteerd
<i>ResistancePlus</i> [®] MG ₍₆₇₅₎	Positief	87	3	Mutant gedetecteerd	42 [^]
	Negatief	0	110	Mutant niet gedetecteerd	2
Gevoeligheid		100,0% (95% CI 95,9-100,0%)		Gevoeligheid	
Specificiteit		97,4% (95% CI 92,4-99,5%)		95,5% (95% CI 84,5-99,4%)	
				Specificiteit	
				100,0% (95% CI 91,6-100,0%)	

95% CI – 95% betrouwbaarheidsinterval; Mutant – 23S rRNA-mutatie op posities A2058G, A2059G, A2058T, A2058C, en A2059C (*E. coli*-nummering); Wildtype – afwezigheid van mutatie op deze posities

[^] De *ResistancePlus*[®] MG₍₆₇₅₎-kit detecteerde 1 monster terecht als *M. genitalium*-mutant op basis van een referentietest. In de tabel staan opgeschoonde resultaten

^{*} De *ResistancePlus*[®] MG₍₆₇₅₎-kit detecteerde 1 monster terecht als *M. genitalium*-negatief op basis van een referentietest. In de tabel staan opgeschoonde resultaten

[#] 1 monster werd uitgesloten van de analyse omdat de sequentie een mengsel van wildtype en mutant was

Tabel 25. Analyse van de klinische resultaten volgens specimen (klinisch onderzoek 4)

Specimen	Verwacht <i>M. genitalium</i> negatief	Verwacht <i>M. genitalium</i> 23S rRNA-wildtype	Verwacht <i>M. genitalium</i> 23S rRNA-mutant
Urine man	26/26	5/5	15/15
Urethraal uitstrijkje man	15/15	3/3	11/12 ¹
Cervicaal uitstrijkje vrouw	16/16	11/11	2/3 ³
Vaginaal uitstrijkje vrouw	20/20	15/15	5/5
Rectaal uitstrijkje man	19/22 ¹	5/5	8/8
Rectaal uitstrijkje vrouw	7/7	3/3	0/0
Faryngeaal uitstrijkje man	5/5	0/0	1/1
Faryngeaal uitstrijkje vrouw	2/2	0/0	0/0

¹ rectaal uitstrijkje man: 3 *M. genitalium*-negatief foutief aangeduid als *M. genitalium*-positief

² urethraal uitstrijkje man: 1 *M. genitalium* 23S rRNA-mutatie positief foutief aangeduid als *M. genitalium* 23S rRNA-mutatie negatief

³ Cervicaal uitstrijkje vrouw: 1 *M. genitalium* 23S rRNA-mutatie positief foutief aangeduid als *M. genitalium* 23S rRNA-mutatie negatief

16.1.5 Klinisch onderzoek 5

Er werd een retrospectief klinisch onderzoek verricht in het Royal Women's Hospital (RWH) in Melbourne, Australië met gebruik van met Aptima[®] afgenomen urinemonsters en uitstrijkjes van juni 2017 tot november 2017. De patiëntmonsters waarbij een overeenkomst werd gevonden bestonden uit 98 *M. genitalium*-positieve en 87 opeenvolgende *M. genitalium*-negatieve monsters, afgenomen als onverdunde urine (routinemonster) of met de Aptima[®] Urine Specimen Collection-kit (Hologic), of als een droog uitstrijkje (routinemonster) of met de Aptima[®] Unisex Swab Specimen Collection-kit (Hologic). De 185 monsters bestonden uit 122 urinemonsters, 18 rectale uitstrijkjes, 15 cervicale uitstrijkjes en 25 vaginale uitstrijkjes. Om de prestaties van met Aptima[®] afgenomen monsters met de *ResistancePlus*[®] MG-kit te bepalen werd de detectie van *M. genitalium* en 23S rRNA-mutanten vergeleken met de klinische diagnoseresultaten verkregen met de *ResistancePlus*[®] MG-kit (SpeeDx) bij gebruik van het routinemonster. Het testen van met Aptima[®] afgenomen monsters werd uitgevoerd op de LC480 II, na monsterextractie op het MagNA Pure 96 Instrument met behulp van de MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit volgens het Viral NA Universal LV 1000-protocol. Klinische diagnoseresultaten van het RWH, verkregen met een overeenkomend diagnostisch monster getest met de *ResistancePlus*[®] MG-kit

(SpeedX), werden aangemerkt als het ware resultaat voor *M. genitalium*. Voor de 23S rRNA-mutantdetectie werd het resultaat vergeleken met het diagnostisch resultaat en Sanger-sequencing.

De gevoeligheid en specificiteit van de **ResistancePlus**[®] MG-kit wat betreft *M. genitalium*-detectie en detectie van 23S rRNA-mutanten worden in **Tabel 26** weergegeven. Voor analyse van 23S rRNA-mutatiedetectie werden alleen monsters gebruikt waarvan de mutantstatus kon worden vastgesteld. De analyse van de resultaten volgens specimentype wordt in **Tabel 27** weergegeven.

Tabel 26. Klinische evaluatie van de ResistancePlus [®] MG-kit (klinisch onderzoek 5)						
		<i>M. genitalium</i> -detectie ResistancePlus [®] MG (routinemonster)		Detectie van 23S rRNA-mutanten ResistancePlus [®] MG (routinemonster)		
		Positief	Negatief	Mutant	Wildtype	
ResistancePlus [®] MG (met 1 mL Aptima-monster)	Positief	94	3	Mutant gedetecteerd	65	0
	Negatief	4	84	Mutant niet gedetecteerd	1*	28
Gevoeligheid		95,9% (95% CI 89,9-98,9%)		Gevoeligheid		98,5% (95% CI 91,8-100,0%)
Specificiteit		96,6% (95% CI 90,3-99,3%)		Specificiteit		100,0% (95% CI 87,7-100,0%)

* Sequencing van monster was niet mogelijk

Tabel 27. Analyse van de klinische resultaten volgens type specimen (klinisch onderzoek 5)			
Specimen	Verwacht <i>M. genitalium</i> negatief	Verwacht <i>M. genitalium</i> -wildtype	Verwacht <i>M. genitalium</i> 23S rRNA-mutant
Urine	50/52 ¹	21/22 ¹	45/48 ¹
Cervicaal uitstrijkje	11/11	1/1	3/3
Vaginaal uitstrijkje	14/15 ²	3/4 ²	6/6
Rectaal uitstrijkje	9/9	3/3	5/6 ³
Anaal uitstrijkje	0/0	0/0	5/5

Mutant – 23S rRNA-mutatie op positie A2058G, A2059G, A2058T, A2058C en A2059C (*E.coli*-nummering); wildtype – afwezigheid van mutatie op deze posities

¹ urine: 2 *M. genitalium*-negatief foutief aangeduid als *M. genitalium*-wildtype en -mutant respectievelijk; 1 *M. genitalium*-wildtype foutief aangeduid als *M. genitalium*-negatief; 2 *M. genitalium*-mutanten foutief aangeduid als *M. genitalium*-wildtype, 1 *M. genitalium*-mutant foutief aangeduid als *M. genitalium*-negatief

² vaginale uitstrijkjes: 1 *M. genitalium*-negatief foutief aangeduid als *M. genitalium*-wildtype; 1 *M. genitalium*-wildtype foutief aangeduid als *M. genitalium*-negatief

³ Rectaal uitstrijkje: 1 *M. genitalium*-mutant foutief aangeduid als *M. genitalium*-negatief

16.1.6 Klinisch onderzoek 6

Een retrospectief klinisch onderzoek is uitgevoerd aan het University of Queensland Centre for Clinical Research (UQCCR), Australië, gebruikmakend van cobas[®] x480-extracten uit urinemonsters en uitstrijkjes verzameld van februari 2017 tot februari 2019. De specimens bestonden uit 85 *M. genitalium*-positieve en 84 *M. genitalium*-negatieve extracten, oorspronkelijk verzameld als onverdunde urine of met de cobas[®] PCR mediaverzamelijk (Roche) en geëxtraheerd op het cobas[®] x480 (cobas[®] 4800, Roche) instrument met de protocollen "Full Workflow" en "CT/NG", zonder toevoeging van SpeedX Internal Control Cells (interne controlecellen). De 169 extracten bestonden uit 28 rectale uitstrijkjes: 13 vaginale uitstrijkjes, 5 hoog-vaginale uitstrijkjes, 15 cervicale uitstrijkjes, 1 ectocervicaal uitstrijkje, 5 urethrale uitstrijkjes, 5 faryngeale uitstrijkjes, 1 penisuitstrijkje, 1 penis meatus uitstrijkje, 1 monduitstrijkje, evenals 83 urinemonsters man en 11 urinemonsters vrouw.

Om de prestaties te bepalen van cobas[®]-extracten met de **ResistancePlus**[®] MG₍₅₅₀₎-kit, werd *M. genitalium*-detectie vergeleken met het routinediagnostische resultaat (MgPa PCR assay (Trembizki *et al.*, 2017)) en werd 23S rRNA-mutantdetectie vergeleken met Sanger-sequencing. De **ResistancePlus**[®] MG₍₅₅₀₎-kit werd uitgevoerd op de ABI 7500 Fast Dx. De gevoeligheid en specificiteit van de **ResistancePlus**[®] MG₍₅₅₀₎-kit wat betreft *M. genitalium*-detectie en detectie van 23S rRNA-mutanten worden in **Tabel 28** weergegeven. Voor analyse van 23S rRNA-mutatiedetectie werden alleen monsters gebruikt waarvan de mutantstatus kon worden vastgesteld. De

analyse van de resultaten volgens specimentype wordt in **Tabel 29** weergegeven. De 23S rRNA-mutatieanalyse wordt in **Tabel 30** weergegeven.

Tabel 28. Klinische evaluatie van de <i>ResistancePlus</i> [®] MG ₍₅₅₀₎ -kit (klinisch onderzoek 6)						
		<i>M. genitalium</i> -detectie MgPa qPCR		Detectie van 23S rRNA- mutanten Sanger-sequencing		
		Positief	Negatief		Mutant	Wildtype
<i>ResistancePlus</i> [®] MG ₍₅₅₀₎	Positief	80	0	Mutant gedetecteerd	49 [^]	0
	Negatief	5	84	Mutant niet gedetecteerd	0	25
Gevoeligheid		94,1% (95% CI 86,8-98,1%)		Gevoeligheid		100,0% (95% CI 92,8-100,0%)
Specificiteit		100,0% (95% CI 95,7-100,0%)		Specificiteit		100,0% (95% CI 86,3-100,0%)

[^] 1 vaginaal monster gaf een gemengd wildtype/A2059G sequencing-resultaat dat correct werd aangeduid als mutant door de *ResistancePlus*[®] MG₍₅₅₀₎-assay

Tabel 29. Analyse van de klinische resultaten volgens specimen (klinisch onderzoek 6) *			
Specimen	Verwacht <i>M. genitalium</i> -negatief	Verwacht <i>M. genitalium</i> 23S rRNA-wildtype	Verwacht <i>M. genitalium</i> 23S rRNA-mutant
Urine man	42/42	13/13	26/27 ¹
Urine vrouw	6/6	1/1	3/3 ²
Cervicaal uitstrijkje	5/5	6/6	2/2 ³
Ectocervicaal uitstrijkje	1/1	-	-
Vaginaal uitstrijkje	1/1	1/2	7/7 ⁴ ▲
Hoog-vaginaal uitstrijkje	2/2	2/2	1/1 ⁵
Rectaal uitstrijkje man	17/17	1/1	7/8 ⁶
Rectaal uitstrijkje vrouw	1/1	-	-
Urethraal uitstrijkje man	3/3	-	2/2 ⁷
Faryngeaal man	5/5	-	-
Penisuitstrijkje	-	1/1	-
Penis meatus uitstrijkje	-	-	1/1 ⁸
Monduitstrijkje man	1/1	-	-

* 6 monsters werden uitgesloten omdat de sequencing was mislukt en de ware 23S-status niet kon worden vastgesteld. Deze monsters waren: 2 cervicale, 2 urine-, 1 vaginaal en 1 rectaal monster

¹ urine man: 8 A2058G, 3 A2058T en 15 A2059G correct aangeduid; 1 A2058T foutief aangeduid als *M. genitalium* niet gedetecteerd

² urine vrouw: 2 A2058G en 1 A2059G correct aangeduid

³ cervicaal uitstrijkje: 2 A2058G correct aangeduid

⁴ vaginaal uitstrijkje: 3 A2058G, 2 A2058T en 1 A2059G correct aangeduid; ▲ 1 vaginaal uitstrijkje werd aangeduid als mengsel WT/A2059G

⁵ hoog-vaginaal uitstrijkje: 1 A2059G correct aangeduid

⁶ rectaal uitstrijkje man: 5 A2059G, 1 A2058T en 1 A2058G correct aangeduid; 1 A2058G foutief aangeduid als *M. genitalium* niet gedetecteerd

⁷ urethraal uitstrijkje man: 2 A2059G correct aangeduid

⁸ Penis meatus uitstrijkje: 1 A2059G correct aangeduid

Tabel 30. *M. genitalium* 23S rRNA-mutatieanalyse (klinisch onderzoek 6)

Referentieresultaat [^]	Resultaat <i>ResistancePlus</i> [®] MG
Wildtype	25/26 ¹
A2058G	16/17 ²
A2059G	27/27 ³
A2058T	6/7 ⁴
A2058C	-
A2059C	-

[^] Alleen voor *M. genitalium*-positieve monsters

¹ Wildtype: 1 vaginaal uitstrijkje foutief aangeduid als *M. genitalium* niet gedetecteerd

² A2058G: 1 rectaal uitstrijkje foutief aangeduid als *M. genitalium* niet gedetecteerd

³ A2059G: 1 vaginaal uitstrijkje gemengd wildtype/A2059G correct aangeduid als *M. genitalium*, 23S-mutatie gedetecteerd

⁴ A2058T: 1 urinemonster man foutief aangeduid als *M. genitalium* niet gedetecteerd

16.1.7 Klinisch onderzoek 7

Er werd een retrospectief klinisch onderzoek uitgevoerd aan het Microbiological Diagnostic Unit Public Health Unit (MDU), Victoria, Australië, gebruikmakend van droge uitstrijkjes en onverdunde urine verzameld van oktober 2018 tot januari 2019. De specimens bestonden uit 59 *M. genitalium*-positieve en 31 *M. genitalium*-negatieve monsters, waaronder 15 anale uitstrijkjes, 19 vaginale uitstrijkjes, 2 hoog-vaginale, 8 cervicale, 1 urethraal uitstrijkje, evenals 45 urinespecimens man.

De *ResistancePlus*[®] MG-kit werd toegepast op de LC480 II, na monsterextractie op het QIASymphony SP (QIAGEN)-instrument met de DSP Virus/Pathogen Mini-kit en het Complex200_V6_DSP-protocol. De resultaten werden vergeleken met de resultaten van routinediagnoses verkregen met de *ResistancePlus*[®] MG-kit (SpeedX) met monsters die geëxtraheerd zijn op het MagNA Pure 96 Instrument (MP96). Voor discordante resultaten werd een 16S rRNA qPCR (Twin 2011) test uitgevoerd voor *M. genitalium*-detectie, en Sanger-sequencing (Twin 2012) werd uitgevoerd voor 23S rRNA mutantdetectie. De gevoeligheid en specificiteit van de *ResistancePlus*[®] MG-kit wat betreft *M. genitalium*-detectie en detectie van 23S rRNA-mutanten worden in **Tabel 31** weergegeven. Voor analyse van 23S rRNA-mutatedetectie werden alleen monsters gebruikt waarvan de mutantstatus kon worden vastgesteld. De analyse van de resultaten volgens type specimen wordt in **Tabel 32** weergegeven.

Tabel 31. Klinische evaluatie van de *ResistancePlus*[®] MG-kit (klinisch onderzoek 7)

		<i>M. genitalium</i> -detectie <i>ResistancePlus</i> [®] MG (MP96)		Detectie van 23S rRNA- mutanten <i>ResistancePlus</i> [®] MG (MP96)		
		Positief	Negatief	Mutant	Wildtype	
<i>ResistancePlus</i> [®] MG (QIASymphony SP)	Positief	54	0 [%]	Mutant gedetecteerd	28	1 [#]
	Negatief	1 [*]	34	Mutant niet gedetecteerd	1 [#]	22
Gevoeligheid		98,2% (95% CI 90,3-100,0%)		Gevoeligheid		96,6% (95% CI 82,2-99,9%)
Specificiteit		100,0% (95% CI 89,7-100,0%)		Specificiteit		95,7% (95% CI 78,1-99,9%)

^{*} De *ResistancePlus*[®] MG-kit detecteerde 6 monsters terecht als *M. genitalium*-negatief die positief waren met de referentietest. In de tabel staan opgeschoonde resultaten

[%] The *ResistancePlus*[®] MG kit detecteerde 2 monsters terecht als *M. genitalium*-positief die negatief waren met de referentietest. In de tabel staan opgeschoonde resultaten

[#] 2 discordante urinemonsters konden niet worden bepaald omdat sequencing mislukte

Tabel 32. Analyse van de klinische resultaten volgens specimen (klinisch onderzoek 7) *			
Specimen	Verwacht <i>M. genitalium</i> -negatief	Verwacht <i>M. genitalium</i> 23S rRNA-wildtype	Verwacht <i>M. genitalium</i> 23S rRNA-mutant
Urine man	17/17	9/9	12/14 ¹
Urine vrouw	1/1	1/2 ²	1/1
Cervicaal uitstrijkje	3/3	2/2	3/3
Vaginaal uitstrijkje	8/8*	7/7	3/3
Hoog-vaginaal uitstrijkje	1/1	1/1	-
Anaal uitstrijkje man	4/4	2/2	8/8
Urethraal uitstrijkje man	-	-	1/1

* 1 vaginaal uitstrijkje werd uitgesloten omdat dit een ongeldig resultaat opleverde met de **ResistancePlus**[®] MG-kit

¹ urinemonster man: 1 *M. genitalium* 23S rRNA-wildtype was foutief aangeduid als *M. genitalium* niet gedetecteerd; 1 *M. genitalium* 23S rRNA-mutant was foutief aangeduid als *M. genitalium* gedetecteerd, 23S-mutant niet gedetecteerd

² urinemonsters vrouw: 1 foutief aangeduid als *M. genitalium* gedetecteerd, 23S rRNA-mutatie gedetecteerd

16.2 Analytische prestaties

16.2.1 Reproduceerbaarheid en herhaalbaarheid

De reproduceerbaarheid en herhaalbaarheid van de **ResistancePlus**[®] MG-kit op de LC480 II werd beoordeeld met behulp van een gekwantificeerde synthetische matrix voor *M. genitalium* MgPa en 23S rRNA-targets (A2058G, A2059G, A2058T, A2058C en A2059C) bij 10.000 en 3x LOD kopieën per reactie met gebruik van 6 replica's (tenzij anders gespecificeerd). De experimenten werden uitgevoerd op de LC480 II.

Om de variabiliteit tussen verschillende partijen te bepalen, werden twee partijen getest waarbij de runs op één machine door één operator werden uitgevoerd (Tabel 33). De twee partijen vertoonden een goede reproduceerbaarheid, met een variatiecoëfficiënt (%CV) tussen 0,35 en 2,37% voor alle targets.

Tabel 33. Variabiliteit tussen verschillende partijen				
	Gemiddelde Cq	STDEV	%CV	Aantal monsters
MgPa 10.000 kopieën	16,9	0,15	0,89	12/12
MgPa 30 kopieën	25,5	0,52	2,05	12/12
A2058G 10.000 kopieën	20,4	0,48	2,37	12/12
A2058G 36 kopieën	27,8	0,43	1,54	12/12
A2059G 10.000 kopieën	18,0	0,06	0,35	12/12
A2059G 30 kopieën	25,6	0,50	1,94	12/12
A2058T 10.000 kopieën	18,7	0,09	0,46	12/12
A2058T 30 kopieën	26,2	0,30	1,14	12/12
A2058C 10.000 kopieën	17,7	0,13	0,75	12/12
A2058C 30 kopieën	25,4	0,29	1,15	12/12
A2059C 10.000 kopieën	19,2	0,08	0,42	12/12
A2059C 45 kopieën	25,0	0,26	1,03	12/12

Om de variabiliteit tussen verschillende dagen te bepalen, werden gedurende drie dagen tests uitgevoerd door één operator op hetzelfde apparaat (**Tabel 34**). De drie runs vertoonden een goede reproduceerbaarheid tussen de verschillende dagen, met een variatiecoëfficiënt tussen 0,44 en 2,31% voor alle targets.

Tabel 34. Variabiliteit tussen verschillende dagen				
	Gemiddelde Cq	STDEV	%CV	Aantal monsters
MgPa 10.000 kopieën	17,0	0,18	1,09	18/18
MgPa 30 kopieën	25,6	0,59	2,31	18/18
A2058G 10.000 kopieën	20,2	0,37	1,83	18/18
A2058G 36 kopieën	27,9	0,51	1,84	18/18
A2059G 10.000 kopieën	18,1	0,24	1,34	18/18
A2059G 30 kopieën	25,7	0,32	1,23	18/18
A2058T 10.000 kopieën	18,7	0,23	1,22	18/18
A2058T 30 kopieën	26,3	0,31	1,17	18/18
A2058C 10.000 kopieën	17,8	0,16	0,88	18/18
A2058C 30 kopieën	25,5	0,31	1,22	18/18
A2059C 10.000 kopieën	19,2	0,08	0,44	18/18
A2059C 45 kopieën	25,0	0,46	1,82	18/18

Om de variabiliteit tussen verschillende runs te bepalen, werden drie qPCR-runs vergeleken die op dezelfde dag door dezelfde operator werden uitgevoerd (**Tabel 35**). De drie runs vertoonden een goede reproduceerbaarheid, met een variatiecoëfficiënt tussen 0,40 en 3,20% voor alle targets.

Tabel 35. Variabiliteit tussen verschillende runs				
	Gemiddelde Cq	STDEV	%CV	Aantal monsters
MgPa 10.000 kopieën	17,0	0,07	0,40	18/18
MgPa 30 kopieën	25,7	0,47	1,83	18/18
A2058G 10.000 kopieën	19,8	0,63	3,20	18/18
A2058G 36 kopieën	27,5	0,51	1,85	18/18
A2059G 10.000 kopieën	18,4	0,11	0,61	18/18
A2059G 30 kopieën	25,7	0,39	1,52	18/18
A2058T 10.000 kopieën	18,7	0,22	1,18	18/18
A2058T 30 kopieën	26,4	0,42	1,59	18/18
A2058C 10.000 kopieën	17,8	0,08	0,46	18/18
A2058C 30 kopieën	25,5	0,31	1,22	18/18
A2059C 10.000 kopieën	19,2	0,15	0,76	18/18
A2059C 45 kopieën	25,2	0,40	1,57	18/18

Om de variabiliteit tussen verschillende operators te bepalen, werden twee runs van twee operators met elkaar vergeleken (**Tabel 36**). De twee runs van de verschillende operators vertoonden een goede reproduceerbaarheid, met een variatiecoëfficiënt tussen 0,54 en 1,86% voor alle targets.

Tabel 36. Variabiliteit tussen verschillende operators				
	Gemiddelde Cq	STDEV	%CV	Aantal monsters
MgPa 10.000 kopieën	16,8	0,12	0,73	12/12
MgPa 30 kopieën	25,3	0,41	1,61	12/12
A2058G 10.000 kopieën	20,2	0,24	1,21	12/12
A2058G 36 kopieën	27,9	0,45	1,62	12/12
A2059G 10.000 kopieën	17,9	0,10	0,58	12/12
A2059G 30 kopieën	25,5	0,39	1,53	12/12
A2058T 10.000 kopieën	18,6	0,10	0,54	12/12
A2058T 30 kopieën	26,1	0,31	1,20	12/12
A2058C 10.000 kopieën	17,7	0,13	0,71	12/12
A2058C 30 kopieën	25,2	0,27	1,06	12/12
A2059C 10.000 kopieën	19,1	0,16	0,83	12/12
A2059C 45 kopieën	24,9	0,46	1,86	12/12

Om de variabiliteit tussen verschillende instrumenten te bepalen, werden twee runs van twee machines, uitgevoerd door dezelfde operator, met elkaar vergeleken (**Tabel 37**). De runs van de verschillende instrumenten vertoonden een goede reproduceerbaarheid, met een variatiecoëfficiënt tussen 0,21 en 2,62% voor alle targets.

Tabel 37. Variabiliteit tussen verschillende instrumenten				
	Gemiddelde Cq	STDEV	%CV	Aantal monsters
MgPa 10.000 kopieën	16,7	0,10	0,60	12/12
MgPa 30 kopieën	25,4	0,67	2,62	12/12
A2058G 10.000 kopieën	20,0	0,07	0,33	12/12
A2058G 36 kopieën	27,8	0,51	1,82	12/12
A2059G 10.000 kopieën	17,8	0,05	0,30	12/12
A2059G 30 kopieën	25,3	0,36	1,41	12/12
A2058T 10.000 kopieën	18,5	0,09	0,50	12/12
A2058T 30 kopieën	25,9	0,30	1,16	12/12
A2058C 10.000 kopieën	17,6	0,13	0,75	12/12
A2058C 30 kopieën	25,3	0,36	1,44	12/12
A2059C 10.000 kopieën	18,9	0,04	0,21	12/12
A2059C 45 kopieën	24,8	0,46	1,85	12/12

Om de variabiliteit binnen een run te bepalen, werden drie experimenten met elkaar vergeleken die door dezelfde operator werden opgezet en waarbij de run voor elke target op dezelfde plaat werd uitgevoerd (**Tabel 38**). De drie experimenten vertoonden een goede reproduceerbaarheid, met een variatiecoëfficiënt tussen 0,57 en 3,12% voor alle targets.

Tabel 38. Variabiliteit binnen een run				
	Gemiddelde Cq	STDEV	%CV	Aantal monsters
MgPa 10.000 kopieën	17,3	0,36	2,09	18/18
MgPa 30 kopieën	25,9	0,81	3,12	18/18
A2058G 10.000 kopieën	20,2	0,11	0,57	18/18
A2058G 36 kopieën	28,0	0,65	2,31	18/18
A2059G 10.000 kopieën	17,9	0,15	0,83	18/18
A2059G 30 kopieën	25,8	0,38	1,46	18/18
A2058T 10.000 kopieën	18,8	0,12	0,66	18/18
A2058T 30 kopieën	26,8	0,38	1,41	18/18
A2058C 10.000 kopieën	17,8	0,15	0,83	18/18
A2058C 30 kopieën	25,5	0,36	1,41	18/18
A2059C 10.000 kopieën	19,0	0,14	0,76	18/18
A2059C 45 kopieën	25,0	0,42	1,66	18/18

16.2.2 Analytische gevoeligheid

De analytische gevoeligheid van de **ResistancePlus**[®] MG-kit op de LC480 II werd bepaald door het uitvoeren van runs met beperkte verdunning, waarbij een gekwantificeerde synthetische matrijs werd gebruikt voor *M. genitalium* MgPa en 23S rRNA-targets (A2058G, A2059G, A2058T, A2058C en A2059C). Voor elke target werd de gevoeligheid bepaald als het aantal kopieën per reactie met $\geq 95\%$ detectie weergegeven in **Tabel 39**.

Tabel 39. Analytische gevoeligheid	
	Analytische gevoeligheid (kopieën/reacties)
MgPa	10
A2058G	12
A2059G	10
A2058T	10
A2058C	10
A2059C	15

16.2.3 Analytische specificiteit

Dit onderzoek werd uitgevoerd om de **ResistancePlus**[®] MG-kit te evalueren bij aanwezigheid van niet-targetorganismen in hoge concentraties. Er werd een paneel geëvalueerd van 65 micro-organismen (4 virussen, 2 protozoën, 4 fungi en 55 bacteriën) die pathogenen of flora representeren welke gewoonlijk aanwezig zijn in het urogenitale systeem, of die nauw samenhangen met *M. genitalium*. Elke bacteriële stam werd getest op 1×10^6 genomen/mL, behalve waar anders aangegeven. Virale stammen werden getest op 1×10^5 genomen/mL, behalve waar anders aangegeven. Alle andere organismen werden getest bij de opgegeven concentraties. Alle organismen werden gekwantificeerd met qPCR, behalve degene die gekwantificeerd werden als Colony Forming Units (CFU) (kolonievormende eenheden) of Plaque Forming Units (PFU) (plaque-vormende eenheden) (**Tabel 40**). Alle micro-

organismen werden in drievoud getest. Alle geteste micro-organismen werden verdund in negatieve klinische matrix (hetzij urine of vaginaal uitstrijkje).

Resultaten gaven aan dat geen van deze organismen onjuiste positieve resultaten opleverden in de *M. genitalium*-negatieve matrixen (**Tabel 40**).

Er werd eveneens een *in silico*-analyse uitgevoerd om te evalueren of de oligonucleotiden in de **ResistancePlus**[®] MG-assay nucleïnezuur-sequenties zouden kunnen versterken en of ze niet-targetorganismen kunnen detecteren die beschikbaar zijn in BLAST. Er werden geen significante interacties gedetecteerd.

Tabel 40. Micro-organismen getest voor analytische specificiteit

Organisme	Concentratie (genomen/mL)	Organisme	Concentratie (genomen/mL)	Organisme	Concentratie (genomen/mL)
<i>Actinomyces israelii</i>	1 x 10 ⁶	HIV-1 [^]	1 x 10 ³	<i>Mycoplasma pirum</i> (2) [*]	1 x 10 ⁶
<i>Atopobium vaginae</i>	1 x 10 ⁶	HPV type 18 (HeLa-cellen) [^]	1 x 10 ⁵	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (6) [*]	1 x 10 ⁶
<i>Bacterioides fragilis</i>	1 x 10 ⁶	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1 x 10 ⁶	<i>Mycoplasma primatum</i>	1 x 10 ⁶
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	1 x 10 ⁶	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1 x 10 ⁶	<i>Mycoplasma salivarium</i>	1 x 10 ⁶
<i>Campylobacter jejuni</i>	1 x 10 ⁶	<i>Lactobacillus crispatus</i>	1 x 10 ⁶	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1 x 10 ⁶
<i>Candida albicans</i>	1 x 10 ⁵	<i>Lactobacillus jensenii</i>	1 x 10 ⁶	<i>Pentatrichomonas hominis</i> [#]	1 x 10 ⁵
<i>Candida glabrata</i>	1 x 10 ⁶	<i>Lactobacillus vaginalis</i>	1 x 10 ⁶	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	1 x 10 ⁶
<i>Candida parapsilosis</i>	1 x 10 ⁶	<i>Listeria monocytogenes</i>	1 x 10 ⁶	<i>Prevotella bivia</i>	1 x 10 ⁶
<i>Candida tropicalis</i>	1 x 10 ⁵	<i>Mobiluncus curtisii</i>	1 x 10 ⁶	<i>Propionibacterium acnes</i>	1 x 10 ⁵
<i>Chlamydia trachomatis</i>	1 x 10 ⁶	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	1 x 10 ⁵	<i>Proteus mirabilis</i>	1 x 10 ⁶
<i>Clostridium perfringens</i>	1 x 10 ⁶	<i>Mycoplasma alvi</i>	1 x 10 ⁶	<i>Proteus vulgaris</i>	1 x 10 ⁶
<i>Corynebacterium genitalium</i>	1 x 10 ⁶	<i>Mycoplasma amphoriforme</i> (2) [*]	1 x 10 ⁶	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1 x 10 ⁶
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1 x 10 ⁶	<i>Mycoplasma arginini</i>	1 x 10 ⁶	<i>Staphylococcus aureus</i>	1 x 10 ⁶
<i>Enterobacter cloacae</i>	1 x 10 ⁶	<i>Mycoplasma buccale</i>	1 x 10 ⁶	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1 x 10 ⁶
<i>Enterococcus faecalis</i>	1 x 10 ⁶	<i>Mycoplasma fermentans</i>	1 x 10 ⁶	<i>Streptococcus agalactiae</i>	1 x 10 ⁶
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	1 x 10 ⁶	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	1 x 10 ⁴	<i>Streptococcus pyogenes</i>	1 x 10 ⁶
<i>Gardnerella vaginalis</i>	1 x 10 ⁶	<i>Mycoplasma hominis</i>	1 x 10 ⁶	<i>Trichomonas vaginalis</i> [#]	1 x 10 ⁵
<i>Haemophilus ducreyi</i>	1 x 10 ⁶	<i>Mycoplasma lipophilum</i>	1 x 10 ⁴	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	1 x 10 ⁵
Herpes simplex virus I	1 x 10 ⁶	<i>Mycoplasma orale</i>	1 x 10 ⁶		
Herpes simplex virus II	1 x 10 ⁶	<i>Mycoplasma penetrans</i>	1 x 10 ⁶		

* getal tussen haakjes geeft het aantal geteste stammen aan

[^] gekwantificeerd als PFU/mL

[#] gekwantificeerd als CFU/mL

16.2.4 Potentieel interfererende substanties

Er werd een onderzoek naar interfererende substanties uitgevoerd om te onderzoeken of substanties of condities die aanwezig kunnen zijn in urine of vaginale uitstrijkjespecimens de prestaties van de **ResistancePlus**[®] MG-assay zouden kunnen beïnvloeden. Het paneel bestond uit endogene substanties zoals bloed, mucinen, leukocyten en medicijnen (op recept en algemeen verkrijgbaar) die gebruikt zouden kunnen worden om urogenitale condities te behandelen. Alle substanties werden geëvalueerd door het uitvoeren van de Internal Control (interne controle) die extractie en qPCR-remming bewaakt. Alle testmonsters werden in drievoud getest. Substanties werden passend verdund in negatieve klinische matrix (hetzij urine of vaginaal uitstrijkje).

Resultaten gaven aan dat geen van de substanties en condities interfereerden met de detectie van de Internal Control (interne controle) of onjuiste positieve resultaten opleverden.

De resultaten zijn in **Tabel 41** en **Tabel 42** samengevat.

Tabel 41. Potentieel interfererende substanties in urinemonsters		
Klasse/substantie	Productnaam	Testconcentratie
Volbloed	--	1% v/v
Zaad	--	5,0% v/v
Mucus	Mucinen	0,8% w/v
Antibiotica	Azitromycine	1,8 mg/mL
	Doxycycline	3,6 mg/mL
Analgetica	Aspirine	40 mg/mL
	Paracetamol	3,2 mg/mL
Intravaginale hormonen	--	7 mg/mL Progesteron + 0,07 mg/mL Beta Estradiol
Leukocyten	--	10 ⁵ cells/mL
Albumine	Runderalbumine	10 mg/mL
Glucose	--	10 mg/mL
Zure urine (pH 4,0)	Urine + N-Acetyl-L-Cysteine	pH 4,0
Alkalische urine (pH 9,0)	Urine + ammoniumcitraat	pH 9,0
Bilirubine	--	1 mg/mL

Tabel 42. Potentieel interfererende substanties in vaginale uitstrijkmonsters

Klasse/substantie	Productnaam	Testconcentratie
Bloed	--	60% v/v
Zaadvocht	--	5,0% v/v
Mucus	Mucinen	0,8% w/v
Algemeen verkrijgbare vaginale producten en contraceptieven	Vagisil Anti-Itch Crème (1,0 oz) - (anti-jeukcrème)	0,25% w/v
	K-Y Jelly (4,0 oz)	0,25% w/v
	Options Gynol II Vaginal Contraceptive Gel - (vaginale contraceptieve gel)	0,25% w/v
	Walgreens Clotrimazole Vaginal Cream (1,5 oz) - (vaginale crème)	0,25% w/v
	Vagisil Sensitive Skin Formula Maximum Strength Anti-Itch Creme with Oatmeal (1,0 oz) - (formule voor gevoelige huid voor maximale sterkte - anti-jeukcreme met haveremout)	0,25% w/v
	Vagisil ProHydrate Natural Feel Internal Moisturizing Gel (0,2 oz x 8 pack) - (interne hydraterende gel)	0,25% w/v
	Vagisil Daily Intimate Deodorant Powder (8,0 oz) - (dagelijks intiem deodorantpoeder)	0,25% w/v
	Summer's Eve Medicated Douche - (zomerse medicinale douche)	0,25% v/v
Deodoranten en poeders	Summer's Eve Deodorant spray (2,0 oz) - (deodorantspray)	0,25% v/v
Aambeienzalf	Preparation H Hemorrhoidal Cream (0,9 oz) - (aambeienzalf)	0,25% w/v
Medicijnen uitsluitend op recept	Metronidazole Vaginal Gel, 0.75% - (vaginale gel)	0,25% w/v
	Estrace® (oestradiol vaginale zalf, USP 0,01%)	0,25% w/v
Leukocyten	--	10 ⁵ cells/mL
Intravaginale hormonen	--	7 mg/mL Progesteron + 0,07 mg/mL Beta Estradiol

17 Klantondersteuning en technische ondersteuning

Neem contact op met de technische ondersteuning als u vragen hebt over de reactieopstelling, cyclusomstandigheden en andere vragen.

Tel: +61 2 9209 4169, E-mail: tech@speedx.com.au

18 Referenties

1. Taylor-Robinson D, Jensen JS. *Mycoplasma genitalium*: from Chrysalis to multicolored butterfly. Clin Microbiol Rev. 2011;24:498–514.
2. Manhart LE, Broad JM, Golden MR. Mycoplasma genitalium: should we treat and how? Clin Infect Dis. 2011 Dec;53 Suppl 3:S129-42.
3. Cazanave C, Manhart LE, Bébéar C. Mycoplasma genitalium, an emerging sexually transmitted pathogen. Med Mal Infect. 2012 Sep;42(9):381-92
4. Jensen JS, Bradshaw CS, Tabrizi SN, Fairley CK, Hamasuna R. Azithromycin treatment failure in Mycoplasma genitalium-positive patients with nongonococcal urethritis is associated with induced macrolide resistance. Clin Infect Dis. 2008 Dec 15;47(12):1546-53.
5. Jensen JS. Hoofdstuk 8: Protocol for the Detection of Mycoplasma genitalium by PCR from Clinical Specimens and Subsequent Detection of Macrolide Resistance-Mediating Mutations in Region V of the 23S rRNA Gene in Diagnosis of Sexually Transmitted Diseases: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 903, Science+Business Media New York 2012.
6. Bissessor M, Tabrizi SN, Twin J, Abdo H, Fairley CK, Chen MY, Vodstrcil LA, Jensen JS, Hocking JS, Garland SM, Bradshaw CS. Macrolide resistance and azithromycin failure in a Mycoplasma genitalium-infected cohort and response of azithromycin failures to alternative antibiotic regimens. Clin Infect Dis. 2015 Apr 15;60(8):1228-36.
7. Twin J, Taylor N, Garland SM, Hocking JS, Walker J, Bradshaw CS, Fairley CK, Tabrizi SN. Comparison of two Mycoplasma genitalium real-time PCR detection methodologies. J Clin Microbiol. 2011 Mar;49(3):1140-2.
8. Twin J, Jensen JS, Bradshaw CS, et al. Transmission and selection of macrolide resistant Mycoplasma genitalium infections detected by rapid high resolution melt analysis. PLoS One 2012; 7:e35593.
9. Jensen JS, Bjornelius E, Dohn B, Lidbrink P. Use of Taqman 5' nuclease realtime PCR for quantitative detection of Mycoplasma genitalium DNA in males with and without urethritis who were attendees at a sexually transmitted disease clinic. J Clin Microbiol. 2004 42:683-692.

19 Bijlage 1: LightCycler® 480 instrument II

De volgende informatie is gebaseerd op LightCycler® 480 Software (versie 1.5).

De **ResistancePlus**® MG-kit bevat kleurstoffen voor het LightCycler® 480 Instrument II. De **PlexPCR**® Colour Compensation-kit (kleurcompensatiekit) (catalogusnr. 90001) moet worden uitgevoerd en toegepast voor LC480 II-analyse (zie **paragraaf 19.2**). Deze kit is op aanvraag leverbaar.

19.1 Het LightCycler® 480 Instrument II (LC480 II) programmeren

Detectieformaat

Maak een aangepast **Detection Format** (detectieformaat)

Open Tools (Open hulpmiddelen) > Detection Formats (detectieformaten)

Maak een nieuw detectieformaat en noem dit '**SpeedX PlexPCR**' (kan worden aangemaakt tijdens het genereren van het SpeedX Colour Compensation-bestand (kleurcompensatiebestand) (zie **Afbeelding 3**).

Selecteer voor **Filter Combination Selection** (keuze filtercombinatie) de volgende (Excitation-Emission (excitatie-emissie)):

Tabel 43. Filtercombinaties*						
LC480 II	440-488	465-510	533-580	533-610	533-640	618-660

* Deze filtercombinaties zijn de standaardnamen voor de kanalen

Stel de **Selected Filter Combination List** (lijst met geselecteerde filtercombinaties) voor alle kanalen in als:

Melt Factor (smeltfactor): 1

Quant Factor (kwantitatieve factor): 10

Max Integration Time (maximale integratietijd) (s): 1

Afbeelding 3. Aangepast SpeedX-detectieformaat

Filter Combination Selection

		Emission					
		488	510	580	610	640	660
Excitation	440	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	465	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	498	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	533	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	618	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
	<input type="button" value="Clear"/>						

Selected Filter Combination List

Excitation Filter	Emission Filter	Name	Melt Factor	Quant Factor	Max Integration Time (Sec)
440	488	440-488	1	10	1
465	510	465-510	1	10	1
533	580	533-580	1	10	1
533	610	533-610	1	10	1
533	640	533-640	1	10	1
618	660	618-660	1	10	1

Instrumentinstellingen

Maak een aangepast **Detection Format** (detectieformaat)

Open Tools (open hulpmiddelen) > Instruments (instrumenten)

Voor **Instrument Settings** (instrumentinstellingen) > selecteer **Barcode Enabled** (barcode ingeschakeld)

Installatie voor experiment

Selecteer **New Experiment** (nieuw experiment)

Ga als volgt te werk op de tabblad **Run Protocol** (run-protocol)

Voor **Detection Format** (detectieformaat) selecteert u het aangepaste '**SpeedX PlexPCR**' (**Afbeelding 4**)

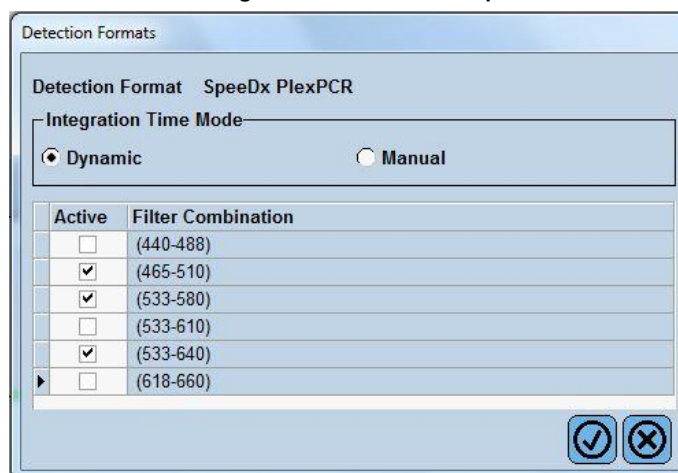
Selecteer **Customize** (aanpassen) >

Selecteer **Integration Time Mode** (modus integratietijd) > **Dynamic** (dynamisch)

Selecteer de volgende actieve **Filter Combinations** (filtercombinaties) die in **Tabel 44**

Tabel 44. Kanalen voor <i>ResistancePlus</i>® MG-targets		
<i>M. genitalium</i> -detectie (MgPa)	23S rRNA-mutatie	Internal Control (interne controle)
465-510	533-580	533-640

Afbeelding 4. Detectieformaat aanpassen



Om geautomatiseerde monsterdetectie in de analysesoftware mogelijk te maken kent u naamtags toe aan de wells op de plaat

Open de module **Sample Editor** (monstreditor)

Selecteer de well

Bewerk **Sample Name** (monsternaam) zodat deze overeenkomt met de naamtags die zijn gedefinieerd in de Assays-module van de analysesoftware (zie **paragraaf 24.4**)













Monsters worden voorzien van een label in de vorm *Voorvoegsel_Achtersvoegsel* (zoals weergegeven in **Tabel 45** en

Afbeelding 5) bijv. Pa_MG

NB: De naamtags van monsters zijn hoofdlettergevoelig. De naamtag moet exact overeenkomen met de toegewezen namen in het run-bestand.

Tabel 45. Naamtags van monsters voor analysesoftware			
Soort monster	Voorvoegsel (in analysesoftware)	_Achtervoegsel (in analysesoftware)	Naam monster (in LC480)
Regulier monster	S	_MG	S_MG
Negatieve controle	N	_MG	N_MG
Positieve controle (MG, 23S rRNA mutanttype) (Pa)	Pa	_MG	Pa_MG
Positieve controle (MG, 23S rRNA-wildtype) (Pb)	Pb	_MG	Pb_MG

Afbeelding 5. Sample Editor (monstereitor) – naamtags aan wells toewijzen

Pos	Filter combination	Color	Repl Of	Sample Name
A12	465-510 (465-510)			S_MG
A12	533-580 (533-580)			S_MG
A12	533-640 (533-640)			S_MG
B12	465-510 (465-510)			Pa_MG
B12	533-580 (533-580)			Pa_MG
B12	533-640 (533-640)			Pa_MG
C12	465-510 (465-510)			Pb_MG
C12	533-580 (533-580)			Pb_MG
C12	533-640 (533-640)			Pb_MG
G8	465-510 (465-510)			N_MG
G8	533-580 (533-580)			N_MG
G8	533-640 (533-640)			N_MG

Stel het **Reaction Volume** (reactievolume) in op > 20 µL

Maak het volgende programma aan (in meer detail weergegeven in **Afbeelding 6 - Afbeelding 9**):

Tabel 46. Thermocyclingprogramma				
Programmanaam	Cycles (cycli)	Target °C	Hold (duur)	Ramp rate (toenametempo) (°C/s) [*]
Polymerase-activering	1	95 °C	2 min	4,4
Touch down cycling (touchdowncycli) [⊖] :	10	95 °C	5 s	4,4
Step down (stapsgewijze afname) -0,5 °C/cyclus		61 °C – 56,5 °C [⊖]	30 s	2,2
Kwantificeringscycli ⁺ : Acquisitie/Detectie	40	95 °C	5 s	4,4
		52 °C ⁺	40 s	2,2
Cooling (afkoeling)	1	40 °C	30 s	2,2

^{*} Standaardtoename (plaat met 96 wells)

[⊖] **Stapgrootte:** -0,5 °C/Cyclus, **Sec Target:** 56 °C

⁺ **Analysemodus:** Kwantificering, **Acquisitiemodus:** Enkelvoudig

Afbeelding 6. Thermocyclingprogramma – polymeraseactivering

Program Name	Cycles	Analysis Mode
Polymerase activation	1	None
Touchdown cycling	10	None
Quantification cycling	40	Quantification
Cooling	1	None

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:02:00	4.4	0	0	0	0

Afbeelding 7. Thermocyclingprogramma – touchdowncycli

Program Name	Cycles	Analysis Mode
Polymerase activation	1	None
Touchdown cycling	10	None
Quantification cycling	40	Quantification
Cooling	1	None

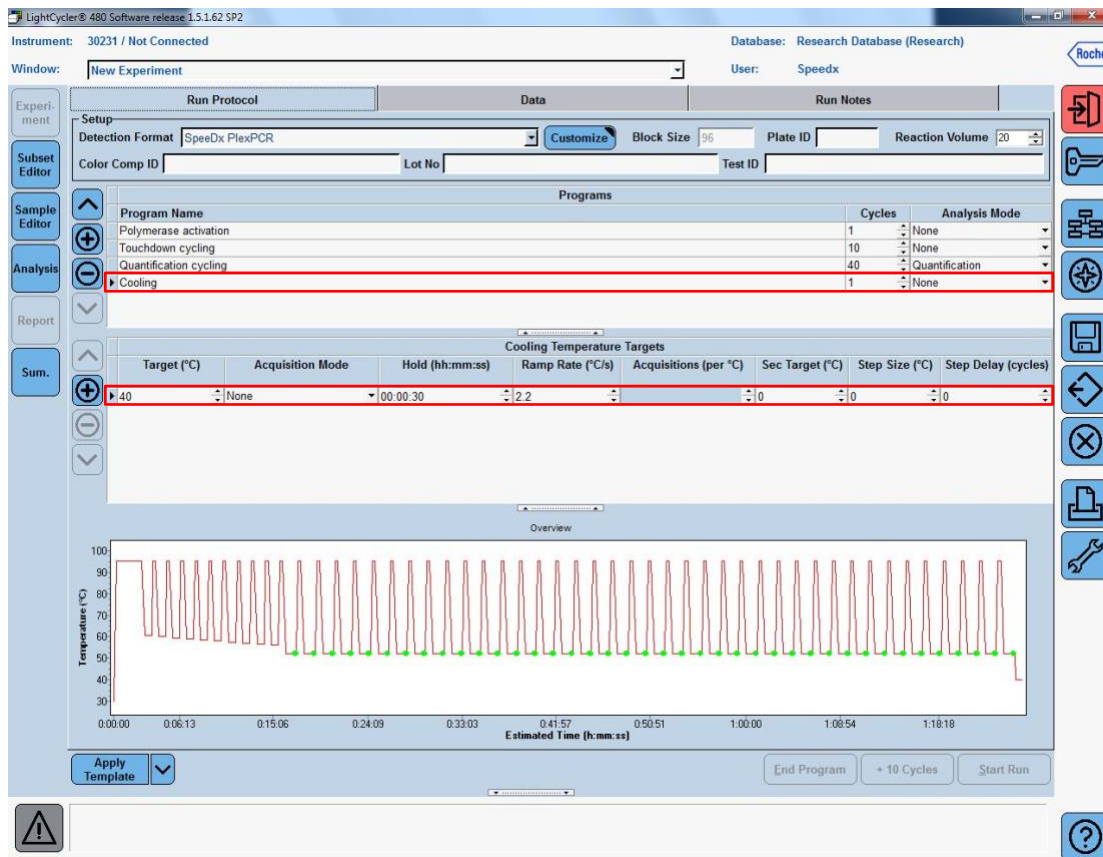
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:05	4.4	0	0	0	0
61	None	00:00:30	2.2	0	0	0	0

Afbeelding 8. Thermocyclingprogramma – kwantificeringscycli

Program Name	Cycles	Analysis Mode
Polymerase activation	1	None
Touchdown cycling	10	None
Quantification cycling	40	Quantification
Cooling	1	None

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:05	4.4	0	0	0	0
52	Single	00:00:40	2.2	0	0	0	0

Afbeelding 9. Thermocyclingprogramma – afkoeling



> **Start Run** (run starten)

Wanneer het cyclingprogramma is afgelopen moet een .ixo bestand voor analyse naar de **ResistancePlus**[®] MG (LC480)-analysesoftware worden geëxporteerd.

Selecteer **Export** (Exporteren)

Sla dit op een duidelijk herkenbare locatie op

19.2 Colour Compensation (kleurcompensatie) voor LightCycler[®] 480 Instrument II

NB: De **PlexPCR**[®] Colour Compensation-kit (kleurcompensatiekit) (catalogusnr. 90001) moet worden uitgevoerd en toegepast voor LC480 II analyse. Deze kit is op aanvraag leverbaar.

Voor analyse met behulp van de software moet de monsternaam van de kleurcompensatiereacties worden gelabeld zoals weergegeven in **Tabel 47**.

Wanneer het cyclingprogramma is afgelopen moet een .ixo bestand voor analyse naar de **ResistancePlus**[®] MG (LC480)-analysesoftware worden geëxporteerd.

Selecteer **Export** (Exporteren)

Sla dit op een duidelijk herkenbare locatie op en noem het "**SpeedX PlexPCR**"

Tabel 47. Monsternaam voor kleurcompensatiereacties voor de analysesoftware							
Reacties							
	BLANK (BLANCO)	488 mix	510 mix (510-mix)	580 mix (580-mix)	610 mix (610-mix)	640 mix (640-mix)	660 mix (660-mix)
Dominant kanaal	Water	440-488	465-510	533-580	533-610	533-640	618-660
Naam monster	BLANK (BLANCO)	440-488	465-510	533-580	533-610	533-640	618-660

19.3 Interpretatie van de resultaten

Voor interpretatie van de gegevens is de **ResistancePlus**[®] MG (LC480)-analysesoftware vereist. De analysesoftware is op aanvraag leverbaar. Neem voor meer informatie contact op met tech@speedx.com.au.

Zie **paragraaf 24** voor instructies voor het gebruik van de **ResistancePlus**[®] MG (LC480)-analysesoftware.

20 Bijlage 2: cobas z 480 analyser

De volgende informatie is gebaseerd op de cobas z 480 analyser-software (LightCycler 480 SW UDF 2.1.0). Neem contact op met uw vertegenwoordiger van Roche voor ondersteuning bij de toegang tot de UDF software van uw cobas z 480 analyser.

De **ResistancePlus**[®] MG-kit bevat kleurstoffen voor de cobas z 480 analyser. De **PlexPCR**[®] Colour Compensation-kit (kleurcompensatiekit) (catalogusnr. 90001) moet worden uitgevoerd en toegepast voor z 480 analyse (zie **paragraaf 20.2**). Deze kit is op aanvraag leverbaar.

20.1 De cobas z 480 analyser programmeren

Detectieformaat

Maak een aangepast **Detection Format** (detectieformaat)

Open Tools (Open hulpmiddelen) > Detection Formats (detectieformaten)

Maak een New Detection Format (nieuw detectieformaat) en noem dit 'SpeedX PlexPCR' (kan worden gemaakt tijdens het genereren van het SpeedX Colour Compensation-bestand (kleurcompensatiebestand) (zie **Afbeelding 10**).

Selecteer voor **Filter Combination Selection** (keuze filtercombinatie) de volgende (Excitation-Emission (excitatie-emissie)):

Tabel 48. Filtercombinaties [^]					
z 480	465-510	540-580	540-610	540-645	610-670

[^] Deze filtercombinaties zijn de standaardnamen voor de kanalen

Stel de **Selected Filter Combination List** (lijst met geselecteerde filtercombinaties) voor alle kanalen in als:

Melt Factor (smeltfactor): 1

Quant Factor (kwantitatieve factor): 10

Max Integration Time (maximale integratietijd) (s): 1

Afbeelding 10. Aangepast SpeedX-detectieformaat

Filter Combination Selection

Emission

E	510	580	610	645	670	700
x	465 <input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
i	498 <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
a	540 <input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
i	610 <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
o	680 <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Selected Filter Combination List

Excitation Filter	Emission Filter	Name	Melt Factor	Quant Factor	Max Integration Time (Sec)
465	510	465-510	1	10	1
540	580	540-580	1	10	1
540	610	540-610	1	10	1
540	645	540-645	1	10	1
610	670	610-670	1	10	1

Instrumentinstellingen

Maak een aangepast **Detection Format** (detectieformaat)

Open Tools (open hulpmiddelen) > Instruments (instrumenten)

Voor **Instrument Settings** (instrumentinstellingen) > selecteer **Barcode Enabled** (barcode ingeschakeld)

Installatie voor experiment

Selecteer **New Experiment** (nieuw experiment)

Ga als volgt te werk op de tabblad **Run Protocol** (run-protocol)

Voor **Detection Format** selecteert u de aangepaste '**SpeedX PlexPCR**' (**Afbeelding 11**)

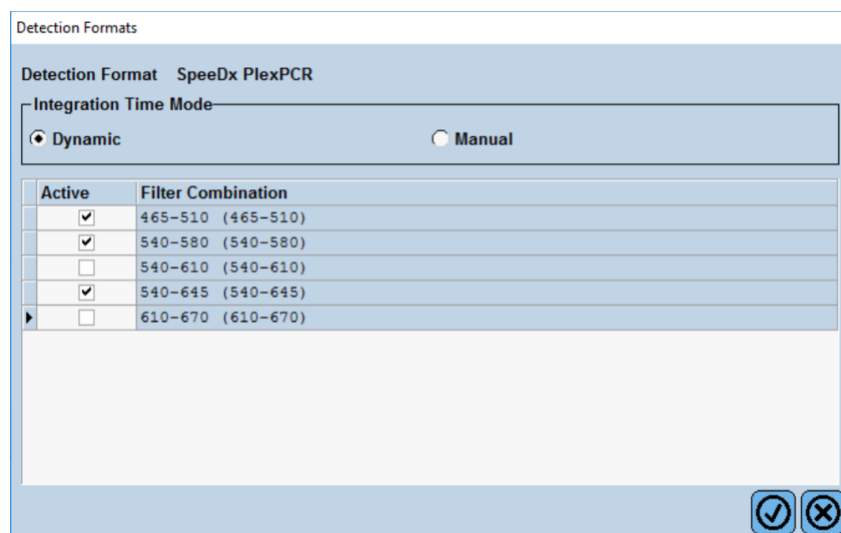
Selecteer **Customize** (aanpassen) >

Selecteer **Integration Time Mode** (modus integratietijd) > **Dynamic** (dynamisch)

Selecteer de volgende actieve **Filter Combinations** (filtercombinaties) die in **Tabel 49**

Tabel 49. Kanalen voor <i>ResistancePlus</i> [®] MG-targets		
<i>M. genitalium</i> -detectie (MgPa)	23S rRNA-mutatie	Internal Control (interne controle)
465-510	540-580	540-645

Afbeelding 11. Detectieformaat aanpassen



Om geautomatiseerde monsterdetectie in de analysesoftware mogelijk te maken kent u naamtags toe aan de wells op de plaat

Open de module **Sample Editor** (monstreditor)

Selecteer de well

Bewerk **Sample Name** (monsternaam) zodat deze overeenkomt met de naamtags die zijn gedefinieerd in de Assays-module van de analysesoftware (zie **paragraaf 24.4**)

Monsters worden voorzien van een label in de vorm van *Voorvoegsel_Achtervoegsel* (zoals weergegeven in **Tabel 50** en

Afbeelding 12) bijv. Pa_MG

NB: De naamtags van monsters zijn hoofdlettergevoelig. De naamtag moet exact overeenkomen met de toegewezen namen in het run-bestand.

Tabel 50. Naamtags van monsters voor analysesoftware			
Soort monster	Voorvoegsel (in analysesoftware)	_Achtervoegsel (in analysesoftware)	Naam monster (in z 480)
Regulier monster	S	_MG	S_MG
Negatieve controle	N	_MG	N_MG
Positieve controle (MG, 23S rRNA mutanttype) (Pa)	Pa	_MG	Pa_MG
Positieve controle (MG, 23S rRNA-wildtype) (Pb)	Pb	_MG	Pb_MG

Afbeelding 12. Sample Editor (monstereditor) – naamtags aan wells toewijzen

Pos	Filter combination	Color	Repl Of	Sample Name	Quantification Sample Type
A12	465–510 (465)	Blue		S_MG	Unknown
A12	540–580 (540)	Blue		S_MG	Unknown
A12	540–645 (540)	Blue		S_MG	Unknown
B12	465–510 (465)	Red		Pa_MG	Unknown
B12	540–580 (540)	Red		Pa_MG	Unknown
B12	540–645 (540)	Red		Pa_MG	Unknown
C12	465–510 (465)	Green		Pb_MG	Unknown
C12	540–580 (540)	Green		Pb_MG	Unknown
C12	540–645 (540)	Green		Pb_MG	Unknown
D12	465–510 (465)	Orange		N_MG	Unknown
D12	540–580 (540)	Orange		N_MG	Unknown
D12	540–645 (540)	Orange		N_MG	Unknown

Stel het **Reaction Volume** (reactievolume) in op > 20 µL

Maak het volgende programma aan (in meer detail weergegeven in **Afbeelding 13 - Afbeelding 16**):

Tabel 51. Thermocyclingprogramma				
Programmanaam	Cycles (cycli)	Target °C	Hold (duur)	Ramp rate (toenametempo) (°C/s)*
Polymerase-activering	1	95 °C	2 min	4,4
Touch down cycling (touchdowncycli) ^o : Step down (stapsgewijze afname) -0,5 °C/cyclus	10	95 °C	5 s	4,4
		61 °C – 56,5 °C ^o	30 s	2,2
Kwantificeringscycli ⁺ : Acquisitie/Detectie	40	95 °C	5 s	4,4
		52 °C ⁺	40 s	2,2
Cooling (afkoeling)	1	40 °C	30 s	2,2

* Standaardtoename (plaat met 96 wells)

^o **Stapgrootte:** -0,5 °C/Cyclus, **Sec Target:** 56 °C

⁺ **Analysemodus:** Kwantificering, **Acquisitiemodus:** Enkelvoudig

Afbeelding 13. Thermocyclingprogramma – polymeraseactivering

LightCycler® 480 SW - User Defined Workflow for cobas z 480

Instrument: 54735 / Not Connected Database: June2020 (Research) User: Speedx

Window: New Experiment

Run Protocol: Setup

Detection Format: SpeedX FlexPCR Block Size: 96 Plate ID: Reaction Volume: 20

Color Comp ID: Lot No: Test ID:

Program Name	Cycles	Analysis Mode
Polymerase activation	1	None
Touchdown cycling	10	None
Quantification cycling	40	Quantification
Cooling	1	None

Polymerase activation Temperature Targets							
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:02:00	4.4	0	0	0	0

Afbeelding 14. Thermocyclingprogramma – touchdowncycli

LightCycler® 480 SW - User Defined Workflow for cobas z 480

Instrument: 54735 / Not Connected Database: June2020 (Research) User: Speedx

Window: New Experiment

Run Protocol: Setup

Detection Format: SpeedX FlexPCR Block Size: 96 Plate ID: Reaction Volume: 20

Color Comp ID: Lot No: Test ID:

Program Name	Cycles	Analysis Mode
Polymerase activation	1	None
Touchdown cycling	10	None
Quantification cycling	40	Quantification
Cooling	1	None

Touchdown cycling Temperature Targets							
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:05	4.4	0	0	0	0
61	None	00:00:30	2.2	5.6	0.5	0	0

Afbeelding 15. Thermocyclingprogramma – kwantificeringscycli

LightCycler® 480 SW - User Defined Workflow for cobas z 480

Instrument: 54735 / Not Connected Database: June2020 (Research) User: Speedx

Window: New Experiment

Run Protocol: Setup

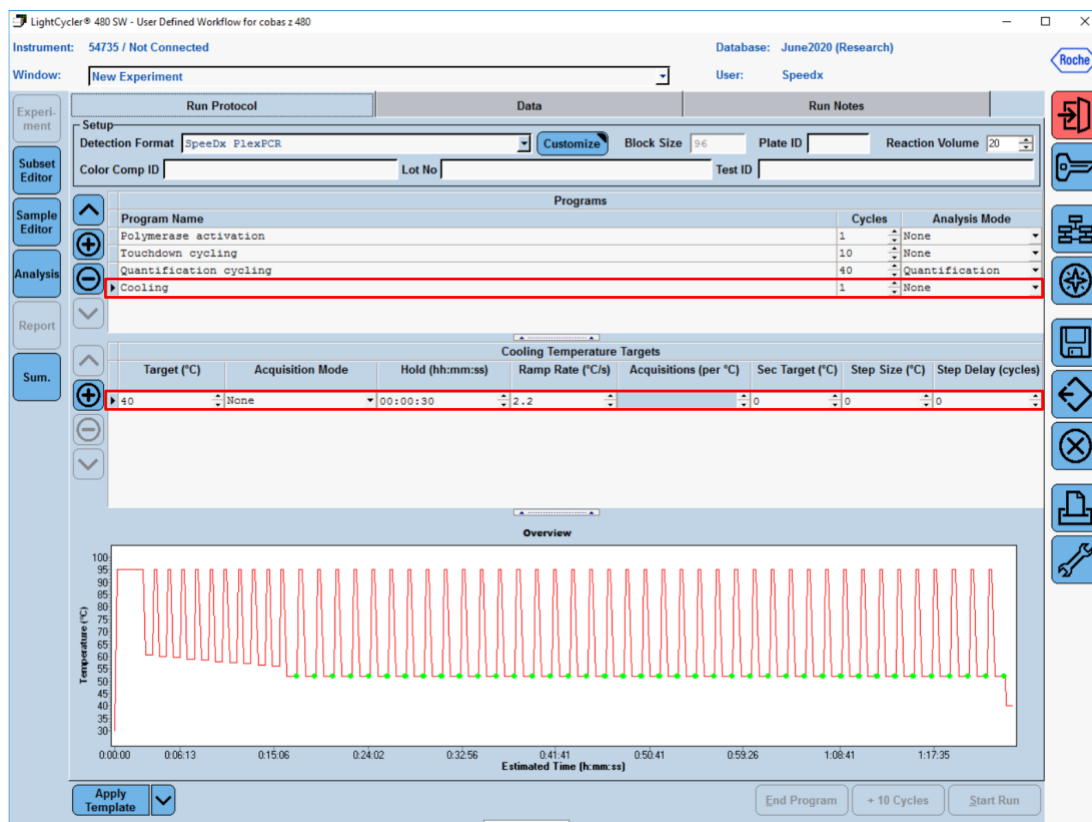
Detection Format: SpeedX FlexPCR Block Size: 96 Plate ID: Reaction Volume: 20

Color Comp ID: Lot No: Test ID:

Program Name	Cycles	Analysis Mode
Polymerase activation	1	None
Touchdown cycling	10	None
Quantification cycling	40	Quantification
Cooling	1	None

Quantification cycling Temperature Targets							
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:05	4.4	0	0	0	0
52	Single	00:00:40	2.2	0	0	0	0

Afbeelding 16. Thermocyclingprogramma – afkoeling



> **Start Run** (run starten)

Wanneer het cyclingprogramma is afgelopen moet een .ixo bestand voor analyse naar de **ResistancePlus**[®] MG (z480)- analysesoftware worden geëxporteerd.

Selecteer **Export** (Exporteren)

Sla dit op een duidelijk herkenbare locatie op

20.2 Colour Compensation (kleurcompensatie) voor cobas z 480 analyser

NB: De **PlexPCR**[®] Colour Compensation-kit (kleurcompensatiekit) (catalogusnr. 90001) moet worden uitgevoerd en toegepast voor z480-analyse. Deze kit is op aanvraag leverbaar.

Voor analyse met behulp van de software moet de monsternaam van de kleurcompensatiereacties worden gelabeld zoals weergegeven in **Tabel 52**.

Wanneer het cyclingprogramma is afgelopen moet een .ixo bestand voor analyse naar de **ResistancePlus**[®] MG (z480)- analysesoftware worden geëxporteerd.

Selecteer **Export** (Exporteren)

Sla dit op een duidelijk herkenbare locatie op en noem het "**SpeedX PlexPCR**"

Tabel 52. Monsternaam voor kleurcompensatiereacties voor de analysesoftware						
Reacties						
	BLANK (BLANCO)	510 mix (510-mix)	580 mix (580-mix)	610 mix (610-mix)	640 mix (640-mix)	660 mix (660-mix)
Dominant kanaal	Water	465-510	540-580	540-610	540-645	610-670
Naam monster	BLANK (BLANCO)	465-510	540-580	540-610	540-645	610-670

20.3 Interpretatie van de resultaten

Voor de interpretatie van de gegevens is de **ResistancePlus**[®] MG (z480)-analysesoftware vereist. De analysesoftware is op aanvraag leverbaar. Neem voor meer informatie contact op met tech@speedx.com.au.

Zie **paragraaf 24** voor instructies voor het gebruik van de **ResistancePlus**[®] MG (z480)-analysesoftware.

21 Bijlage 3: Applied Biosystems® 7500 Fast

De volgende informatie is gebaseerd op 7500 Software v2.3.

De **ResistancePlus®** MG₍₅₅₀₎-kit bevat kleurstoffen voor de Applied Biosystems® (ABI) 7500 Fast. Er wordt gebruikgemaakt van standaard kleurstofkalibraties voor alle kanalen. Aangepaste kalibratie is niet nodig.

21.1 De Applied Biosystems® 7500 Fast programmeren

Selecteer **Advanced Setup** (geavanceerde instellingen)

Open in **Setup** (instellingen) > **Experiment Properties** (eigenschappen van experiment) en selecteer het volgende

Geef het experiment een naam

Instrument (instrument) > 7500 Fast (96 Wells)

Type of experiment (soort experiment) > Quantitation (kwantificatie) – Standard Curve (standaardcurve)

Reagents (reagentia) > Other (overige)

Ramp Speed (toenamesnelheid) > Standard (standaard)

Open in **Setup** (instellingen) > **Plate Setup** (instellingen plaat)

Ga op het tabblad **Define Targets and Samples** (doelen en monsters definiëren) naar >

Define Targets (doelen definiëren) zoals hieronder weergegeven (definieer kleuren naar behoefte)

Doelnaam	Reporter	Quencher
MgPa	FAM	None (geen)
23S rRNA-mutatie	JOE	None (geen)
IC	TAMRA	None (geen)

Om geautomatiseerde monsterdetectie in de analysesoftware mogelijk te maken kent u naamtags toe aan de wells op de plaat

Open in **Setup** (instellingen) > **Plate Setup** (instellingen plaat)

Ga op het tabblad **Define Targets and Samples** (doelen en monsters definiëren) naar >

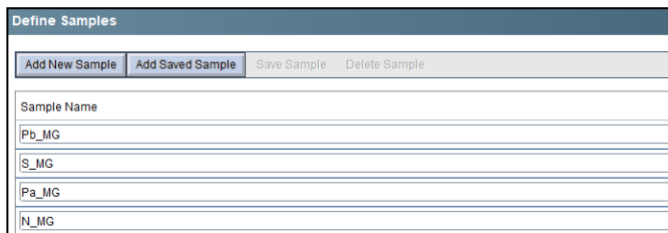
Define Samples (monsters definiëren)

Bewerk **Sample Name** (monsternaam) zodat deze overeenkomt met de naamtags die zijn gedefinieerd in de Assays-module van de analysesoftware (zie **paragraaf 24.4**)

Monsters worden voorzien van een label in de vorm *Voorvoegsel_Achtersvoegsel* (zoals weergegeven in **Tabel 54** en **Afbeelding 17**) bijv. Pa_MG

NB: De naamtags van monsters zijn hoofdlettergevoelig. De naamtag moet exact overeenkomen met de toegewezen namen in het run-bestand.

Soort monster	Voorvoegsel (in analysesoftware)	_Achtersvoegsel (in analysesoftware)	Naam monster (in 7500 Fast)
Regulier monster	S	_MG	S_MG
Negatieve controle	N	_MG	N_MG
Positieve controle (MG, 23S rRNA mutanttype) (Pa)	Pa	_MG	Pa_MG
Positieve controle (MG, 23S rRNA-wildtype) (Pb)	Pb	_MG	Pb_MG

Afbeelding 17. Sample Editor (monstereditor) – naamtags aan wells toewijzen


Ga op het tabblad **Assign Targets and Samples** (doelen en monsters toewijzen) naar >

Selecteer wells en wijs doelen en monsters toe aan de geselecteerde wells

Selecteer **Passive reference** (passieve referentie) > None (geen)

Open in **Setup** (instellingen) > **Run Method** (run-methode)

Stel **Reaction Volume Per Well** (reactievolume per well) in op > 20 µL

Maak het volgende programma aan (in meer detail weergegeven in Graphical View [grafische weergave] (**Afbeelding 18** en **Afbeelding 19**) en Tabular View (tabelweergave) (**Afbeelding 20**):

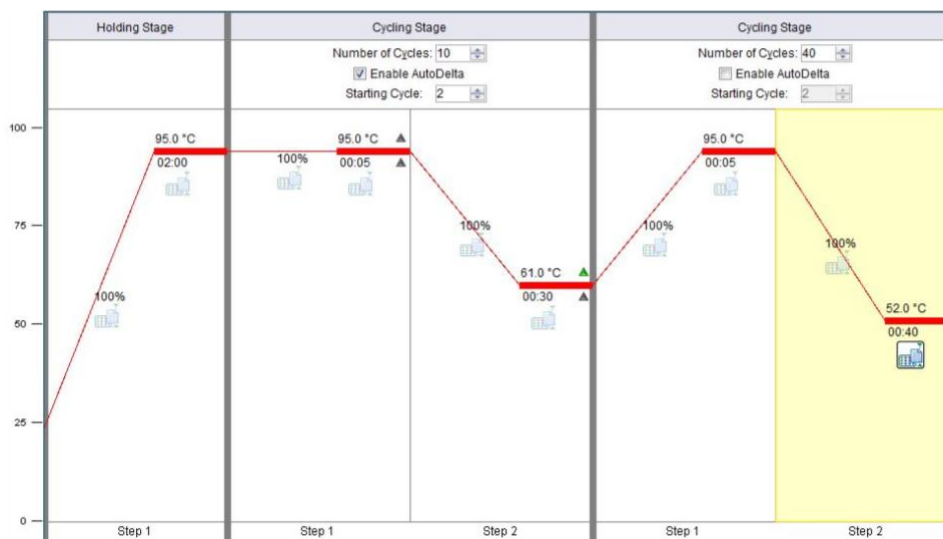
Tabel 55. Thermocyclingprogramma				
Programmanaam	Cycles (cycli)	Target °C	Hold (duur)	Ramp (toename)*
Polymerase-activering	1	95 °C	2 min	100%
Touch down cycling (touchdowncycli):	10	95 °C	5 s	100%
Step down (stapsgewijze afname) -0,5 °C/cyclus [♠]		61 °C – 56,5 °C [♠]	30 s	100%
Quantification cycling (kwantificeringscycli)*:	40	95 °C	5 s	100%
Acquisitie/detectie		52 °C ⁺	40 s	100%

* Standaardtoename/-afname

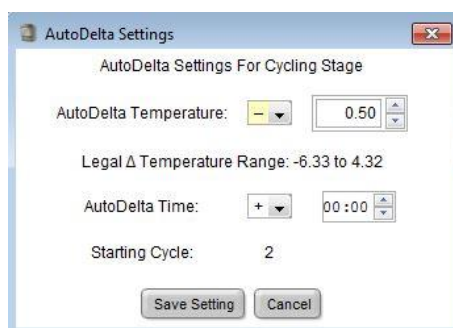
♠ Enable AutoDelta (AutoDelta inschakelen): -0,5 °C/cyclus

+ Collect data on hold (gegevens verzamelen opgeschort)

Afbeelding 18. Run method (run-methode) – Graphical View (grafische weergave)



Afbeelding 19. Run method (run-methode) – Graphical View (grafische weergave) – Enable AutoDelta (AutoDelta inschakelen)



Afbeelding 20. Run method (run-methode) – Tabular View (tabelweergave)

	Holding Stage	Cycling Stage		Cycling Stage	
		Number of Cycles: 10	Number of Cycles: 40	Number of Cycles: 40	Number of Cycles: 40
		<input checked="" type="checkbox"/> Enable AutoDelta	<input checked="" type="checkbox"/> Enable AutoDelta	<input type="checkbox"/> Enable AutoDelta	<input type="checkbox"/> Enable AutoDelta
		Starting Cycle: 2	Starting Cycle: 2	Starting Cycle: 2	Starting Cycle: 2
Ramp Rate (%)	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Temperature (°C)	95.0	95.0	61.0	95.0	52.0
Time	02:00	00:05	00:30	00:05	00:40
AutoDelta Temp.		+ 0.00	- 0.50		
AutoDelta Time		+ 00:00	+ 00:00		
Collect Data on Ramp	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Collect Data on Hold	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
	Step 1	Step 1	Step 2	Step 1	Step 2

Open in **Setup** (instellingen) > **Run Method** (run-methode)

Selecteer **Start Run** (run starten)

21.2 Interpretatie van de resultaten

Voor interpretatie van de gegevens is de **ResistancePlus**[®] MG (7500)-analysesoftware vereist. De analysesoftware is op aanvraag leverbaar. Neem voor meer informatie contact op met tech@speedx.com.au.

Zie **paragraaf 24** voor instructies voor het gebruik van de **ResistancePlus**[®] MG (7500)-analysesoftware.

22 Bijlage 4: Applied Biosystems 7500 Fast Dx

De volgende informatie is gebaseerd op SDSSoftware v1.4.1 voor de 7500 Fast Dx.

De **ResistancePlus**[®] MG₍₅₅₀₎-kit bevat kleurstoffen voor de Applied Biosystems[®] (ABI) 7500 Fast Dx. Er wordt gebruikgemaakt van standaard kleurstofkalibraties voor alle kanalen. Aangepaste kalibratie is niet nodig.

22.1 De Applied Biosystems[®] 7500 Fast Dx programmeren

Selecteer Create New Document (nieuw document aanmaken)

Selecteer in de **New Document Wizard** (wizard nieuw document) het volgende (**Afbeelding 21**):

Assay > Standard Curve (Absolute Quantification) (Standaardcurve (absolute kwantificering))

Container > 96-Well Clear

Template (sjabloon) > Leeg document

Run mode (run-modus) > Standard 7500

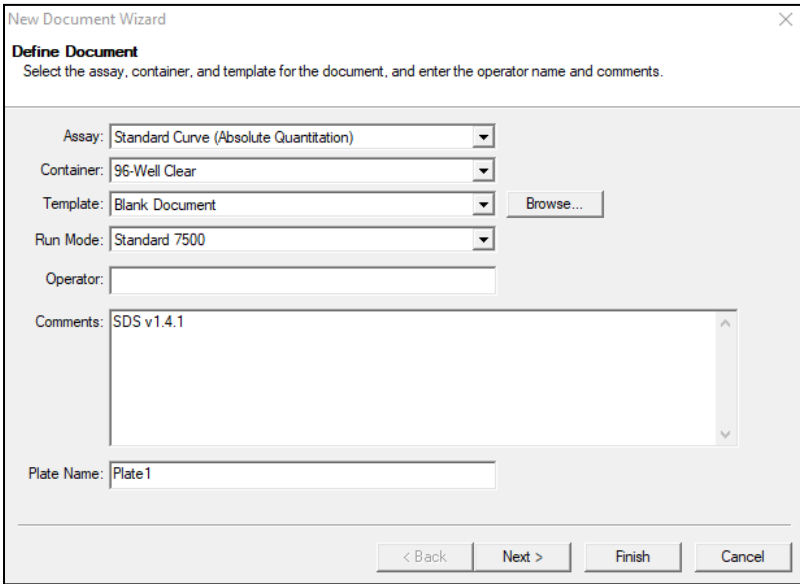
Operator > Voer naam operator in

Comments (opmerkingen) > Voer opmerkingen of extra aantekeningen in voor het run-bestand

Plate Name (plaatnaam) > Wijs een unieke naam toe aan het run-bestand

Selecteer **Next** (volgende)

Afbeelding 21. Venster New Document Wizard (wizard nieuw document)



Selecteer in **Select Detectors** (detectoren selecteren) > **New Detector** (nieuwe detector)

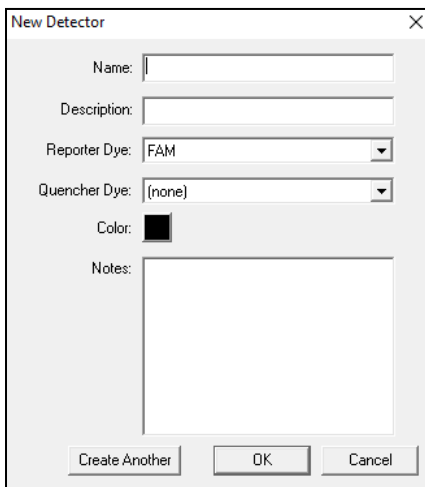
Definieer targets zoals hieronder weergegeven (definieer kleuren naar behoefte) (**Tabel 56** en

Afbeelding 22)

Tabel 56. Detectoren definiëren			
Detectoren	Detectornaam	Reporter kleurstof	Quencher
Detector 1	MgPa	FAM	None (geen)
Detector 2	23S rRNA-mutatie	JOE	None (geen)
Detector 3	IC	TAMRA	None (geen)

Selecteer **OK**

Afbeelding 22. Nieuw detectorvenster

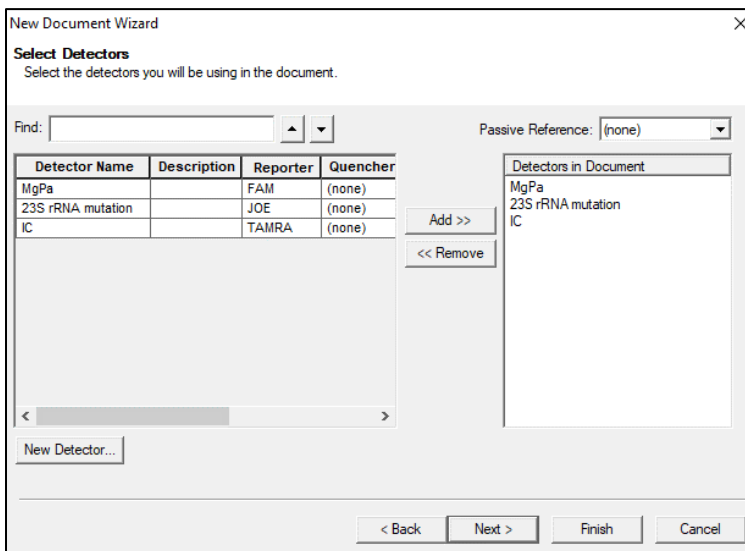


Selecteer **Detectors** (detectoren) (Afbeelding 23)

Selecteer detectoren en **Add** (toevoegen) aan document

Selecteer **Passive reference** (passieve referentie) > **None** (geen)

Afbeelding 23. Venster Select Detectors (detectoren selecteren)



Detector Name	Description	Reporter	Quencher
MgPa		FAM	(none)
23S rRNA mutation		JOE	(none)
IC		TAMRA	(none)

Detectors in Document
MgPa
23S rRNA mutation
IC

In **Set Up** (instellen) monsterplaat >

Selecteer wells en wijs 4 detectoren toe aan de geselecteerde wells

- MgPa
- 23S rRNA-mutatie
- IC

Selecteer **Next** (volgende)

Om geautomatiseerde monsterdetectie in de analysesoftware mogelijk te maken kent u naamtags toe aan de wells op de plaat
Ga in **Setup** (instellen) naar tabblad **Plate** (plaat)

Klik rechts op de well en selecteer **Well Inspector** (well-inspecteur) > voer **Sample Name** (monsternaam) in

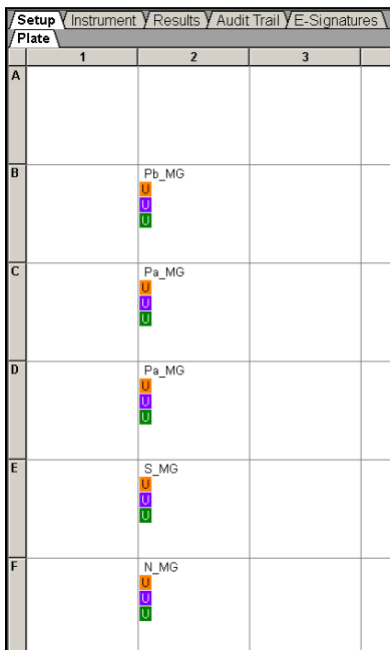
Bewerk **Sample Name** (monsternaam) zodat deze overeenkomt met de naamtags die zijn gedefinieerd in de Assays-module van de analysesoftware (zie **paragraaf 24.4**)

Monsters worden voorzien van een label in de vorm *Voorvoegsel_Achtersvoegsel* (zoals weergegeven in **Tabel 57** en **Afbeelding 24**) bijv. Pb_MG

NB: De naamtags van monsters zijn hoofdlettergevoelig. De naamtag moet exact overeenkomen met de toegewezen namen in het run-bestand.

Tabel 57. Naamtags van monsters voor analysesoftware			
Soort monster	Voorvoegsel_ (in analysesoftware)	_Achtersvoegsel (in analysesoftware)	Naam monster (in 7500 Fast Dx)
Regulier monster	S	_MG	S_MG
Negatieve controle	N	_MG	N_MG
Positieve controle (MG, 23S rRNA mutanttype) (Pa)	Pa	_MG	Pa_MG
Positieve controle (MG, 23S rRNA-wildtype) (Pb)	Pb	_MG	Pb_MG

Afbeelding 24. Weergave Setup plate (plaat instellen) – Assigning nametags to wells (naamtags aan wells toewijzen)



Setup Plate	1	2	3	4
A				
B		Pb_MG U U U		
C		Pa_MG U U U		
D		Pa_MG U U U		
E		S_MG U U U		
F		N_MG U U U		

Selecteer **Next** (volgende)

Op tabblad **Instrument**

In vak **Settings** (instellingen)

Voer voor **Sample Volume (monstervolume) (µL)** in: 20 µL

Maak het volgende thermocycler-protocol aan (Tabel 58 en Afbeelding 25 en Afbeelding 26)

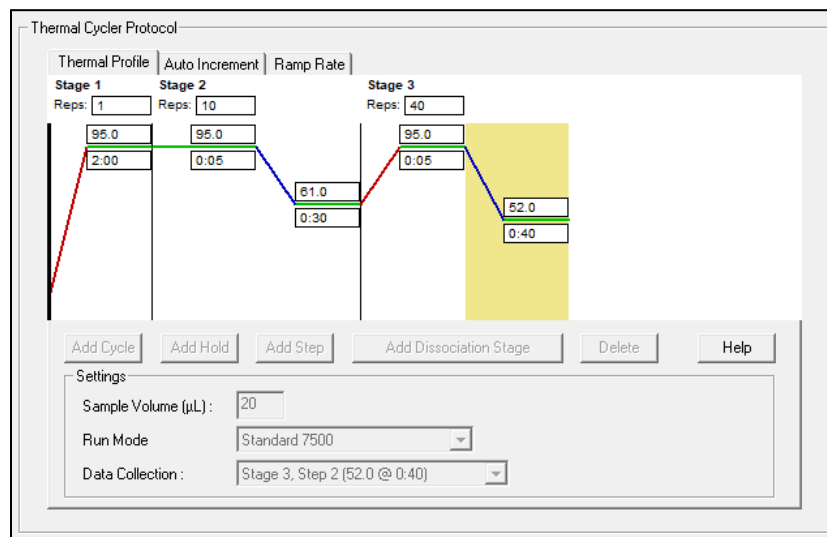
Tabel 58. Thermocycler-protocol				
Programmanaam	Cycles (cycli)	Target °C	Hold (duur)	Ramp (toename) [‡]
Polymerase-activering	1	95 °C	2 min	100%
Touch down cycling (touchdowncycli): Step down (stapsgewijze afname) -0,5 °C/cyclus [⊖]	10	95 °C	5 s	100%
		61 °C – 56,5 °C [⊖]	30 s	100%
Kwantificeringscycli ⁺ : Acquisitie/Detectie	40	95 °C	5 s	100%
		52 °C ⁺	40 s	100%

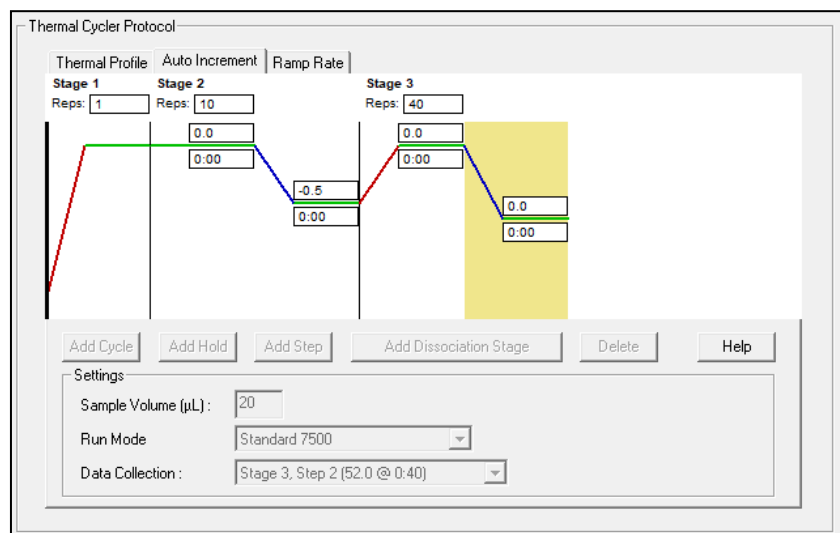
[‡] Standaardtoename/-afname

[⊖] Enable AutoDelta (AutoDelta inschakelen): -0,5 °C/cyclus

⁺ Collect data on hold (gegevens verzamelen opgeschoort)

Afbeelding 25. Thermocycler-protocol - Thermisch profiel



Afbeelding 26. Thermocycler-protocol - Auto Increment (automatische toename)

22.2 Interpretatie van de resultaten

Voor interpretatie van de gegevens is de **ResistancePlus**[®] MG (7500)-analysesoftware vereist. De analysesoftware is op aanvraag leverbaar. Neem voor meer informatie contact op via tech@speedx.com.au.

Zie **paragraaf 24** voor instructies voor het gebruik van de **ResistancePlus**[®] MG (7500)-analysesoftware.

23 Bijlage 5: Bio-Rad CFX96™ Dx en CFX96 Touch™ Real-Time PCR System

De volgende informatie is gebaseerd op Bio-Rad CFX Manager v3.1

De **ResistancePlus**® MG₍₆₇₅₎-kit bevat kleurstoffen voor het CFX96 Real-Time PCR System. Er wordt gebruikgemaakt van standaard kleurstofkalibraties voor alle kanalen. Aangepaste kalibratie is niet nodig.

23.1 De Bio-Rad CFX96™ Dx en CFX96 Touch™ Real-Time PCR System programmeren

Selecteer **View** (weergave) > open **Run Setup** (run instellen)

In **Run Setup** (run instellen) > tabblad **Protocol** (protocol) > selecteert u **Create New** (nieuwe aanmaken)

In de **Protocol Editor** (Protocol-editor) (zie **Afbeelding 27**):

Stel **Sample Volume** (monstervolume) in op > 20 µL

Maak het volgende thermocyclingprogramma en sla dit op als '**SpeedX PCR**'. Dit protocol kan voor toekomstige runs worden geselecteerd.

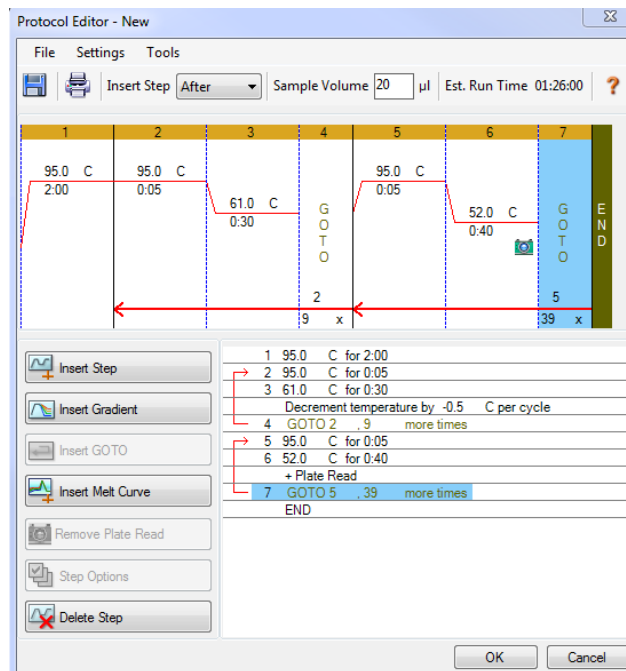
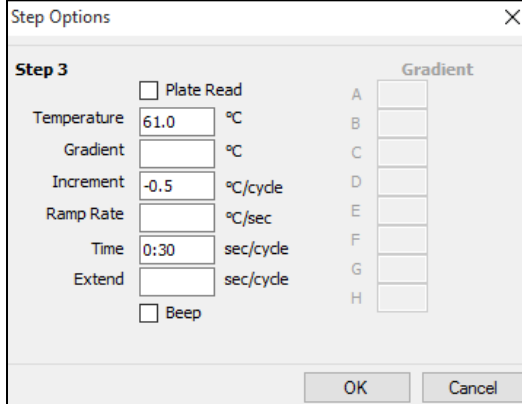
Voor touchdowncycli selecteert u stap 3 en selecteert u **Step options** (stappenopties) > Increment (toename): -0,5 °C/cyclus (in meer detail weergegeven in

Afbeelding 28).

Tabel 59. Thermocyclingprogramma			
Programmanaam	Cycles (cycli)	Target °C	Hold (duur)
Polymerase-activering	1	95 °C	2 min
Touch down cycling (touch-downcycli) ^δ : Step down (stapsgewijze afname) -0,5 °C/cyclus	10	95 °C	5 s
		61 °C – 56,5 °C ^δ	30 s
Kwantificeringscycli ⁺ : Acquisitie/Detectie	40	95 °C	5 s
		52 °C ⁺	40 s

^δ **Step options** (stappenopties) > Increment (toename): -0,5 °C/cyclus

⁺ **Add Plate Read to Step** (plaat lezen toevoegen aan stap)

Afbeelding 27. Thermocycling-protocol – grafische weergave

Afbeelding 28. Step Options (stappenopties)


Step Options

Step 3

Plate Read

Temperature 61.0 °C

Gradient °C

Increment -0.5 °C/cycle

Ramp Rate °C/sec

Time 0:30 sec/cycle

Extend sec/cycle

Beep

Gradient

A
B
C
D
E
F
G
H

OK Cancel

In **Run Setup** (run instellen) > tabblad **Plate** (plaat)

Selecteer **Create New** (nieuwe maken)

Selecteer **Settings** (instellingen) > **Plate Type** (soort plaat) > Selecteer **BR Clear** (BR transparant)

Stel **Scan mode** (scanmodus) in op > All channels (alle kanalen)

Selecteer **Fluorophores** (fluorenen) > FAM, HEX, Quasar 705 (zie **Tabel 60**)

Selecteer wells die monsters bevatten, wijs het **Sample Type** (monstertype) toe en controleer **Load** (belasting) voor fluoroforen (FAM, HEX, Quasar 705)

Sla de plaat op

Tabel 60. Kanalen voor <i>ResistancePlus</i> [®] MG ₍₆₇₅₎ -targets		
<i>M. genitalium</i> -detectie (MgPa)	23S rRNA-mutatie	Internal Control (interne controle)
FAM	HEX	Quasar 705

In **Run Setup** (run instellen) > tabblad **Start Run** (run starten)

Selecteer blok

Start Run (run starten)

Om geautomatiseerde monsterdetectie in de analysesoftware mogelijk te maken kent u naamtags toe aan de wells op de plaat

Open de module **Plate Setup** (plaat instellen)

Selecteer de well

Bewerk **Sample Name** (monsternaam) zodat deze overeenkomt met de naamtags die zijn gedefinieerd in de Assays-module van de analysesoftware (zie **paragraaf 24.4**)

Monsters worden voorzien van een label in de vorm *Voorvoegsel_Achtersvoegsel* (zoals weergegeven in **Tabel 61** en **Afbeelding 29**) bijv. Pb_MG

NB: De naamtags van monsters zijn hoofdlettergevoelig. De naamtag moet exact overeenkomen met de toegewezen namen in het run-bestand.

Tabel 61. Naamtags van monsters voor analysesoftware			
Soort monster	Voorvoegsel_ (in analysesoftware)	Achtersvoegsel (in analysesoftware)	Naam monster (in CFX96)
Regulier monster	S	_MG	S_MG
Negatieve controle	N	_MG	N_MG
Positieve controle (MG, 23S rRNA mutanttype) (Pa)	Pa	_MG	Pa_MG
Positieve controle (MG, 23S rRNA-wildtype) (Pb)	Pb	_MG	Pb_MG

Afbeelding 29. Sample Editor (monstereditor) – Naamtags toewijzen aan wells

	1	2	3
A	Unk FAM HEX Quasar 705 S_MG		
B	Unk FAM HEX Quasar 705 Pa_MG		
C	Unk FAM HEX Quasar 705 Pb_MG		
D	Unk FAM HEX Quasar 705 N_MG		

23.2 Interpretatie van de resultaten

Voor de interpretatie van de gegevens is de **ResistancePlus**[®] MG (CFX)-analysesoftware vereist. De analysesoftware is op aanvraag leverbaar. Neem voor meer informatie contact op via tech@speedx.com.au.

Zie **paragraaf 24** voor instructies voor het gebruik van de **ResistancePlus**[®] MG (CFX)-analysesoftware.

24 Bijlage A: Interpretatie van de resultaten

Voor de interpretatie van de gegevens is de **ResistancePlus**[®] MG-analysesoftware nodig. Hoewel **PlexPrime**[®]-primers een grotere specificiteit bieden dan andere allel-specifieke primers kan niet-specifieke versterking van de 23S rRNA mutant-assay worden waargenomen in monsters die hoge concentraties aan *M. genitalium*-wildtype 23S rRNA bevatten. De **ResistancePlus**[®] MG-analysesoftware automatiseert de gegevensinterpretatie van de amplificatieresultaten en stroomlijnt de workflow.

Zie **Tabel 62** voor de juiste analysesoftware voor elk instrument voor realtime PCR. De analysesoftware is op aanvraag leverbaar. Neem voor meer informatie contact op via tech@speedx.com.au.

Tabel 62. ResistancePlus [®] MG analysesoftware		
Catalogusnr.	Analysesoftware*	Instrument voor realtime PCR
99003	ResistancePlus [®] MG (LC480)	LC480 II
99018	ResistancePlus [®] MG (z480)	z 480
99002	ResistancePlus [®] MG (7500)	7500 Fast en 7500 Fast Dx
99008	ResistancePlus [®] MG (CFX)	CFX96 Dx en CFX96 Touch
99023	REFLEX ResistancePlus [®] MG (LC480)	LC480 II
99024	REFLEX ResistancePlus [®] MG (z480)	z 480
99026	REFLEX ResistancePlus [®] MG (7500)	7500 Fast en 7500 Fast Dx
99025	REFLEX ResistancePlus [®] MG (CFX)	CFX96 Dx en CFX96 Touch

* Raadpleeg de website <https://plexpcr.com/products/sexually-transmitted-infections/resistanceplus-mg/#resources> om te controleren of u de meest recente versie van de analysesoftware gebruikt.

NB: Voor de overdracht, rapportage en opslag van resultaten moeten standaard laboratoriumpraktijken worden gevolgd om verlies van monsterinformatie te voorkomen.

24.1 FastFinder-platform - Minimum IT-vereisten

De analysesoftware is beschikbaar binnen het FastFinder platform (<https://www.ugentec.com/fastfinder/analysis>). De minimum IT-vereisten voor de installatie van het FastFinder-platform staan hieronder weergegeven.

Hardwarevereisten

PC (Mac-computers worden niet ondersteund)

Processor: 2 GHz, 2 GB RAM

Opslagcapaciteit: 10GB

Internetverbindingkabel of DSL, proxy wordt niet ondersteund

Min. schermresolutie: 1366x768 pixels

Ondersteunde client-besturingssystemen

Besturingssysteem	Ondersteunde edities
Windows 10	32-bits en 64-bits
Windows 8.1	32-bits, 64-bits en ARM
Windows 8	32-bits, 64-bits en ARM
Windows 7 SP1	32-bits en 64-bits
Windows Vista SP2	32-bits en 64-bits

Ondersteunde browsers

Voor FastFinder Administrator-accountgebruikers is een van de volgende browsers vereist:

- Internet Explorer 11 of nieuwer
- Microsoft Edge 25 of nieuwer
- Firefox 45 of nieuwer
- Google Chrome 47 of nieuwer.

De software kan ook op oudere versies draaien, maar deze worden niet officieel ondersteund.

Softwarevereisten

Om de FastFinder software te kunnen gebruiken is minimaal .NET 4.6.1 vereist. Meer informatie over het .NET framework vindt u op de helppagina's van Microsoft Windows.

Antivirusinstellingen

Mogelijk plaatst uw antivirussoftware het Fastfinder-installatieprogramma (UgenTec.FastFinder.Installer.exe) in quarantaine. Voeg in dat geval het bestand toe aan de witte lijst van uw antivirus. Voorbeeld: Symantec (Risico: WS.Reputation.1)

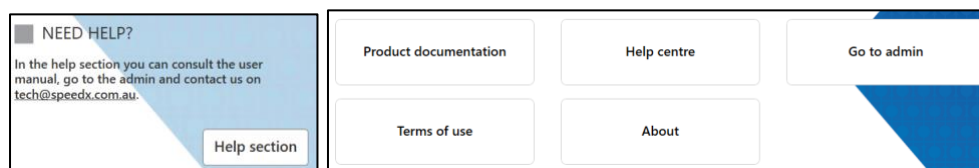
Vereisten voor de firewall

https-verbindingen moeten worden toegestaan voor *.fastfinderplatform.com:443

Zie voor verdere gedetailleerde aanwijzingen over het **FastFinder**-platform de **FastFinder-gebruiksaanwijzing** toegankelijk in het menu **Help**.

Het menu Help openen

- Open het startmenu 
- Selecteer  of **Help** en selecteer vervolgens **Productdocumentatie** gevolgd door **Gebruiksaanwijzing**



24.2 Device set up (instellingen apparaat) (nieuwe gebruiker of nieuw apparaat)

Zie de **FastFinder User Manual** (FastFinder-gebruiksaanwijzing) voor gedetailleerde instructies voor het instellen van het apparaat, toegankelijk via het menu **Help**


Open FastFinder

- Selecteer **Devices** (Apparaten) op de workflowbalk
 - > Selecteer **Add** (toevoegen)
 - > Selecteer een bestand (run-bestand) voor het nieuwe apparaat
- Om de Current directory (huidige directory) te wijzigen
 - > Selecteer **Browse** (bladeren) en selecteer de map met de betreffende bestanden
 - > Selecteer **Next** (volgende)
- Voeg informatie toe over het apparaat
 - > Selecteer **Save** (opslaan)

24.2.1 Colour Compensation (kleurcompensatie)



NB: Zie **paragraaf 19.2**-en **paragraaf 20.2** voor meer informatie over Colour Compensation (kleurcompensatie)

Voor **LC480 II**- en **z 480**-apparaten moet aan het apparaat een kleurcompensatiebestand worden toegevoegd

- Selecteer het LC480 II- of z 480-apparaat
 - > Selecteer in het gedeelte **Colour Compensation** (kleurcompensatie) 
 - > Selecteer het kleurcompensatiebestand voor het apparaat in de directory
- Om de Current directory (huidige directory) te wijzigen
 - > Selecteer **Browse** (bladeren) en selecteer de map met de betreffende bestanden
- Selecteer **Next** (volgende)
- Selecteer **ResistancePlus MG (LC480)**, **ResistancePlus MG (z480)**, **REFLEX ResistancePlus MG (LC480)**, of **REFLEX ResistancePlus MG (z480)** in de lijst om een koppeling naar deze assay te maken
- Selecteer **Save** (opslaan)

Wanneer nodig kunnen nieuwe of aanvullende kleurcompensatiebestanden aan een apparaat worden toegevoegd of gedeactiveerd.

In het kleurcompensatiegedeelte van het apparaat

- Selecteer naast de bestandsnaam 
- Selecteer  om een kleurcompensatiebestand voor een assay te activeren of te deactiveren
- Selecteer **Save** (opslaan)



24.3 Plug-in voor assays (nieuwe gebruiker)

Zie de **gebruiksaanwijzing** van **FastFinder** voor gedetailleerde instructies voor het instellen van assays, toegankelijk via het menu **Help**

Open **FastFinder**

- Selecteer **Assays** op de workflowbalk
- Selecteer **Add** (toevoegen)
 - > Voor LC480 II > selecteer **ResistancePlus MG (LC480)** in de lijst
 - > Voor z 480 > selecteer **ResistancePlus MG (z480)** in de lijst
 - > Voor 7500 Fast en 7500 Fast Dx > selecteer **ResistancePlus MG (7500)** in de lijst
 - > Voor CFX96 Dx en CFX96 Touch > selecteer **ResistancePlus MG (CFX)** in de lijst
 - > Voor de analyse van monsters geëxtraheerd zonder IC op de LC480 (reflex-workflow) > selecteer **REFLEX ResistancePlus[®] MG (LC480)** in de lijst
 - > Voor de analyse van monsters geëxtraheerd zonder IC op de z 480 (reflex-workflow) > selecteer **REFLEX ResistancePlus[®] MG (z480)** in de lijst
 - > Voor de analyse van monsters geëxtraheerd zonder IC op de 7500 Fast en 7500 Fast Dx (reflex-workflow) > selecteer **REFLEX ResistancePlus[®] MG (7500)** in de lijst
 - > Voor de analyse van monsters geëxtraheerd zonder IC op de CFX96 Dx en CFX96 Touch (reflex-workflow) > selecteer **REFLEX ResistancePlus[®] MG (CFX)** in de lijst
- Selecteer **Add** (toevoegen)





Om versies van het plug-in voor assays activeren of deactiveren

- In General assay information (algemene assay-informatie)
 - > Selecteer  Versions (versies)
 - > Selecteer  om de versie van de assay te activeren of deactiveren
 - > Selecteer **Save** (opslaan)

24.4 Monsternaamgeving

Er kunnen monsternaamtags worden toegewezen aan een plug-in voor assays ter automatisering van de detectie van wells en monstertypen voor analyse.



Selecteer **Assays** op de workflowbalk


- Selecteer in het Nametags soort monster (voorvoegsel) 
 - > Selecteer  om een naamtag toe te voegen om monstertype-naamtags te definiëren (Negative control (negatieve controle), Positive control/s (positieve controle/s) en Regular sample (normaal monster))
 - > Voeg het gewenste woord, acroniem of letter toe aan het tekstvak
 - > Selecteer **Save** (opslaan)
- Selecteer in Nametags voor mixdefinitie (achtervoegsel) 
 - > Selecteer  om een nametag toe te voegen om de mixnaam te definiëren
 - > Voeg het gewenste woord, acroniem of letter toe aan het tekstvak
 - > Selecteer **Save** (opslaan)
- Wijs in de instrumentsoftware (vóór of na voltooiing van de run) dezelfde naamtag toe aan de desbetreffende wells
 - > Voor **LC480 II** raadpleegt u **paragraaf 19** of voor instructies betreffende het programmeren van monsternaamtags in het run-bestand
 - > Voor **z 480** raadpleegt u **paragraaf 20** voor instructies betreffende het programmeren van monsternaamtags in het run-bestand
 - > Voor **7500 Fast** raadpleegt u **paragraaf 21** voor instructies betreffende het programmeren van monsternaamtags in het run-bestand
 - > Voor **7500 Fast Dx** zie **paragraaf 22** voor instructies over het programmeren van monsternaamtags in het run-bestand
 - > Voor **CFX96 Dx** en **CFX96 Touch** raadpleegt u **paragraaf 23** voor instructies betreffende het programmeren van monsternaamtags in het run-bestand

NB: De naamtags van monsters zijn hoofdlettergevoelig. De naamtag moet exact overeenkomen met de toegewezen namen in het run-bestand.

24.5 Mixpartijnummers toevoegen

Er kunnen mixpartijnummers worden toegewezen aan de assay om reagentia traceerbaar te maken

- Selecteer **Assays** op de workflowbalk
 - > In de **Assay Lot (partij)**: selecteer  om een nieuwe partij toe te voegen of selecteer  om een bestaande partij te bewerken
 - > Eenmaal toegevoegd komen partijnummers beschikbaar in de analysemodule.

Selecteer  om alle partijnummers of alleen actieve partijnummers weer te geven

24.6 Analyse

Selecteer **Analyses** op de workflowbalk om met een nieuwe analyse te beginnen

1 Select datafile

Zoek het bestand dat ter analyse moet worden geüpload op in een gespecificeerde directory

- Om de **Current directory** (huidige directory) te wijzigen
 - > Selecteer **Browse** (bladeren) en selecteer de map met de betreffende bestanden
- Selecteer het run-bestand (gegevensbestand) uit de lijst

- > Selecteer **Next step** (volgende stap)

2 Assign assay(s)


Wijs de assay-informatie handmatig toe aan de plaat als in de Assays-module geen namen van monsters zijn ingesteld

- Voor **LC480 II** > selecteer **ResistancePlus MG (LC480)**
- Voor **z 480** > selecteer **ResistancePlus MG (z480)**
- Voor **7500 Fast** en **7500 Fast Dx** > selecteer **ResistancePlus MG (7500)**
- Voor **CFX96 Dx** en **CFX96 Touch** > selecteer **ResistancePlus MG (CFX)**
- Voor de analyse van monsters geëxtraheerd zonder IC op de **LC480** > selecteer **REFLEX ResistancePlus® MG (LC480)**
- Voor de analyse van monsters geëxtraheerd zonder IC op de **z 480** > selecteer **REFLEX ResistancePlus® MG (z480)**
- Voor de analyse van monsters geëxtraheerd zonder IC op de **7500 Fast** en **7500 Fast Dx** > selecteer **REFLEX ResistancePlus® MG (7500)**
- Voor de analyse van monsters geëxtraheerd zonder IC op de **CFX96 Dx** en **CFX96 Touch** > selecteer **REFLEX ResistancePlus® MG (CFX)**
- Selecteer wells en wijs ze als volgt toe:
 - > Regulier monster (S)
 - > Negatieve controle (N)
 - > Positieve controle (MG, 23S rRNA mutanttype) (Pa)
 - > Positieve controle (MG, 23S rRNA-wildtype) (Pb)
- Selecteer **Next step** (volgende stap)

Om de plaatindeling op te slaan als sjabloon voor toekomstig gebruik

- Selecteer wells en wijs monstertypen toe
 - > Selecteer  om het sjabloon op te slaan
- Specificeer sjabloonnaam voor toekomstig gebruik
 - > Selecteer **Save** (opslaan)

Een eerder opgeslagen plaatsjabloon laden

- Selecteer  om het plaatsjabloon te laden
 - > Selecteer de sjabloon in het vervolgkeuzemenu
 - > Vink het vakje aan om in de plaatsjabloon gespecificeerde monstertypen te laden
 - > Selecteer **Load** (laden)

3 Configure assay(s)

- Voor **LC480 II** > selecteer **ResistancePlus MG (LC480)**
 - > Selecteer het juiste kleurcompensatiebestand in het vervolgkeuzemenu
 - > Selecteer **Assay Lot** (partij) in het vervolgkeuzemenu
 - > Selecteer **Analyse** (analyseren)
- Voor **z 480** > selecteer **ResistancePlus MG (z480)**
 - > Selecteer het juiste kleurcompensatiebestand in het vervolgkeuzemenu

- > Selecteer **Assay Lot** (partij) in het vervolgkeuzemenu
- > Selecteer **Analyse** (analyseren)

- Voor **7500 Fast** en **7500 Fast Dx** > selecteer **ResistancePlus MG (7500)**
 - > Selecteer **Assay Lot** (partij) in het vervolgkeuzemenu
 - > Selecteer **Analyse** (analyseren)

- Voor **CFX96 Dx** en **CFX96 Touch** > selecteer **ResistancePlus MG (CFX)**
 - > Selecteer **Assay Lot** (partij) in het vervolgkeuzemenu
 - > Selecteer **Analyse** (analyseren)

- Voor monsters geëxtraheerd zonder IC (reflex-workflow) op de **LC480 II** > selecteer **REFLEX ResistancePlus MG (LC480)**
 - > Selecteer het juiste kleurcompensatiebestand in het vervolgkeuzemenu
 - > Selecteer **Assay Lot** (partij) in het vervolgkeuzemenu
 - > Selecteer **Analyse** (analyseren)

- Voor monsters geëxtraheerd zonder IC (reflex-workflow) op de **z 480** > selecteer **REFLEX ResistancePlus MG (z480)**
 - > Selecteer het juiste kleurcompensatiebestand in het vervolgkeuzemenu
 - > Selecteer **Assay Lot** (partij) in het vervolgkeuzemenu
 - > Selecteer **Analyse** (analyseren)

- Voor monsters geëxtraheerd zonder IC (reflex-workflow) op de **7500 Fast** en **7500 Fast Dx** > selecteer **REFLEX ResistancePlus MG (7500)**
 - > Selecteer **Assay Lot** (partij) in het vervolgkeuzemenu
 - > Selecteer **Analyse** (analyseren)

- Voor monsters geëxtraheerd zonder IC (reflex-workflow) op de **CFX96 Dx** en **CFX96 Touch** > selecteer **REFLEX ResistancePlus MG (CFX)**
 - > Selecteer **Assay Lot** (partij) in het vervolgkeuzemenu
 - > Selecteer **Analyse** (analyseren)

24.7 Resultaten

Zie **Tabel 63** voor een overzicht van mogelijke gerapporteerde monsterresultaten.

NB: Het wordt ten sterkste aanbevolen om amplificatiecurven te bevestigen voor alle positieve monsters.

Om eventuele onzekere resultaten op te schonen 

- Selecteer het tabblad **Resolve** (opschonen)
- Selecteer het monster dat u wilt opschonen
- Inspecteer de amplificatiecurven op onzekere resultaten
 - > Selecteer om een referentiecurve uit te zetten in de grafiek
 - > Selecteer om een positieve controle uit te zetten in de grafiek

- > Selecteer om een negatieve controle uit te zetten in de grafiek
- > Selecteer om het voorgestelde resultaat te bevestigen of om een andere optie te selecteren
- Bevestig als **Negative** (negatief) of **Inconclusive** (onzeker) en voeg opmerkingen toe

NB: Voor onzekere monsters moet u de monsters eenmaal opnieuw extraheren en testen. Als het resultaat van het monster onzeker blijft, verzamel dan een nieuw monster om opnieuw te testen.

Om de analyse af te ronden en verdere bewerkingen door de gebruiker te voorkomen

- > Selecteer **Authorise Analysis** (analyse autoriseren)
- > Selecteer **Yes** (ja) om te bevestigen
- Om de analyse af te wijzen of opnieuw te starten
 - > Selecteer **Restart Analysis** (analyse opnieuw opstarten) of **Reject Analysis** (analyse afwijzen)
 - > Selecteer een optie om te bevestigen



24.8 Referentiecurve

Een referentiecurve kan worden opgeslagen en gebruikt om monsters op dezelfde plaat of op verschillende platen te vergelijken

- Selecteer het gewenste monster in het menu **Well Details** (Well-details) of **Target Details** (doelgegevens)
- In het amplificatiegrafiekmenu > selecteer 
 - > Vink het selectievakje aan voor het betreffende kanaal en voeg een label toe
 - > Selecteer **Save** (opslaan) om het signaal als referentiecurve toe te voegen

Deze referentiecurve wordt nu in het Assays-menu gekoppeld aan de assay weergegeven en kan op elk gewenst moment worden gedeactiveerd.


24.9 Overzicht van de resultaten

Tabel 63. Interpretatie van de resultaten <i>ResistancePlus</i> [®] MG-analysesoftware (Results Overview tab (tabblad Overzicht resultaten))						
Well	Naam	Assay	Resultaat	Cq-waarden [^]	Algehele resultaten	
A1	Monster 1	ResistancePlus MG	Negatief	KANAAL C: 25,31	Monster 1 - Negatief M. genitalium niet gedetecteerd, IC geldig	
A2	Monster 2	ResistancePlus MG	Positief	KANAAL A: 13,35 KANAAL B: 24,22 KANAAL C: 24,36	Monster 2 - Positief M. genitalium gedetecteerd, 23S rRNA-mutatie niet gedetecteerd	
A3	Monster 3	ResistancePlus MG	Positief	KANAAL A: 23,32 KANAAL B: 31,64	Monster 3 - Positief M. genitalium gedetecteerd, 23S rRNA-mutatie niet gedetecteerd	
A4	Monster 4	ResistancePlus MG	Positief	KANAAL A: 21,32 KANAAL B: 23,22 KANAAL C: 24,30	Monster 4 - Positief M. genitalium, 23S rRNA-mutatie gedetecteerd	
A5	Monster 5	ResistancePlus MG	Positief	KANAAL A: 23,16 KANAAL C: 24,31	Monster 5 - Positief M. genitalium, 23S rRNA-mutatie gedetecteerd	
A6	Monster 6	ResistancePlus MG	Ongeldig	KANAAL C: 35,02	Monster 6 - Ongeldig IC ongeldig, herhaal test ¹	
 A7	Monster 7 (gemarkeerd om op te schonen)	ResistancePlus MG	Positief	KANAAL A: 26,27 KANAAL B: 28,11 ² KANAAL C: 28,92	Monster 7 - Positief ² M. genitalium, 23S rRNA-mutatie gedetecteerd	
 A7	Monster 7 (Opschonen als onzeker)	ResistancePlus MG	Ongeldig	KANAAL A: 26,27 KANAAL C: 28,92	Monster 7 - Ongeldig ³ Resultaat onzeker, herhaal test ¹	
B2	Pa (Positieve controle type mutant)	ResistancePlus MG	Positief	KANAAL A: 25,01 KANAAL B: 24,23	Pa - Positief Positieve controle geldig	
B3	Pb (Positieve controle wildtype)	ResistancePlus MG	Positief	KANAAL A: 25,90	Pb - Positief Positieve controle geldig	
B4	N (Negatieve controle)	ResistancePlus MG	Negatief	KANAAL C: 26,25	N - Negatief Negatieve controle geldig	

[^] Raadpleeg **Tabel 12** voor de kanaalnamen voor verschillende instrumenten

¹ Voor monsters met IC ongeldig en onzekere monsters, opnieuw extraheren en opnieuw testen

² Een monster met een onzekere Cq zal voor opschoning worden gemarkeerd met 

³ Een monster dat is opgeschoond als onzeker is gemarkeerd met 

24.10 Resultaten exporteren

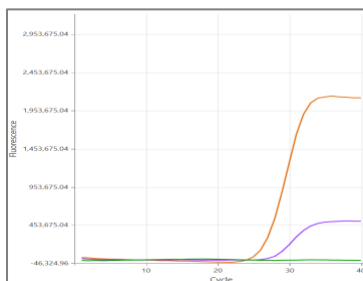
- Resultaten exporteren
 - > Selecteer **Exports** (exporten) op de workflowbalk
 - > Exporteer een of meer van de volgende soorten rapporten: **Cq values list (Cq-waardenlijst) (CSV)**, **Results (resultaten) (CSV)**, **Generic Amplification CSV** (generieke amplificatie CSV) of het juiste LIS-integratiebestand.
 - > Selecteer **Exports** (exporten)
- Exporten downloaden
 - > Selecteer **Reports** (rapporten) op de workflowbalk
 - > Selecteer bestanden en sla ze op
- U kunt in plaats hiervan ook een aangepast rapport exporteren
 - > Exporteer **Amplification Curve Analysis (PDF)** (amplificatiecurveanalyse [PDF])

- > Selecteer de informatie die u in het rapport wilt opnemen (grafieken, audit-trail, resultatenoverzicht)
- > Selecteer de gewenste rapportinstellingen om de monstervolgorde aan te passen
- Selecteer **Exports** (exporten)
 - > Open het rapport in **Report Viewer** (rapportviewer) voor weergave, opslaan en afdrukken

24.11 Voorbeeldgrafieken controles

De volgende voorbeelden tonen de amplificatiecurven (baseline-gecorrigeerde amplificatiecurven) en het resultatenoverzicht uit de **ResistancePlus MG (7500)**-analysesoftware voor controlemonstertypen.

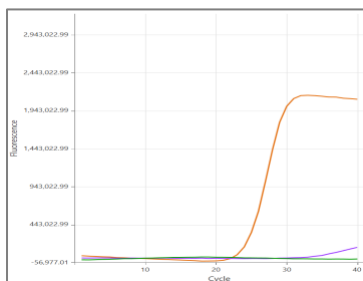
24.11.1 *M. genitalium*, 23S rRNA-mutantcontrole (Pa)



KANAAL A KANAAL B KANAAL C

Well	Naam	Assay	Resultaat	Cq-waarden	Algehele resultaten
B1	Pa	ResistancePlus MG	Positief	KANAAL A: 26,36 KANAAL B: 27,38	Pa - Positief Positieve controle geldig

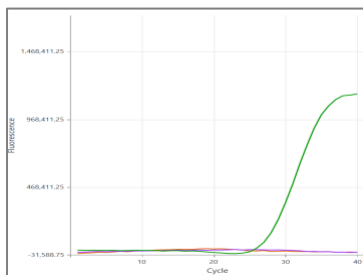
24.11.2 *M. genitalium*, 23S rRNA-wildtypecontrole (Pb)



KANAAL A KANAAL B KANAAL C

Well	Naam	Assay	Resultaat	Cq-waarden	Algehele resultaten
D12	Pb	ResistancePlus MG	Positief	KANAAL A: 24,30 KANAAL B: 34,29	Pb - Positief Positieve controle geldig

24.11.3 *M. genitalium*-negatieve controle (N) (negatief monster)



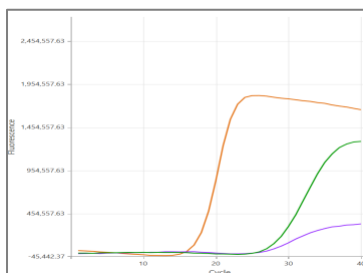
KANAAL A KANAAL B KANAAL C

Well	Naam	Assay	Resultaat	Cq-waarden	Algehele resultaten
D12	N	ResistancePlus MG	Negatief	KANAAL C: 27,65	N - Negatief Negatieve controle geldig

24.12 Voorbeelden

De volgende voorbeelden tonen de amplificatiecurven (baseline-gecorrigeerde amplificatiecurven) en het resultatenoverzicht uit de **ResistancePlus MG (7500)**-analysesoftware voor verschillende monsters.

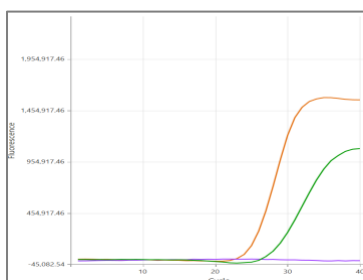
24.12.1 Voorbeeld 1. High copy *M. genitalium*, 23S rRNA-wildtype monster



KANAAL A KANAAL B KANAAL C

Well	Naam	Assay	Resultaat	Cq-waarden	Algehele resultaten
D2	Monster 12	ResistancePlus MG	Positief	KANAAL A: 16,34 KANAAL B: 26,59 KANAAL C: 26,00	Monster 12 - Positief M. genitalium gedetecteerd, 23S rRNA-mutatie niet gedetecteerd

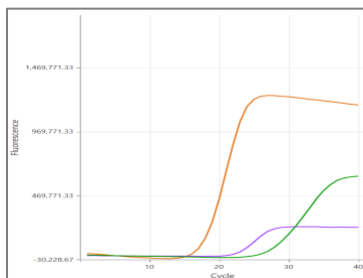
24.12.2 Voorbeeld 2. Low copy *M. genitalium*, 23S rRNA-wildtype monster



KANAAL A KANAAL B KANAAL C

Well	Naam	Assay	Resultaat	Cq-waarden	Algehele resultaten
F1	Monster 6	ResistancePlus MG	Positief	KANAAL A: 29,30 KANAAL C: 28,11	Monster 6 - Positief M. genitalium gedetecteerd, 23S rRNA-mutatie niet gedetecteerd

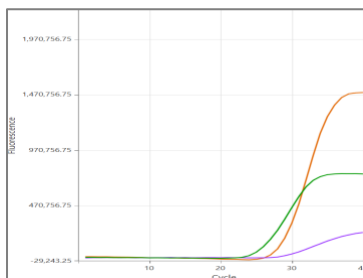
24.12.3 Voorbeeld 3. High copy *M. genitalium*, 23S rRNA-mutantmonster



KANAAL A KANAAL B KANAAL C

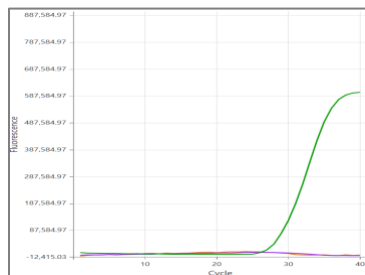
Well	Naam	Assay	Resultaat	Cq-waarden	Algehele resultaten
G3	Monster 9	ResistancePlus MG	Positief	KANAAL A: 18,08 KANAAL B: 22,31 KANAAL C: 28,03	Monster 9 - Positief M. genitalium, 23S rRNA-mutatie gedetecteerd

24.12.4 Voorbeeld 4. Low copy *M. genitalium*, 23S rRNA-mutantmonster



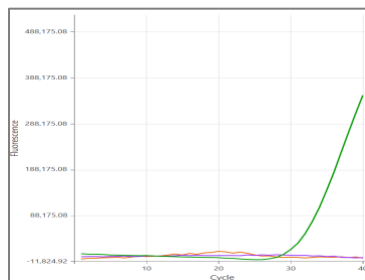
KANAAL A KANAAL B KANAAL C

Well	Naam	Assay	Resultaat	Cq-waarden	Algehele resultaten
E3	Monster 21	ResistancePlus MG	Positief	KANAAL A: 29,08 KANAAL B: 29,23 KANAAL C: 26,13	Monster 21 - Positief M. genitalium, 23S rRNA-mutatie gedetecteerd

24.12.5 Voorbeeld 5. Negatief monster

KANAAL A KANAAL B KANAAL C

Well	Naam	Assay	Resultaat	Cq-waarden	Algehele resultaten
E3	Monster 73	ResistancePlus MG	Negatief	KANAAL C: 29,03	Monster 73 - Negatief M. genitalium niet gedetecteerd, IC geldig

24.12.6 Voorbeeld 6. Ongeldig monster

KANAAL A KANAAL B KANAAL C






Well	Naam	Assay	Resultaat	Cq-waarden	Algehele resultaten
E3	Monster 35	ResistancePlus MG	Ongeldig	KANAAL C: 31,16	Monster 35 - Ongeldig IC ongeldig, herhaal test

In dit voorbeeld valt het IC-sigitaal buiten de grenswaarden van het kanaal. Voor monsters die ongeldig zijn voor IC moet het monster opnieuw worden geëxtraheerd en vervolgens de test worden herhaald.

24.12.7 Voorbeeld 7. Op te schonen monsters – Negatief signaal

In dit voorbeeld is KANAAL B (JOE) gemarkeerd voor opschonen, waarbij de software suggereert dat het monster negatief is (**Afbeelding 30**).

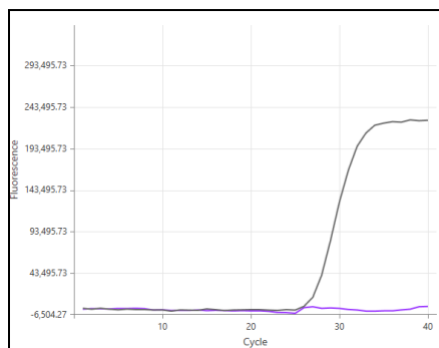
Afbeelding 30. Op te schonen monsters zoals te zien in het menu Resolve (opschonen) van de analysesoftware

Target	Channel	Cq	Curve result	Info	
MgPa	FAM	21.32	Positive 	M. genitalium detected	
 23S rRNA mutation	JOE	—	Negative  	Mutant not detected	
IC	TAMRA	27.31	Positive 		

Om te bepalen wat de juiste opschoonactie is, kunt u nog een monster of controle uitzetten ter vergelijking van het signaal

- Selecteer voor het uitzetten van een positieve referentiecurve (eerder opgeslagen) voor KANAAL B (JOE)
- Selecteer om een positieve controle uit de run uit te zetten
- Selecteer om een negatieve controle uit de run uit te zetten



KANAAL B



Na inspectie van de amplificatiecurven (hierboven) is te zien dat er geen sprake is van amplificatie in het kanaal.

Het resultaat wordt opgeschoond door selectie van het pictogram , ter bevestiging van het door de software voorgestelde negatieve resultaat. Het opgeschoonde resultaat wordt in **Afbeelding 31** hieronder weergegeven.






Afbeelding 31. Opgeschoond resultaat zoals te zien in het menu Resolve (opschonen) van de analysesoftware

Target	Channel	Cq	Result	Info	
MgPa	FAM	21.32	Positive	M. genitalium detected	
23S rRNA mutation	JOE	—	Negative	Mutant not detected	
IC	TAMRA	27.31	Positive		

24.12.8 Voorbeeld 8. Op te schonen monsters – Onzeker signaal

In dit voorbeeld is KANAAL B (JOE) gemarkeerd voor opschonen, waarbij de software suggereert dat het monster positief is (**Afbeelding 32**).

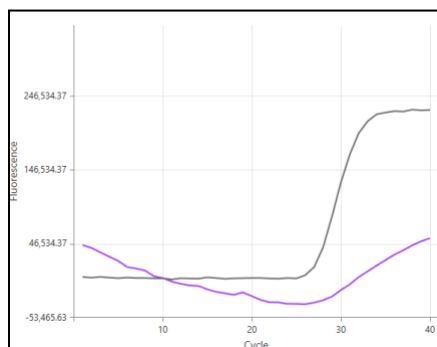
Afbeelding 32. Op te schonen monsters zoals te zien in het menu Resolve (opschonen) van de analysesoftware

Target	Channel	Cq	Curve result	Info	
MgPa	FAM	26.27	Positive 	M. genitalium detected	
 23S rRNA mutation	JOE	28.11	Positive  	Mutant detected	
IC	TAMRA	28.92	Positive 		


Om te bepalen wat de juiste opschoonactie is, zet u nog een monster of controle uit ter vergelijking van het signaal

- Selecteer voor het uitzetten van een positieve referentiecurve (eerder opgeslagen) voor KANAAL B (JOE)
- Selecteer om een positieve controle uit de run uit te zetten
- Selecteer om een negatieve controle uit de run uit te zetten

KANAAL B




Na inspectie van de amplificatiecurven (hierboven) is te zien dat er sprake is van potentiële amplificatie in het kanaal.

Het wordt aanbevolen om het resultaat op te schonen en aan te merken als onzeker, door het pictogram  te selecteren en vervolgens de optie Inconclusive (Onzeker) te selecteren in het vervolgkeuzemenu. Er kunnen opmerkingen aan de audit-trail van het monster worden toegevoegd. Het monster moet opnieuw worden geëxtraheerd en opnieuw getest. Het opgeschoonde resultaat wordt in **Afbeelding 33** hieronder weergegeven.

Raadpleeg **Tabel 63**, Monster 7 om te zien hoe de resultaten voor en na opschoning op het tabblad **Results Overview** (Overzicht resultaten) worden weergegeven.

Afbeelding 33. Opgeschoond resultaat zoals te zien in het menu Resolve (opschonen) van de analysesoftware

Target	Channel	Cq	Result	Info	
MgPa	FAM	26.27	Positive	M. genitalium detected	
23S rRNA mutation	JOE	28.11	Inconclusive	Mutant detected	
IC	TAMRA	28.92	Positive		

25 Woordenlijst



Europese conformiteit
Voor *in-vitro*diagnostiek



Catalogusnummer



Batchcode



Geautoriseerde vertegenwoordiger
In de Europese Gemeenschap



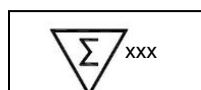
Fabrikant



Aanmaakdatum



Temperatuurbepering



Bevat voldoende voor
xxx bepalingen



Uiterste gebruiksdatum



Europese importeur



Verenigd Koninkrijk Markering
voor conformiteitsbepaling

SpeedX-producten worden mogelijk door één of meer plaatselijke of buitenlandse octrooien beschermd. Zie www.plexpcr.com/patents voor gedetailleerde informatie over het octrooi.

PlexPCR[®], **ResistancePlus**[®], **PlexPrime**[®] en **PlexZyme**[®] zijn handelsmerken van SpeedX. Overige auteursrechten en handelsmerken zijn eigendom van de desbetreffende rechthebbende.

© Copyright 2022 SpeedX Pty. Ltd.