



ResistancePlus[®] MG

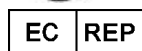
Realtime multiplex-PCR-assay voor de identificatie van *Mycoplasma genitalium* en de detectie van mutaties die met resistentie tegen azitromycine worden geassocieerd



Product	Platform	Aantal (reacties)	Catalogusnr.
ResistancePlus [®] MG	LC480 II	100	REF 20001L-01
ResistancePlus [®] MG	LC480 II	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 (7500)	REF 99002
ResistancePlus [®] MG (CFX)	REF 99008



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	Verzending en opslag	7
6	Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen.....	8
6.1	Algemeen.....	8
6.2	Laboratorium	8
6.3	Monsterverwerking.....	8
6.4	Test.....	8
6.5	Veiligheidsmaatregelen	8
6.6	Test-plugin-ins: Waarschuwingen/voorzorgsmaatregelen/beperkingen	8
7	Geassocieerde producten en verbruiksartikelen.....	9
8	Principe van de technologie	11
9	Overzicht procedure.....	13
10	Gedetailleerde procedure.....	14
10.1	Afname, transport en opslag van monsters.....	14
10.1.1	Gevalideerde hulpmiddelen voor het afnemen van monsters.....	14
10.1.2	Correcte afname, transport en opslag van urine	14
10.1.3	Afname, transport en opslag van uitstrijkjes.....	14
10.1.4	Multi-Collect-monsterafnamekit (Abbott, cat. nr. 9K12-01) afname, transport en opslag	14
10.1.5	Aptima®-urineverzamelkit (Hologic, cat. nr. 301040) verzameling, transport en opslag	15
10.1.6	Aptima® Multitest-afnamekit voor uitstrijkjes (Hologic, cat. nr. PRD-03546) afname, transport en opslag	15
10.1.7	DeltaSwab ViCUM® 2 mL + standaard flocced wattenstaafje (Deltalab, cat. nr. 304278), afname, transport en opslag 15	
10.1.8	Vacumed®-urineverzamelkit zonder conserveermiddel (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	16
10.1.11	Gevalideerde monsterextracten	16
10.2	Monsterverwerking	16
10.3	Interne Controle (IC).....	17
10.3.1	Interne controle op de MagNA Pure 96.....	17
10.3.2	Interne controle op de MICROLAB STARlet IVD.....	17
10.3.3	Interne controle op de QIA Symphony® SP	18
10.3.4	Interne controle op de easyMAG®	18
10.4	Voorbereiding van realtime PCR	19
10.4.1	Bereiding van mastermix	20
10.4.2	Stabiliteit van de mastermix.....	20
11	Programmering en analyse	20
12	Interpretatie van de resultaten.....	21
13	Beperkingen.....	22
14	Kwaliteitscontrole	22
15	Gebruikshandleiding ResistancePlus® MG Positive Control	23

15.1	Gebruikshandleiding.....	23
16	Prestatiekarakteristieken.....	24
16.1	Klinische prestaties	24
16.1.1	Klinisch onderzoek 1	24
16.1.2	Klinisch onderzoek 2	26
16.1.3	Klinisch onderzoek 3	26
16.1.4	Klinisch onderzoek 4	28
16.1.5	Klinisch onderzoek 5	29
16.1.6	Klinisch onderzoek 6	30
16.1.7	Klinisch onderzoek 7	31
16.2	Klinische prestaties	32
16.2.1	Reproduceerbaarheid en herhaalbaarheid.....	32
16.2.2	Analytische gevoeligheid	35
16.2.3	Analytische specificiteit.....	35
16.2.4	Mogelijk storende substanties.....	36
16.2.5	Kruisreactiviteit met andere 23S-rRNA-mutaties.....	38
17	Klantondersteuning en technische ondersteuning	38
18	Referenties	39
19	Bijlage 1: LightCycler® 480 instrument II.....	40
19.1	Het programmeren van LightCycler® 480 Instrument II (LC480 II).....	40
19.2	Kleurcompensatie voor de LightCycler® 480 Instrument II	45
19.3	Interpretatie van de resultaten	47
20	Bijlage 2: Applied Biosystems® 7500 Fast	48
20.1	De Applied Biosystems® 7500 Fast programmeren	48
20.2	Interpretatie van de resultaten	51
21	Bijlage 3: Applied Biosystems 7500 Fast Dx	52
21.1	De Applied Biosystems® 7500 Fast Dx programmeren	52
21.2	Interpretatie van de resultaten	55
22	Bijlage 4: Bio-Rad CFX96™ Dx en CFX96 Touch™ Real-Time PCR System	56
22.1	De Bio-Rad CFX96™ Dx en CFX96 Touch™ Real-Time PCR System programmeren.....	56
22.2	Interpretatie van de resultaten	58
23	Bijlage A: Interpretatie van de resultaten.....	59
23.1	FastFinder-platform – Minimale IT-vereisten.....	59
23.2	Testplug-in (nieuwe gebruiker)	60
23.3	Benaming monsters	61
23.4	Analyse	61
23.5	Resultaten.....	63
23.5.1	Tabblad Samenvatting.....	63
23.5.2	Tabblad Details	65
23.6	Referentiecurve.....	66
23.7	Resultaten exporteren	66
23.8	Geautoriseerde analyses ophalen	66
23.9	Voorbeeldgrafieken controles	66

23.9.1	<i>M. genitalium</i> negatieve controle (Na) (negatief monster)	67
23.9.2	Controle zonder template (Nb).....	68
23.9.3	<i>M. genitalium</i> , 23S rRNA mutant controle (Pa)	68
23.9.4	<i>M. genitalium</i> , 23S rRNA wildtype controle (Pb)	69
23.10	Voorbeelden.....	70
23.10.1	Voorbeeld 1. High copy <i>M. genitalium</i> , 23S rRNA wildtype monster	70
23.10.2	Voorbeeld 2. Low copy <i>M. genitalium</i> , 23S rRNA wildtype monster	71
23.10.3	Voorbeeld 3. High copy <i>M. genitalium</i> , 23S rRNA mutant monster	72
23.10.4	Voorbeeld 4. Low copy <i>M. genitalium</i> , 23S rRNA mutant monster	73
23.10.5	Voorbeeld 5. Negatief monster	74
23.10.6	Voorbeeld 6. Ongeldig monster	74
24	Woordenlijst.....	76

1 Productbeschrijving

De **ResistancePlus**® MG-kit detecteert tegelijkertijd *M. genitalium* en 4 mutaties op posities 2058 en 2059 in het 23S-rRNA-gen (*E. coli*-nummering) die verband houden met resistentie tegen azitromycine (een macrolide antibioticum). De **ResistancePlus**® MG-kit is een 1-well realtime PCR multiplex bestaande uit 3 uitlezingen. Uitlezing 1 geeft de aan- of afwezigheid aan van *M. genitalium* door detectie van het MgPa-gen; uitlezing 2 geeft de aanwezigheid aan van een A2058G-, A2059G-, A2058T- of A2058C-mutatie in het 23S-rRNA-gen; en uitlezing 3 is een interne controle om de extractie-efficiëntie en qPCR-remming te monitoren. De **ResistancePlus**® MG-kit gebruikt **PlexZyme**® en **PlexPrime**® voor specificiteit en superieure multiplexingcapaciteit. De test is gevalideerd op monsters die zijn geëxtraheerd met behulp van het MagNA Pure 96 System (Roche), MICROLAB STARlet IVD (Hamilton), QIAAsymphony® SP (QIAGEN), NUCLISENS® easyMAG® (Biomérieux) en realtime detectie op de volgende apparaten: het Roche LightCycler® 480 Instrument II (LC480 II), de Applied Biosystems® 7500 Fast (7500 Fast), de Applied Biosystems® 7500 Fast Dx (7500 Fast Dx), de Bio-Rad CFX96™ Dx (CFX96 Dx) en de CFX96 Touch™ (CFX96 Touch) realtime PCR-detectiesystemen.

2 Beoogd gebruik

De **ResistancePlus**® MG-kit is een kwalitatieve, multiplexed, *in-vitro* diagnostische realtime PCR-test voor de identificatie van *M. genitalium* en detectie van 4 mutaties in het 23S-rRNA-gen (A2058G, A2059G, A2058T en A2058C, nummering *Escherichia coli*) die verband houden met resistentie tegen azitromycine (een macrolide antibioticum). Het is bedoeld als hulpmiddel bij de diagnose van *M. genitalium* en detecteert mutaties die verband houden met resistentie tegen azitromycine in *M. genitalium* en moet worden gebruikt in combinatie met klinische en andere laboratoriuminformatie.

De **ResistancePlus**® MG-kit kan worden gebruikt met de volgende typen monsters: urine van mannen en vrouwen en vaginale uitstrijkjes van symptomatische en asymptomatische patiënten.

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

De **ResistancePlus**® MG-kit is bedoeld voor gebruik in professionele omgevingen zoals ziekenhuizen of referentie- of staatslaboratoria. De kit is niet bedoeld voor zelftesten, thuisgebruik of gebruik op een zorglocatie.

3 Informatie over de pathogenen

M. genitalium is een kleine bacterie die voorkomt in de urinewegen van de mens. *M. genitalium* wordt in verband gebracht met een reeks seksueel overdraagbare aandoeningen (soa's). Bij mannen is het de op één na meest voorkomende oorzaak van niet-gonokokken-urethritis (NGU) en wordt het ook in verband gebracht met prostatitis, epididymitis en balanoposthitis, ontsteking van de eikel en voorhuid¹. Bij vrouwen is *M. genitalium* geassocieerd met cervicitis, inflammatoire aandoeningen van het bekken, inclusief endometritis (ontsteking van het baarmoederslijmvlies) en salpingitis (ontsteking van de eileiders)^{1,2,3}.

Azitromycine wordt vaak gebruikt voor de behandeling van *M. genitalium* en voor de syndroombehandeling van soa's zoals NGU en cervicitis. Azitromycine behoort tot de klasse van macrolide antibiotica en werkt door binding aan het 23S-rRNA om zo de eiwitsynthese te remmen. Puntmutaties in het 23S-rRNA-gen van *M. genitalium*, A2058G, A2059G, A2058T, A2058C en A2059C (*E. coli*-nummering) worden in verband gebracht met het falen van de behandeling en/of *in-vitro* resistentie tegen azitromycine^{4,5}. De meest voorkomende mutaties zijn A2058G en A2059G, die in een recent onderzoek 89% van de macrolideresistentiemutaties uitmaakten⁶.

4 Inhoud van de kit

Tabel 1. Inhoud van ResistancePlus® MG-kits

Kleur van de dop	Inhoud	Omschrijving	Cat. nr. 20001L-01 (100 reacties)	Cat. nr. 2000125 (25 reacties)
Blauw	Plex Mastermix, 2x	Mastermix met componenten die nodig zijn voor qPCR, waaronder dNTP's, MgCl ₂ , DNA-polymerase en buffer	1 x 1 mL	1 x 250 µL
Bruin	MG+23S Mix, 20x	Mix met oligonucleotiden [^] voor amplificatie en detectie van <i>M. genitalium</i> en 23S-rRNA-mutaties	1 x 100 µL	1 x 25 µL
Wit	Controlemix 1, 20x	Mix met oligonucleotiden [^] voor amplificatie en detectie van de interne controletest voor LC480 II	1 x 100 µL	1 x 25 µL
Rood	Interne controlecellen [#]	Interne controlecellen met DNA-template voor interne controle om de extractie- en amplificatie-efficiëntie te monitoren	1 x 500 µL	1 x 100 µL
Neutraal	Nucleasevrij water	Water van PCR-kwaliteit	1 x 1 mL	1 x 1 mL

[#] Bewaar reageerbuizen voor de templates apart van oligomixen, d.w.z. in de verwerkingsruimte voor templates of nucleïne-zuren

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

Tabel 2. Inhoud van ResistancePlus® MG₍₅₅₀₎-kits

Kleur van de dop	Inhoud	Omschrijving	Cat. nr. 2000201 (100 reacties)	Cat. nr. 2000225 (25 reacties)
Blauw	Plex Mastermix, 2x	Mastermix met componenten die nodig zijn voor qPCR, waaronder dNTP's, MgCl ₂ , DNA-polymerase en buffer	1 x 1 mL	1 x 250 µL
Bruin	MG+23S Mix, 20x	Mix met oligonucleotiden [^] voor amplificatie en detectie van <i>M. genitalium</i> en 23S-rRNA-mutaties	1 x 100 µL	1 x 25 µL
Wit	Controlemix 2, 20x	Mix met oligonucleotiden [^] voor amplificatie en detectie van de interne controletest voor 7500 Fast en 7500 Fast Dx	1 x 100 µL	1 x 25 µL
Rood	Interne controlecellen [#]	Interne controlecellen met DNA-template voor interne controle om de extractie- en amplificatie-efficiëntie te monitoren	1 x 500 µL	1 x 100 µL
Neutraal	Nucleasevrij water	Water van PCR-kwaliteit	1 x 1 mL	1 x 1 mL

[#] Bewaar reageerbuizen voor de templates apart van oligomixen, d.w.z. in de verwerkingsruimte voor templates of nucleïne-zuren

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

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

Kleur van de dop	Inhoud	Omschrijving	Cat. nr. 2000301 (100 reacties)	Cat. nr. 2000325 (25 reacties)
Blauw	<i>Plex</i> Mastermix, 2x	Mastermix met componenten die nodig zijn voor qPCR, waaronder dNTP's, MgCl ₂ , DNA-polymerase en buffer	1 x 1 mL	1 x 250 µL
Bruin	MG+23S Mix, 20x	Mix met oligonucleotiden [^] voor amplificatie en detectie van <i>M. genitalium</i> en 23S-rRNA-mutaties	1 x 100 µL	1 x 25 µL
Wit	Controlemix 3, 20x	Mix met oligonucleotiden [^] voor amplificatie en detectie van de interne controletest voor CFX96 Dx en CFX96 Touch	1 x 100 µL	1 x 25 µL
Rood	Interne controlecellen [#]	Interne controlecellen met DNA-template voor interne controle om de extractie- en amplificatie-efficiëntie te monitoren	1 x 500 µL	1 x 100 µL
Neutraal	Nucleasevrij water	Water van PCR-kwaliteit	1 x 1 mL	1 x 1 mL

[#] Bewaar reageerbuizen voor de templates apart van oligomixen, d.w.z. in de verwerkingsruimte voor templates of nucleïneazuren

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

5 Verzending en opslag

- De onderdelen van de *ResistancePlus*[®] MG-kits worden op droogijs of ijsgelpakketten verzonden. Alle onderdelen moeten bij ontvangst worden bewaard bij -25°C tot -15°C bij ontvangst. Geadviseerd wordt om het aantal vries- en ontdooicycli te beperken tot 15.
- Wanneer de kit onder de aanbevolen omstandigheden wordt bewaard en op de juiste wijze wordt behandeld, blijft deze werkzaam tot de op het etiket vermelde uiterste gebruiksdatum. Niet gebruiken na de uiterste gebruiksdatum.
- Elk ernstig incident moet worden gemeld bij SpeedX door contact op te nemen met tech@speedx.com.au

6 Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen

6.1 Algemeen

- Uitsluitend voor *in-vitro* diagnostisch gebruik.
- Lees voor gebruik deze gebruikshandleiding zorgvuldig door. Volg de beschreven procedures zorgvuldig om de betrouwbaarheid van de testresultaten te garanderen. Elke afwijking van deze procedures kan de testresultaten beïnvloeden.
- Gebruikers moeten goed opgeleid zijn in het gebruik van de **ResistancePlus**[®] MG-test.
- Elk ernstig incident moet worden gemeld bij de fabrikant en de bevoegde autoriteit van de lidstaat waarin de gebruiker en/of de patiënt is gevestigd.

6.2 Laboratorium

- Geadviseerd wordt om de voorbereiding/extractie van de monsters, de voorbereiding van de mastermix, het toevoegen van monsters en de thermocycling in ruimtelijk gescheiden ruimtes uit te voeren. Op z'n minst dient het PCR-apparaat zich bij voorkeur in een andere ruimte te bevinden dan de ruimtes waar de reacties worden voorbereid.
- Geadviseerd wordt om alle routinematige laboratoriumvoorzorgsmaatregelen toe te passen. Draag de juiste persoonlijke beschermingsmiddelen zoals handschoenen, oogbescherming en een laboratoriumjas bij het werken met reagentia.
- In medische monsters kunnen pathogene organismen aanwezig zijn. Behandel alle biologische monsters als mogelijk infectieus en pas de in uw instelling geldende veiligheidsprocedures voor het werken met chemicaliën en biologische monsters toe.
- Volg de in uw instelling geldende procedures voor het verwijderen van gevaarlijk afval voor de juiste verwijdering van monsters, reagentia en andere mogelijk besmette materialen.

6.3 Monsterverwerking

- Monsters moeten worden afgenomen, vervoerd en opgeslagen gebruikmakend van standaard laboratoriumtechnieken of volgens de instructies van de afnamekit.

6.4 Test

- Standaard voorzorgsmaatregelen om contaminatie van PCR-reacties te voorkomen omvatten het gebruik van steriele filterpipetpunten, het gebruik van een nieuwe pipetpunt voor elke pipetteerhandeling en het scheiden van de verschillende werkzaamheden.
- PCR-testen zijn gevoelig voor contaminatie door eerdere PCR-producten. Open nooit de reageerbuisjes nadat de PCR voltooid is.
- Testreagentia bevatten IDTE-buffer die ernstige oogirritatie kan veroorzaken. Geadviseerd wordt om de test in een goed geventileerde ruimte te gebruiken en de juiste persoonlijke beschermingsmiddelen te dragen, zoals handschoenen, oogbescherming en een laboratoriumjas bij het verwerken van reagentia.

6.5 Veiligheidsmaatregelen

- Safety data sheets (SDS) zijn beschikbaar op verzoek. Neem contact op met tech@speedx.com.au voor meer informatie.

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

- De software van SpeedX kan alleen de analyse van de door de testkit gegenereerde ruwe gegevens verwerken als deze wordt gebruikt met het bijbehorende PCR-apparaat. De software controleert niet de voorbereiding van de monsters, de reacties, de programmering van de apparatuur of het toedienen van behandelingen.
- Gebruikers moeten goed opgeleid zijn in het gebruik van de **ResistancePlus**[®] MG-analysesoftware en de toegang dient te worden beperkt tot elke toegewezen individuele gebruiker.
- Geadviseerd wordt om gebruikersauthenticatie en cyberbeveiligingscontroles zoals antivirussoftware of het gebruik van een firewall toe te passen voor het IT-systeem en de infrastructuur die gebruikmaakt van de software.
- Neem bij ontdekking van een cyberbeveiligingsincident, zoals onbevoegde toegang en ransomware-aanvallen, contact op met tech@speedx.com.au voor verdere ondersteuning.

7 Geassocieerde producten en verbruiksartikelen

Positief controlemateriaal

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

Algemene laboratoriumverbruiksartikelen

- Handschoenen en schone laboratoriumjassen
- Vortexmixer
- Tafelcentrifuge voor reageerbuisjes van 0,5 mL en 1,5 mL
- Micropipetapparaten
- Steriele aerosolbestendige pipetpunten
- 0,5 mL-buisjes en 1,5 mL-buisjes (PCR-kwaliteit)
- 2,0 mL-buisjes (voor voorverdunding van 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 1000 µL (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

- **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)

Apparatuur monsternamen

- Multi-Collect-monsterkit (Abbott, Cat. nr. 9K12-01)
- Aptima® urinemonsterkit (Hologic, Cat. nr. 301040)
- Aptima® Multitest-afnamekit voor uitstrijkjes (Hologic, Cat. nr. PRD-03546)
- 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)

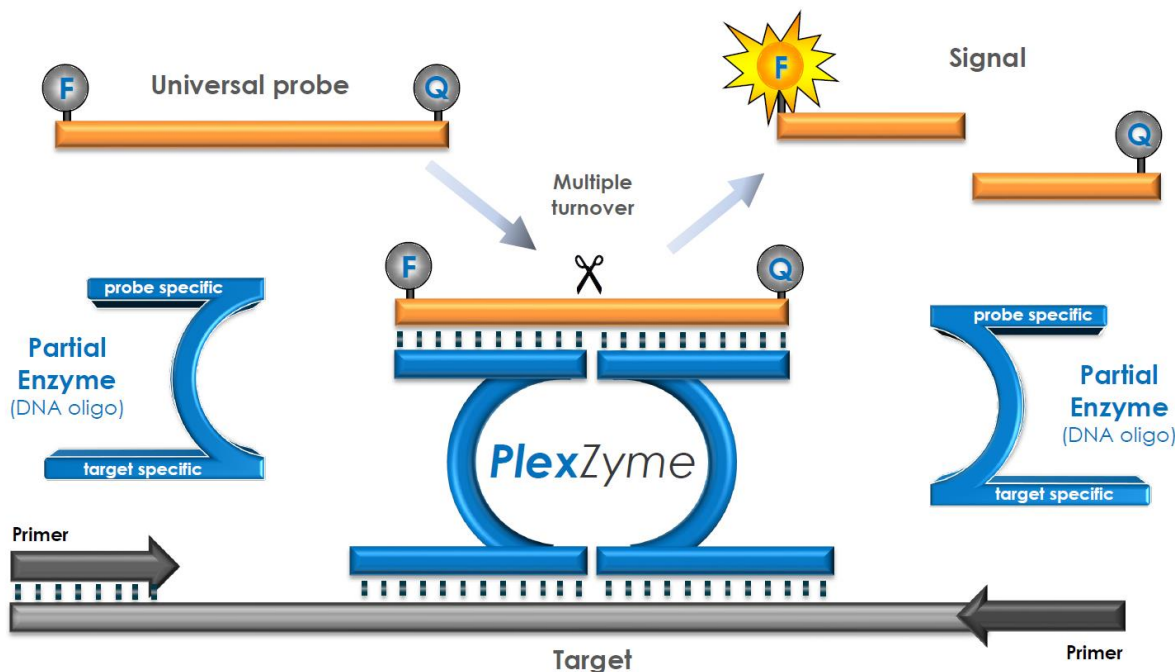
8 Principe van de technologie

Realtime PCR (qPCR) kan worden toegepast om specifieke nucleïnezuuren van pathogenen te amplificeren en te detecteren. **PlexPCR**[®] is een qPCR-technologie die gebruikmaakt van **PlexZyme**[®]-enzymen die het geamplificeerde product detecteren en weergeven door het genereren van een fluorescentiesignaal (**Afbeelding 1**). **PlexPrime**[®]-primers voor specifieke amplificatie van gemuteerde sequenties, die gekoppeld zijn aan mutantspecifieke **PlexZyme**[®]-detectie (**Afbeelding 2**).

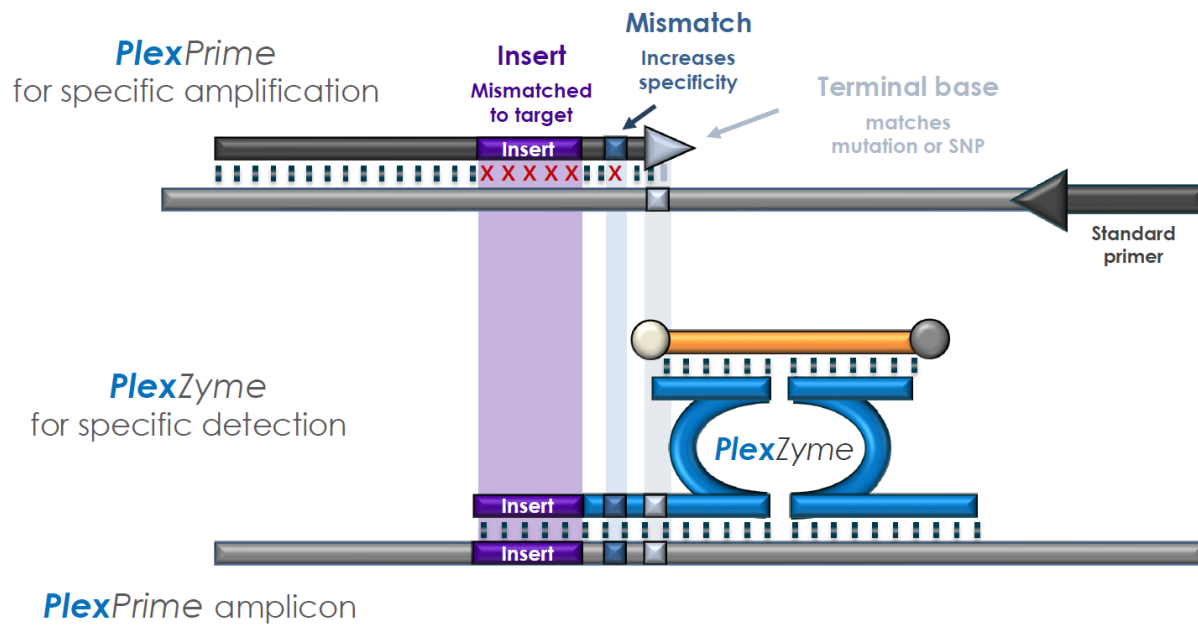
PlexZyme[®]-enzymen zijn katalytische DNA-complexen die bestaan uit twee DNA-oligo's die worden aangeduid als "Partial Enzymes". Elk Partial Enzyme heeft een doelspecifiek gebied, een katalytische kern en een universeel probebindend gebied. Als het doelproduct aanwezig is, vormen de twee Partial Enzymes een verbinding om zo het actieve **PlexZyme**[®] te vormen dat de katalytische activiteit heeft om een gelabelde probe te splitsen. Door de splitsing worden de fluorofore en de quencherkleurstoffen van elkaar gescheiden, waardoor een fluorescentiesignaal wordt geproduceerd dat in realtime kan worden gemeten. **PlexZyme**[®]-enzymen hebben een extra specificiteit in vergelijking met alternatieve detectietechnieken, omdat er twee Partial Enzymes nodig zijn om een verbinding te maken voor de detectie. **PlexZyme**[®]-enzymen zijn ook enzymen met een meervoudige turnover, en tijdens elke PCR-cyclus kunnen meerdere probes worden gesplitst, waardoor een sterk en gevoelig signaal wordt verkregen. **PlexZyme**[®]-testen zijn zeer gevoelig en specifiek en zijn bij voorkeur geschikt voor de multiplexe detectie van pathogenen.

PlexPrime[®]-primers hebben drie functionele gebieden. Het lange 5'-gebied verankert de primer op een bepaalde locatie en het korte 3'-gebied richt zich selectief op een extensie van de gemuteerde base. Een insertsequentie tussen de 5'- en 3'-gebieden fungeert als een brugstructuur die een doelonafhankelijke sequentie in het resulterende amplicon invoegt en de selectieve druk van het 3'-gebied verhoogt. In multiplex is elke **PlexPrime**[®]-primer ontworpen om zich op een specifieke gemuteerde base te richten en zal een unieke insertsequentie invoegen, om zo verschillende gemuteerde ampliconsequenties te produceren. In tegenstelling tot andere op probes gebaseerde detectietechnieken, kan het **PlexZyme**[®]-enzym de **PlexPrime**[®]-primer overlappen om zich te richten op het specifieke amplicon van de mutant dat de gemuteerde basis en de opgenomen insertsequentie bevat. De unieke combinatie van **PlexPrime**[®]-primers gekoppeld aan **PlexZyme**[®]-enzymen maakt de specifieke amplificatie van gemuteerde sequenties en de gevoelige en specifieke detectie in multiplex mogelijk.

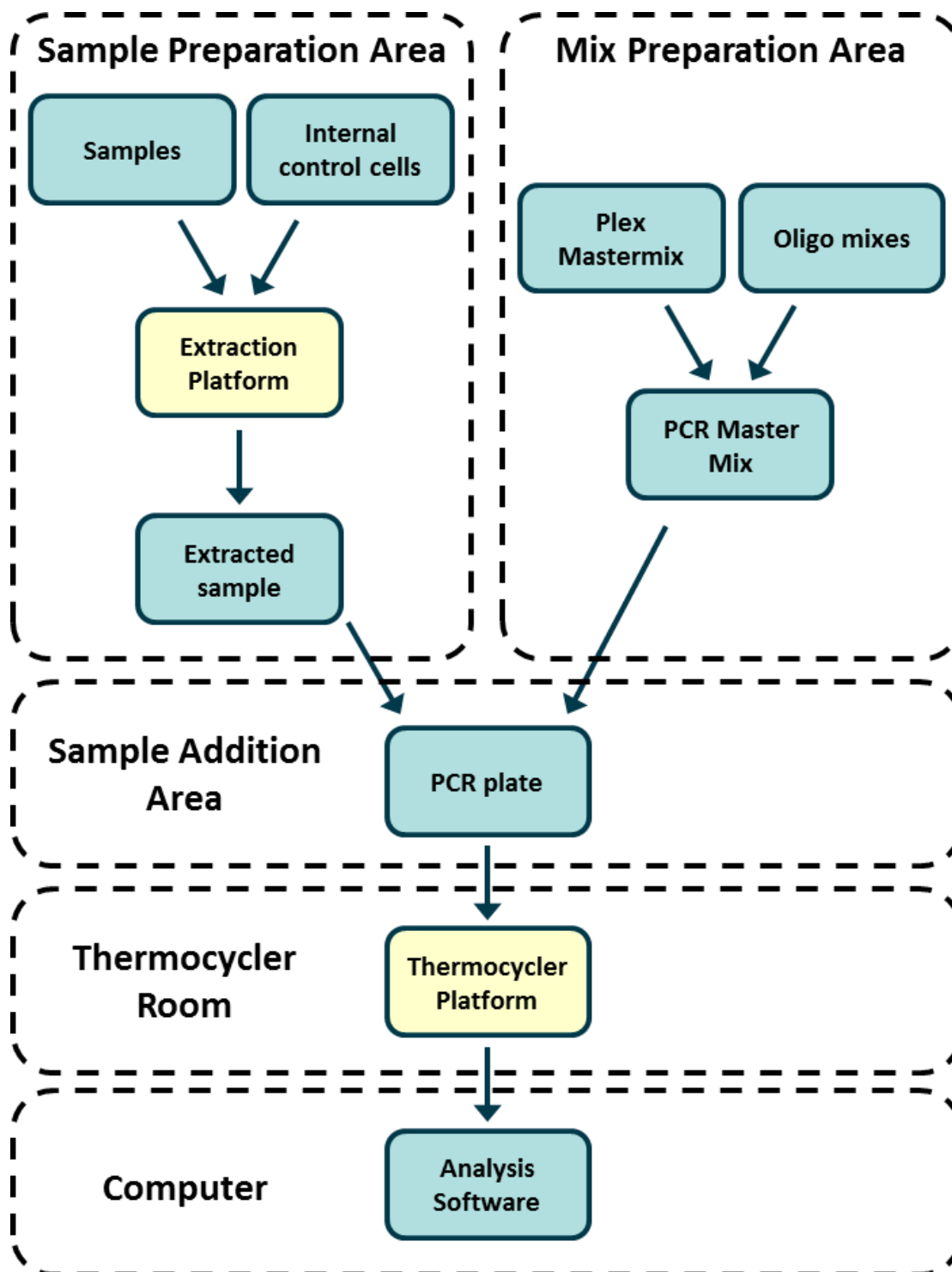
Afbeelding 1. Schematische voorstelling van **PlexZyme**[®]-detectie en universele signalering



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



9 Overzicht procedure



10 Gedetailleerde procedure

Opmerking: De bijgeleverde reagentia worden cursief benoemd met de kleur van de buisdop tussen haakjes.

10.1 Afname, transport en opslag van monsters

Mannelijke urine, vrouwelijke urine en vaginale uitstrijkjes van symptomatische of asymptomatische patiënten dienen volgens de standaard laboratoriumtechnieken of volgens de gebruikshandleiding van de afnamekit worden afgenomen, vervoerd en opgeslagen.

10.1.1 Gevalideerde hulpmiddelen voor het afnemen van monsters

Onjuiste of slechte afname, opslag en transport van monsters geven waarschijnlijk foutieve testresultaten. Een goede training in het afnemen van monsters wordt sterk geadviseerd om de kwaliteit en stabiliteit van de monsters te garanderen.

Hulpmiddelen voor monsterafname die zijn gevalideerd met de **ResistancePlus**® MG-kit zijn hieronder opgenomen met beknopte richtlijnen op basis van de handleiding van de fabrikant van het hulpmiddel voor afname, verwerking en transport. Deze instructies zijn niet bedoeld om instructies van de fabrikant te vervangen. Raadpleeg altijd de handleiding van de fabrikant van het hulpmiddel voor monsterafname voor de juiste afnamemethoden.

Voorafgaand aan elke afnamemethode moet getraind personeel ervoor zorgen dat het hulpmiddel en de methodologie goed worden begrepen. Op z'n minst moet de beschrijving van de test op het volgende worden nagelezen: indicatie van het type monster, voldoende volume, procedure(s), benodigde afnamematerialen, voorbereiding van de patiënt en juiste verwerkings- en opslaginstructies.

10.1.2 Correcte afname, transport en opslag van urine

1. Het gebruik van een heldere steriele urine-opvangbeker, vrij van conserveringsmiddel of transportmedium, wordt geadviseerd voor het zelf verzamelen van urine door de patiënt.
2. De patiënt dient 20-50 ml urine op te vangen van de eerste urinelozing en het deksel goed af te sluiten.
3. Geadviseerd wordt om urinemonsters in dubbele zakken met absorberend materiaal te vervoeren. De opslagtemperatuur van urinemonsters is afhankelijk van de beoogde verwerkingstijd.

10.1.3 Afname, transport en opslag van uitstrijkjes

Droge wattenstaafjes kunnen worden gebruikt door artsen en patiënten om vaginale uitstrijkjes af te nemen. Raadpleeg, vanwege de verschillende mogelijkheden, de bijsluiters van de fabrikant voor de juiste afnamemethoden.

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

Hieronder wordt een korte beschrijving gegeven van de gebruiksaanwijzing voor het afnemen en vervoeren van urine- en vaginale uitstrijkjes met behulp van de multi-Collect-monsterafnamekit (Abbott, cat. nr. 9K12-01).

10.1.4.1 Correcte verzameling, transport en opslag van urine

1. De patiënt mag ten minste één uur voor het verzamelen van de monsters niet hebben geplast.
2. Gooi het wattenstaafje weg; het is niet vereist voor het verzamelen van urinemonsters.
3. Met behulp van een urineopvangbeker dient de patiënt de eerste 20 tot 30 mL urine op te vangen (het eerste deel van de stroom).
4. Schroef de dop van de transportbuis los en zorg ervoor dat u de transportbuffer niet morst.
5. Hanteer de dop en de buis voorzichtig om besmetting te voorkomen.
6. Gebruik de plastic transferpipet om urine uit de opvangbeker in de transportbuis over te brengen totdat het vloeistofniveau in de buis binnen het doorzichtige vulvenster van het etiket van de transportbuis valt, anders moet er een nieuw monster worden verkregen. Niet te veel vullen. Er kan iets meer dan één volledige knijpbeweging van de pipet vereist zijn om het benodigde volume urinemonster over te brengen.
7. Hersluit de transportbuis zorgvuldig. Zorg ervoor dat de dop goed afsluit.
8. Voorzie de transportbuis van een zelfklevend etiket met informatie over het monster, inclusief de afnamedatum. Zorg ervoor dat u met het etiket het vulvenster op de transportbuis niet afdekt.
9. Vervoer en bewaar de transportbuis na afname bij 2°C tot 30°C gedurende maximaal 14 dagen. Als langer bewaren nodig is, bewaar het monster dan bij -10°C of kouder gedurende maximaal 90 dagen.

10.1.4.2 Correcte afname, transport en opslag van vaginale uitstrijkjes

1. Gooi de wegwerppipet weg; deze is voor het afnemen van vaginale uitstrijkjes niet nodig.
2. Haal het steriele wattenstaafje uit de verpakking. Let er daarbij op dat u de punt van het wattenstaafje niet aanraakt en het wattenstaafje niet op een oppervlak legt.

3. Steek de witte punt van het wattenstaafje ongeveer 5 cm in de opening van de vagina.
4. Draai het wattenstaafje zachtjes 15 tot 30 seconden tegen de wanden van de vagina.
5. Trek het wattenstaafje voorzichtig terug.
6. Hanteer de dop en de buis voorzichtig om besmetting te voorkomen.
7. Schroef de dop van de transportbuis los en plaats het wattenstaafje onmiddellijk in de transportbuis met de witte punt naar beneden.
8. Breek het wattenstaafje voorzichtig af bij de ingekerfde lijn op de schacht. Doe dit voorzichtig om spatten van de inhoud te voorkomen.
9. Hersluit de transportbuis. Zorg ervoor dat de dop goed afsluit.
10. Voorzie de transportbuis van een zelfklevend etiket met informatie over het monster, inclusief de afnamedatum.
11. Vervoer en bewaar de transportbuis na afname bij 2°C tot 30°C gedurende maximaal 14 dagen. Als langer bewaren nodig is, bewaar het monster dan bij -10°C of kouder gedurende maximaal 90 dagen.

10.1.5 Aptima®-urineverzamelkit (Hologic, cat. nr. 301040) verzameling, transport en opslag

Hieronder wordt een korte beschrijving gegeven van de gebruiksaanwijzing voor het afnemen en vervoeren van mannelijke en vrouwelijke urinemonsters met behulp van de Aptima®-urineverzamelkit (Hologic, cat. nr. 301040). Let op: de klinische prestaties van dit afnamehulpmiddel zijn alleen aangetoond met monsters die geëxtraheerd zijn met het MagNA Pure 96-apparaat en de MagNA Pure 96 DNA-kit en de Viral NA Large Volume Kit. Zie paragraaf 10.2 en paragraaf 16.1.5 voor meer informatie.

1. Het gebruik van een heldere steriele urine-opvangbeker, vrij van conserveringsmiddel of transportmedium, wordt geadviseerd voor het zelf verzamelen van urine door de patiënt.
2. De patiënt wordt gevraagd om 20-30 ml urine van de eerste urinelozing op te vangen in de bijgeleverde urine-opvangbeker. Vrouwelijke patiënten mogen de vagina niet reinigen voorafgaand aan het opvangen van het monster.
3. Breng met behulp van de bijgeleverde pipet 2 ml urine over in de transportbuis (zonder dop) uit de Aptima®-urineverzamelkit. Het volume van de urine moet binnen de zwarte vullijnen op de urinetransportbuis vallen. Urine moet binnen 24 uur na afname uit de heldere steriele urinebeker in de Aptima-urinetransportbuis worden overgebracht.
4. Sluit de urinetransportbuis goed af.
5. Na afname moeten de verwerkte urinemonsters in de Aptima-urinemonstertransportbuis vervoerd en opgeslagen worden bij 2°C tot 30°C totdat ze getest worden. Raadpleeg de handleiding van de fabrikant voor de optimale opslagcondities.

10.1.6 Aptima® Multitest-afnamekit voor uitstrijkjes (Hologic, cat. nr. PRD-03546) afname, transport en opslag

Hieronder wordt een korte beschrijving gegeven van de gebruiksaanwijzing voor het afnemen en vervoeren van vaginale uitstrijkjes met behulp van de Aptima® Multitest-afnamekit voor uitstrijkjes (Hologic, cat. nr. PRD-03546). Let op: de klinische prestaties van dit afnamehulpmiddel zijn alleen aangetoond met monsters die geëxtraheerd zijn met het MagNA Pure 96-apparaat en de MagNA Pure 96 DNA-kit en de Viral NA Large Volume Kit. Zie paragraaf 10.2 en paragraaf 16.1.5 voor meer informatie.

10.1.6.1 Correcte afname, transport en opslag van vaginale uitstrijkjes

1. Trek de verpakking van het wattenstaafje gedeeltelijk open. Verwijder het wattenstaafje. Raak daarbij de zachte punt niet aan en leg het wattenstaafje niet ergens neer. Als de zachte punt wordt aangeraakt, het wattenstaafje wordt neergelegd of het wattenstaafje valt, gebruik dan een nieuwe Aptima® Multitest-afnamekit voor uitstrijkjes.
2. Houd het wattenstaafje vast door uw duim en wijsvinger in het midden van de schacht van het wattenstaafje over de markeringslijn te plaatsen. Houd het wattenstaafje niet vast onder de markeringslijn.
3. Breng het wattenstaafje voorzichtig tot ongeveer 5 cm voorbij de ingang in de vagina en draai het wattenstaafje voorzichtig 10 tot 30 seconden met de klok mee. Zorg ervoor dat het wattenstaafje de wanden van de vagina raakt zodat het vocht door het wattenstaafje wordt opgenomen en trek daarna het wattenstaafje terug zonder de huid buiten de vagina aan te raken.
4. Schroef de dop van het buisje terwijl u het wattenstaafje nog steeds in dezelfde hand houdt. Mors de inhoud van het buisje niet. Als de inhoud van het buisje wordt gemorst, gebruik dan een nieuwe Aptima® Multitest-afnamekit voor uitstrijkjes.
5. Plaats het wattenstaafje onmiddellijk in het transportbuisje zodat de markeringslijn zich aan de bovenzijde van het buisje bevindt.
6. Breek de schacht van het wattenstaafje voorzichtig af bij de markeringslijn tegen de zijkant van het buisje.
7. Gooi het bovenste deel van de schacht van het wattenstaafje onmiddellijk weg.
8. Draai de dop stevig op het buisje. Vervoer en bewaar het wattenstaafje in het transportbuisje bij 2°C tot 30°C tot het moment van testen.

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

Hieronder wordt een korte beschrijving gegeven van de gebruiksaanwijzing voor het afnemen en vervoeren van vaginale uitstrijkjes met behulp van de DeltaSwab ViCUM® 2 mL + standaard flocked wattenstaafje (Deltalab, cat. nr. 304278).

1. Open de peel-pack door met beide handen aan de tegenoverliggende zijden te trekken.
2. Meng de inhoud van het buisje voorzichtig.
3. Open de flow-pack en neem een monster af met behulp van het wattenstaafje.
4. Open het buisje met de andere hand en plaats het wattenstaafje in het buisje met de punt in het medium.

5. Breng het breekpunt van het wattenstaafje op één lijn met de bovenzijde van het buisje en druk het wattenstaafje daarbij lichtjes naar beneden. Breek het wattenstaafje bij het breekpunt door het tegen de binnenzijde van het buisje te drukken.
6. Gooi het overgebleven deel van het wattenstaafje weg, schroef de dop goed vast en schud om het monster met het medium te mengen.
7. Vervoer en bewaar het wattenstaafje in het transportbuisje bij 4°C tot 25°C tot het moment van testen.

10.1.8 Vacumed®-urineverzamelkit zonder conserveermiddel (FL medical, cat. nr. 44950), afname, transport en opslag

Hieronder wordt een korte beschrijving gegeven van de gebruiksaanwijzing voor het afnemen en vervoeren van mannelijke en vrouwelijke urinemonsters met behulp van de Vacumed®-urineverzamelkit zonder conserveermiddel (FL medical, cat. nr. 44950).

1. Draai de dop van de urine-opvangbeker en leg deze ondersteboven op een schoon oppervlak.
2. Raak de interne oppervlakken van de opvangbeker en de dop niet aan.
3. Verzamel het urinemonster. Vul de opvangbeker tot ¾.
4. Plaats de dop terug op de opvangbeker en draai deze stevig met de klok mee vast.
5. Meng het urinemonster voorzichtig.
6. Til het beschermetiket van de beker gedeeltelijk op zonder dit helemaal te verwijderen.
7. Duw het vacuumbuisje in de opening en oefen lichte druk uit. Wacht tot het buisje vol is (einde flow).
8. Verwijder het monsterbuisje en plak het beschermetiket weer volledig vast.
9. Bewaar het monsterbuisje bij 4°C tot 25°C tot het moment van testen.

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

Hieronder wordt een korte beschrijving gegeven van de gebruiksaanwijzing voor het afnemen en vervoeren 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 de reageerbuis met medium en het zakje met het steriele wattenstaafje.
2. Neem het steriele wattenstaafje uit het zakje en neem het klinische monster af. Om het risico op besmetting te voorkomen, zorg ervoor dat de punt van het wattenstaafje alleen in contact komt met de monsterafnameplaats.
3. Nadat het monster is afgenomen, schroef de dop van de reageerbuis en verwijder deze. Let er daarbij op dat er geen medium wordt gemorst.
4. Breng het wattenstaafje in de reageerbuis zodat het breekpunt gelijk ligt met de bovenzijde van de reageerbuis.
5. Houd de reageerbuis van uw gezicht af en buig en breek het wattenstaafje op het breekpunt. Gooi het afgebroken deel weg.
6. Schroef de dop weer op de reageerbuis en sluit deze goed af.
7. Verwerk het monster in het UTM-medium binnen 48 uur na afname en bewaar de reageerbuis bij 2-25°C.
8. Voorafgaand aan het verwerken, vortex 20 seconden om ervoor te zorgen dat het monster uit het wattenstaafje homogeen wordt gemengd met het medium.

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

Hieronder wordt een korte beschrijving gegeven van de gebruiksaanwijzing voor het afnemen en vervoeren van mannelijke en vrouwelijke urinemonsters met behulp van Cobas® PCR-medium (Roche, cat. nr. 06466281190).

1. Meng de urine en breng deze over in de Cobas® PCR-mediumbuis met behulp van een pipet voor eenmalig gebruik (niet meegeleverd). Opmerking: het urinemonster kan maximaal 24 uur worden bewaard bij 2°C tot 30°C voordat het wordt overgebracht in de Cobas® PCR-mediumbuis.
2. Vul de buis met urine tot het vloeistofniveau zich tussen de twee zwarte lijnen op het etiket bevindt.
3. Sluit de Cobas® PCR-mediumbuis goed af met de dop.
4. Meng de buis door deze 5 keer te kantelen. Het monster is nu klaar voor vervoer en testen.
5. Vervoer en bewaar de Cobas® PCR-mediumbuis met het gestabiliseerde urinemonster bij 2°C tot 30°C.

10.1.11 Gevalideerde monsterextracten

Voor gebruik gevalideerde monsterextracten zijn:

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

Zie **paragraaf 10.5** voor instructies voor het voorbereiden van PCR met geëxtraheerde nucleïnezuuren (reflex workflow).

10.2 **Monsterverwerking**

De **ResistancePlus®** MG-kit is gevalideerd voor de volgende extractie-apparaten in **Tabel 4**.

Zie **paragraaf 10.3** voor instructies voor het gebruik van de interne controle.

Tabel 4. Gevalideerde extractieprotocollen				
Apparaat	Extractiekit	Monstervolume	Protocol	Elutievolume
MagNA Pure 96 ^a	MagNA Pure 96 DNA en 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 Universal Cartridge-kit (Seegene)	200 µL	10 µl verdunde interne controlecellen toegevoegd per monster Selecteer "Pause before PCR setup" om alleen de monsterextractie uit te voeren	100 µL
QIAasympy SP ^c	DSP Virus/Pathogen Mini Kit	200 µL	Complex200_V6_DSP	110 µL
NucliSENS [®] easyMAG ^{®d}	NucliSENS [®] easyMAG [®] -reagens	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 het gebruik van de interne controle met de MagNA Pure 96

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

^c Zie 10.3.3 voor het gebruik van de interne controle met de QIAasympy SP

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

[^] De klinische prestaties van monsters verzameld met Aptima[®]-verzamelkits zijn alleen aangetoond met dit extractieprotocol. Raadpleeg Paragraaf 16.1.5 voor meer informatie.

10.3 Interne Controle (IC)

De kit bevat een interne controle om de extractie-efficiëntie en de qPCR-remming te monitoren. De interne controletest wordt geleverd als een *controlemix (WIT)* en *interne controlecellen (ROOD)*. De *controlemix* is toegevoegd aan de PCR-mastermix (**Tabel 11**). De *interne controlecellen* bevatten het DNA- template voor interne controle. De *interne controlecellen* worden verdund en verwerkt zoals hieronder beschreven voor specifieke extractie-apparaten. De DNA-template voor interne controle wordt daarom samen met het monster geëxtraheerd en samen in de reactie geamplificeerd.

10.3.1 Interne controle op de MagNA Pure 96

Verdund de *interne controlecellen (ROOD)* 1 op 200 in 1x PBS (**Tabel 5**). Pas het volume naar behoefte aan met dezelfde verdunningsfactor (zie de handleiding van de extractiekit voor het minimumvolume voor het vereiste aantal monsters). De verdunde interne controlecellen worden in het interne controlebuisje op de MagNA Pure 96 gebracht:

- 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 Viral NA Large Volume Kit (Viral NA Universal LV 1000 3.1-protocol) wordt het volume van het monster verdeeld en verwerkt in twee afzonderlijke wells van de MagNA Pure 96 Processing Cartridge. Een totaal van 40 µl verdunde interne controlecellen wordt automatisch aan elk monster toegevoegd (20 µL per well van de Processing Cartridge).

Opmerking: Bewaar de verdunde interne controlecellen NIET.

Tabel 5. Verdunning van interne controlecellen voor de MagNA Pure 96 (verdunning 1 op 200)			
Interne controlecellen (ROOD) (µL)	1x PBS (µL)	Totaal volume (µL)	Volume toegevoegd aan het monster (µL)
18	3582	3600	20

10.3.2 Interne controle op de MICROLAB STARlet IVD

Verdund de *interne controlecellen (ROOD)* 1 op 20 in 1x PBS (**Tabel 6**). Pas het volume naar behoefte aan met dezelfde verdunningsfactor (zie de handleiding van de extractiekit voor het minimumvolume voor het vereiste aantal monsters). De verdunde cellen van de interne controle worden in een buis van 2 mL gebracht en op het steunrek voor reagentia geplaatst, waarbij automatisch 10 µL aan elk monster wordt toegevoegd.

Opmerking: Bewaar de verdunde interne controlecellen NIET.

Tabel 6. Verdunning van interne controlecellen voor de MICROLAB STARlet IVD (verdunning 1 op 20)			
Interne controlecellen (ROOD) (µL)	1x PBS (µL)	Totaal volume (µL)	Volume toegevoegd aan het monster (µL)
50	950	1000	10

10.3.3 Interne controle op de QIASymphony® SP

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

Opmerking: Bewaar de verdunde interne controlecellen NIET.

Tabel 7. Verdunning van interne controlecellen voor de QIASymphony® SP (verdunning 1 op 50)		
Interne controlecellen (ROOD) (µL)	1x PBS (µL)	Totaal volume (µL)
40	1950	2000

De verdunde *interne controlecellen* worden vervolgens gebruikt voor de bereiding van een Internal Control-carrier RNA-Buffer AV-mengsel, zoals weergegeven in Tabel 8. hieronder. Pas het volume naar behoefte aan met dezelfde verdunningsfactor voor het vereiste aantal monsters (zie de handleiding van de extractiekit voor het minimumvolume voor het vereiste aantal monsters). Het Internal Control-carrier RNA-Buffer AV-mengsel moet onmiddellijk voorafgaand aan de start van de run worden gemaakt.

Het Internal Control-carrier RNA-Buffer AV-mengsel wordt toegevoegd aan een buis, die in een buishouder wordt geplaatst en in slot A van de schuiflade voor monsters in de QIASymphony® SP wordt geplaatst. Aan elk monster wordt 120 µL (standaard) van het mengsel toegevoegd.

Tabel 8. Bereiding van het Internal Control-carrier RNA-Buffer AV-mengsel voor de QIASymphony SP					
Buistype	Aantal monsters	Volume van verdunde interne controlecellen (µL)	RNA-voorraadhouder (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

[^] de buis van 2 mL moet worden aangevuld met 3 extra monsters (360 µL) vanwege het lege volume.

[#] de buis van 14 mL moet worden aangevuld met 5 extra monsters (600 µL) vanwege het lege volume.

10.3.4 Interne controle op de easyMAG®

Verdun de *interne controlecellen* (ROOD) 1 op 200 in 1x PBS (Tabel 9). Pas het volume naar behoefte aan met dezelfde verdunningsfactor. Bereid een voormengsel van verdunde interne controlecellen en NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica voor het vereiste aantal monsters (Tabel 10). Per monster is 100 µL voormengsel silica vereist.

Opmerking: Bewaar de verdunde interne controlecellen NIET.

Tabel 9. Verdunning van interne controlecellen voor de NucliSENS® easyMAG® (verdunning 1 op 200)

<i>Interne controlecellen (ROOD) (µL)</i>	1x PBS (µL)	Totaal volume (µL)	Verdunningsfactor
10	1990	2000	200

Tabel 10. Voormengsel van NucliSENS® easyMAG® Magnetic Silica en verdunde interne controlecellen

Aantal monsters	Volume van verdunde interne controlecellen (µL)	Volume van Magnetic Silica (µL)	Volume toegevoegd aan het monster (µL)
1	50	50	100

"On-board" of "off-board" workflow wordt gebruikt afhankelijk van het type monster. De "off-board" workflow wordt gebruikt voor een optimale recovery van nucleïnezuuren uit urinemonsters. Raadpleeg de gebruiksaanwijzing van NucliSENS® easyMAG® voor meer informatie.

"On-board" workflow (wattenstaafjes)

Breng monsters over in het monstervat.

Laad de monstervaten op de easyMAG.

Programmeer de volgende extractieverzoeken:

Protocol: Generic 2.0.1 (voor softwareversie 2.0)

Matrix: Overige

Volume (ml): 0,200

Eluaat (µL): 100 µL

Type: Primair

Voeg na de on-board lysis 100 µL voorgemengde silica toe aan elk monster.

Ga door met het extractieproces

"Off-board" workflow (urine)

Centrifugeer de buis met NucliSENS Lysis Buffer kort 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 ze op de easyMAG.

Voeg aan elk monster 100 µL voorgemengde silica toe.

Programmeer de volgende extractieverzoeken:

Protocol: Generic 2.0.1 (voor softwareversie 2.0)

Matrix: Overige

Volume (mL): 1.000

Eluaat (µL): 100 µL

Type: Gelyseerd

Ga door met het extractieproces

10.4 Voorbereiding van realtime PCR

Opmerking: Voor gebruik van de reagentia volledig ontdooien en grondig mengen door kort te vortexen.

Zie **Tabel 1 – Tabel 3** voor een beschrijving van de inhoud van de kit.

10.4.1 Bereiding van mastermix

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

Voor een reactievolume van 20 µL zijn 15 µL mastermix en 5 µL monster vereist. Pipetteer de mastermix in de PCR-plaat en voeg vervolgens geëxtraheerde monsters aan de reactie toe.

Bij elke run moet een No Template Control (NTC) worden opgenomen. Voeg voor de NTC-reactie *nucleasevrij water* (**NEUTRAAL**) toe in plaats van een monster.

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

Tabel 11. Mastermix		
Reagens	Concentratie	Volume per 20 µL reactie (µL)
Nucleasevrij water (NEUTRAAL)	N.v.t.	3,0
Plex Mastermix (BLAUW)	2x	10,0
MG+23S Mix (BRUIN)	20x	1,0
Controlemix* (WIT)	20x	1,0
Totaal volume (µL)		15,0
Voeg 5 µL monsters toe voor een eindvolume van 20 µL.		

* De controlemix in elke kit is specifiek voor het gebruikte PCR-apparaat; raadpleeg **Tabel 1 - Tabel 3** voor de juiste controlemix die u moet gebruiken

10.4.2 Stabiliteit van de mastermix

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

11 Programmering en analyse

De details voor programmering en analyse worden beschreven in de **paragrafen 19 – paragrafen 22**.

De **ResistancePlus**® MG-kit heeft drie kanalen voor detectie van *M. genitalium*, 23S-rRNA-mutatie en interne controle (**Tabel 12**).

De **ResistancePlus**® MG-software is beperkt tot de analyse van resultaten in verband met nucleïnezuurextracten die zijn verkregen

Tabel 12. Kanalen voor ResistancePlus ® MG-doelen			
Apparaat	Kanaal A	Kanaal B	Kanaal C
	<i>M. genitalium</i> -detectie (MgPa)	23S-rRNA-mutatie	Interne Controle
LC480 II	465-510	533-580	533-640
7500 Fast en 7500 Fast Dx	FAM	JOE	TAMRA
CFX96 Dx en CFX Touch	FAM	HEX	Quasar 705

12 Interpretatie van de resultaten

Voor de interpretatie van de resultaten is de **ResistancePlus**® MG-analysesoftware vereist. Hoewel **PlexPrime**®-primers een grotere specificiteit bieden dan andere allelspecifieke primers, kan er enige niet-specifieke amplificatie van de 23S-rRNA-mutanttest worden waargenomen in monsters met hoge concentraties *M. genitalium* wildtype 23S-rRNA. De **ResistancePlus**® MG -analysesoftware automatiseert de interpretatie van amplificatieresultaten en stroomlijnt de workflow. De gebruikshandleiding van de analysesoftware wordt beschreven in **paragrafen 23**.

Zie **Tabel 13** voor de juiste analysesoftware voor elk realtime PCR-apparaat. De analysesoftware kan op verzoek geleverd worden. Neem contact op met tech@speedx.com.au voor meer informatie.

Tabel 13. ResistancePlus ® MG-analysesoftware		
Cat. nr.	Analysesoftware*	Realtime PCR-apparaat
99003	ResistancePlus ® MG (LC480)	LC480 II
99002	ResistancePlus ® MG (7500)	7500 Fast en 7500 Fast Dx
99008	ResistancePlus ® MG (CFX)	CFX96 Dx en CFX96 Touch

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

13 Beperkingen

- De **ResistancePlus**[®] MG-test is gericht op het *MgPa*-gen voor *M. genitalium* en mutaties op posities 2058 en 2059 in het 23S-rRNA-gen (A2058G, A2059G, A2058T en A2058C, *E. coli*-nummering) die verband houden met resistentie tegen azitromycine (een macrolide antibioticum).
- Van de **ResistancePlus**[®] MG-test is aangetoond dat deze kruisreageert met de 23S-rRNA-A2059C-mutantsequenties van *M. genitalium*.
- De klinische effectiviteitsonderzoeken van **ResistancePlus**[®] MG die in **paragraaf 16.1** worden beschreven, omvatten testen met mannelijke urine, vrouwelijke urine en vaginale uitstrijkjes. Daarnaast zijn ook andere types monsters getest, waaronder rectale, cervicale, endocervicale, urethrale, peniele, peniele meatale en faryngeale uitstrijkjes. Op dit moment zijn er echter beperkte gegevens die het gebruik van deze types monsters ondersteunen.
- De **ResistancePlus**[®] MG-test dient alleen te worden uitgevoerd door personeel dat is getraind in de procedure en dient te worden uitgevoerd in overeenstemming met deze gebruikshandleiding.
- De betrouwbaarheid van de resultaten is afhankelijk van het juiste transport, de juiste opslag en de juiste verwerking van de monsters. Als bij een van deze stappen niet de juiste procedures worden gevolgd, kan dit onjuiste resultaten tot gevolg hebben.
- De **ResistancePlus**[®] MG-test is een kwalitatieve test en geeft geen kwantitatieve waarden of informatie over de hoeveelheid micro-organismen.
- De resultaten van de test moeten worden gerelateerd aan de klinische voorgeschiedenis, epidemiologische gegevens, laboratoriumgegevens en alle andere gegevens waarover de arts beschikt.
- De prevalentie van *M. genitalium* en macrolideresistentie zullen de positieve en negatieve voorspellende waarden voor de test beïnvloeden.
- Detectie van antibioticaresistentiemarkers komt mogelijk niet overeen met fenotypische genexpressie.
- Op basis van de testresultaten kan het falen of slagen van de behandeling niet bepaald worden, omdat er persisterende nucleïnezuuren kunnen blijven bestaan na een geschikte antimicrobiële behandeling.
- Negatieve resultaten sluiten de mogelijkheid van een infectie niet uit als gevolg van onjuiste monsterafname, technische fouten, aanwezigheid van remmers, verwisseling van monsters of lage aantallen organismen in het klinische monster.
- Negatieve resultaten voor de resistentiemarkers duiden niet op een genetische gevoeligheid van de gedetecteerde micro-organismen, aangezien er resistentiemarkers aanwezig kunnen zijn die niet worden gemeten met de test, of andere potentiële mechanismen van antibioticaresistentie.
- Vals-positieve resultaten kunnen optreden door kruisbesmetting met doelorganismen, hun nucleïnezuuren of geamplificeerd product.

14 Kwaliteitscontrole

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

De **ResistancePlus**[®] MG Positive Control-kit (cat. nr. 95001) wordt geadviseerd als positief controlemateriaal voor nucleïnezuuramplificatie. Raadpleeg **paragrafen 15** voor de gebruikshandleiding van de **ResistancePlus**[®] MG Positive Controls. Geadviseerd wordt om een bekend negatief monster als negatieve controle te gebruiken.

15 Gebruikshandleiding *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 14**)

Tabel 14. Inhoud van de <i>ResistancePlus</i> ® MG Positive Control-kit (cat. nr. 95001)			
Kleur van de dop	Inhoud	Omschrijving	Hoeveelheid (10 reacties)
Neutraal	MG, 23S-rRNA wildtype	Positieve controletemplate voor de detectie van <i>M. genitalium</i> , 23S-rRNA wildtype	1 x 50 µL
Groen	MG, 23S-rRNA A2058G	Positieve controletemplate voor de detectie van <i>M. genitalium</i> , 23S-rRNA-A2058G-mutatie	1 x 50 µL
Rood	MG, 23S-rRNA A2059G	Positieve controletemplate voor de detectie van <i>M. genitalium</i> , 23S-rRNA-A2059G-mutatie	1 x 50 µL
Blauw	MG, 23S-rRNA A2058T	Positieve controletemplate voor de detectie van <i>M. genitalium</i> , 23S-rRNA-A2058T-mutatie	1 x 50 µL
Geel	MG, 23S-rRNA A2058C	Positieve controletemplate voor de detectie van <i>M. genitalium</i> , 23S-rRNA-A2058C-mutatie	1 x 50 µL

15.1 Gebruikshandleiding

Bereid qPCR-reacties voor zoals beschreven in **paragrafen 10.4** gebruikmakend van de positieve controle als monster.

Voor de gegevensinterpretatie is de *ResistancePlus*® MG-analysesoftware vereist. Zie **paragrafen 23.9** voor voorbeelden van resultaten.

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. Er werden van mei tot juni 2016 monsters afgenomen en op basis van de klinische laboratoriumresultaten werden 144 monsters geselecteerd voor opname in het onderzoek. De 144 monsters bestonden uit 84 mannelijke urinemonsters, 33 vrouwelijke urinemonsters, 14 vaginale uitstrijkjes en 13 hoge vaginale uitstrijkjes. Om de prestaties van de **ResistancePlus**® MG-kit te bepalen, werd de detectie van *M. genitalium* vergeleken met de klinische laboratoriumresultaten van een algemeen erkende 16S-rRNA-qPCR-test die wordt gebruikt voor routinediagnostiek bij RWH², en werd de 23S-rRNA-mutantdetectie vergeleken met Sanger-sequenzen⁹. De **ResistancePlus**® MG-kit werd uitgevoerd op de LC480 II, na monsterextractie op het MagNA Pure 96-apparaat met de MagNA Pure 96 DNA en Viral NA Small Volume Kit volgens het Universal Pathogen 200-protocol. Voor de detectie van *M. genitalium* werd een samengestelde referentie gebruikt voor monsters waarvan de uitslag niet overeenkwam, middels een derde qPCR-reactie gericht op het MgPa-gen⁹. Voor 23S-rRNA-mutantdetectie werd Sanger-sequencing als het juiste resultaat genomen. De verkregen resultaten en de gevoeligheid en specificiteit van de **ResistancePlus**® MG-kit voor *M. genitalium*-detectie en 23S-rRNA-mutantdetectie worden weergegeven in **Tabel 15**. Twee monsters werden uitgesloten omdat het resultaat van de interne controle ongeldig was (1 vrouwelijk urinemonster en 1 mannelijk urinemonster). De analyse van 23S-rRNA-mutantdetectie omvatte alleen monsters waarbij de mutantstatus kon worden vastgesteld. De analyse van de resultaten per type monster wordt weergegeven in **Tabel 16**. De analyse van de 23S-rRNA-mutatie wordt weergegeven in **Tabel 17**.

Tabel 15. Klinische evaluatie van de ResistancePlus® MG-kit (klinisch onderzoek 1)

		Detectie van <i>M. genitalium</i> 16S-rRNA-qPCR				23S-rRNA-mutantdetectie Sequencing	
		Positief	Negatief			Mutant	Wildtype
<i>ResistancePlus</i> ® MG	Positief	83	0		Mutant gedetecteerd	52	2
	Negatief	1	58^		Mutant niet gedetecteerd	2	21
Gevoeligheid		98,8% (95% BI 93,5-100,0%)			Gevoeligheid	96,3% (95% BI 87,3-99,6%)	
Specificiteit		100,0% (95% BI 93,8-100,0%)			Specificiteit	91,3% (95% BI 72,0-98,9%)	

95% BI - 95% betrouwbaarheidsinterval; Mutant - 23S-rRNA-mutatie in A2058G-, A2059G-, A2058T- en A2058C-posities (*E. coli*-nummering); Wildtype - het ontbreken van een mutatie in deze posities.

[^] Met de **ResistancePlus**® MG-kit werd 1 echte negatieve *M. genitalium* gedetecteerd met behulp van de samengestelde referentie. De tabel geeft de verkregen resultaten weer.

Tabel 16. De analyse van de resultaten per type monster [^] (klinisch onderzoek 1)

Monster	Verwacht <i>M. genitalium</i> negatief	Verwacht <i>M. genitalium</i> 23S-rRNA wildtype	Verwacht <i>M. genitalium</i> 23S-rRNA-mutant
Mannelijke urine	28/28	8/10 ¹	41/42 ¹
Vrouwelijke urine	12/13	11/11	4/6 ²
Vaginaal uitstrijkje	8/8	1/1	2/2 ³
Hoog vaginaal uitstrijkje	9/9	1/1	4/4 ⁴

Mutant - 23S-rRNA-mutatie in A2058G-, A2059G-, A2058T- en A2058C-posities (*E. coli*-nummering); Wildtype - het ontbreken van een mutatie in deze posities.

[^] 2 vrouwelijke urines, 3 mannelijke urines en 1 vaginaal uitstrijkje werden uitgesloten vanwege mislukte sequentie bepaling en omdat de mutantstatus niet kon worden vastgesteld.

¹ Mannelijke urine 2 *M. genitalium*-wildtype foutief gedetecteerd als *M. genitalium*-mutant, 18 A2058G, 20 A2059G, 3 A2058T juist gedetecteerd; 1 A2058G foutief gedetecteerd als *M. genitalium* niet gedetecteerd

² Vrouwelijke urine 1 A2058G, 3 A2059G juist gedetecteerd; 2 A2059G foutief gedetecteerd als *M. genitalium*-mutant niet gedetecteerd

³ Vaginaal uitstrijkje: 2 A2059G juist gedetecteerd

⁴ Hoog vaginaal uitstrijkje 3 A2058G, 1 A2059G juist gedetecteerd

Tabel 17. De analyse van de *M. genitalium* 23S-rRNA-mutatie (klinisch onderzoek 1)

Resultaat van de referentie [^]	Resultaat van <i>ResistancePlus</i> ® MG
Wildtype	21/33 ¹
A2058G	22/23 ²
A2059G	26/28 ³
A2058T	3/3

[^] Alleen voor monsters die positief zijn voor *M. genitalium*

¹ Wildtype 2 mannelijke urines foutief gedetecteerd als *M. genitalium*-mutant

² A2058G: 1 mannelijke urine foutief gedetecteerd als *M. genitalium* niet gedetecteerd

³ A2059G: 2 vrouwelijke urines foutief gedetecteerd als *M. genitalium*-mutant niet gedetecteerd

16.1.2 Klinisch onderzoek 2

Een subset van de geëxtraheerde monsters uit onderzoek 1 werd uitgevoerd op de ABI 7500 Fast. De resultaten werden vergeleken met het klinische resultaat van de 16S-rRNA-qPCR (Twin 2011) en Sanger-sequenzen (Twin 2012). Monsters waarvan de uitslag niet overeenkwam voor *M. genitalium*-detectie werden opnieuw getest met de 16S-rRNA-qPCR (Twin 2011) vanwege vermoedelijke degradatie van het monster. De verkregen resultaten en de gevoeligheid en specificiteit van de **ResistancePlus[®] MG₍₅₅₀₎**-kit voor *M. genitalium*-detectie en 23S-rRNA-mutantdetectie worden weergegeven in **Tabel 18**. De analyse van 23S-rRNA-mutantdetectie omvatte alleen monsters waarbij de mutantstatus kon worden vastgesteld.

Tabel 18. Klinische evaluatie van de ResistancePlus[®] MG₍₅₅₀₎ -kit (klinisch onderzoek 2)						
		Detectie van <i>M. genitalium</i> 16S-rRNA-qPCR		23S-rRNA-mutantdetectie Sequencing		
		Positief	Negatief		Mutant	Wildtype
ResistancePlus[®] MG	Positief	79	0 [^]	Mutant gedetecteerd	47	1
	Negatief	2	43 [#]	Mutant niet gedetecteerd	4	19
Gevoeligheid		97,5% (95% BI 91,4-99,7%)		Gevoeligheid		
Specificiteit		100,0% (95% BI 91,8-100,0%)		Specificiteit		

95% BI - 95% betrouwbaarheidsinterval; Mutant - 23S-rRNA-mutatie in A2058G-, A2059G-, A2058T- en A2058C-posities (*E. coli*-nummering); Wildtype - het ontbreken van een mutatie in deze posities.

[^] Met de **ResistancePlus[®] MG₍₅₅₀₎**-kit werd 1 echt positief *M. genitalium*-monster gedetecteerd met behulp van de referentietest. De tabel geeft de verkregen resultaten weer.

[#] Met de **ResistancePlus[®] MG₍₅₅₀₎**-kit werden 10 echt negatieve *M. genitalium*-monsters gedetecteerd met behulp van de referentietest. De tabel geeft de verkregen resultaten weer.

16.1.3 Klinisch onderzoek 3

Er werd een retrospectief klinisch onderzoek uitgevoerd in Canterbury Health Laboratories (CHL), Christchurch, Nieuw-Zeeland op onderzochte, gearchiveerde monsters uit de periode 2010 tot 2016, die waren afgenomen met de multi-Collect-monsterafnamekit (Abbott). De 137 monsters bestonden uit 110 mannelijke urinemonsters, 11 vrouwelijke urinemonsters, 15 vaginale uitstrijkjes, 1 urethraal/vaginaal uitstrijkje en 1 vaginaal/baarmoederhalsuitstrijkje. Om de prestaties van de **ResistancePlus[®] MG**-kit te bepalen, werd de detectie van *M. genitalium* vergeleken met de klinische laboratoriumuitslag van een algemeen erkende MgPa qPCR, die ook wordt gebruikt voor routinediagnostiek in CHL (Jensen 2004), en werd de 23S-rRNA-mutantdetectie vergeleken met Sanger-sequenzen (Jensen 2008). De **ResistancePlus[®] MG**-kit werd uitgevoerd op de LC480 II, na monsterextractie op het MagNA Pure 96-apparaat, met de MagNA Pure 96 DNA en Viral NA Small Volume Kit volgens het Universal Pathogen 200-protocol. Voor detectie van *M. genitalium* werd de routinematige MgPa-test herhaald voor monsters waarvan de uitslag niet overeenkwam. Voor 23S-rRNA-mutantdetectie werd Sanger-sequencing als het juiste resultaat genomen. De gevoeligheid en specificiteit van de **ResistancePlus[®] MG**-kit voor *M. genitalium*-detectie en 23S-rRNA-mutantdetectie worden weergegeven in **Tabel 19**. Eén monster werd uitgesloten omdat het resultaat van de interne controle niet geldig was. De analyse van 23S-rRNA-mutantdetectie omvatte alleen monsters waarbij de mutantstatus kon worden vastgesteld. De analyse van de resultaten per type monster wordt weergegeven in **Tabel 20**. De analyse van de 23S-rRNA-mutatie wordt weergegeven in **Tabel 21**.

Tabel 19. Klinische evaluatie van de ResistancePlus® MG-kit (klinisch onderzoek 3)

		Detectie van <i>M. genitalium</i> 16S-rRNA-qPCR				23S-rRNA-mutantdetectie Sequencing	
		Positief	Negatief			Mutant	Wildtype
<i>ResistancePlus</i> ® MG	Positief	76	0		Mutant gedetecteerd	52	1
	Negatief	3	57^		Mutant niet gedetecteerd	5	19
Gevoeligheid		96,2% (95% BI 89,3-99,2%)			Gevoeligheid	91,2% (95% BI 80,7-97,1%)	
Specificiteit		100,0% (95% BI 93,7-100,0%)			Specificiteit	95,0% (95% BI 75,1-99,9%)	

95% BI - 95% betrouwbaarheidsinterval; Mutant - 23S-rRNA-mutatie in A2058G-, A2059G-, A2058T- en A2058C-posities (*E. coli*-nummering); Wildtype - het ontbreken van een mutatie in deze posities.

[^] De tabel geeft de verkregen resultaten weer.

Tabel 20. De analyse van de resultaten per type monster (klinisch onderzoek 3)

Monster	Verwacht <i>M. genitalium</i> negatief	Verwacht <i>M. genitalium</i> wildtype	Verwacht <i>M. genitalium</i> 23S-rRNA-mutant
Mannelijke urine	45/45	17/18 ¹	38/45 ¹
Vrouwelijke urine	4/4	1/1	6/6 ²
Vaginaal uitstrijkje	6/6	1/1	8/8 ³
Urethraal/vaginaal uitstrijkje	1/1	0/0	0/0
Vaginaal/cervicaal uitstrijkje	1/1	0/0	0/0

Mutant - 23S-rRNA-mutatie in A2058G-, A2059G-, A2058T- en A2058C-posities (*E. coli*-nummering); Wildtype - het ontbreken van een mutatie in deze posities.

¹ Mannelijke urine 1 *M. genitalium*-wildtype foutief gedetecteerd als *M. genitalium*-mutant, 4 A2058G, 32 A2059G, 1 A2058T juist gedetecteerd; 1 A2058C en 1 A2059G foutief gedetecteerd als *M. genitalium* niet gedetecteerd, 3 A2058C en 2 A2059G foutief gedetecteerd als *M. genitalium*-mutant niet gedetecteerd

² Vrouwelijke urine: 2 A2058G, 4 A2059G juist gedetecteerd

³ Vaginaal uitstrijkje: 1 A2058G, 7 A2059G juist gedetecteerd

Tabel 21. De analyse van de *M. genitalium* 23S-rRNA-mutatie (klinisch onderzoek 3)

Resultaat van de referentie [^]	Resultaat van ResistancePlus® MG
Wildtype	19/20 ¹
A2058G	7/10 ²
A2059G	43/45 ³
A2058T	1/1
A2058C	1/1

[^] Alleen voor monsters die positief zijn voor *M. genitalium*

¹ Wildtype 1 mannelijke urine foutief gedetecteerd als *M. genitalium*-mutant

² A2058G: 3 mannelijke urines foutief gedetecteerd als *M. genitalium*-mutant niet gedetecteerd

³ A2059G: 2 mannelijke urines foutief gedetecteerd als *M. genitalium*-mutant niet gedetecteerd

16.1.4 Klinisch onderzoek 4

Er werd een retrospectief klinisch onderzoek uitgevoerd in het Universitair Ziekenhuis Vall d'Hebron (HUVH), Barcelona, Spanje, om de prestaties van de **ResistancePlus[®] MG₍₆₇₅₎**-kit te beoordelen voor de detectie van *M. genitalium* en met azitromycineresistentie-geassocieerde mutaties in retrospectieve monsters die tussen december 2017 en april 2018 werden afgenomen. De monsters werden afgenomen met de DeltaSwab ViCUM[®] (Deltalab, Spanje) voor uitstrijkjes of met de Vacumed[®] Urine (FL medical, Italië) voor urine. De 86 monsters bestonden uit 46 urinemonsters en 40 vaginale uitstrijkjes. De monsters werden geëxtraheerd met de STARlet IVD (Hamilton) en geanalyseerd op het CFX96 Dx (Bio-Rad)-apparaat. Om de prestaties te beoordelen, werd de detectie van *M. genitalium* vergeleken met die van de Allplex[™] STI Essential (Seegene) en de **ResistancePlus[®] MG-kit** (SpeedX) op de LC480 II voor zowel de detectie van *M. genitalium* als van de 23S-rRNA-status. De gevoeligheid en specificiteit van de **ResistancePlus[®] MG₍₆₇₅₎**-kit voor detectie van *M. genitalium* in vergelijking met de Allplex[™] STI Essential (Seegene) zijn weergegeven in **Tabel 22**. De gevoeligheid en specificiteit van de **ResistancePlus[®] MG₍₆₇₅₎** in vergelijking met de **ResistancePlus[®] MG** wordt weergegeven in **Tabel 23**. De analyse van de resultaten per type monster wordt weergegeven in **Tabel 24**.

Tabel 22. Vergelijking van de ResistancePlus[®] MG₍₆₇₅₎ -kit met de Allplex [™] STI essential (klinisch onderzoek 4)			
		Detectie van <i>M. genitalium</i> Allplex [™] STI Essential	
		Positief	Negatief
ResistancePlus[®] MG₍₆₇₅₎	Positief	40	0
	Negatief	0	46
Gevoeligheid		100,0% (95% BI 91,2-100,0%)	
Specificiteit		100,0% (95% BI 92,3-100,0%)	

Tabel 23. Klinische evaluatie van de ResistancePlus[®] MG₍₆₇₅₎ -kit (klinisch onderzoek 4)					
		Detectie van <i>M. genitalium</i> ResistancePlus[®] MG (LC480 II)		23S-rRNA-mutantdetectie [#] ResistancePlus[®] MG (LC480 II)	
		Positief	Negatief		
ResistancePlus[®] MG₍₆₇₅₎	Positief	40	0	Mutant gedetecteerd	20
	Negatief	0	46	Mutant niet gedetecteerd	0
Gevoeligheid		100,0% (95% BI 91,2-100,0%)		Gevoeligheid	
Specificiteit		100,0% (95% BI 92,3-100,0%)		Specificiteit	
				100,0% (95% BI 83,2-100,0%)	
				100,0% (95% BI 83,2-100,0%)	

95% BI - 95% betrouwbaarheidsinterval; Mutant - 23S-rRNA-mutatie in A2058G-, A2059G-, A2058T- en A2058C-posities (*E. coli*-nummering); Wildtype - het ontbreken van een mutatie in deze posities.

[#] 1 monster werd uitgesloten van analyse omdat deze was gesequenced als gemengd wildtype en mutant

Tabel 24. De analyse van de resultaten per type monster (klinisch onderzoek 4)			
Monster	Verwacht <i>M. genitalium</i> negatief	Verwacht <i>M. genitalium</i> 23S-rRNA wildtype	Verwacht <i>M. genitalium</i> 23S-rRNA-mutant
Mannelijke urine	26/26	5/5	15/15
Vaginaal uitstrijkje	20/20	15/15	5/5

16.1.5 Klinisch onderzoek 5

Er werd een retrospectief klinisch onderzoek uitgevoerd in het Royal Women's Hospital (RWH), Melbourne, Australië in de periode juni tot november 2017 met urinemonsters en vaginale uitstrijkjes die werden afgenomen met de Aptima®. Monsters van gematchte patiënten werden afgenomen als zuivere urine (routinemonster) of met de Aptima® Urine Specimen Collection kit (Hologic), of als droog wattenstaafje (routinemonster) of met de Aptima® Unisex Swab Specimen Collection kit (Hologic). De 147 monsters bestonden uit 122 urinemonsters en 25 vaginale uitstrijkjes. Om de prestaties van de 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 diagnostische resultaten van de routinemonsters met de **ResistancePlus**® MG-kit (SpeedX). Het testen van de met de Aptima® afgenomen monsters werd uitgevoerd op de LC480 II, na monsterextractie op het MagNA Pure 96-apparaat met de MagNA Pure 96 DNA en Viral NA Small Volume Kit volgens het Viral NA Universal LV 1000-protocol. De klinische diagnostische resultaten van RWH, verkregen uit een gematcht diagnostisch monster getest met de **ResistancePlus**® MG-kit (SpeedX), werd genomen als het juiste resultaat voor *M. genitalium*. Voor de 23S-rRNA-mutantdetectie werd het resultaat vergeleken met het diagnostische resultaat en Sanger-sequenzen.

De gevoeligheid en specificiteit van de **ResistancePlus**® MG-kit voor detectie van *M. genitalium* en 23S-rRNA-mutanten zijn weergegeven in **Tabel 25**. De analyse van 23S-rRNA-mutantdetectie omvatte alleen monsters waarbij de mutantstatus kon worden vastgesteld. De analyse van de resultaten per type monster wordt weergegeven in **Tabel 26**.

Tabel 25. Klinische evaluatie van de ResistancePlus ® MG-kit (klinisch onderzoek 5)					
		Detectie van <i>M. genitalium</i> ResistancePlus ® MG (routinemonster)		23S-rRNA-mutantdetectie ResistancePlus ® MG (routinemonster)	
		Positief	Negatief		
ResistancePlus ® MG (met 1 ml Aptima-monster)	Positief	77	3	Mutant gedetecteerd	51
	Negatief	3	64	Mutant niet gedetecteerd	2
Gevoeligheid		96,3% (95% BI 89,4-99,2%)		Gevoeligheid	
Specificiteit		95,5% (95% BI 87,5-99,1%)		Specificiteit	
				96,2% (95% BI 87,0-99,5%)	
				100,0% (95% BI 86,0-100,0%)	

Tabel 26. De analyse van de resultaten per type monster (klinisch onderzoek 5)			
Monster	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
Vaginaal uitstrijkje	14/15 ²	3/4 ²	6/6

Mutant - 23S-rRNA-mutatie in A2058G-, A2059G-, A2058T- en A2058C-posities (*E. coli*-nummering); Wildtype - het ontbreken van een mutatie in deze posities.

¹ Urine: 2 *M. genitalium*-negatieve monsters foutief gedetecteerd als respectievelijk *M. genitalium* wildtype en mutant; 1 *M. genitalium* wildtype foutief gedetecteerd als *M. genitalium* negatief; 2 *M. genitalium*-mutanten foutief gedetecteerd als *M. genitalium* wildtype; 1 *M. genitalium*-mutant foutief gedetecteerd als *M. genitalium*-negatief

² Vaginaal uitstrijkje: 1 *M. genitalium*-negatief monster foutief gedetecteerd als *M. genitalium* wildtype; 1 *M. genitalium* wildtype foutief gedetecteerd als *M. genitalium*-negatief

16.1.6 Klinisch onderzoek 6

Er werd een retrospectief klinisch onderzoek uitgevoerd aan het University of Queensland Centre for Clinical Research (UQCCR), Australië, met gebruik van Cobas® x480-extracten van urine en uitstrijkjes afgenomen in de periode februari 2017 tot februari 2019. Monsters werden afgenomen als zuivere urine of met de Cobas® PCR media collection kit (Roche) en geëxtraheerd op het Cobas® x480 (Cobas® 4800, Roche)-apparaat met gebruik van de "Full Workflow" en het "CT/NG"-protocol, zonder toevoeging van SpeedX interne controlecellen. De monsters bestonden uit 10 vaginale uitstrijkjes, 5 hoge vaginale uitstrijkjes en 84 mannelijke en 10 vrouwelijke urinemonsters.

Om de prestaties van de Cobas®-extracten te bepalen met de **ResistancePlus®** MG₍₅₅₀₎-kit, werd de detectie van *M. genitalium* vergeleken met de klinisch routinematige diagnostische resultaten (MgPa PCR-test (Trembizki *et al.*, 2017)) en 23S-rRNA-mutantdetectie werd vergeleken met Sanger-sequenzen. De **ResistancePlus®** MG₍₅₅₀₎-kit werd uitgevoerd op de ABI 7500 Fast Dx. 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 27**. De analyse van 23S-rRNA-mutantdetectie omvatte alleen monsters waarbij de mutantstatus kon worden vastgesteld. De analyse van de resultaten per type monster wordt weergegeven in **Tabel 28**. De analyse van de 23S-rRNA-mutatie wordt weergegeven in **Tabel 29**.

Tabel 27. Klinische evaluatie van de ResistancePlus® MG₍₅₅₀₎-kit (klinisch onderzoek 6)

		Detectie van <i>M. genitalium</i> MgPa qPCR		23S-rRNA-mutantdetectie Sanger-sequenzen	
		Positief	Negatief	Mutant	Wildtype
ResistancePlus® MG ₍₅₅₀₎	Positief	54	0	Mutant gedetecteerd 37 [^]	0
	Negatief	1	51	Mutant niet gedetecteerd	17
Gevoeligheid		98,2% (95% BI 90,3-100,0%)		Gevoeligheid	100,0% (95% BI 90,5-100,0%)
Specificiteit		100,0% (95% BI 93,0-100,0%)		Specificiteit	100,0% (95% BI 80,5-100,0%)

[^] 1 vaginaal monster gaf een gemengd wildtype/A2059G-sequencingresultaat dat juist als mutant werd geïdentificeerd in de **ResistancePlus®** MG₍₅₅₀₎-test

Tabel 28. De analyse van de resultaten per type monster (klinisch onderzoek 6) *

Monster	Verwacht <i>M. genitalium</i> negatief	Verwacht <i>M. genitalium</i> 23S-rRNA wildtype	Verwacht <i>M. genitalium</i> 23S-rRNA-mutant
Mannelijke urine	42/42	13/13	26/27 ¹
Vrouwelijke urine	6/6	1/1	3/3 ²
Vaginaal uitstrijkje	1/1	1/1	7/7 ^{3^}
Hoog vaginaal uitstrijkje	2/2	2/2	1/1 ⁴

* 3 monsters werden uitgesloten omdat het sequencen mislukte en de juiste 23S-status niet kon worden bepaald, waaronder: 2 urinemonsters en 1 vaginaal monster

¹ Mannelijke urine: 8 A2058G, 3 A2058T en 15 A2059G juist geïdentificeerd; 1 A2058T werd foutief geïdentificeerd als *M. genitalium* niet-gedetecteerd

² Vrouwelijke urine: 2 A2058G en 1 A2059G juist geïdentificeerd

³ Vaginaal uitstrijkje: 3 A2058G, 2 A2058T en 1 A2059G juist geïdentificeerd; [^] 1 vaginaal uitstrijkje werd geïdentificeerd als een gemengd WT/A2059G

⁴ Hoog vaginaal uitstrijkje 1 A2059G juist geïdentificeerd

Tabel 29. De analyse van de *M. genitalium* 23S-rRNA-mutatie (klinisch onderzoek 6)

Resultaat van de referentie [^]	Resultaat van <i>ResistancePlus</i> ® MG
Wildtype	17/17
A2058G	13/13
A2059G	19/19 ¹
A2058T	5/5
A2058C	-

[^] Alleen voor monsters die positief zijn voor *M. genitalium*

¹ A2059G: 1 vaginaal uitstrijkje gemengd wildtype/A2059G juist geïdentificeerd als *M. genitalium*, 23S-mutatie gedetecteerd

16.1.7 Klinisch onderzoek 7

Er werd een retrospectief klinisch onderzoek uitgevoerd in de Microbiological Diagnostic Unit, Public Health Unit (MDU), Victoria, Australië, met behulp van droge wattenstaafjes en zuivere urine afgenomen in de periode oktober 2018 tot januari 2019. De monsters bestonden uit 19 vaginale uitstrijkjes, 2 hoge vaginale uitstrijkjes en 44 urinemonsters.

De *ResistancePlus*® MG-kit werd uitgevoerd op de LC480 II, na monsterextractie op het QIAAsymphony SP (QIAGEN)-apparaat met de DSP Virus/Pathogen Mini-kit en het Complex200_V6_DSP-protocol. De resultaten werden vergeleken met de diagnostische routineresultaten van de *ResistancePlus*® MG-kit (SpeedX) waarbij de monsters geëxtraheerd werden met het MagNA Pure 96-apparaat (MP96). Voor monsters waarvan de uitslag niet overeenkwam werd een 16S-rRNA-qPCR (Twin 2011)-test uitgevoerd voor detectie van *M. genitalium* en Sanger-sequenzen (Twin 2012) werd uitgevoerd voor detectie van 23S-rRNA-mutanten. De gevoeligheid en specificiteit van de *ResistancePlus*® MG-kit voor detectie van *M. genitalium* en detectie van 23S-rRNA-mutanten zijn weergegeven in **Tabel 30**. De analyse van 23S-rRNA-mutantdetectie omvatte alleen monsters waarbij de mutantstatus kon worden vastgesteld. De analyse van de resultaten per type monster wordt weergegeven in **Tabel 31**.

Tabel 30. Klinische evaluatie van de *ResistancePlus*® MG-kit (klinisch onderzoek 7)

		Detectie van <i>M. genitalium</i> <i>ResistancePlus</i> ® MG (MP96)		23S-rRNA-mutantdetectie <i>ResistancePlus</i> ® MG (MP96)		
		Positief	Negatief		Mutant	Wildtype
<i>ResistancePlus</i> ® MG (QIAAsymphony SP)	Positief	36	0	Mutant gedetecteerd	16	1
	Negatief	1	27	Mutant niet gedetecteerd	1	18
Gevoeligheid		97,3% (95% BI 85,8-99,9%)		Gevoeligheid	94,1% (95% BI 71,3-99,9%)	
Specificiteit		100,0% (95% BI 87,2-100,0%)		Specificiteit	94,7% (95% BI 74,0-99,9%)	

Tabel 31. De analyse van de resultaten per type monster (klinisch onderzoek 7) *

Monster	Verwacht <i>M. genitalium</i> negatief	Verwacht <i>M. genitalium</i> 23S-rRNA wildtype	Verwacht <i>M. genitalium</i> 23S-rRNA-mutant
Mannelijke urine	17/17	9/9	12/14 ¹
Vrouwelijke urine	1/1	1/2 ²	1/1
Vaginaal uitstrijkje	8/8 [#]	7/7	3/3
Hoog vaginaal uitstrijkje	1/1	1/1	-

* 1 vaginaal uitstrijkje werd uitgesloten omdat het resultaat van de **ResistancePlus**® MG-kit niet geldig was.

¹ Mannelijke urine: 1 *M. genitalium* 23S-rRNA-mutant werd foutief geïdentificeerd als *M. genitalium* niet-gedetecteerd; 1 *M. genitalium* 23S-rRNA-mutant werd foutief geïdentificeerd als *M. genitalium* gedetecteerd, 23S-mutatie niet-gedetecteerd

² Vrouwelijke urine: 1 foutief geïdentificeerd als *M. genitalium* gedetecteerd, 23S-rRNA-mutatie gedetecteerd

16.2 Klinische 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 gekwantificeerde synthetische templates voor *M. genitalium* MgPa en 23S-rRNA-doelen (A2058G, A2059G, A2058T en A2058C) bij 10.000 en 3x LOD-kopieën per reactie met 6 herhalingen (tenzij anders aangegeven). De testen werden uitgevoerd op de LC480 II.

Om de variabiliteit tussen partijen te bepalen, werden twee partijen getest die op één machine en door één medewerker (**Tabel 32**) werden uitgevoerd. De twee partijen vertoonden een goede reproduceerbaarheid met een variatiecoëfficiënt (%CV) tussen 0,35-2,37% voor alle doelen.

Tabel 32. Variabiliteit tussen partijen				
	Gemiddelde Cq	STDEV	%CV	# 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

Om de variabiliteit van dag tot dag te bepalen, werden er gedurende drie dagen testen uitgevoerd door één medewerker op dezelfde machine (**Tabel 33**). De drie runs lieten een goede reproduceerbaarheid zien tussen verschillende dagen met variatiecoëfficiënten tussen 0,88-2,31% voor alle doelen.

Tabel 33. Variabiliteit van dag tot dag				
	Gemiddelde Cq	STDEV	%CV	# 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

Om de variabiliteit van run tot run te bepalen, werden drie qPCR-runs vergeleken die op dezelfde dag door dezelfde medewerker werden uitgevoerd (**Tabel 34**). De drie runs lieten een goede reproduceerbaarheid zien met variatiecoëfficiënten tussen 0,40-3,20% voor alle doelen.

Tabel 34. Variabiliteit van run tot run				
	Gemiddelde Cq	STDEV	%CV	# 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

Om de variabiliteit tussen medewerkers te bepalen, werden twee runs van twee medewerkers met elkaar vergeleken (**Tabel 35**). De twee runs van verschillende medewerkers lieten een goede reproduceerbaarheid zien met variatiecoëfficiënten tussen 0,54-1,62% voor alle doelen.

Tabel 35. Variabiliteit tussen medewerkers

	Gemiddelde Cq	STDEV	%CV	# 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

Om de variabiliteit tussen apparaten te bepalen, werden twee runs van twee apparaten vergeleken, uitgevoerd door dezelfde medewerker (**Tabel 36**). De runs van verschillende apparaten lieten een goede reproduceerbaarheid zien met variatiecoëfficiënten tussen 0,30-2,62% voor alle doelen.

Tabel 36. Variabiliteit tussen apparaten

	Gemiddelde Cq	STDEV	%CV	# 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

Om de variabiliteit binnen een run te bepalen, werden drie testen vergeleken, apart uitgevoerd door dezelfde medewerker en waarbij elk doel op dezelfde plaat werd uitgevoerd (**Tabel 37**). De drie testen lieten een goede reproduceerbaarheid zien met variatiecoëfficiënten tussen 0,57-3,12% voor alle doelen.

Tabel 37. Variabiliteit binnen een run				
	Gemiddelde Cq	STDEV	%CV	# 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

16.2.2 Analytische gevoeligheid

De analytische gevoeligheid van de **ResistancePlus®** MG-kit op de LC480 II werd bepaald door beperkte verdunningsreeksen uit te voeren met gekwantificeerde synthetische templates voor *M. genitalium* MgPa en 23S-rRNA-doelen (A2058G, A2059G, A2058T en A2058C). De gevoeligheid voor elk doel werd bepaald als het aantal kopieën per reactie met $\geq 95\%$ detectie weergegeven in **Tabel 38**.

Tabel 38. Analytische gevoeligheid	
	Analytische gevoeligheid (kopieën/reactie)
MgPa	10
A2058G	12
A2059G	10
A2058T	10
A2058C	10

16.2.3 Analytische specificiteit

Dit onderzoek werd uitgevoerd om de **ResistancePlus®** MG-kit te beoordelen bij de aanwezigheid van hoge concentraties niet-doelorganismen. Een panel van 65 micro-organismen (4 virussen, 2 protozoën, 4 schimmels en 55 bacteriën) die pathogenen of flora vertegenwoordigen die vaak voorkomen in het urogenitale systeem, of die nauw verband houden met *M. genitalium*, werd onderzocht. Elke bacteriestam werd getest met 1×10^6 genomen/ml, tenzij anders aangegeven. Virale stammen werden getest met 1×10^5 genomen/ml, tenzij anders aangegeven. Alle andere organismen werden getest bij de aangegeven concentraties. Alle organismen werden gekwantificeerd met qPCR, buiten de organismen die gekwantificeerd werden als kolonievormende eenheden (CFU) of plaquevormende eenheden (PFU) (**Tabel 39**). Alle micro-organismen werden in drievoud getest. Alle geteste micro-organismen werden verdund in een negatieve klinische matrix (urine of vaginaal uitstrijkje).

Geen van de organismen gaven vals-positieve resultaten in de negatieve *M. genitalium*-matrices (**Tabel 39**).

Ook werd een *in silico* analyse uitgevoerd om te beoordelen of de oligonucleotiden in de **ResistancePlus®** MG-test nucleïnezuursequenties van niet-doelorganismen die beschikbaar zijn in BLAST konden amplificeren en detecteren. Er werden geen significante interacties gedetecteerd.

Tabel 39. Micro-organismen getest op 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		

* het getal tussen haakjes geeft het aantal geteste stammen weer

[^] gekwantificeerd als PFU/ml

[#] gekwantificeerd als CFU/ml

16.2.4 Mogelijk storende substanties

Er werd een onderzoek uitgevoerd naar mogelijk storende substanties om na te gaan of substanties of omstandigheden die aanwezig kunnen zijn in urinemonsters of vaginale uitstrijkjes de prestaties van de **ResistancePlus**[®]-test zouden kunnen beïnvloeden. Het panel bestond uit endogene stoffen zoals bloed, mucine, leukocyten en geneesmiddelen (op recept en vrij verkrijgbaar) die gebruikt zouden kunnen worden voor de behandeling van urogenitale aandoeningen. Alle substanties werden geëvalueerd aan de hand van de prestaties van de interne controle, die de extractie en qPCR-remming controleert. Alle testen werden in drievoud uitgevoerd. De substanties werden verdund in een negatieve klinische matrix (urine of vaginaal uitstrijkje).

Geen van de substanties en omstandigheden verstoorden de detectie van de Interne Controle of leverden vals-positieve resultaten op.

De resultaten zijn samengevat in **Tabel 40** en **Tabel 41**.

Tabel 40. Mogelijk storende substanties in urinemonsters

Klasse/substantie	Naam product	Testconcentratie
Volbloed	--	1% v/v
Sperma	--	5,0% v/v
Mucus	Mucine	0,8% w/v
Antibiotica	Azithromycine	1,8 mg/ml
	Doxycycline	3,6 mg/ml
Analgesica	Aspirine	40 mg/ml
	Paracetamol	3,2 mg/ml
Intravaginale hormonen	--	7 mg/ml progesteron + 0,07 mg/ml beta-estradiol
Leukocyten	--	10 ⁵ cellen/ml
Albumine	Runderalbumine	10 mg/ml
Glucose	--	10 mg/ml
Zure urine (pH 4,0)	Urine + N-acetyl-L-cysteïne	pH 4,0
Alkalische urine (pH 9,0)	Urine + ammoniumcitraat	pH 9,0
Bilirubine	--	1 mg/ml

Tabel 41. Mogelijk storende substanties in vaginale uitstrijkjes

Klasse/substantie	Naam product	Testconcentratie
Bloed	--	60% v/v
Spermavocht	--	5,0% v/v
Mucus	Mucine	0,8% w/v
Vaginale producten en voorbodemiddelen die zonder recept verkrijgbaar zijn	Vagisil Anti-Itch Crème (1.0 oz)	0,25% w/v
	K-Y Jelly (4.0 oz)	0,25% w/v
	Options Gynol II Vaginal Contraceptive Gel	0,25% w/v
	Walgreens Clotrimazole Vaginal Cream (1.5 oz)	0,25% w/v
	Vagisil Sensitive Skin Formula Maximum Strength Anti-Itch Creme with Oatmeal (1.0 oz)	0,25% w/v
	Vagisil ProHydrate Natural Feel Internal Moisturizing Gel (0.2 oz x 8 pack)	0,25% w/v
	Vagisil Daily Intimate Deodorant Powder (8.0 oz)	0,25% w/v
	Summer's Eve Medicated Douche	0,25% v/v
Deodorant en poeders	Summer's Eve Deodorant spray (2.0 oz)	0,25% v/v
Aambeienzalf	Preparation H Hemorrhoidal Cream (0.9 oz)	0,25% w/v

Tabel 41. Mogelijk storende substanties in vaginale uitstrijkjes

Klasse/substantie	Naam product	Testconcentratie
Uitsluitend op recept verkrijgbare medicaties	Metronidazole Vaginal Gel, 0.75%	0,25% w/v
	Estrace® (estradiol vaginal cream, USP 0.01%)	0,25% w/v
Leukocyten	--	10 ⁵ cellen/ml
Intravaginale hormonen	--	7 mg/ml progesteron + 0,07 mg/ml beta-estradiol

16.2.5 Kruisreactiviteit met andere 23S-rRNA-mutaties

De kruisreactiviteit van de **ResistancePlus**® MG-kit werd beoordeeld met behulp van gekwantificeerde synthetische templates voor *M. genitalium* MgPa en 23S-rRNA-doelen (A2059C) bij 10.000 en 45 kopieën per reactie. Aangetoond werd dat de **ResistancePlus**® MG-test kruisreageert met het *M. genitalium* A2059C 23S-rRNA-doel met een succesratio van 100%.

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, Bébér 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 de LightCycler® 480 Instrument II. The **PlexPCR®** kleurcompensatiekit (Cat nr. 90001) moet worden uitgevoerd en toegepast voor LC480 II analyse (zie **paragrafen 19.2**) Deze kit kan op verzoek worden geleverd.

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

Detectieformaat

Maak een aangepast **Detectieformaat**

Open Tools (open gereedschap) > **Detection Formats** (detectieformaten)

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

Voor de **Filter Combination Selection** (filtercombinatieselectie) selecteert u het volgende (Excitatie-Emissie) zoals weergegeven in **Tabel 42**.

Tabel 42. Filtercombinaties [^]						
LC480 II	440-488	465-510	533-580	533-610	533-640	618-660

[^] Deze filtercombinaties zijn de standaard namen voor de kanalen

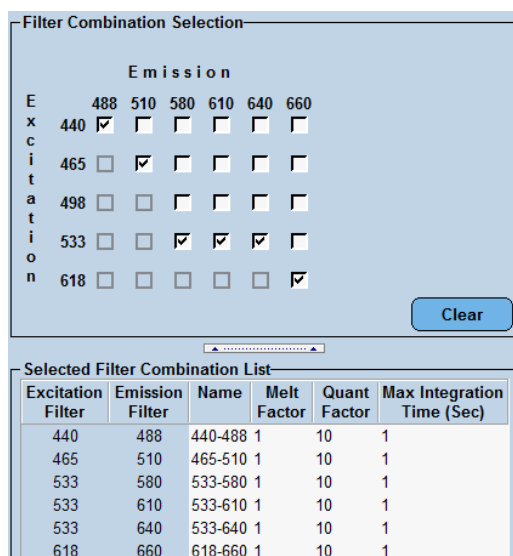
Stel de **Selected Filter Combination List** (geselecteerde filtercombinatielijst) voor alle kanalen in als volgt:

Smeltfactor: 1

Kwantiteitsfactor: 10

Maximale integratietijd (sec): 1

Afbeelding 3. Aangepast SpeedX-detectieformaat



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

Instrument Settings (instrumentinstellingen)

Maak een aangepast **detectieformaat**

Open Tools (open gereedschap) > **Instruments** (instrumenten)

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

Experimentele opstelling

Selecteer **New Experiment** (Nieuw experiment)

In het tabblad **Run Protocol** (protocol uitvoeren)

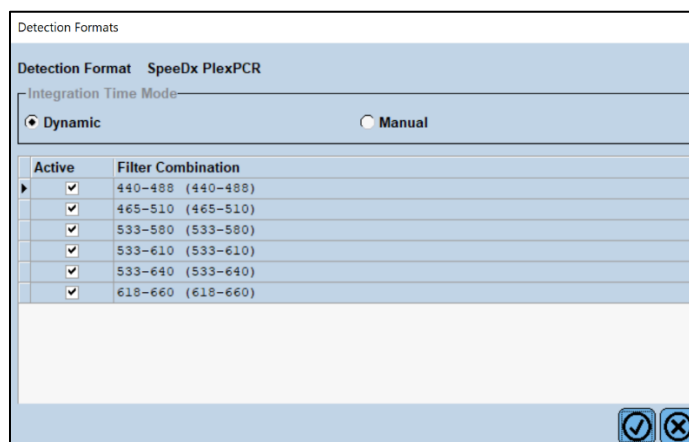
Voor **Detection Format** (detectieformaat) selecteer de aangepaste '**SpeedX PlexPCR**' (Afbeelding 4)

Selecteer **Customize** (aanpassen) >

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

Selecteer alle actieve **Filter Combinations** (filtercombinaties) zoals weergegeven in **Afbeelding 4**.

Afbeelding 4. Detectieformaat aanpassen

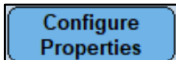


Active	Filter Combination
☒	440-488 (440-488)
☒	465-510 (465-510)
☒	533-580 (533-580)
☒	533-610 (533-610)
☒	533-640 (533-640)
☒	618-660 (618-660)

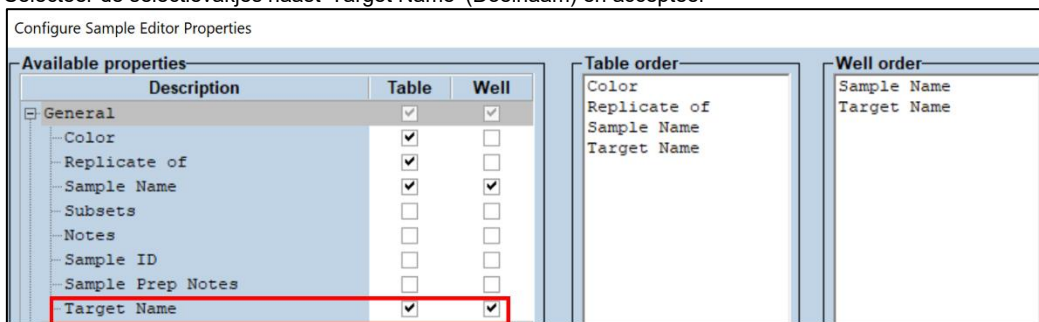
Om automatische monsterdetectie in de analysesoftware mogelijk te maken, wijst u een naamlabel toe aan de putjes op de plaat

Open de module **Sample Editor** (monster bewerken)

Om doelnamen toe te voegen, selecteert u **Configure Properties** (eigenschappen configureren)



Selecteer de selectievakjes naast 'Target Name' (Doelnaam) en accepteer



Description	Table	Well
General	☒	☒
Color	☒	☐
Replicate of	☒	☐
Sample Name	☒	☒
Subsets	☐	☐
Notes	☐	☐
Sample ID	☐	☐
Sample Prep Notes	☐	☐
Target Name	☒	☒

Bewerk de **Target Name** (doelnaam) voor elk kanaal zodat deze overeenkomt met de doelinstrumentreferentie zoals gedefinieerd in het menu **Lab Configuration** (labconfiguratie) > **Assays** (testen) van de analysesoftware en die wordt weergegeven in **Tabel 43**.

Tabel 43. Kanalen voor ResistancePlus® MG doelen

Doel	MgPa	23S rRNA mutation	IC
LC480 II	465-510	533-580	533-640

Om een naamlabel toe te wijzen, selecteert u het putje

Bewerk de **Sample Name** (monsternaam) zodat deze overeenkomt met het naamlabel zoals die is gedefinieerd in het menu **Lab Configuration** (labconfiguratie) > **Assays** (testen) van de analysesoftware (zie **Paragraaf 23.3**)

Monsters moeten worden gelabeld met het naamlabel als voorvoegsel. Voor de controlereacties worden standaard naamlabels geleverd (zoals weergegeven in **Tabel 44** en **Afbeelding 5**). Binnen de analysesoftware kunnen extra naamlabels worden gedefinieerd voor zowel reguliere monsters als controles.

Opmerking: Naamlabels voor monsters zijn hoofdlettergevoelig. Het naamlabel moet exact overeenkomen met het naamlabel dat is toegewezen in het runbestand.

Tabel 44. Naamlabels voor monsters voor analysesoftware	
Type monster	Standaard voorvoegsel (in analysesoftware)
Regulier monster	Niet standaard – door de gebruiker gedefinieerd
Negatieve controle	NC
Controle zonder template	NTC
Positieve controle (MG, 23S rRNA mutant type) (Pa)	Pa
Positieve controle (MG, 23S rRNA wildtype) (Pb)	Pb

Afbeelding 5. Monsters bewerken – Naamlabels toewijzen aan putjes

Pos	Filter combination	Color	Repl Of	Sample Name	Target Name
A1	465-510 (465-510)			NC	MgPa
A1	533-580 (533-580)			NC	23S rRNA mutation
A1	533-640 (533-640)			NC	IC
A2	465-510 (465-510)			NTC	MgPa
A2	533-580 (533-580)			NTC	23S rRNA mutation
A2	533-640 (533-640)			NTC	IC
A3	465-510 (465-510)			Pa	MgPa
A3	533-580 (533-580)			Pa	23S rRNA mutation
A3	533-640 (533-640)			Pa	IC
A4	465-510 (465-510)			Pb	MgPa
A4	533-580 (533-580)			Pb	23S rRNA mutation
A4	533-640 (533-640)			Pb	IC

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

Creëer het programma zoals weergegeven in **Tabel 45** (meer gedetailleerd weergegeven in **Afbeelding 6 - Afbeelding 9**):

Tabel 45. Thermocyclingprogramma

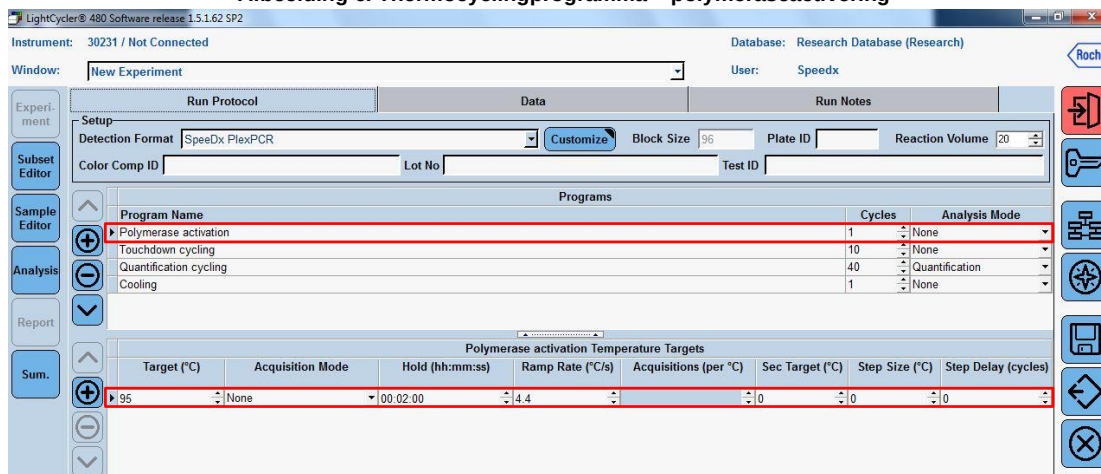
Programmanaam	Cycles (cycli)	Target °C	Hold (duur)	Ramp rate (toenametempo) (°C/s) [‡]
Polymerase-activering	1	95 °C	2 min	4,4
Touch down cycling (touchdowncycli) [‡] : Step down (stapsgewijze afname) -0,5 °C/cyclus	10	95 °C	5 s	4,4
		61 °C – 56,5 °C [‡]	30 s	2,2
Kwantificeringscycli [‡] : Acquisitie/Detectie	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



LightCycler® 480 Software release 1.5.1.62 SP2

Instrument: 30231 / Not Connected Database: Research Database (Research) User: Speedx

Window: New Experiment

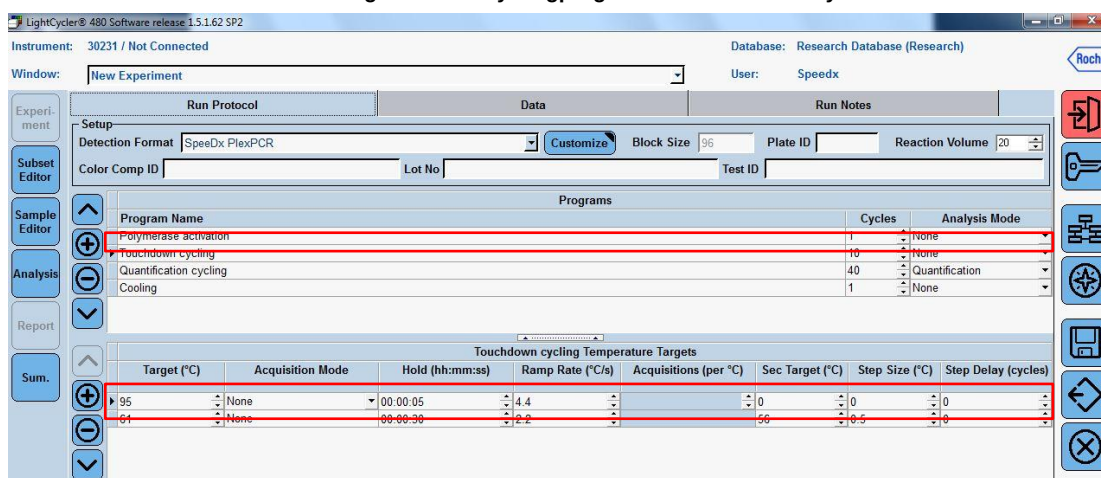
Setup: Detection Format SpeedX PlexPCR Block Size 96 Plate ID Reaction Volume 20

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

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



LightCycler® 480 Software release 1.5.1.62 SP2

Instrument: 30231 / Not Connected Database: Research Database (Research) User: Speedx

Window: New Experiment

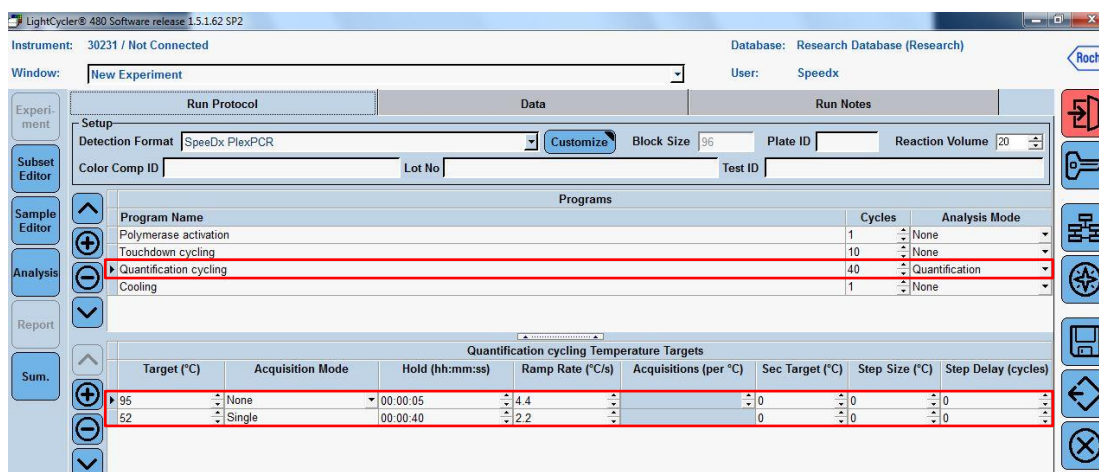
Setup: Detection Format SpeedX PlexPCR Block Size 96 Plate ID Reaction Volume 20

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

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	50	56.5	0.5	0

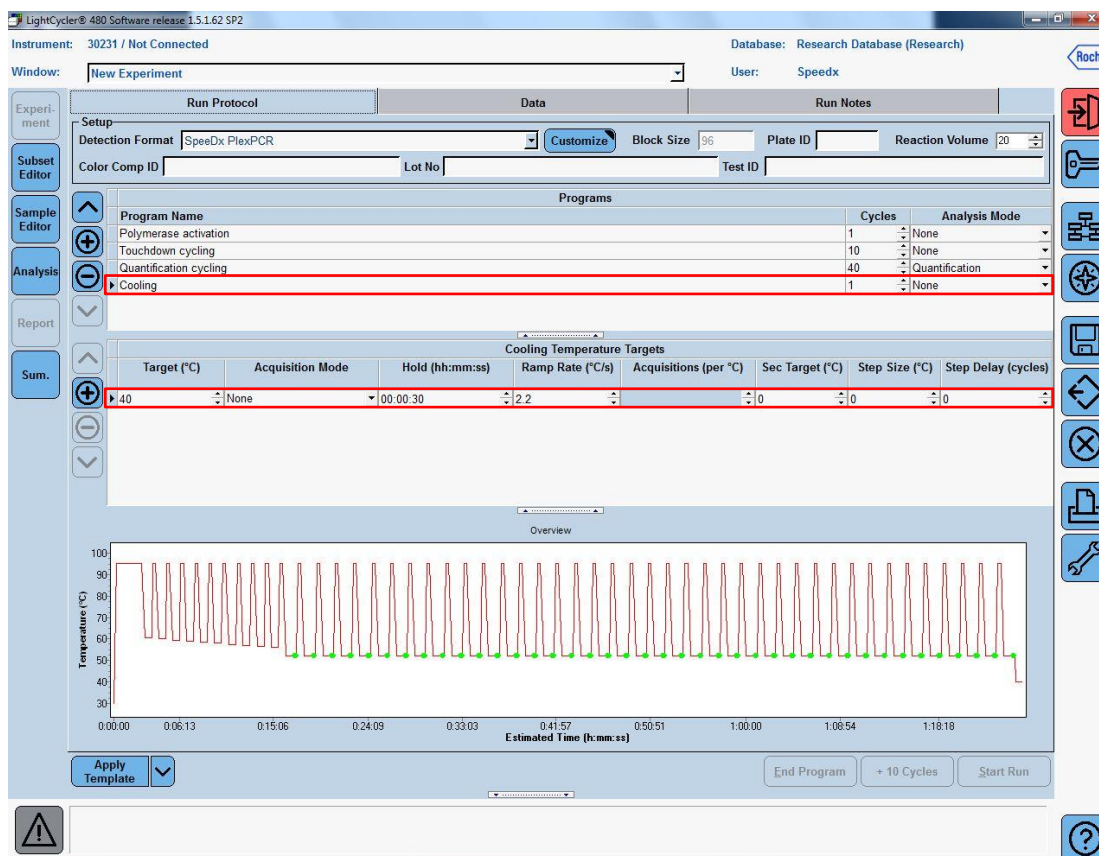
Afbeelding 8. Thermocyclingprogramma – kwantificeringscycli



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. Thermocyclisch programma– Koelen



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)
40	None	00:00:30	2.2	0	0	0	0

Overview

Temperature (°C) vs. Estimated Time (h:mm:ss)

Graph showing temperature cycles over time. The final cooling step is highlighted in green.

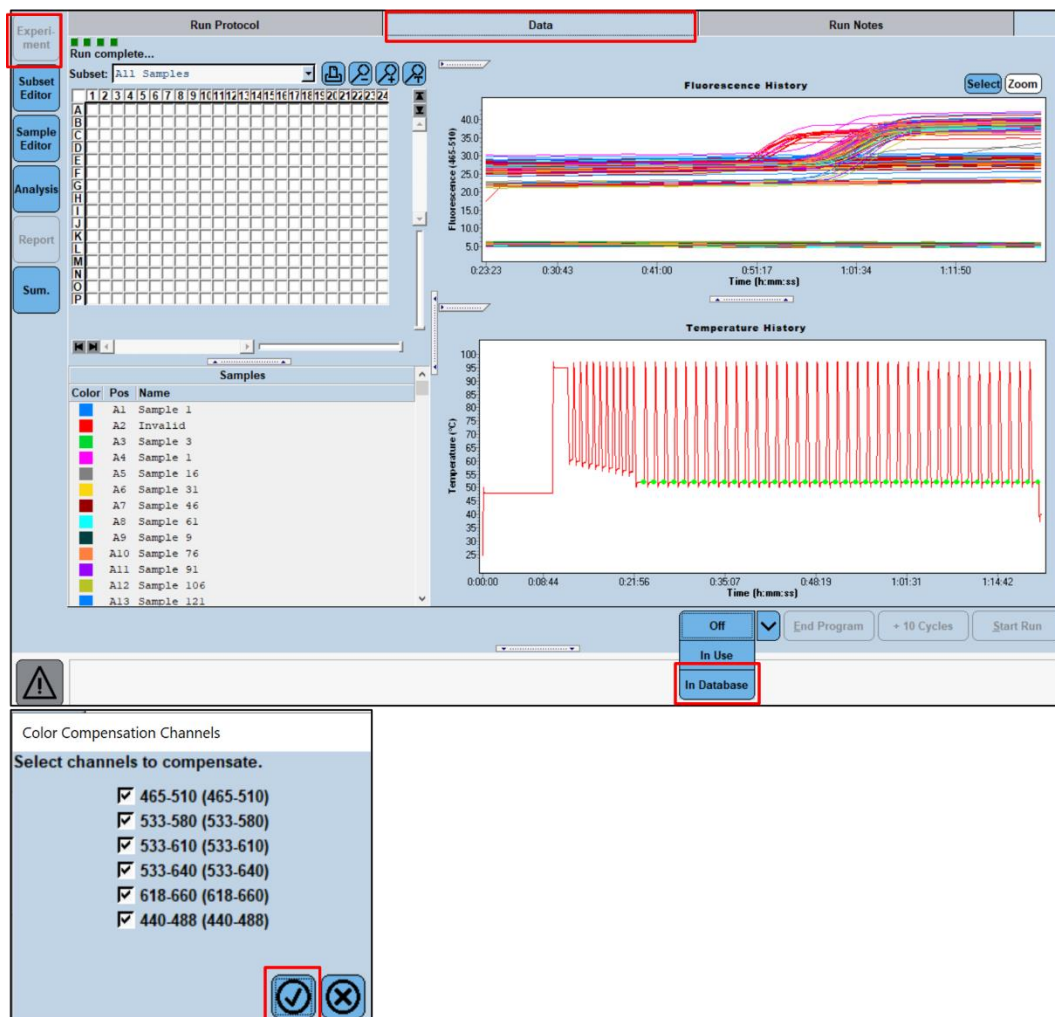
> **Start Run** (run starten)

Wanneer het cyclisch programma is voltooid, koppelt u het CC-object aan het runbestand zoals weergegeven in **Afbeelding 10** en exporteert u het als een .IXO-bestand voor analyse in de **ResistancePlus®** MG analysesoftware. Zie **Paragraaf 19.2** voor instructies over het creëren van het CC-object en het opslaan hiervan in de LightCycler 480-software database.

Selecteer **Experiment** (experiment) > **Data** (gegevens)

Klik op de vervolgkeuzepijl naast **Colour Comp (Off)** (kleurcompensatie (uit)) en selecteer **In Database** (in database)

Afbeelding 10. Het CC-object aan het runbestand koppelen



Selecteer het juiste CC-object, zorg ervoor dat alle kanalen zijn geselecteerd en selecteer het 'tick'-pictogram (vinkje) 

Selecteer het pictogram **Save** (opslaan) 

Selecteer het pictogram **Export** (exporteren) 

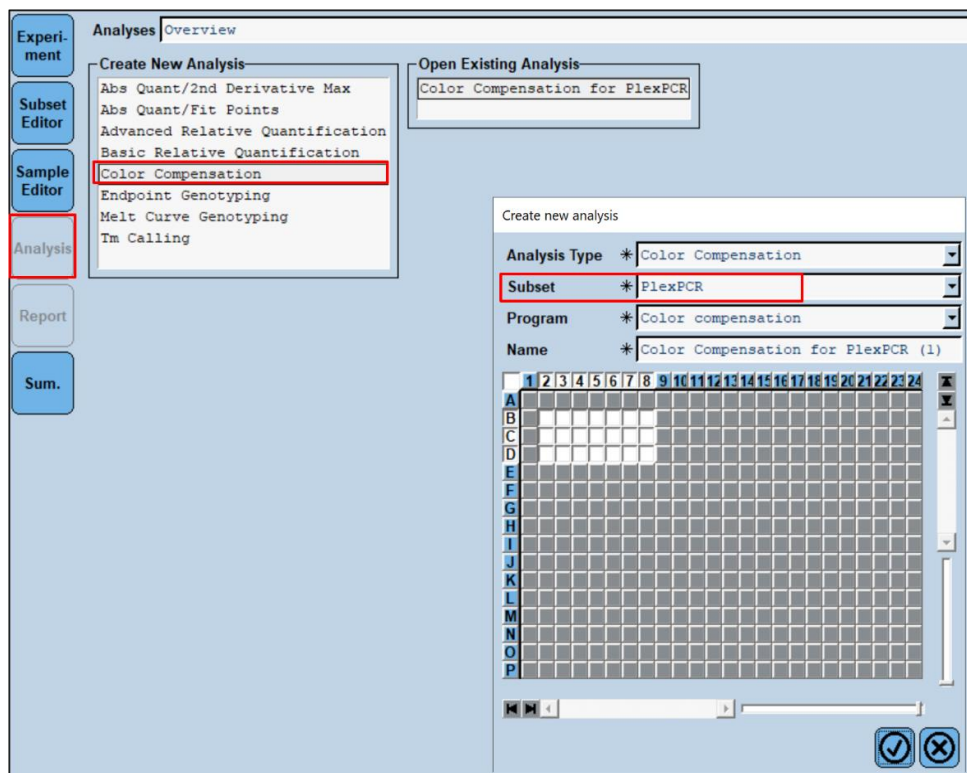
Sla op een gemakkelijk herkenbare locatie op

19.2 Kleurcompensatie voor de LightCycler® 480 Instrument II

OPMERKING: Voor LC480 II-analyse dient de **PlexPCR®** kleurcompensatiekit (Cat nr. 90001) te worden uitgevoerd en toegepast. Deze kit kan op verzoek worden geleverd.

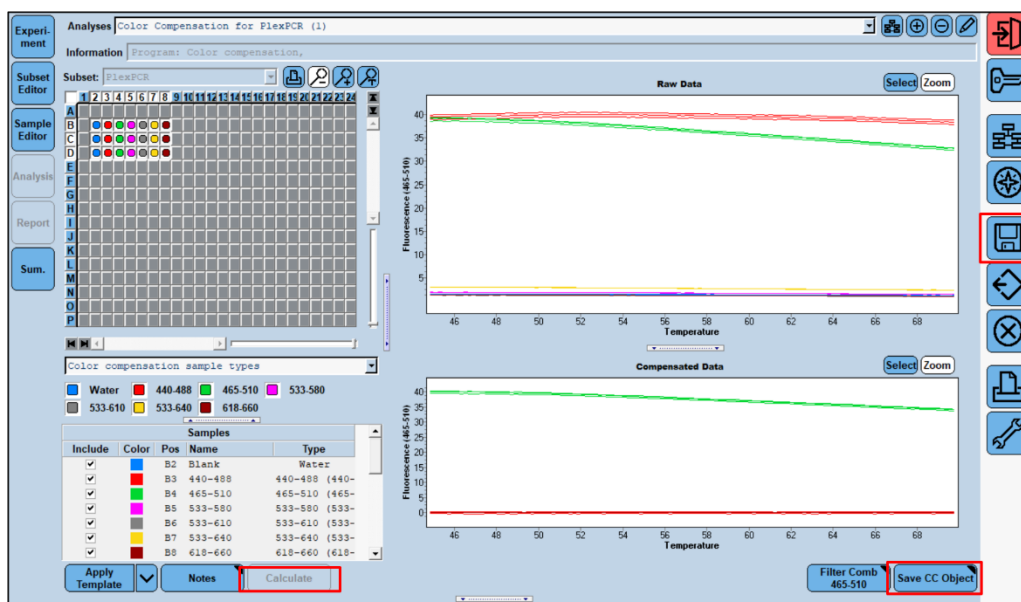
Analyseer het kleurcompensatiebestand via **Analysis** (analyse) > **Colour Compensation** (kleurcompensatie) en selecteer de juiste subset, zoals weergegeven in **Afbeelding 11**.

Afbeelding 11. Analyse – Kleurcompensatie



Selecteer **Calculate** (berekenen) (Afbeelding 12).

Afbeelding 12. CC-object berekenen en opslaan



Raadpleeg de gebruiksaanwijzing voor PlexPCR-kleurcompensatie (IF-IV0001) voor meer informatie om te controleren of het kleurcompensatiebestand correct is gecreëerd.

Selecteer **Save** (opslaan)



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

20 Bijlage 2: 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.

20.1 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)

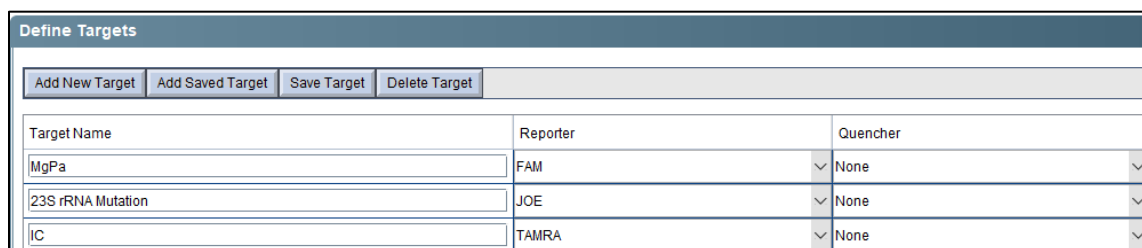
In **Setup** (setup) > open **Plate Setup** (setup plaat)

In het tabblad **Define Targets and Samples** (doelen en monsters definiëren) >

Define Targets (definieer doelen) zoals hieronder weergegeven in **Tabel 46** en **Afbeelding 13** (definieer kleuren zoals vereist)

Tabel 46. Definieer doelen		
Doelnaam	Reporter	Quencher
MgPa	FAM	Geen
23S rRNA mutation	JOE	Geen
IC	TAMRA	Geen

Afbeelding 13. Doelen en monsters definiëren



Target Name	Reporter	Quencher
MgPa	FAM	None
23S rRNA Mutation	JOE	None
IC	TAMRA	None

Define Samples (monsters definiëren) (definieer kleuren zoals vereist)

Om automatische monsterdetectie in de analysesoftware mogelijk te maken, moet u ervoor zorgen dat de doelnaam (weergegeven in **Tabel 46**) overeenkomt met de doelinstrumentreferentie die is gedefinieerd in het menu **Lab Configuration** (labconfiguratie) > **Assays** (testen) van de analysesoftware.

Bovendien moeten er ook naamlabellen voor de monsters worden toegewezen aan de putjes op de plaat

In **Setup** (setup) > open **Plate Setup** (setup plaat)

In het tabblad **Define Targets and Samples** (doelen en monsters definiëren) >

Define Samples (monsters definiëren)

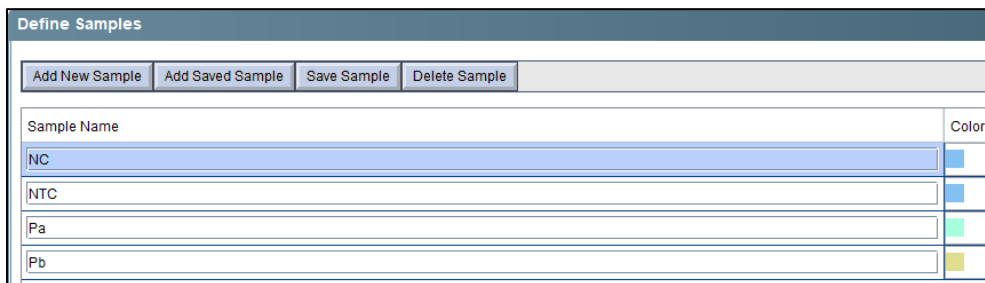
Bewerk de **Sample Name** (monsternaam) zodat deze overeenkomt met het naamlabel dat is gedefinieerd in het menu **Lab Configuration** (labconfiguratie) > **Assays** (testen) van de analysesoftware (**Paragraaf 23.3**).

Monsters moeten worden gelabeld met het naamlabel als voorvoegsel. Standaard naamlabels worden geleverd voor de controlereacties (zoals weergegeven in **Tabel 47** en **Afbeelding 14**). Extra naamlabels kunnen binnen de analysesoftware worden gedefinieerd voor zowel reguliere monsters als controles.

Opmerking: Naamlabels voor monsters zijn hoofdlettergevoelig. Het naamlabel moet exact overeenkomen met het naamlabel dat is toegewezen in het runbestand.

Tabel 47. Naamlabels voor monsters voor analysesoftware	
Type monster	Standaard voorvoegsel (in analysesoftware)
Regulier monster	Niet standaard – door de gebruiker gedefinieerd
Negatieve controle	NC
Controle zonder template	NTC
Positieve controle (MG, 23S rRNA mutant type) (Pa)	Pa
Positieve controle (MG, 23S rRNA wildtype) (Pb)	Pb

Afbeelding 14. Monsters bewerken – Naamlabels toewijzen aan putjes



Define Samples	
Add New Sample Add Saved Sample Save Sample Delete Sample	
Sample Name	Color
NC	Blue
NTC	Blue
Pa	Green
Pb	Yellow

In het tabblad **Assign Targets and Samples** (doelen en monsters toewijzen) >

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

Selecteer **Passive reference** (passieve referentie) > Geen

In **Setup** (setup) > open **Run Method** (methode uitvoeren)

Set **Reaction Volume Per Well** (reactievolume per putje) > 20 µL

Creëer het programma zoals weergegeven in **Tabel 48** (meer gedetailleerd weergegeven in grafische weergave (**Afbeelding 15** en **Afbeelding 16**) en tabelweergave (**Afbeelding 17**).

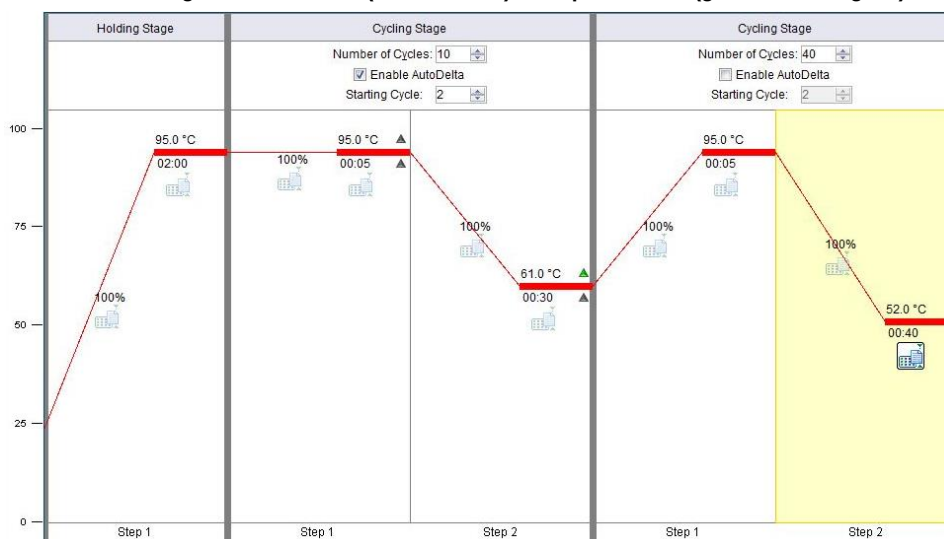
Tabel 48. Thermocyclingprogramma				
Programmanaam	Cycles (cycli)	Target °C	Hold (duur)	Ramp (toename)*
Polymerase-activering	1	95 °C	2 min	100%
Touch down cycling (touchdowncycli): Step down (stapsgewijze afname) -0,5 °C/cyclus ^o	10	95 °C	5 s	100%
		61 °C – 56,5 °C ^o	30 s	100%
Quantification cycling (kwantificeringscycli)*: Acquisitie/detectie	40	95 °C	5 s	100%
		52 °C ⁺	40 s	100%

* Standaardtoename/-afname

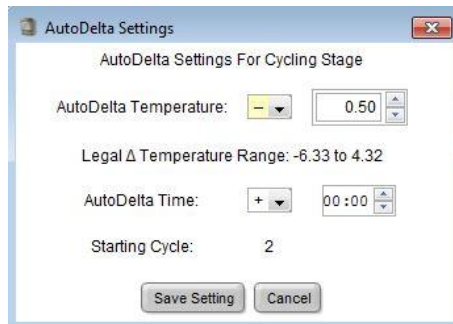
^o Enable AutoDelta (AutoDelta inschakelen): -0,5 °C/cyclus

⁺ Collect data on hold (gegevens verzamelen opgeschoort)

Afbeelding 15. Run method (run-methode) – Graphical View (grafische weergave)



Afbeelding 16. Run method (run-methode) – Graphical View (grafische weergave) – Enable AutoDelta (AutoDelta inschakelen)



Afbeelding 17. Run method (run-methode) – Tabular View (tabelweergave)

	Holding Stage	Cycling Stage		Cycling Stage	
		Number of Cycles: 10 ☒ Enable AutoDelta Starting Cycle: 2		Number of Cycles: 40 ☐ Enable AutoDelta 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					
Collect Data on Hold					
	Step 1	Step 1	Step 2	Step 1	Step 2

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

Selecteer **Start Run** (run starten)

20.2 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 23** voor instructies voor het gebruik van de **ResistancePlus®** MG (7500)-analysesoftware.

21 Bijlage 3: 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.

21.1 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 18**):

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

Container > 96-Well Clear

Template (sjabloon) > Leeg document

Run mode (run-modus) > Standard 7500

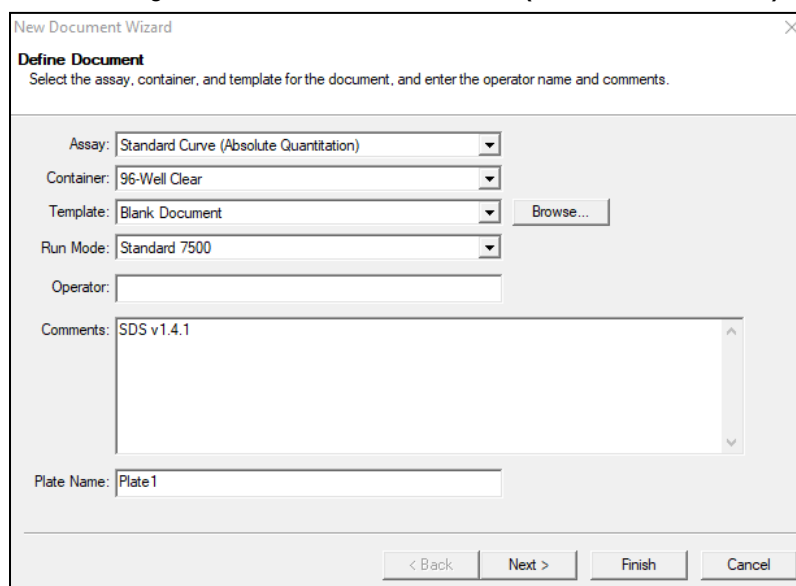
Operator > Voer naam operator in

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 18. Venster New Document Wizard (wizard nieuw document)



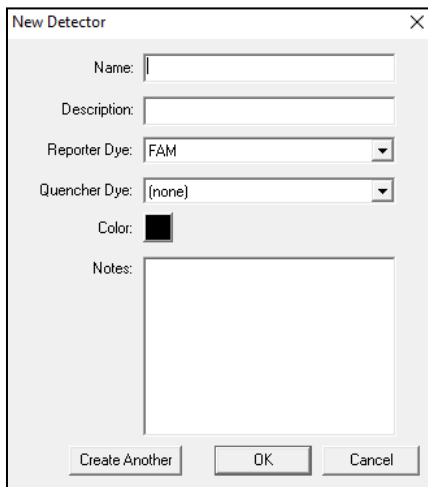
Selecteer in **Select Detectors** (detectoren selecteren) > **New Detector** (nieuwe detector)

Definieer targets zoals hieronder weergegeven (definieer kleuren naar behoefte) (**Tabel 49** en **Afbeelding 19**)

Tabel 49. Detectoren definiëren			
Detectoren	Detectornaam	Reporter kleurstof	Quencher
Detector 1	MgPa	FAM	None (geen)
Detector 2	23S rRNA mutation	JOE	None (geen)
Detector 3	IC	TAMRA	None (geen)

Selecteer **OK**

Afbeelding 19. Nieuw detectorvenster

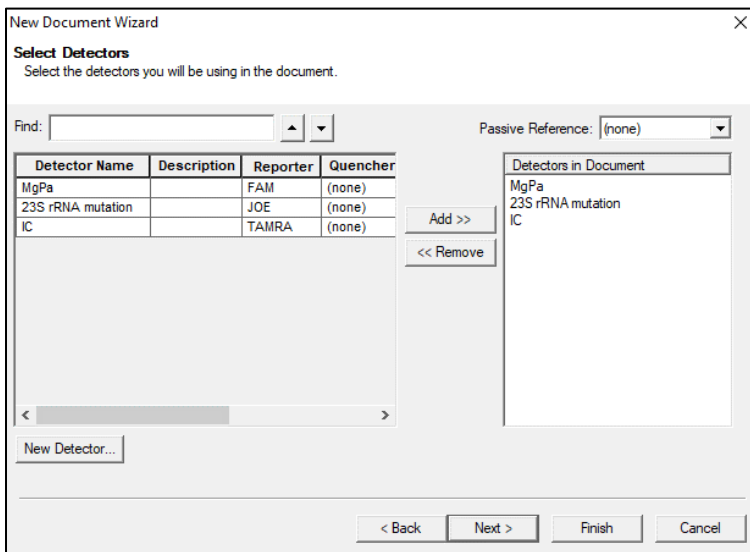


Selecteer **Detectors** (detectoren) (**Afbeelding 20**)

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

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

Afbeelding 20. 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 3 detectoren toe aan de geselecteerde wells

- MgPa
- 23S rRNA mutation IC

Selecteer **Next** (volgende)

Om automatische monsterdetectie in de analysesoftware mogelijk te maken, moet u ervoor zorgen dat de detectornaam (weergegeven in **Tabel 49**) overeenkomt met de doelinstrumentreferentie die is gedefinieerd in het menu **Lab Configuration** (labconfiguratie) > **Assays** (testen) van de analysesoftware

Bovendien moeten er ook naamlabels voor monsters worden toegewezen aan de putjes op de plaat

In **Setup** (setup) > open **Plate Setup** (setup plaat)

Bewerk de **Sample Name** (monsternaam) zodat deze overeenkomt met het naamlabel dat is gedefinieerd in het menu **Lab Configuration** (labconfiguratie) > **Assays** (testen) van de analysesoftware (zie **Paragraaf 23.3**)

Monsters moeten worden gelabeld met het naamlabel als voorvoegsel. Standaard naamlabels worden geleverd voor de controlereacties (zoals weergegeven in **Tabel 50**). Extra naamlabels kunnen binnen de analysesoftware worden gedefinieerd voor zowel reguliere monsters als controles

Opmerking: Naamlabels voor monsters zijn hoofdlettergevoelig. Het naamlabel moet exact overeenkomen met het naamlabel dat is toegewezen in het runbestand

Tabel 50. Naamlabels voor monsters voor analysesoftware	
Type monster	Standaard voorvoegsel (in analysesoftware)
Regulier monster	Niet standaard – door de gebruiker gedefinieerd
Negatieve controle	NC
Controle zonder template	NTC
Positieve controle (MG, 23S rRNA mutant type) (Pa)	Pa
Positieve controle (MG, 23S rRNA wildtype) (Pb)	Pb

Op tabblad **Instrument**

In vak **Settings** (instellingen)

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

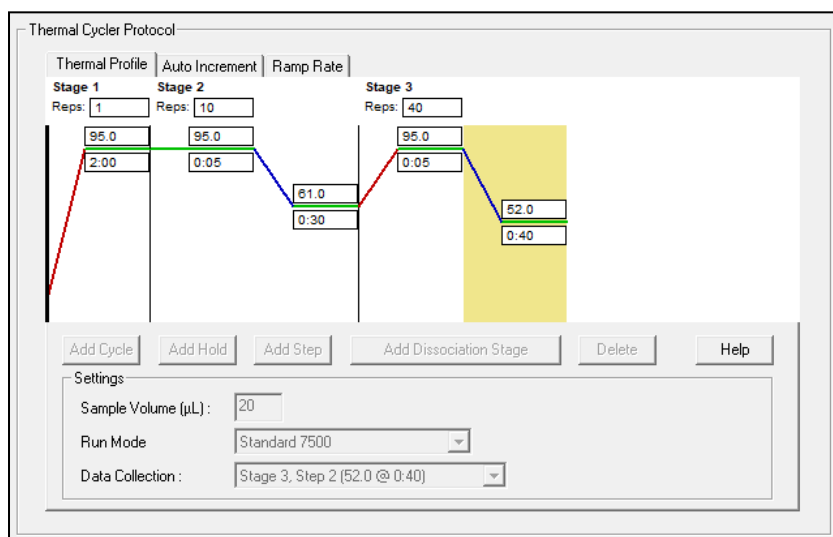
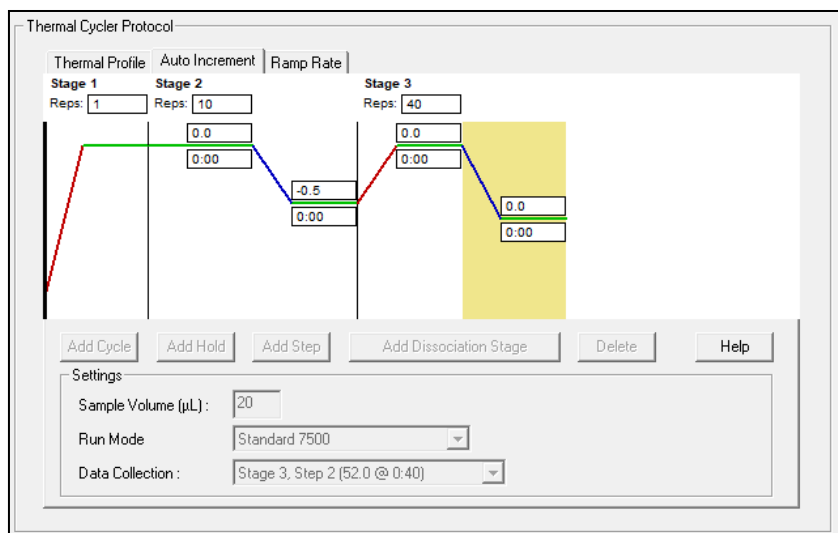
Maak het volgende thermocycler-protocol aan (**Tabel 51** en **Afbeelding 21** en **Afbeelding 22**).

Tabel 51. Thermocycler-protocol				
Programmanaam	Cycles (cycli)	Target °C	Hold (duur)	Ramp [†]
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 opgeschort)

Afbeelding 21. Thermocycler-protocol - Thermisch profiel

Afbeelding 22. Thermocycler-protocol - Auto Increment (automatische toename)


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 via tech@speedx.com.au.

Zie **paragraaf 23** voor instructies voor het gebruik van de **ResistancePlus®** MG (7500)-analysesoftware.

22 Bijlage 4: 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.

22.1 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 23**):

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 24**).

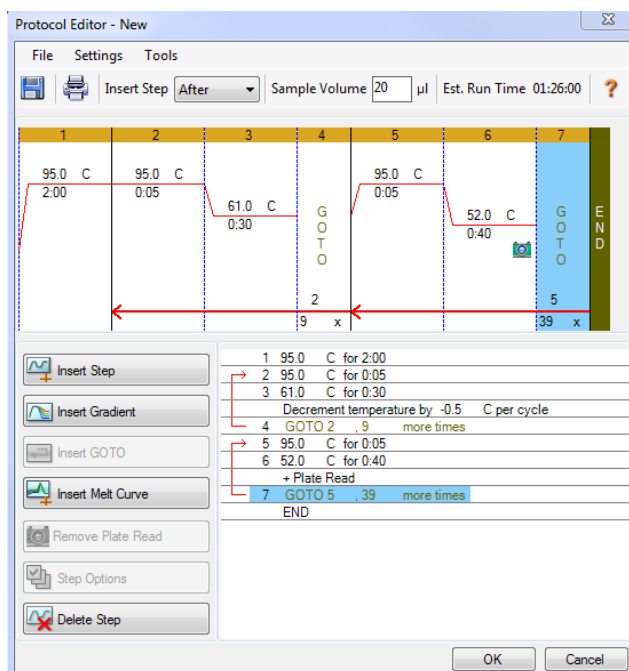
Tabel 52. Thermocyclingprogramma

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

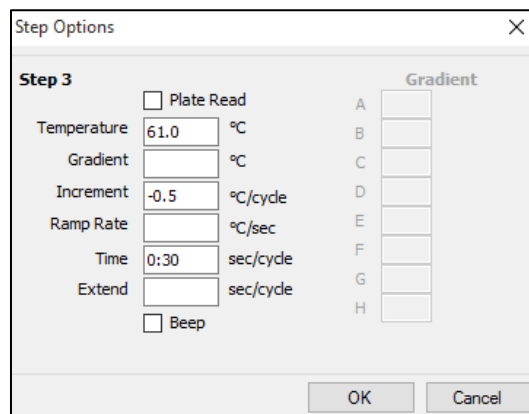
^δ **Step options** (stappenopties) > Increment (toename): -0,5 °C/cyclus

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

Afbeelding 23. Thermocycling-protocol – grafische weergave



Afbeelding 24. Step Options (stappenopties)



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** (fluoroforen) > FAM, HEX, Quasar 705 (zie **Tabel 53**)

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 53. Kanalen voor <i>ResistancePlus</i> [®] MG ₍₆₇₅₎ -targets		
MgPa	23S	IC
FAM	HEX	Quasar 705

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

Selecteer blok

Start Run (run starten)

Om automatische monsterdetectie in de analysesoftware mogelijk te maken, moet u ervoor zorgen dat de doelnaam en het kanaal (weergegeven in **Tabel 53**) overeenkomt met de doelinstrumentrefer die is gedefinieerd in het menu **Lab Configuration** (labconfiguratie) > **Assays** (testen) van de analysesoftware

Bovendien moeten er ook naamlabels voor de monsters worden toegewezen aan de putjes op de plaat

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

Selecteer een putje

Bewerk de **Sample Name** (monsternaam) zodat deze overeenkomt met het naamlabel dat is gedefinieerd in de module **Lab Configuration** (labconfiguratie) > **Assays** (testen) van de analysesoftware (zie **Paragraaf 23.3**)

Monsters moeten worden gelabeld met het naamlabel als voorvoegsel. Standaard naamlabels worden geleverd voor de controleacties (zoals weergegeven in **Tabel 54** en **Afbeelding 25**). Extra naamlabels kunnen binnen de analysesoftware worden gedefinieerd voor zowel reguliere monsters als controles

Opmerking: Naamlabels voor monsters zijn hoofdlettergevoelig. Het naamlabel moet exact overeenkomen met het naamlabel dat is toegewezen in het runbestand.

Tabel 54. Naamlabels voor monsters voor analysesoftware	
Type monster	Standaard voorvoegsel (in analysesoftware)
Regulier monster	Niet standaard – door de gebruiker gedefinieerd
Negatieve controle	NC
Controle zonder template	NTC
Positieve controle (MG, 23S rRNA mutant type) (Pa)	Pa
Positieve controle (MG, 23S rRNA wildtype) (Pb)	Pb

Afbeelding 25. Monsters bewerken – Naamlabels toewijzen aan putjes

	1	2
A	Neg	Unk
	MgPa	MgPa
	23S	23S
	IC	IC
B	NC	Sample 1
	NTC	Unk
	MgPa	MgPa
	23S	23S
C	IC	IC
	NTC	Sample 2
	Pos	Unk
	MgPa	MgPa
D	23S	23S
	IC	IC
	PA	Sample 3
	Pos	Unk
	MgPa	MgPa
	23S	23S
	IC	IC
	PB	Sample 4

22.2 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 23** voor instructies voor het gebruik van de **ResistancePlus®** MG (CFX)-analysesoftware.

23 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 55** 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 55. ResistancePlus [®] MG analysesoftware		
Catalogusnr.	Analysesoftware*	Instrument voor realtime PCR
99003	ResistancePlus [®] MG (LC480)	LC480 II
99002	ResistancePlus [®] MG (7500)	7500 Fast en 7500 Fast Dx
99008	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.

23.1 FastFinder-platform – Minimale IT-vereisten

De analysesoftware is beschikbaar binnen het FastFinder-platform (<https://www.ugentec.com/fastfinder/analysis>). Het wordt aanbevolen dat klanten toegang krijgen tot het softwareplatform vanaf een veilig en vertrouwd netwerk en computer. De minimale IT-vereisten voor toegang tot en gebruik van het FastFinder-platform worden hieronder vermeld.

Hardwarevereisten

Internetverbinding kabel of DSL

Min. schermresolutie: 1366 x 768 pixels, optimaal 1920 x 1080 pixels of hoger

Ondersteunde browsers

- Microsoft Edge 88 of nieuwer
- Firefox 83 of nieuwer
- Google Chrome 88 of nieuwer.

Firewallvereisten

De volgende hosts moeten bereikbaar zijn via HTTPS (poort 443):

- *.ugentec.app
- *.fastfinder.app
- *.pendo.io
- *.fonts.gstatic.com
- *.googleapis.com
- *.msecnd.net
- *.visualstudio.com
- *.browser-update.org

*.blob.core.windows.net
 *.powerbi.com
 *.analysis.windows.net
 *.pbideidicated.windows.net
 *.content.powerapps.com

Indien nodig, moeten firewall-uitzonderingen worden geconfigureerd voor deze hosts. Om toegang te krijgen tot alle inhoud van in-app-gebruikershandleidingen, moet de host *.player.vimeo.com ook bereikbaar zijn.

Voor meer gedetailleerde instructies over het **FastFinder**-platform, raadpleeg de **FastFinder-gebruiksaanwijzing** die toegankelijk is via het menu **Support** (ondersteuning).

Om toegang te krijgen tot het menu Support (ondersteuning)

- Selecteert u Support (ondersteuning) in de lijst met menuopties in het paneel aan de linkerzijde
- Selecteert u **Download Instructions for Use here** (Hier instructies voor gebruik downloaden) in het gedeelte **User Documentation** (gebruikersdocumentatie)

Support

FastFinder

Lab Management v1.12.4
 Lab Engine v1.0.2
 Analysis v4.12.6

[Release notes](#) 9 Nov 2023
[Release notes](#) 9 Nov 2023
[Release notes](#) 9 Nov 2023

Ugentec NV, Kempische Steenweg 303/105, 3500 Hasselt, Belgium

Get support

Need help with FastFinder?

[Visit our knowledge base here](#)

[Send an email to tech@speedx.com.au](#)

[Visit our status page here](#)

User documentation

[Download Instructions For Use here](#)

[Get access to the Terms of Use and Data Privacy Agreement](#)

[Download licenses](#)

23.2 Testplug-in (nieuwe gebruiker)

Raadpleeg de **FastFinder-gebruiksaanwijzing** voor gedetailleerde instructies om testen in te stellen, toegankelijk via het menu **Support** (ondersteuning).

FastFinder is rechtstreeks toegankelijk via een webbrowser door in te loggen op <https://customer.fastfinder.app> met uw unieke gebruikersnaam en wachtwoord.

- Selecteer **Lab Configuration** (labconfiguratie) > **Assays** (testen) in het menu aan de linkerzijde
- Selecteer **Add New Assay** (nieuwe test toevoegen)
 - > Voor LC480 II > Selecteer **ResistancePlus MG (LC480)** uit de lijst
 - > Voor 7500 Fast en 7500 Fast Dx > Selecteer **ResistancePlus MG (7500)** uit de lijst
 - > Voor CFX96 Dx en CFX96 Touch > Selecteer **ResistancePlus MG (CFX)** uit de lijst
- Selecteer **Import Selected** (importeer het geselecteerde)

Om versies van de testplug-in te activeren of deactiveren

- > In het tabblad **General** (algemeen)
- > Navigeer naar de Status
- > Selecteer  **Active** om de versie van de test te activeren of deactiveren

23.3 Benaming monsters

Naamlabels voor monsters kunnen worden toegewezen aan een testplug-in om de detectie van putjes en het type monster voor analyse te automatiseren.

Selecteer Lab **Configuration** (labconfiguratie) > **Assays** (testen) in het menu aan de linkerkzijde

- Navigeer in het tabblad **General** (algemeen) naar de tabel met **Sample types** (type monsters), naamlabels (voorvoegsel) en selecteer  om een nieuw naamlabel toe te voegen
 - > Voeg het gewenste woord of acroniem of de gewenste letter toe aan het tekstvak
 - > Voor de controles worden standaard naamlabels geleverd. Deze kunnen worden verwijderd door de  naast het naamlabel te selecteren
- Wijs in de instrumentsoftware (vóór of nadat de run is voltooid) hetzelfde naamlabel toe aan de juiste putje
 - > Voor **LC480 II** zie **Paragraaf 19** voor instructies over het programmeren van naamlabels voor monsters in het runbestand
 - > Voor **7500 Fast** zie **Paragraaf 20** voor instructies over het programmeren van naamlabels voor monsters in het runbestand
 - > Voor **7500 Fast Dx** zie **Paragraaf 21** voor instructies over het programmeren van naamlabels voor monsters in het runbestand
 - > Voor **CFX96 Dx** en **CFX96 Touch** zie **Paragraaf 22** voor instructies over het programmeren van naamlabels voor monsters in het runbestand

Opmerking: Naamlabels voor monsters zijn hoofdlettergevoelig. Het naamlabel moet exact overeenkomen met het naamlabel dat is toegewezen in het runbestand.

23.4 Analyse

Om een nieuwe analyse te starten, selecteert u **Analyses** (analyses) in het menu aan de linkerkzijde

Selecteer **+ Create New Analysis** (maak een nieuwe analyse) vanuit de rechterbovenhoek van het scherm

Zoek naar het bestand dat moet worden geüpload voor analyse vanuit een gespecificeerde directory

- Selecteer run (data) file (selecteer (gegevens)bestand) uit de relevante map
 - > Selecteer **Open** (openen)

De analyse verschijnt in **Open Tab** (tabblad openen) als een nieuwe rij in de tabel

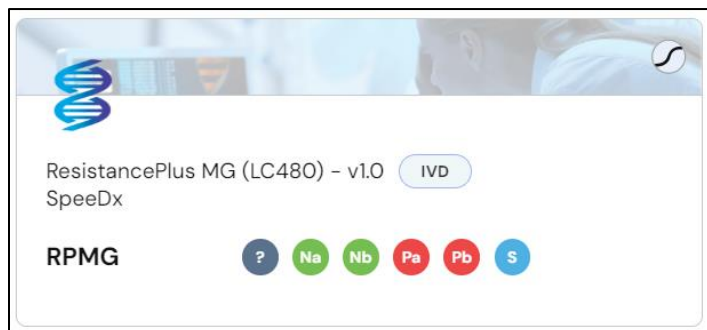
- Als alle naamlabels zijn aangebracht en correct zijn gelezen, wordt de status weergegeven als **Ready for review** (klaar voor beoordeling)
- Als de testinformatie handmatig aan de putjes moet worden toegewezen, wordt de status weergegeven als **Manual PCR setup required** (handmatige PCR-instelling vereist)

Wijs de testinformatie handmatig toe aan de plaat als de monsterbenaming niet is ingesteld in het menu Lab **Configuration** (labconfiguratie) > **Assays** (testen) of als de namen van de monsters/doelen niet zijn toegepast in de software van het instrument

Selecteer het runbestand via **Open tab** (tabblad openen) in het menu **Analyses** (analyses)

Voor de open analyse wordt de plaatconfiguratie weergegeven in het tabblad **PCR setup** (ssetup PCR)

- Voor **LC480 II** > Selecteer **ResistancePlus MG (LC480)**



- Voor **7500 Fast** en **7500 Fast Dx** > Selecteer **ResistancePlus MG (7500)**



- Voor **CFX96 Dx** en **CFX96 Touch** > Selecteer **ResistancePlus MG (CFX)**



- Selecteer putjes en wijs toe als volgt:
 - > Regulier Monster (S)
 - > Negatieve Controle (Na)
 - > Controle zonder template (Nb)
 - > Positieve Controle (MG 23S rRNA mutant) (Pa)
 - > Positieve Controle (MG 23S rRNA wildtype) (Pb)

Om putjes op de plaat toe te wijzen, kunt u het volgende doen:

- Klik en sleep de gekleurde symbolen om deze op de plaat te plaatsen
- Selecteer een of meerdere putjes (gebruik de toetsen Ctrl en Shift) en klik vervolgens op de relevante gekleurde symbolen om ze aan de selectie toe te wijzen.

[illegible]

- Selecteer **Analyze** (analyseren)

23.5 Resultaten

Zie **Tabel 57** voor een samenvatting van mogelijke gerapporteerde resultaten van de monsters

OPMERKING: Het wordt sterk aanbevolen om de amplificatiecurven voor alle positieve monsters te bevestigen.

23.5.1 Tabblad Samenvatting

Controleresultaten voor elke test worden linksboven in het tabblad Samenvatting weergegeven, zodat de validiteit van de controle voor de run kan worden geëvalueerd. Meer details zijn te vinden door dit blok te vergroten, zodat de details per controle worden weergegeven.

Control Results				
Filters Settings				
☒	!	Assay	Status	Info
See all assay details →				
☒		WT_MG	☒ Mut_MG	☒ NEG_MG
		VALID	VALID	VALID
M. genitalium	+ Detected	+ Detected	- Not detected	- Not detected
23S rRNA mutation	- Not detected	+ Detected	- Not detected	- Not detected

Als een controle ongeldig is, kunnen alle monsters als gefaald worden gemarkeerd door **Fail all samples for this assay** (alle monsters hebben de test gefaald) te selecteren

☐ Fail all samples for this assay

Failure reason 

Er moet een reden voor het falen worden gekozen uit het keuzemenu

Resultaten van de monsters worden linksonder in het tabblad Samenvatting weergegeven. Naast de header kunnen extra pictogrammen een algemeen overzicht van de analyseresultaten bieden en het totale aantal monsters aangeven dat overeenkomt met een bepaald pictogram.

-  • Containing an error notification
-  • Containing a warning notification
-  • Marked for retest
-  • Containing at least one detected assay result
-  • Containing at least one not detected assay result
-  • Containing at least one invalid assay result
-  • Containing at least one inconclusive assay result

Elk monster wordt weergegeven als een rij in de tabel met de resultaten van de monsters.

Sample Results

 1
 4
 1
 1

Filters | 

☐		Sample	Assay	Result
		Sample_MG	ResistancePlus MG (CFX)	Invalid: M. genitalium, 23S rRNA mutation
		Sample_MG	ResistancePlus MG (CFX)	Detected: M. genitalium
		Sample_MG	ResistancePlus MG (CFX)	Detected: M. genitalium, 23S rRNA mutation
		Sample_MG	ResistancePlus MG (CFX)	Detected: M. genitalium, 23S rRNA mutation
		Sample_MG	ResistancePlus MG (CFX)	Not detected

Het keuzemenu biedt meer details over elk doelresultaat en Cq per monster (raadpleeg de voorbeelden in **Paragraaf 23.10**)

Individuele monsters kunnen indien gewenst als gefaald worden gemarkeerd (bijvoorbeeld als het monster ongeldig is) door **Fail this sample for this assay** (dit monster heeft de test gefaald) te selecteren

☐ Fail this sample for this assay

Failure reason 

Er moet een reden voor het falen worden gekozen uit het keuzemenu

Fluorescentiegrafieken kunnen rechtsboven in het tabblad Samenvatting worden bekeken

Een lay-out van de plaat kan rechtsonder in het tabblad Samenvatting worden bekeken

Voorbeeldinformatie en waarschuwingmeldingen worden hieronder in **Tabel 56** samengevat.

Tabel 56. Voorbeeldinformatie en waarschuwingmeldingen voor de ResistancePlus® MG analysesoftware*		
Type monster	Fout	Melding
Meldingen testdoelen		
Regulier monster	Ongeldig – IC-fout	Waarschuwing: IC ongeldig. Opnieuw extraheren en het monster opnieuw testen.
	Geldig maar controle ongeldig – Ongeldige controlewaarschuwing voor een regulier monster met een geldig resultaat	Waarschuwing: Ongeldige controle aanwezig. Opnieuw extraheren en het monster opnieuw testen.
Negatieve controle	Ongeldig – Besmetting	Waarschuwing: Mogelijke besmetting gedetecteerd
Template zonder controle		
Meldingen gendoelen		
Regulier monster	Doel Cq buiten cut-off	Informatie: Cq buiten de cut-off
Positieve controle	Ongeldig – Doel niet gedetecteerd	Waarschuwing: Verwachte reactie vond niet plaats in de controle.
Negatieve controle	Ongeldig – Besmetting	Waarschuwing: Mogelijke besmetting
	Ongeldig – IC niet gedetecteerd	Waarschuwing: IC niet gedetecteerd
	Ongeldig – IC Cq buiten de cut-off	Waarschuwing: Cq buiten cut-off
Template zonder controle	Ongeldig - Besmetting	Waarschuwing: Mogelijke besmetting
Regulier monster of controle	Onzeker fluorescentiesignaal	Waarschuwing: Onzeker fluorescentiesignaal. Beoordeling vereist.
	Cq gedetecteerd met lage fluorescentie	dRn einde fluorescentie onder de cut-off

*De hier vermelde voorbeelden zijn mogelijk niet van toepassing op alle testplug-ins. Raadpleeg de FastFinder-gebruiksaanwijzing voor alle mogelijke meldingen, toegankelijk via het menu Support (ondersteuning)

23.5.2 Tabblad Details

Alle doelen worden voor elk monster weergegeven als afzonderlijke rijen in de tabel aan de linkerkant. Door een of meer rijen te selecteren, worden de bijbehorende fluorescentiecurven weergegeven in de grafiek rechtsboven en worden ook de putjes in de plaatindeling rechtsonder gemarkeerd.

Selecteer **Filters** (filters) om resultaten weer te geven op basis van parameters zoals de naam van de test, het type monster, het doel en het resultaat.

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

- > Selecteer **Authorize** (autoriseren)
- > Selecteer **Authorize** (autoriseren) opnieuw om te bevestigen
- Een tweede beoordeling toewijzen
 - > Selecteer **Actions** (acties), **Assign label** (label toewijzen) en **Second Review** (tweede beoordeling)
- Om de analyse aan een andere gebruiker toe te wijzen
 - > Selecteer **Actions** (acties) en **Assign User** (gebruiker toewijzen)
 - > Selecteer de juiste gebruiker uit het keuzemenu
- Om de analyse af te wijzen
 - > Selecteer **Actions** (acties) en **Discard Analysis** (verwijder analyse)
 - > Voeg een opmerking toe en selecteer **Discard** (verwijderen) om te bevestigen

23.6 Referentiecurve

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

- Selecteer het gewenste monster in het tabblad **Summary** (samenvatting) of **Details** (details)
- Vanuit het menu van de versterkingsgrafiek > Selecteer 
 - > Selecteer het selectievakje voor de gewenste curve en selecteer **Mark as reference** (markeren als referentie)

Deze referentiecurve wordt nu gekoppeld aan de test in het menu **Lab Configuration** (labconfiguratie) > **Assays** (testen) binnen het tabblad **PCR** en kan op elk gewenst moment worden gedeactiveerd.

23.7 Resultaten exporteren

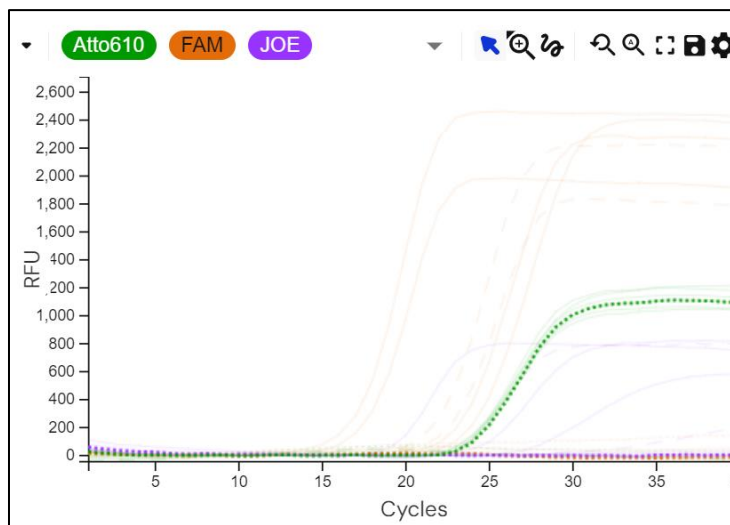
- Om resultaten van een individuele geautoriseerde run te exporteren als een CSV- of pdf-bestand:
 - > Selecteer **Actions** (acties) > **Downloads** (downloads) in de rechterbovenhoek
 - > Selecteer een van de volgende rapporttypen: **Analysis** (analyse) (**CSV**) of **Analysis** (analyse) (**pdf**)
- Om resultaten van meerdere eerder geautoriseerde runs te exporteren als één CSV-bestand:
 - > Navigeer naar het menu **Archive** (archief) > **Sample Results** (resultaten monsters)
 - > Gebruik de filters bovenaan de pagina om de betreffende resultaten weer te geven (het CSV-bestand is beperkt tot maximaal 10.000 resultaten)
 - > Selecteer **Export CSV** (exporteer CSV) in de rechterbovenhoek

23.8 Geautoriseerde analyses ophalen

- Alle geautoriseerde analyses zijn beschikbaar door **Archive** (archief) > **Analysis Results** (analyseresultaten) te selecteren. Selecteer een rij om terug te keren naar het resultatenoverzicht voor die specifieke analyse
- Alle geautoriseerde reguliere monsters worden opgeslagen in het menu **Archive** (archief) > **Sample Results** (resultaten monsters). Als u een monster selecteert, wordt aanvullende informatie weergegeven, waaronder de analysenaam en de details van de resultaten
- De individuele doelresultaten voor alle geautoriseerde reguliere monsters en controles worden opgeslagen in het menu **Archive** (archief) > **Target Results** (resultaten doelen). Als u een doel selecteert, wordt dit gemarkeerd op de fluorescentiegrafiek. Als u de analysenaam selecteert, keert u terug naar het resultatenoverzicht voor die specifieke analyse.

23.9 Voorbeeldgrafieken controles

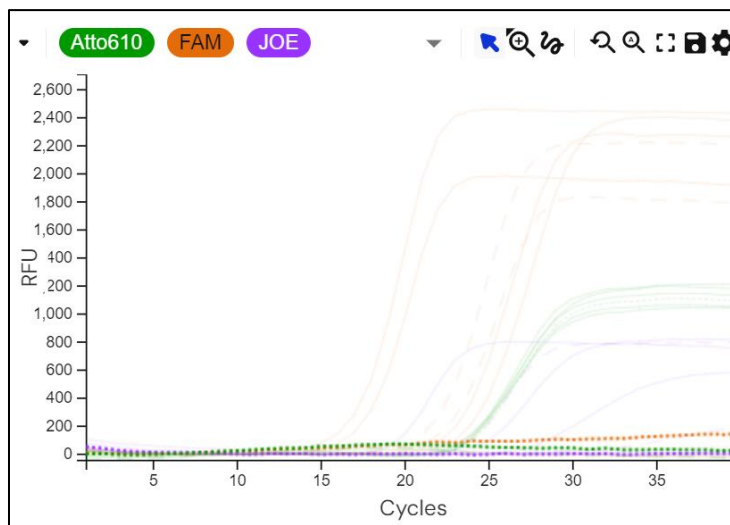
De volgende voorbeelden tonen de amplificatiecurven (amplificatiecurven gecorrigeerd voor de uitgangswaarde) en het resultatenoverzicht van de **ResistancePlus MG (LC480)**-analysesoftware voor het monstertype controle

23.9.1 *M. genitalium* negatieve controle (Na) (negatief monster)

IC MgPa 23S rRNA-mutatie

Monster	Test	Resultaat
Na	ResistancePlus MG (LC480)	Geldig
M. genitalium ⊖ Not detected 23S rRNA mutation ⊖ Not detected		

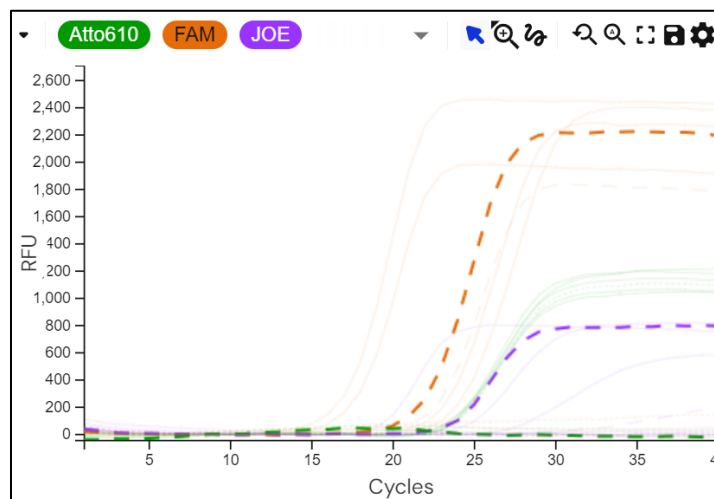
23.9.2 Controle zonder template (Nb)



IC MgPa 23S rRNA-mutatie

Monster	Test	Resultaat
Nb	ResistancePlus MG (LC480)	Geldig
	M. genitalium	⊖ Not detected
	23S rRNA mutation	⊖ Not detected

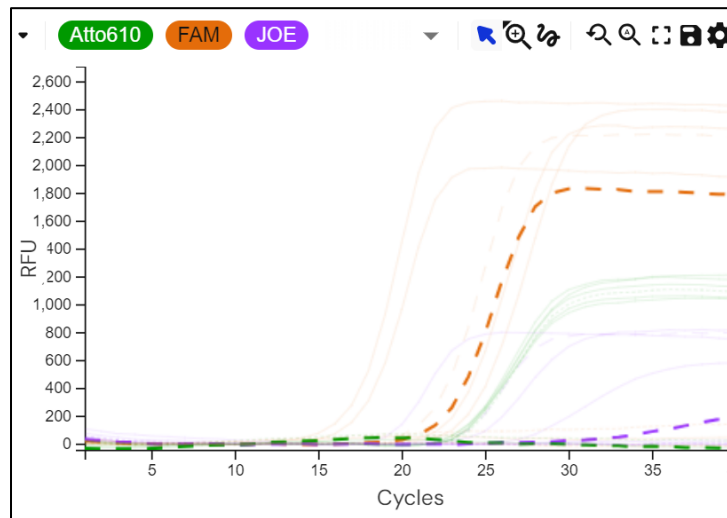
23.9.3 M. genitalium, 23S rRNA mutant controle (Pa)



IC MgPa 23S rRNA-mutatie

Monster	Test	Resultaat
Pa	ResistancePlus MG (LC480)	Geldig
M. genitalium ⊕ Detected 23S rRNA mutation ⊕ Detected		

23.9.4 *M. genitalium*, 23S rRNA wildtype controle (Pb)



IC MgPa 23S rRNA mutatie

Monster	Test	Resultaat
Pb	ResistancePlus MG (LC480)	Geldig
M. genitalium ⊕ Detected 23S rRNA mutation ⊖ Not detected		

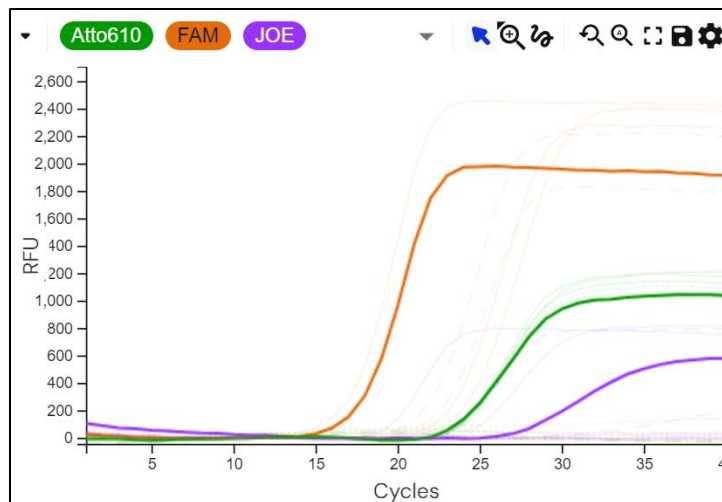
23.10 Voorbeelden

Voorbeeldresultaten voor de **ResistancePlus®** MG-analysesoftware worden weergegeven in **Tabel 57**.

Tabel 57. Voorbeeldresultaten voor interpretatie van ResistancePlus® MG-analysesoftware			
	Monster	Test	Resultaat
	Monster 101	ResistancePlus MG (LC480)	Niet gedetecteerd
	Monster 102	ResistancePlus MG (LC480)	Gedetecteerd: M. genitalium
	Monster 103	ResistancePlus MG (LC480)	Gedetecteerd: M. genitalium, 23S rRNA-mutatie
¹	Monster 104	ResistancePlus MG (LC480)	Ongeldig: M. genitalium, 23S rRNA-mutatie

¹ Een monster dat als ongeldig wordt geïnterpreteerd, wordt gemarkeerd met  Waarschuwing: IC ongeldig. Extraheer opnieuw en test het monster opnieuw.

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



IC MgPa 23S rRNA-mutatie

Monster	Test	Resultaat
Monster 105	ResistancePlus MG (LC480)	Gedetecteerd: M. genitalium

Assay results

- M. genitalium  Detected
- 23S rRNA mut...  Not detected

MgPa

↳ A2  Detected 17.451

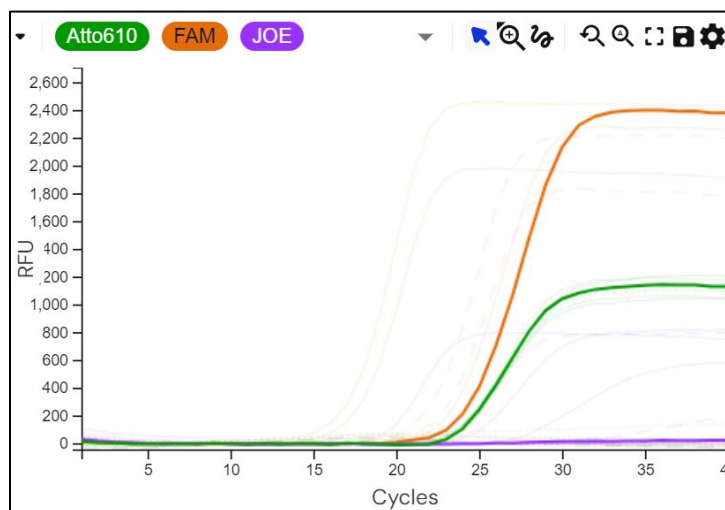
23S rRNA mutation

↳ A2  Detected 27.229

IC

↳ A2  Detected 23.307

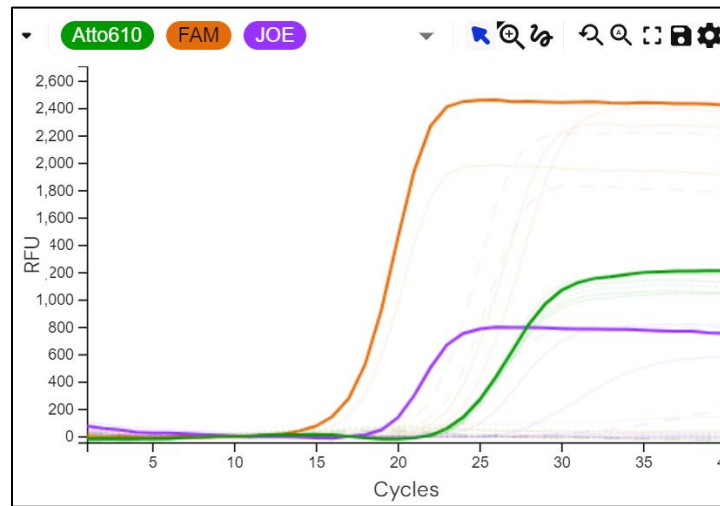
23.10.2 Voorbeeld 2. Low copy *M. genitalium*, 23S rRNA wildtype monster



IC MgPa 23S rRNA-mutatie

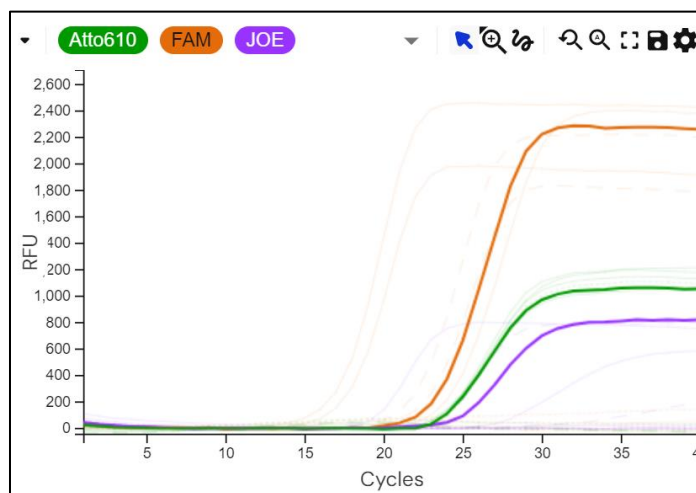
Monster	Test	Resultaat
Monster 106	ResistancePlus MG (LC480)	Gedetecteerd: M. genitalium
Assay results M. genitalium ⊕ Detected 23S rRNA mut... ⊖ Not detected MgPa ↳ F2 ● Detected 24.094 23S rRNA mutation ↳ F2 ● Not detected IC ↳ F2 ● Detected 23.587		

23.10.3 Voorbeeld 3. High copy *M. genitalium*, 23S rRNA mutant monster



IC MgPa 23S rRNA-mutatie

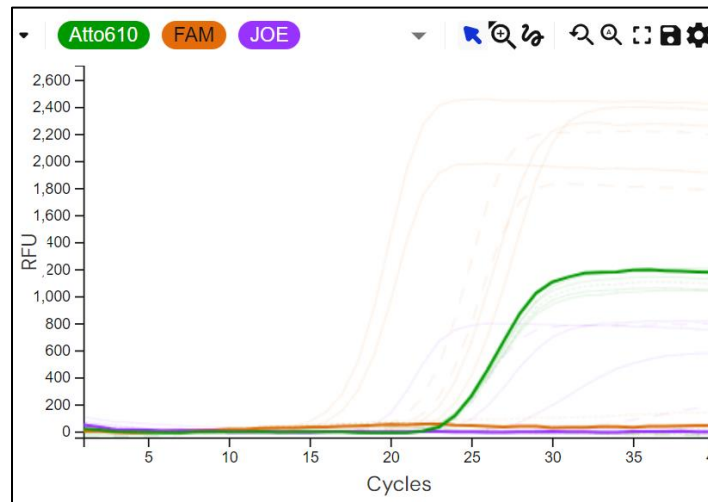
Monster	Test	Resultaat
Monster 107	ResistancePlus MG (LC480)	Gedetecteerd: M. genitalium, 23S rRNA-mutatie
Assay results M. genitalium ⊕ Detected 23S rRNA mut... ⊕ Detected MgPa ↳ D2 • Detected 16.767 23S rRNA mutation ↳ D2 • Detected 19.125 IC ↳ D2 • Detected 23.421		

23.10.4 Voorbeeld 4. Low copy *M. genitalium*, 23S rRNA mutant monster

IC MgPa 23S rRNA-mutatie

Monster	Test	Resultaat
Monster 108	ResistancePlus MG (LC480)	Gedetecteerd: <i>M. genitalium</i> , 23S rRNA-mutatie
Assay results M. genitalium + Detected 23S rRNA mut... + Detected MgPa L> C2 • Detected 23.191 23S rRNA mutation L> C2 • Detected 24.539 IC L> C2 • Detected 23.528		

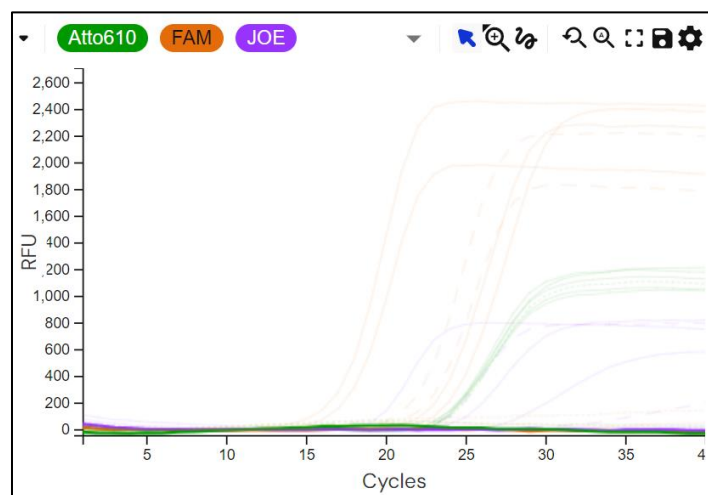
23.10.5 Voorbeeld 5. Negatief monster



IC MgPa 23S rRNA-mutatie

Monster	Test	Resultaat
Monster 109	ResistancePlus MG (LC480)	Niet gedetecteerd
Assay results M. genitalium ⊖ Not detected 23S rRNA mut... ⊖ Not detected MgPa ↳ E2 ● Not detected ▾ 23S rRNA mutation ↳ E2 ● Not detected ▾ IC ↳ E2 ● Detected ▾ 23.583		

23.10.6 Voorbeeld 6. Ongeldig monster



IC MgPa 23S rRNA-mutatie

Monster	Test	Resultaat
Monster 110	ResistancePlus MG (LC480)	Ongeldig: M. genitalium, 23S rRNA-mutatie

Assay results

M. genitalium	 Invalid	Warning: IC invalid. Re-extract and re-test sample.
23S rRNA mut...	 Invalid	Warning: IC invalid. Re-extract and re-test sample.

MgPa

↳ B2 ● Not detected ▼

23S rRNA mutation

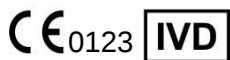
↳ B2 ● Not detected ▼

IC

↳ B2 ● Not detected ▼

In dit voorbeeld is de IC niet versterkt en daarom niet gedetecteerd. Voor monsters die IC-ongeldig zijn, extraheer het monster opnieuw en herhaal de test.

24 Woordenlijst



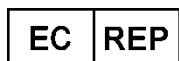
Europese conformiteit
Voor *in-vitro* diagnostiek



Catalogusnummer



Batchcode



Geautoriseerde vertegenwoordiger
In de Europese Gemeenschap



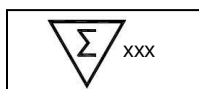
Fabrikant



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 2025 SpeedX Pty. Ltd.