



Hybrid Capture<sup>®</sup> 2

CT-ID DNA Test

Gebruiksaanwijzing

## **digene<sup>®</sup> HC2 CT-ID DNA Test**

Een *in-vitro* nucleïnezuur-hybridisatie-assay met signaalversterking gebruikmakend van microtiterplaat-chemiluminescentie voor de kwalitatieve detectie van DNA van *Chlamydia trachomatis* (CT) in cervicale monsters.

Voor gebruik met:

digene<sup>®</sup> HC2 DNA Collection Device  
digene<sup>®</sup> Female Swab Specimen Collection Kit  
Hologic PreservCyt<sup>®</sup> Solution

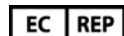
### **BELANGRIJKSTE VERANDERINGEN TEN OPZICHTE VAN DE VORIGE BIJGEWERKTE BIJSLUITER**

1. Bijgewerkte product branding
2. Bijgewerkt CE-registratienummer
3. Verwijderde reflex-test referenties en gegevens.

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



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



QIAGEN GmbH  
QIAGEN Str. 1  
D-40724 Hilden  
Germany

©2011 QIAGEN



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

0197

IVD



96

REF 5135-1330

L2171NL Rev. 3

# INHOUDSOPGAVE

<b>NAAM EN BEOOGD GEBRUIK</b> .....	<b>1</b>
<b>SAMENVATTING EN UITLEG</b> .....	<b>1</b>
<b>PRINCIPE VAN DE PROCEDURE</b> .....	<b>2</b>
<b>BIJGELEVERDE REAGENTIA EN MATERIALEN</b> .....	<b>3</b>
<b>BENODIGDE, MAAR NIET BIJGELEVERDE MATERIALEN</b> .....	<b>4</b>
<b>WAARSCHUWINGEN EN VOORZORGSMATREGELEN</b> .....	<b>5</b>
VEILIGHEIDSMATREGELEN .....	5
INFORMATIE OVER VEILIGHEIDS- EN GEZONDHEIDSRISICO'S .....	6
VOORZORGSMATREGELEN BIJ DE VERWERKING .....	6
<b>BEREIDING EN OPSLAG VAN REAGENTIA</b> .....	<b>7</b>
<b>AFNAME EN BEHANDELING VAN MONSTERS</b> .....	<b>10</b>
CERVICALE MONSTERS IN <i>digene</i> STM .....	10
CERVICALE MONSTERS IN HOLOGIC PRESERVCYT SOLUTION.....	11
<b>TESTPROCEDURE</b> .....	<b>11</b>
HOOGVOLUME-MONSTERVERWERKINGSTESTS MET BEHULP VAN HET RAPID CAPTURE SYSTEM .....	11
HANDMATIGE METHODE .....	11
DENATURATIE .....	12
Bereidingsprocedure van kalibrators, kwaliteitscontroles en STM-monsters .....	13
Bereidingsprocedure voor monsters in PreservCyt solution.....	14
Facultatief stoppunt.....	17
HYBRIDISATIE .....	17
HYBRIDECAPTURE .....	19
HYBRIDEDETECTIE .....	19
WASSEN.....	20
SIGNAALAMPLIFICATIE .....	21
<b>VERIFICATIECRITERIA VOOR DE TESTKALIBRATIE</b> .....	<b>22</b>
<b>GRENSWAARDEBEREKENING</b> .....	<b>23</b>
<b>KWALITEITSCONTROLE</b> .....	<b>24</b>
<b>INTERPRETATIE VAN MONSTERRESULTATEN</b> .....	<b>24</b>
<b>BEPERKINGEN VAN DE PROCEDURE</b> .....	<b>25</b>
<b>VERWACHTE RESULTATEN</b> .....	<b>26</b>
PREVALENTIE .....	26
POSITIEF EN NEGATIEF VOORSPELLENDE WAARDEN .....	26
FREQUENTIEDISTRIBUTIE: <i>digene</i> HC2 CT-ID DNA TEST RLU/CO RESULTATEN .....	27
<b>WERKINGSEIGENSCHAPPEN</b> .....	<b>27</b>
RESULTATEN VAN KLINISCH ONDERZOEK PER MONSTER.....	27
REPRODUCEERBAARHEID.....	31
NAUWKEURIGHEID.....	33
Nauwkeurigheid bij PreservCyt-monsters.....	34
ANALYTISCHE GEVOELIGHEID.....	36
Aanvullende opmerkingen bij monsters in PreservCyt solution.....	37
ANALYTISCHE SPECIFICITEIT.....	38
EFFECT VAN BLOED EN ANDERE STOFFEN OP STM-MONSTERS.....	40
EFFECT VAN BLOED EN ANDERE STOFFEN OP MONSTERS IN PRESERVCYT SOLUTION.....	40
PRECISIE AAN DE ASSAYGRENS VAN DE <i>digene</i> HC2 CT-ID DNA TEST BEPAALD AAN KLINISCHE MONSTERS AFGENOMEN IN STM .....	40
HISTORISCHE INFORMATIE .....	42
EQUIVALENTIE TUSSEN MONSTERS IN STM EN PRESERVCYT SOLUTION .....	43
<b>REFERENTIES</b> .....	<b>44</b>

<b>PROBLEMEN OPLOSSEN .....</b>	<b>46</b>
<b>CONTAMINATIECONTROLE .....</b>	<b>51</b>
<b>QIAGEN CONTACTINFORMATIE .....</b>	<b>52</b>
<b>SAMENVATTING VAN <i>digene</i> HC2 CT-ID DNA TEST .....</b>	<b>53</b>

## NAAM EN BEOOGD GEBRUIK

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

Voor hoogvolumemonster-verwerkingstests kan de *digene* HC2 CT-ID DNA Test worden uitgevoerd met behulp van de Rapid Capture<sup>®</sup> System (RCS).

Voor *in-vitro*diagnostiek

IVD

## SAMENVATTING EN UITLEG

Chlamydiae zijn Gram-negatieve organismen met een twee-fasen levenscyclus die bestaat uit morfologisch te onderscheiden besmettelijke en reproductieve vormen.<sup>1</sup> Het *Chlamydia trachomatis* genoom is relatief klein, ter grootte van ongeveer  $1 \times 10^6$  baseparen (bp).<sup>2</sup> De besmettelijke vorm is een elementair lichaam dat niet kan delen en alleen dient om de infectie van de ene cel naar een andere te voeren. Zodra zij zich in een gastheercel bevinden, verzamelen elementaire lichamen zich in membraangebonden vacuolen om de metabolisch actieve Chlamydia-reproductieve vormen, of reticulaire lichamen, te produceren. Replicatie is volledig afhankelijk van gastheer-ATP<sup>3</sup> en wordt bereikt door binaire deling binnen de refractieve cytoplasmatische inclusies, waardoor een nieuwe generatie van elementaire lichamen wordt geproduceerd die daarna worden vrijgegeven om andere cellen te infecteren. Chlamydiae hebben een membraan-gebonden, genus-specifiek lipopolysaccharide dat heeft gediend als antigeenbron voor de productie van diagnostische antilichamen.

Tot de conventionele methoden voor de rechtstreekse detectie van *Chlamydia trachomatis* in klinische monsters behoren jodium- of Giemsa-kleuring van het organisme gevolgd door microscopische evaluatie<sup>4</sup> of het gevoeliger gebruik van direct fluorescerende antilichaam (DFA)-kleuring.<sup>5</sup> Deze methoden benaderen echter slechts 70-85% gevoeligheid in vergelijking met optimale weefselkweektechnieken.<sup>6</sup> De meest geaccepteerde procedure voor Chlamydia-detectie is de infectie van McCoy-cellen in cellenkweek. Fluoresceïne-geconjugeerde antilichamen worden dan gebruikt voor het detecteren van intracytoplasmische inclusielichamen gecreëerd door chlamydiaal reproductieve elementen in de geïnfecteerde cellen.<sup>7</sup> Optimale cellenkweek heeft uitstekende gevoeligheid en specificiteit voor de detectie van Chlamydiae, maar is een complexe, kostbare en tijdrovende procedure. De resultaten zijn over het algemeen pas na 48-72 uur post-inoculatie beschikbaar.<sup>8</sup> Enzymimmuno-assays worden ook gebruikt voor het detecteren van Chlamydia-antigenen<sup>6</sup> en lijken iets gevoeliger en iets minder specifiek dan directe fluorescentie-antilichaambenaderingen.<sup>9</sup> Nucleïnezuurtests zijn ook verkrijgbaar voor het detecteren van een verscheidenheid aan Chlamydia-targets, waaronder chromosomaal DNA, mRNA en de cryptoplasmide die veel voorkomt bij de grote meerderheid van *Chlamydia trachomatis*-stammen. Deze methoden variëren in gevoeligheid en specificiteit, maar benaderen of overschrijden over het algemeen de prestatie van kweekmethoden.<sup>10-12</sup>

## PRINCIPE VAN DE PROCEDURE

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

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

De CT probe bevat een Probe Mix specifiek gekozen voor het elimineren of minimaliseren van kruis-reactiviteit met DNA-sequenties van humane cellen, andere bacteriële species of Chlamydia-species anders dan *Chlamydia trachomatis*. De met de *digene* HC2 CT-ID DNA Test geleverde CT Probe is complementair aan ongeveer 39.300 bp of 4% van de genoom-DNA van Chlamydia ( $1 \times 10^6$  bp).<sup>3</sup> Eén probe is complementair aan 100% van de cryptoplasmide van 7.500 bp.

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

## BIJGELEVERDE REAGENTIA EN MATERIALEN

Er zitten 96 tests in één *digene* HC2 CT-ID DNA Test-kit (REF 5135-1330). Het aantal patiëntenresultaten zal verschillen, afhankelijk van het aantal keren dat een kit wordt gebruikt:

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

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

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

## BENODIGDE, MAAR NIET BIJGELEVERDE MATERIALEN

### In-vitro diagnostische apparatuur en accessoires voor Hybrid Capture System<sup>A</sup>

<p><i>digene</i> Hybrid Capture 2 systeem ("digene HC2 systeem"), samengesteld uit een door QIAGEN goedgekeurde luminometer ("luminometer"), door QIAGEN goedgekeurde persoonlijke computer en computer-randapparatuur (monitor, klavier, muis, printer en printerkabel), <i>digene</i> HC2 systeemsoftware ("digene assay analys software"), <i>digene</i> HC2 systeem assay protocollen voor CT/GC, LumiCheck Plate software, en <i>digene</i> HC2 systeemsoftware gebruikershandleiding</p> <p>Hybrid Capture System Rotary Shaker I (Hybrid Capture System roterend schudapparaat I)</p> <p>Hybrid Capture System Microplate Heater I (Hybrid Capture System microtiterplaatverwarmer I)</p> <p>Hybrid Capture System Automated Plate Washer (Hybrid Capture System automatische plaatwasser)</p> <p>Hybrid Capture System Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2 (optioneel)</p> <p>Conversierek en rekdeksel (optioneel voor handmatig gebruik; vereist bij gebruik van het Rapid Capture systeem met de <i>digene</i> HC2 CT-ID DNA test en PreservCyt monsters)</p> <p><i>digene</i> Monsterrek en rekdeksel (optioneel voor handmatig gebruik (vereist bij gebruik van het Rapid Capture systeem met de <i>digene</i> HC2 CT-ID DNA test en <i>digene</i> HC2 monsters afgenomen met het <i>digene</i> HC2 DNA Collection Device))</p> <p>EXPAND-4 Pipettor en standaard (optioneel)<sup>C</sup></p> <p><i>digene</i> HC2 DNA Collection Device<sup>D</sup></p> <p><i>digene</i> Female Swab Specimen Collection Kit (bestaat uit 2 swabs en <i>digene</i> Monster Transport Medium)<sup>D</sup></p> <p>Dispenser en snij-apparaat voor afdekfolie (voor gebruik met de MST Vortexer)</p>	<p>Rapid Capture<sup>®</sup> System (optioneel voor hoogvolume-monsterverwerkingstests)<sup>E</sup></p> <p>Wasapparatuur</p> <p>Hybridisatie-microtiterplaten</p> <p>Deksels voor microtiterplaat</p> <p>Leg microtiterplaatstrips (verkrijgbaar bij Costar, Model #2581); optioneel voor gebruik met de automatische plaatwasser I</p> <p>Extra lange pipetpunten voor het verwijderen van monsters</p> <p>Afnamebuizen</p> <p>Rek voor afnamebuizen</p> <p>Schroefdoppen voor afnamebuizen</p> <p>Wegwerpreservoirs voor reagentia</p> <p>DuraSeal<sup>®</sup>-afdekfolie</p>
--	---

### Algemene laboratoriumapparatuur en accessoires

65 ± 2 °C waterbad van geschikt formaat voor ofwel één MST Vortexer Rack (36 x 21 x 9 cm) of twee *digene* monsterrekken (elk 31,7 x 15,2 x 6,4 cm)

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

Vortex mixer met cupbevestiging

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

Repeterende positieve-verplaatsingspipet, zoals Eppendorf Repeater Pipette of gelijkwaardig

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

Timer

Natriumhypochlorietoplossing 0,5% finale concentratie (van huishoudchlor)

Parafilm<sup>®</sup> of gelijkwaardig

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

Wegwerppunten voor Eppendorf Repeater Pipette (25 en 500 µl)

Wegwerppunten voor 8-kanaalspipet (25 tot 200 µl)

Kimtowels<sup>®</sup> tissues of gelijkwaardig pluisarm keukenpapier

Wegwerptafelfilterpapier

Poedervrije handschoenen

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

2,0 ml polypropyleen microcentrifugebuizen met dop

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

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

Serologische pipetten of transferpipetten van 5 ml

*digene* HC2 Sample Conversion Kit<sup>A</sup>

Wegwerptips voor Eppendorf Repeater Pipette (50 en 100 µl)

#### Handmatige vortexprocedure:

*digene* HC2 Sample Conversion Tubes (15 ml conisch)<sup>F</sup>, conische buizen met dop van het merk Sarstedt van 10 ml of centrifugebuizen van 15 ml van het merk VWR<sup>®</sup> of Corning<sup>®</sup> van polypropyleen met conische bodem en dop

Buisrek voor conische buizen van 10 ml of 15 ml

#### Voor Multi-Specimen Tube Vortexer 2 Procedure

*digene* HC2 Sample Conversion Tubes (15-ml conisch)<sup>F</sup>

Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2

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

Dispenser en snij-apparaat voor afdekfolie

DuraSeal Tube Sealer afdekfolie (wordt gebruikt bij de MST Vortexer 2)

<sup>A</sup> Bij QIAGEN zijn alleen apparatuur en accessoires gevalideerd met de *digene* HC2 CT-ID DNA Tests verkrijgbaar.

<sup>B</sup> Ook noodzakelijk voor gebruik bij uitvoeren van de semi-automatische RCS toepassing.

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

## WAARSCHUWINGEN EN VOORZORGSMAATREGELEN

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

### VEILIGHEIDSMATREGELEN

ALLE MONSTERS dienen als potentieel besmettelijk te worden beschouwd. Er bestaat geen enkele testmethode die volledige garantie kan bieden dat een monster geen infectie kan overbrengen. Het verdient aanbeveling om monsters van menselijke oorsprong te behandelen overeenkomstig de toepasselijke nationale/plaatselijke werkpraktijk betreffende de bioveiligheid.<sup>13,14,15,16</sup> Pas deze werkwijze met het oog op bioveiligheid toe bij materialen die besmettelijke stoffen bevatten of waarvan vermoed wordt dat zij die bevatten. Deze voorzorgsmaatregelen omvatten, maar zijn niet beperkt tot, de volgende punten:

1. Niet met de mond pipetteren.
2. Rook, eet of drink niet in ruimten waar reagentia of monsters worden gehanteerd.
3. Draag poedervrije wegwerphandschoenen bij het hanteren van reagentia of monsters. Was uw handen grondig na het verrichten van de test.
4. Reinig en desinfecteer alle gemorste hoeveelheden met behulp van een tuberculocide desinfectans zoals 0,5% v/v natriumhypochloriet of een ander geschikt desinfectans.<sup>17,18</sup>
5. Ontsmet alle monsters, reagentia en andere potentieel verontreinigde materialen en voer ze af volgens de nationale en plaatselijke voorschriften.<sup>19,20</sup>

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



## INFORMATIE OVER VEILIGHEIDS- EN GEZONDHEIDSRISICO'S

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



T

### Wasbufferconcentraat. Bevat natriumazide: Giftig (Toxic - T)

R25: Giftig bij opname door de mond.

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

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

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



C

### Denaturatiereagens. Bevat natriumhydroxide: Bijtend (Corrosive - C)

R35: Veroorzaakt ernstige brandwonden.

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

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

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



Xi

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

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

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

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

## 24-UUR INFORMATIE VOOR NOODGEVALLEN


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

#### ANTIGIFCENTRUM MAINZ, DUITSLAND

TEL: +49-6131-19240


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

## VOORZORGSMATREGELEN BIJ DE VERWERKING

1. Voor *in-vitro*diagnostiek.
2. Cervicale borstel uitsluitend voor gebruik bij niet-zwangere vrouwen.
3. De reagentia mogen niet worden gebruikt na de op het etiket van de buitenverpakking naast het symbool  vermelde houdbaarheidsdatum.
4. Het verrichten van de test buiten de vastgestelde tijd- en temperatuurbereiken kan ongeldige resultaten opleveren. Assays die niet binnen de vastgestelde tijd- en temperatuurbereiken vallen zijn ongeldig en moeten worden herhaald.
5. Om betrouwbare testresultaten te verkrijgen moeten de *digene* HC2 CT-ID DNA Test-procedure, verificatiecriteria voor de testkalibratie, kwaliteitscontrole en de interpretatie van de testresultaten nauwgezet worden gevolgd.

6. Het is belangrijk om exact het aangegeven volume reagens te pipetteren en na toevoeging van elk reagens goed te mengen. Het nalaten hiervan zou kunnen leiden tot onjuiste testresultaten. Door te controleren of de gemelde kleurveranderingen optreden, kan men bevestigen dat aan deze voorwaarden is voldaan.
7. Deze componenten zijn als eenheid getest. De onderdelen **mogen niet** worden verwisseld met die van andere bronnen of van andere partijen.
8. Nucleïnezuren zijn zeer gevoelig voor nuclease-afbraak in het milieu. Nucleases komen voor op de menselijke huid en op oppervlakken of materialen die door mensen zijn aangeraakt. Reinig werkoppervlakken en dek ze af met wegwerptafelfiltreerpapier **en draag bij het verrichten van alle assaystappen poedervrije handschoenen.**
9. Voorzichtigheid is geboden om contaminatie van de gecoate microtiterplaat en detectiereagens 2 met exogene alkalische fosfatase te voorkomen tijdens het uitvoeren van de test. Stoffen die alkalische fosfatase kunnen bevatten zijn o.a. detectiereagens 1, bacteriën, speeksel, haar en huidoliën. **Het afdekken van de gecoate microtiterplaat is vooral belangrijk na de wasfase en tijdens de incubatie met detectiereagens 2, aangezien exogene alkalische fosfatase kan reageren met detectiereagens 2 hetgeen fout-positieve resultaten kan opleveren.**
10. Bescherm detectiereagens 2 tegen langdurige blootstelling aan direct licht. Gebruik het reagens onmiddellijk na de aliquotverdeling en vermijd direct zonlicht.
11. De herhalingspipet moet vóór het toedienen van reagens worden gevuld en periodiek op grote luchtbellens worden gecontroleerd. Excessieve hoeveelheden grote luchtbellens in de punt van de herhalingspipet kunnen onnauwkeurige afgifte veroorzaken, wat kan worden vermeden door de pipet te vullen, alle vloeistof uit te pipetteren en opnieuw te vullen. Raadpleeg de gebruikshandleidingen voor de pipet voor specifieke richtlijnen voor gebruik.
12. Pipetteren met de meerkanaalspipet moet geschieden met de “reverse” pipetteertechniek (zie *Hybridedetectie*) voor het doseren van detectiereagens 1 en 2. Controleer of alle pipetpunten van de meerkanaalspipet goed zitten en goed gevuld zijn. Raadpleeg de specifieke gebruikshandleiding.
13. Zorg dat alle microwells grondig gespoeld worden volgens de aanbevelingen in de instructies voor het wassen met de hand. Een ontoereikende spoeling zal leiden tot een verhoogde achtergrond en kan fout-positieve resultaten opleveren. Restanten van wasbuffer in de wells kunnen leiden tot een verminderd signaal of een slechte reproduceerbaarheid.
14. Wacht ten minste 60 minuten totdat Microplate Heater I vanuit een koude start is geëquilibreerd tot  $65\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ . Als deze opwarmperiode wordt overgeslagen zou de hybridisatie-microtiterplaat kunnen smelten. Zie de gebruikshandleiding van Microplate Heater I voor bijzonderheden.

## **BEREIDING EN OPSLAG VAN REAGENTIA**

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

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

## Methode voor het bereiden van reagens

<p><b>Denaturatiereagens</b></p>	<p><b>EERST BEREIDEN:</b> Voeg 5 druppels indicatorkleurstof toe aan het flesje denaturatiereagens en meng grondig. Het denaturatiereagens moet een uniforme, donkerpaarse kleur hebben.</p> <p>Na het bereiden blijft het denaturatiereagens gedurende drie maanden stabiel, als het wordt bewaard bij een temperatuur van 2-8 °C. Label het met de nieuwe houdbaarheidsdatum. Als de kleur verbleekt, 5 druppels indicatorvloeistof toevoegen en grondig mengen vóór gebruik.</p> <p><b>Waarschuwing:</b> Het denaturatiereagens is bijtend. Draag geschikte beschermende kleding, handschoenen, oog-/gezichtsbescherming. Wees voorzichtig bij hantering.</p>																		
<p><b>CT Probe Mix (bereid uit CT Probe en probe-verdunningsmiddel reagentia)</b></p>	<p><b>BEREIDEN TIJDENS DE INCUBATIE VAN DE MONSTERDENATURATIE:</b></p> <p><b>BELANGRIJK: SOMS KAN DE PROBE ZICH IN HET DEKSEL BEVINDEN.</b></p> <p><b>N.B.:</b> Deze stap vereist grote voorzichtigheid om contaminatie van de probe en de Probe Mix met RNase te voorkomen. Gebruik aërosol-beschermende pipetpunten om de probe te pipetteren. Het probe-verdunningsmiddel is stroperig. <b>Zorg voor een grondige menging bij het bereiden van de CT Probe Mix. Tijdens de mengstap moet er in de vloeistof een zichtbare vortex ontstaan. Een onvolledige menging kan leiden tot een verminderd signaal.</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Centrifugeer de buis van de CT Probe kort om de vloeistof onderin de buis te krijgen. Tik voorzichtig tegen de buis om te mengen.</li> <li>• Bepaal de benodigde hoeveelheid Probe Mix (25 µl/test). Geadviseerd wordt om extra Probe Mix te maken ter compensatie van het volume dat eventueel verloren gaat in de pipetpunten of aan de zijkanten van de buis. Raadpleeg de hieronder vermelde aanbevolen hoeveelheden. Het kleinste aantal wells dat per gebruik wordt aanbevolen is 24. Indien er minder dan 24 wells per assay gewenst zijn, kan het totaal aantal tests per kit worden verminderd in verband met de beperkte hoeveelheden probe en probe-verdunningsmiddel.</li> <li>• Breng de benodigde hoeveelheid probe-verdunningsmiddel over naar een nieuwe wegwerpcontainer. Afhankelijk van het aantal tests wordt een polypropyleen buisje met ronde bodem en snap-cap van 5 ml of van 15 ml aanbevolen. Maak een 1:25 verdunning van CT probe in probe-verdunningsmiddel om de Probe Mix te bereiden.</li> </ul> <table border="1" data-bbox="565 1226 1292 1419"> <thead> <tr> <th><u>Aantal tests/strips</u></th> <th><u>Volume probe-verdunningsmiddel*</u></th> <th><u>Volume probe*</u></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>96/12</td> <td>4,0 ml</td> <td>160,0 µl</td> </tr> <tr> <td>72/9</td> <td>3,0 ml</td> <td>120,0 µl</td> </tr> <tr> <td>48/6</td> <td>2,0 ml</td> <td>80,0 µl</td> </tr> <tr> <td>24/3</td> <td>1,0 ml</td> <td>40,0 µl</td> </tr> <tr> <td>Per well</td> <td>0,045 ml</td> <td>1,8 µl</td> </tr> </tbody> </table> <p>*Deze waarden zijn inclusief het aanbevolen extra volume.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pipetteer de probe in probe-verdunningsmiddel door de pipetpunt tegen de binnenwand van de buis vlak boven de meniscus te plaatsen. <b>De punt mag niet in het probe-verdunningsmiddel worden ondergedompeld.</b></li> <li>• Vortex gedurende tenminste 5 seconden bij maximum snelheid om grondig te mengen. <b>Er moet een zichtbare vortex ontstaan.</b> Label als CT Probe Mix en bewaar in een gesloten container tot het klaar is voor gebruik. <b>Ongebruikte hoeveelheden Probe Mix moeten worden weggeworpen.</b></li> </ul>	<u>Aantal tests/strips</u>	<u>Volume probe-verdunningsmiddel*</u>	<u>Volume probe*</u>	96/12	4,0 ml	160,0 µl	72/9	3,0 ml	120,0 µl	48/6	2,0 ml	80,0 µl	24/3	1,0 ml	40,0 µl	Per well	0,045 ml	1,8 µl
<u>Aantal tests/strips</u>	<u>Volume probe-verdunningsmiddel*</u>	<u>Volume probe*</u>																	
96/12	4,0 ml	160,0 µl																	
72/9	3,0 ml	120,0 µl																	
48/6	2,0 ml	80,0 µl																	
24/3	1,0 ml	40,0 µl																	
Per well	0,045 ml	1,8 µl																	

<b>Wasbuffer</b>	<p><b>BEREIDEN TIJDENS DE CAPTURE-STAP:</b>  <b>Voor de automatische plaatwasser</b> kan de wasbuffer volgens de onderstaande beschrijving worden bereid en in een afgedekte container worden bewaard of er kan telkens 1 L tegelijk worden bereid en in de reservoirs van automatische plaatwasser worden geplaatst: Zie de onderstaande tabel voor de mengvolumes.</p> <p>Zie de gebruikshandleiding van de automatische plaatwasser voor verzorgings- en onderhoudsinstructies.</p> <p><b>Waarschuwing:</b> Wasbufferconcentraat is giftig bij inname. Draag geschikte beschermende kleding, handschoenen, oog-/gezichtsbescherming. Om blootstelling tot een minimum te beperken water toevoegen aan wasbufferconcentraat tijdens het bereiden.</p> <table style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th style="text-align: center;"><u>Hoeveelheid wasbufferconcentraat</u></th> <th style="text-align: center;"><u>Hoeveelheid gedestilleerd of gedeïoniseerd water</u></th> <th style="text-align: center;"><u>Uiteindelijk volume wasbuffer</u></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">33,3 ml</td> <td style="text-align: center;">966,7 ml</td> <td style="text-align: center;">1 L</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">66,6 ml</td> <td style="text-align: center;">1.933,4 ml</td> <td style="text-align: center;">2 L</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">100,0 ml</td> <td style="text-align: center;">2.900,0 ml</td> <td style="text-align: center;">3 L</td> </tr> </tbody> </table> <p><b>N.B.: Het is bijzonder belangrijk dat de stroom naar de automatische plaatwasser altijd ingeschakeld blijft. Hierdoor kan de onderhoudspoeling plaatsvinden nadat het apparaat acht uur niet is gebruikt.</b></p> <p><b>Voordat elke assay plaatsvindt moet worden gecontroleerd of het afvalreservoir van de automatische plaatwasser leeg is en het spoelreservoir gevuld is met gedestilleerd of gedeïoniseerd water.</b></p> <p>Zie de gebruikshandleiding van de automatische plaatwasser voor aanvullende verzorgings- en onderhoudsinstructies.</p> <p><b>Voor het handmatig wassen met de plaatwasser:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Meng het wasbufferconcentraat goed.</li> <li>• Verdun 100 ml wasbufferconcentraat met 2,9 L gedestilleerd of gedeïoniseerd water en meng goed (uiteindelijk volume moet 3 L zijn).</li> <li>• Sluit de container af om verontreiniging of verdamping te voorkomen.</li> </ul> <p>Na het bereiden blijft de wasbuffer gedurende drie maanden stabiel bij 2-30 °C. Label het met de nieuwe houdbaarheidsdatum. Indien de wasbuffer gekoeld is bewaard, moet deze vóór gebruik tot 20-25 °C worden geëquilibreerd.</p> <p>Geadviseerd wordt om het wasapparaat en de leidingen eenmaal per drie maanden met 0,5% natriumhypochloriet oplossing te reinigen en grondig te spoelen met gedestilleerd of gedeïoniseerd water ter voorkoming van mogelijke verontreiniging door alkalische fosfatase die aanwezig is in bacteriën en schimmels.</p>	<u>Hoeveelheid wasbufferconcentraat</u>	<u>Hoeveelheid gedestilleerd of gedeïoniseerd water</u>	<u>Uiteindelijk volume wasbuffer</u>	33,3 ml	966,7 ml	1 L	66,6 ml	1.933,4 ml	2 L	100,0 ml	2.900,0 ml	3 L
<u>Hoeveelheid wasbufferconcentraat</u>	<u>Hoeveelheid gedestilleerd of gedeïoniseerd water</u>	<u>Uiteindelijk volume wasbuffer</u>											
33,3 ml	966,7 ml	1 L											
66,6 ml	1.933,4 ml	2 L											
100,0 ml	2.900,0 ml	3 L											

**Volumes voor gebruiksklare reagentia**

<b>Detectiereagens 1 en detectiereagens 2</b>	<p><b>VLAK VOÓR GEBRUIK:</b>  Meng het reagens grondig en <u>meet</u> daarna zorgvuldig het gewenste volume detectiereagens 1 of detectiereagens 2 af in een schoon reagensreservoir volgens de onderstaande richtlijnen. Ter voorkoming van contaminatie mogen deze reagentia <b>NIET</b> in de originele flessen worden teruggegoten: <b>Ongebruikt materiaal moet na afloop als afval worden verwijderd.</b> Indien er geen 8-kanaalspipet wordt gebruikt mag er in plaats daarvan een geschikte repeterende pipet worden gebruikt. In dit geval moeten er hoeveelheden van het reagens worden gemaakt in een polypropyleenbuisje van een geschikt formaat voor het vereiste volume zoals hieronder is aangegeven.</p> <table style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th style="text-align: center;"><u>Aantal tests/strips</u></th> <th style="text-align: center;"><u>Volume detectiereagens <u>1</u> of <u>2</u> inhoud flesje</u></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">96/12</td> <td style="text-align: center;">7,0 ml</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">72/9</td> <td style="text-align: center;">5,0 ml</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">48/6</td> <td style="text-align: center;">3,0 ml</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">24/3</td> <td style="text-align: center;">0,125 ml</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">1 test</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	<u>Aantal tests/strips</u>	<u>Volume detectiereagens <u>1</u> of <u>2</u> inhoud flesje</u>	96/12	7,0 ml	72/9	5,0 ml	48/6	3,0 ml	24/3	0,125 ml	1 test	
<u>Aantal tests/strips</u>	<u>Volume detectiereagens <u>1</u> of <u>2</u> inhoud flesje</u>												
96/12	7,0 ml												
72/9	5,0 ml												
48/6	3,0 ml												
24/3	0,125 ml												
1 test													

## AFNAME EN BEHANDELING VAN MONSTERS

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

### CERVICALE MONSTERS IN *digene* STM

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

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

### Opmerkingen:

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

## CERVICALE MONSTERS IN HOLOGIC PRESERVCYT SOLUTION

Monsters genomen met behulp van een spatelvormig hulpmiddel en in PreservCyt Solution opgenomen voor het maken van Hologic ThinPrep Pap Test objectglasjes, kunnen worden gebruikt voor de *digene* HC2 CT-ID DNA Test. Monsters moeten op de standaardmanier worden genomen en de ThinPrep Pap Test objectglasjes moeten overeenkomstig de instructies van Hologic worden geprepareerd.

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

## TESTPROCEDURE

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

### HOOGVOLUME-MONSTERVERWERKINGSTESTS MET BEHULP VAN HET RAPID CAPTURE SYSTEM

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

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

### HANDMATIGE METHODE

#### Opstelling

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

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

**VOORBEELDINDELING VOOR EEN TEST MET 24 MICROWELLS:**

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

**DENATURATIE**

**Opmerkingen:**

- **Let op:** Het denaturatiereagens is bijtend. Draag geschikte beschermende kleding, handschoenen, oog-/gezichtsbescherming. Wees voorzichtig en draag poedervrije handschoenen bij het hanteren hiervan.
- **Belangrijk:** Sommige monsters kunnen bloed of ander biologisch materiaal bevatten die de kleurveranderingen na toevoeging van het denaturatiereagens kunnen maskeren. Het is mogelijk dat monsters die vóór de toevoeging van het denaturatiereagens een donkere kleur tonen niet de juiste kleurveranderingen aangeven tijdens deze stappen. In zulke gevallen zal het niet tonen van de juiste kleurveranderingen geen invloed hebben op de resultaten van de test. De juiste menging kan worden vastgesteld door de kleurverandering van de kalibrators en kwaliteitscontroles.
- Tijdens de denaturatiestap het waterniveau in het waterbad toereikend zijn, zodat het gehele monstervolume in de buis ondergedompeld is.
- Monsters kunnen tijdens de hele denaturatiestap worden bereid en 's nachts bij 2-8 °C worden bewaard of gedurende maximaal 3 maanden bij -20 °C. Er mogen maximaal 3 invries-ontdooicycli worden uitgevoerd met elke ontdooicyclus maximaal 2 uur bij kamertemperatuur. Vóór gebruik goed mengen.
- Kalibrators en kwaliteitscontroles kunnen tijdens de gehele denaturatiestap worden bereid en 's nachts bij 2-8 °C worden bewaard, **maar zij mogen niet ingevroren worden**. Wanneer kalibrators en kwaliteitscontroles bevroren zijn, moeten zij worden weggegooid.
- Na de denaturatie en incubatie worden de monsters als niet meer besmettelijk beschouwd.<sup>21</sup> Niettemin moeten laboratoriummedewerkers zich steeds houden aan de nationale/plaatselijke voorzorgsmaatregelen.

## BEREIDINGSPROCEDURE VAN KALIBRATORS, KWALITEITSCONTROLES EN STM-MONSTERS

### Opmerkingen:

- Het hulpmiddel voor monsterafname mag niet worden verwijderd voordat denaturatie heeft plaatsgevonden.
- Ter voorkoming van fout-positieve resultaten is het essentieel dat alle kalibrator-, kwaliteitscontrole- en monstermaterialen in contact komen met denaturatiereagens. Mengen na toevoeging van het denaturatiereagens is een essentiële stap: **Zorg ervoor dat de Multi-Specimen Tube Vortexer 2 op 100 (maximumtoerental) staat en er tijdens het mengen een zichtbare vortex van vloeistof wordt waargenomen zodat de gehele binnenkant van de buis door de vloeistof wordt gewassen. Bij het vortexen met de hand moet ervoor worden gezorgd dat alle kalibrators, kwaliteitscontroles en monsters afzonderlijk worden gemengd door ze ieder gedurende minstens 5 seconden op volle snelheid te vortexen zodat het gehele binnenvlak van de buis door de vloeistofvortex wordt gewassen, waarna de buis eenmaal moet worden omgekeerd.**

1. Verwijder de doppen van de kalibrators, kwaliteitscontroles en STM-monsterbuizen en werp ze weg.

**Opmerking:** Doppen die van de monsterbuisjes verwijderd zijn, worden beschouwd als mogelijk besmettelijk. Gooi ze weg conform nationale/plaatselijke voorschriften.

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

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

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

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

#### Methode met de Multi-specimen Tube Vortexer 2

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

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

#### Methode voor handmatig vortexen van afzonderlijke buizen

- a) Sluit de kalibrator-, kwaliteitscontrole- en STM-monsterbuizen met schone schroefdoppen voor afnamebuizen.
- b) Meng alle buizen grondig door ze afzonderlijk gedurende 5 seconden bij hoge snelheid te vortexen.
- c) Keer elke monsterbuis eenmaal om, om de binnenkant van de buis, dop en rand te wassen.
- d) Zet de buis terug in het rek.



4. Onafhankelijk van de toegepaste vortexmethode **moet er tijdens het mengen in elke buis een zichtbare vortex van vloeistof zijn, zodat de vloeistof het gehele binnenoppervlak van de buis bereikt**. De kalibrators, kwaliteitscontroles en monsters moeten paars kleuren.
5. Incubeer de buizen in het rek gedurende  $45 \pm 5$  minuten in een waterbad van  $65 \pm 2$  °C (gedenatureerde kalibrators, kwaliteitscontroles en monsters moeten onmiddellijk worden getest. Kalibrators en kwaliteitscontroles mogen een nacht worden opgeslagen bij 2-8 °C, volgens de beschrijving bij **Opmerkingen** hierboven). Raadpleeg voor de opslag van monsters *Facultatief stoppunt*. CT Probe Mix(s) moet(en) tijdens deze incubatie worden bereid. Zie het onderdeel *Bereiding en opslag van reagentia*.

## BEREIDINGSPROCEDURE VOOR MONSTERS IN PRESERVCYT SOLUTION

### Opmerkingen:

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

### Bereiding van reagens

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

**Tabel 1.** Benodigde volume: bereiding van reagens.

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

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

**Opmerking:** De MST Vortexer 2 procedure is niet goedgekeurd voor het vortexen van monsters in PreservCyt Solution met de monsterconversiebuffer voorafgaand aan centrifuge, en mag daarom niet worden toegepast.

5. Centrifugeer de buisjes in een centrifuge met uitzwaairotor bij  $2.900 \pm 150 \times g$  gedurende  $15 \pm 2$  minuten.
6. Bereid tijdens centrifuge het mengsel van het *digene* Specimen Transport Medium en het denaturatiereagens (STM/DNR) in de verhouding 2:1 volgens tabel 2.

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

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

**Tabel 2.** Benodigde volume: STM/DNR.

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

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

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

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

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

**Opmerkingen:**

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

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

## Vortexen en denaturatie

### Handmatige vortexprocedure

1. Voeg het toepasselijke volume STM/DNR-mengsel toe aan elke pellet (zie tabel 2). Haal de dop van elk buisje af en resuspendeer de pellets afzonderlijk door elk buisje ten minste 30 seconden op de hoogste stand te vortexen. Als een pellet moeilijk te resuspenderen is, vortex dan 10-30 seconden

langer of totdat het pellet van de bodem van het buisje loskomt en rondzweeft. Als een pellet ongeresuspendeerd blijft na langer vortexen (in totaal maximaal 2 minuten), noteer dan het identificatienummer van het monster en ga verder met de volgende stap.

2. Zet de buisjes in een rek.
3. Zet het rek gedurende  $15 \pm 2$  minuten in een waterbad van  $65 \pm 2$  °C. Zorg ervoor dat er voldoende water in zit, zodat de vloeistof in de buisjes onder het waterniveau blijft.
4. Haal het rek met monsters uit het waterbad en vortex de afzonderlijke monsters gedurende 15-30 seconden.  
**Opmerking:** Zorg ervoor dat alle pellets in deze fase volledig geresuspendeerd zijn. Monsters die nog zichtbare pellets bevatten, zijn niet geschikt voor de test en moeten worden weggegooid.
5. Zet het rek terug in het waterbad van  $65 \pm 2$  °C en ga nog eens  $30 \pm 3$  minuten door met denaturatie.
6. Ga verder met de Hybridisatiestap hieronder of raadpleeg Facultatief stoppunt over opslag en behandeling van gedenatureerde monsters.

#### Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2 Procedure

##### **Opmerkingen:**

- De Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2 methode is goedgekeurd voor het verwerken van monsters in PreservCyt Solution na centrifuge en het afgieten van het supernatant.
  - Alleen de MST Vortexer 2 is ontworpen voor de verwerking van monsters in PreservCyt Solution.
  - Het conversierek en deksel zijn speciaal ontworpen voor de *digene* HC2 Sample Conversion Tubes (conische buisjes van 15 ml van het merk VWR of Corning). De gebruiker mag per keer slechts één type buis in het conversierek gebruiken. Andere merken zijn niet goedgekeurd voor gebruik.
  - Het is noodzakelijk dat de gespecificeerde vortextijden van het conversierek en deksel strikt in acht worden genomen.
  - Het conversierek en deksel kunnen niet worden gebruikt voor het vortexen van kalibrators of kwaliteitscontroles van de *digene* HC2 DNA Test Kit. Door de hoogte van de STM-buisjes kan niet goed gevortext worden als het conversierek en deksel gebruikt worden.
1. Plaats elke gelabelde conische buis van 15 ml, nadat deze is afgevoerd, op de juiste plaats in het conversierek.
  2. Voeg het toepasselijke volume STM/DNR-mengsel toe aan elke pellet (zie tabel 2).
  3. Bedek de conische buisjes van 15 ml met DuraSeal Tube Sealer afdekfolie door de folie over de buisjes in het rek te trekken.
  4. Plaats het deksel van het rek over de met afdekfolie bedekte buisjes en klik het deksel dicht met de twee klembeugels. Snij de afdekfolie met het snij-apparaat af, nadat het deksel stevig vastgezet is.
  5. Beweeg de rode hendel van de klembeugel omhoog, zodat deze horizontaal komt te staan.
  6. Plaats het conversierek en deksel zodanig op de MST Vortexer 2 dat de grootste diagonale hoek van het conversierek zich op de rechterhoek aan de voorzijde bevindt. Plaats het rek met deksel zodanig op het platform van de MST Vortexer 2 dat het goed tussen de geleiders past. Zet het rek stevig op zijn plaats vast door de rode hendel van de klembeugel naar beneden in verticale stand te duwen. Hierdoor wordt het rek vastgezet.
  7. Controleer of de motorsnelheid op 100 (maximale snelheid) staat en of de tuimelschakelaar Pulser op OFF staat.
  8. Zet de stroomschakelaar van de Vortexer op ON. **Vortex de buisjes gedurende 30 seconden.**
  9. Zet de stroomschakelaar van de Vortexer op OFF.
  10. Verwijder het conversierek en deksel van de MST Vortexer 2 door de rode hendel van de klembeugel omhoog te duwen.
  11. Zet het rek gedurende  $15 \pm 2$  minuten in een waterbad van  $65 \pm 2$  °C. Zorg ervoor dat de vloeistof in de buisjes onder het waterniveau blijft.
  12. Haal het rek met monsters na een incubatietijd van 15 minuten uit het waterbad.

13. Verwijder het overtollige water van het rek om spatten te voorkomen voordat u het op de MST Vortexer 2 zet.
14. Zet het conversierek en deksel stevig op de MST Vortexer 2 vast, zoals bij Stap 6 is beschreven.
15. Controleer of de snelheid op 100 is ingesteld en zet de stroomschakelaar van de vortexer op ON. **Vortex de buisjes gedurende 1 minuut.**
16. Zet de stroomschakelaar van de Vortexer op OFF.
 

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

#### FACULTATIEF STOPPUNT

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

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

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

#### HYBRIDISATIE

##### Opmerkingen:

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

1. Neem en label een hybridisatie-microtiterplaat.
2. Verwijder de kalibrators, kwaliteitscontroles en monsters na de incubatie uit het waterbad. Indien gebruik wordt gemaakt van de Multi-Specimen Tube Vortexer 2 moet het gehele rek met STM-monsters gedurende minimaal 5 seconden op de maximum snelheid worden gevortext. Vortex het gehele conversierek gedurende minimaal 10 seconden op maximale snelheid bij gebruik van monsters in PreservCyt Solution. In andere gevallen moet elke buis minstens 5 seconden afzonderlijk worden gevortext.
3. Pipetteer 75 µl van elke kalibrator, kwaliteitscontrole of elk monster op de **bodem** van een lege hybridisatie-microtiterplaat volgens de plaatindeling die onder *Opzet* is gemaakt. Raak de zijanten van de wells niet aan en beperk de vorming van luchtballen. Gebruik voor elke transfer een schone extra lange pipetpunt om kruiscontaminatie van kalibrators, kwaliteitscontroles of monsters te

voorkomen. Verwijder bij STM-monsters het hulpmiddel voor monsterafname niet uit de monstertransportbuis. Gedenatureerde monsters mogen met schroefdoppen voor afnamebuizen worden afgesloten en met de overige hulpmiddelen voor monsterafname in de buizen worden bewaard. Gedenatureerde PreservCyt-monsters mogen weer worden voorzien van de originele doppen.

**Opmerking:**

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

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

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

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

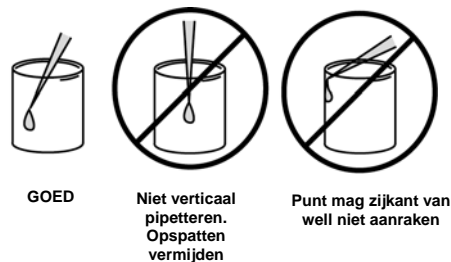
**Opmerking:**

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

## HYBRIDECAPTURE

1. Verwijder alle gecoate microtiterplaatwells van de voorgemonteerde plaat behalve het vereiste aantal voor de run. Plaats de ongebruikte microwells terug in de oorspronkelijke zak en hersluit deze. Gebruik een marker om elke kolom 1, 2, 3... te nummeren en label de microtiterplaat met een geschikte identificatie. De monsters worden aan de wells toegevoegd volgens de onder *Opzet* voorbereide voorbeeldindeling:
2. Verwijder zorgvuldig de hybridisatie-microtiterplaat met de kalibrators, controles en monsters uit de Microplate Heater I. Verwijder onmiddellijk het deksel van de plaat en leg hem op een schoon oppervlak.
3. Breng de gehele inhoud (circa 100 µl) van de kalibrators, kwaliteitscontroles en monsters van de wells van de hybridisatie-microtiterplaat met behulp van een 8-kanaalspipet over naar de bodem van de overeenkomstig gecoate microwell. Gebruik voor elke overgebrachte kolom nieuwe pipetpunten op de 8-kanaalspipet en laat elke pipetpunt goed leeglopen om te zorgen voor een volledige transfer van het monster. Desgewenst kan de pipet worden gestabiliseerd door het **midden** van de pipetpunten op de bovenste rand van de gecoate microwells te laten rusten (zie *diagram 1*).

DIAGRAM 1: JUISTE WIJZE VAN PIPETTEREN



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

## HYBRIDEDETECTIE

### Opmerkingen:

- Toevoegingen aan de plaat moeten van links naar rechts plaatsvinden met behulp van een 8-kanaalspipet.
- Geadviseerd wordt om de “reverse” pipetteertechniek toe te passen om de consistentie van de afgifte van het reagens te verbeteren. Met deze techniek worden de pipetpunten aanvankelijk overvuld door de tweede stop op de aspiratie/doseercontrole (zuiger) van de pipet te gebruiken. Zie de onderstaande procedure. Veeg de punten af in het reagensreservoir of op een schoon pluisarm keukenpapier om overtollig reagens te verwijderen voor het op de plaat wordt gebracht.
- Desgewenst kan de pipet worden gestabiliseerd door het midden van de pipetpunten op de bovenste rand van de microwells te laten rusten. Zorg dat de zijkanten van de microwells niet worden

aangeraakt, omdat er anders kruis-contaminatie van de monsters kan optreden. Raadpleeg het hiervoor afgebeelde diagram 1.

1. Breng het vereiste volume detectiereagens 1 over naar een reagensreservoir (zie het onderdeel *Bereiding en opslag van reagentia* voor instructies). Pipetteer telkens zorgvuldig 75 µl van het detectiereagens 1 in elke well van de gecoate microtiterplaat met behulp van een 8-kanaalspipet en toepassing van de hieronder beschreven "reverse" pipetteertechniek.  
"Reverse" pipetteertechniek:
  - a) Bevestig de punten aan een 8-kanaalspipet; zorg dat alle punten goed vastzitten.
  - b) Duw de zuiger van de pipet voorbij de eerste stop tot aan de tweede stop.
  - c) Dompel de punten onder in de detectiereagens 1-oplossing.
  - d) Laat de zuiger langzaam los en laat de oplossing in de punten vloeien.
  - e) Doseer de oplossing in de microwells (75 µl) door de zuiger tot de eerste stop in te drukken. Laat de zuiger pas los wanneer de pipetpunten in de detectiereagens 1-oplossing zijn ondergedompeld.
  - f) Vul de punten opnieuw en herhaal totdat alle wells zijn gevuld. Vul de wells van de microtiterplaat van links naar rechts. *Controleer of alle wells gevuld zijn door de intensiteit van de roze kleur te observeren. Alle wells moeten een soortgelijke intensiteit hebben.*
2. Dek de plaat af met een plaatdeksel en incubeer gedurende 30-45 minuten bij 20-25 °C.

## WASSEN

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

Methoden met de automatische plaatwasser:

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

## VÓÓR ELK GEBRUIK:

- Controleer of het waterreservoir minimaal tot het 1L-streepje met wasbufferoplossing is gevuld. Bereid de wasbufferoplossing als dat niet het geval is. Zie het onderdeel *Bereiding en opslag van reagentia*.
  - Controleer of het spoelreservoir gevuld is met gedestilleerd of gedeïoniseerd water.
  - Controleer of het afvalreservoir leeg is en de dop stevig vast zit.
  - De automatische plaatwasser zal zich na elke was automatisch primen voor elke was en spoeling.
1. Verwijder het plaatdeksel en leg de plaat op het platform van de automatische plaatwasser.
  2. Controleer of de stroom is ingeschakeld en of de display "Digene Wash Ready" of "P1" aangeeft.  
**Opmerking:** Als er alleen een gedeeltelijke strip gecoate wells wordt gebruikt, moeten er lege microtiterplaatwells in de gecoate plaat worden geplaatst om de kolom aan te vullen voordat het wassen begint. Zie het deel Accessoires voor bestelinformatie.
  3. Kies het aantal te wassen strips door op de "Rows" toets te drukken en daarna op "+" of "-" om af te stellen. Druk op de "Rows" toets om terug te keren naar "Digene Wash Ready" of "P1".
  4. Druk op "Start/Stop" om te beginnen.
  5. De automatische plaatwasser verricht zes vul- en aspiratiecycli wat ongeveer 10 minuten duurt. Tijdens het programma is er sprake van een korte pauze, zorg dus dat u de plaat niet te vroeg verwijdert. Wanneer de automatische plaatwasser klaar is met wassen geeft hij "Digene Wash Ready" of "P1" aan.
  6. Verwijder de microtiterplaat uit de water wanneer het programma is afgelopen. De plaat moet er wit uitzien en er mag geen roze vloeistof in de microwells achterblijven.

## Methode voor handmatig wassen

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

1. Verwijder detectiereagens 1 uit de wells door schone Kimtowels tissues of gelijkwaardig pluisarm keukenpapier boven op de plaat te plaatsen en deze voorzichtig om te keren. Zorg voordat u gaat omkeren dat het papier met het gehele oppervlak van de plaat in aanraking komt. Laat de plaat gedurende 1-2 minuten afdruipe. Vloei goed af met schone Kimtowels tissues of gelijkwaardig pluisarm keukenpapier. Werp het gebruikte pluisarme keukenpapier voorzichtig weg om verontreiniging met alkalische fosfatase tijdens de latere stappen te voorkomen.
2. Was de plaat 6 keer met de hand met behulp van het wasapparaat. Elke well wordt overstroomd met wasbufferoplossing om detectiereagens 1 vanaf de bovenkant van de wells te verwijderen. Het wassen begint bij well A1 en gaat daarna kronkelend naar rechts en naar beneden. Nadat alle wells gevuld zijn moet de vloeistof met een sterke neerwaartse beweging in de gootsteen worden afgegoten. De tweede was begint bij well H12 en volgt een kronkelbeweging naar links en naar boven. Deze volgorde van 2 wasbeurten wordt nog 2 keer herhaald tot in totaal 6 wasbeurten per well.
3. Na het wassen moet de plaat worden afgevoeid door hem om te keren op schone Kimtowels tissues of gelijkwaardig pluisarm keukenpapier en 3-4 keer stevig te kloppen. Vervang het pluisarme keukenpapier en vloei opnieuw af. Laat de plaat omgekeerd liggen en gedurende 5 minuten afdruipe. Vloei de plaat nog een keer af.
4. De plaat moet er wit uitzien en er mag geen roze vloeistof in de microwells achterblijven.

## **SIGNAALAMPLIFICATIE**

### **Opmerkingen:**

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



## VERIFICATIECRITERIA VOOR DE TESTKALIBRATIE

De testkalibratieverificatie wordt verricht om te zorgen dat de reagentia en geleverde kalibrator- en kwaliteitscontrolematerialen goed functioneren, waardoor een nauwkeurige bepaling van de grenswaarde van de test mogelijk is. De verificatiecriteria worden automatisch berekend en als geldig of ongeldig geverifieerd door de *digene* assay analyse software. De *digene* HC2 CT-ID DNA Test moet daarom voor elke assay worden gekalibreerd. Het is daarom noodzakelijk om elke assay te verifiëren met behulp van de volgende criteria. Deze verificatieprocedure is niet bedoeld ter vervanging van een interne kwaliteitscontroletest.

### 1. Negatieve kalibrator

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

### 2. Positieve kalibrator

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

### 3. Gemiddelde PC/Gemiddelde NC-verhouding

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

**Opmerking:** Voor het bepalen van de reproduceerbaarheid van de kalibrator en controle voor de *digene* HC2 CT-ID DNA Test, werden de resultaten die werden behaald met de *digene* Microplate Luminometer 2000 (DML 2000) gebruikt van interne studies waarbij 63 assays betrokken waren met behulp van de Rapid Capture System toepassing en 43 assays met behulp van de handmatige methode (tabel 3). Uit de resultaten bleek dat de gemiddelde van de %CV voor de positieve kalibrator voor deze 106 assays gelijk was aan of lager dan 5,8% en het gemiddelde van de %CV voor de negatieve kalibrator gelijk aan of lager dan 11,2%. Hoewel een maximum negatieve gemiddelde RLU-waarde van 88 werd verkregen voor handmatige assays, produceerde de RCS-toepassing NC RLU-waarden die gemiddeld iets hoger lagen dan die van de handmatige methode. Dit bleek geen invloed te hebben op de testresultaten geproduceerd met behulp van een van de optionele methoden. De gemiddelde RLU-drempel voor de negatieve kalibrator is gedefinieerd als 250 RLU's op basis van een statistische berekening van  $\pm 3SD$  van de gemiddelde RLU-waarde voor de negatieve kalibrator gecheckt voor het *digene* HC2 CT/GC DNA Test-systeem tijdens uitgebreide tests die hebben plaatsgevonden bij de ontwikkeling van de RCS-toepassing. De bovengrens van dat  $\pm 3SD$  bereik werd met nog eens 20% verhoogd om zeker te stellen dat de NC RLU-drempel tijdens een klinische routinebepaling bereikt kan worden.

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

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

Methode	Aant. platen	PC/NC berekende gemiddelden				Testkit kwaliteitscontroles (Gemiddeld RLU/CO)	
		Gemiddeld	Mediaan	Min	Max	QC CT	QC GC
RCS	63	7,11	6,87	5,24	10,23	3,8	0,24
Handmatig	43	6,75	5,70	4,60	11,25	3,5	0,16

Methode	Kalibrator	RLU Berekende gemiddelden				Gemiddelde van de berekende %CV
		Gemiddeld	Mediaan	Min	Max	
RCS	Negatief	52	50	29	84	9,2
	Positief	362	369	179	505	5,3
Handmatig	Negatief	41	37	28	88	11,2
	Positief	275	274	135	428	5,8

## GRENSWAARDEBEREKENING

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

RLU-grenswaarde = gemiddelde positieve kalibrator RLU

Voorbeeld van grenswaardeberekening:

	NC RLU-waarden	PC RLU-waarden
	97	312
	101	335
	91	307
Gemiddelde waarde	96	318
%CV	4,9	4,7
Gemiddelde PC/Gemiddelde NC	NVT	3.31

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

Alle RLU-waarden van de monsters moeten worden omgerekend in een ratio volgens de toepasselijke RLU-grenswaarde voor de *digene* assay analyse software. Alle assays moeten bijvoorbeeld worden uitgedrukt als monster RLU/CO.

**Opmerking:** De RLU/CO-waarden en positieve/negatieve resultaten voor alle monsters worden gerapporteerd in het *digene* assay analyse software gegevensanalyserapport.

## KWALITEITSCONTROLE

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

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

1. De met de kit meegeleverde kwaliteitscontroles zijn gekloonde CT en GC DNA-targets, samengesteld uit dezelfde plasmideconstructie voor elk afzonderlijk organisme (één voor CT en één voor GC), evenals de positieve kalibrator meegeleverd met de *digene* HC2 CT-ID DNA Test.
2. Dit kwaliteitscontrole materiaal is niet hetzelfde als het CT-organisme in het monster en zal geen dienst doen als geschikte kwaliteitscontrole voor de verwerking van *digene* Specimen Transport Medium of PreservCyt Solution.
3. De positieve kalibrator wordt gebruikt voor het normaliseren van monsterresultaten door het bepalen van de RLU-grenswaarden voor elke testrun. De in de kit geleverde kwaliteitscontroles moeten worden gebruikt voor interne kwaliteitscontrole. Aanvullende kwaliteitscontroles kunnen worden getest volgens richtlijnen of vereisten van plaatselijke, provinciale en/of landelijke voorschriften of bevoegde organisaties.
4. Voor het testen van de effectiviteit van monsterlyse en denaturatie moeten laboratoria periodiek >100.000 elementaire lichamen van *C. trachomatis* toevoegen (Serovars E of J geadviseerd en verkrijgbaar bij ATCC, respectievelijk als ATCC VR348B en VR886) aan een verse buis STM. Incubeer gedurende ten minste 1 uur vóór het testen op dezelfde manier als een normaal klinisch monster. Wanneer het monster goed is verwerkt moet een RLU/CO  $\geq 2,50$  worden verkregen. Als alternatief kunnen ook in de handel verkrijgbare monstertestpanels met CT-organisme worden gebruikt voor dit doel.
5. Acceptabele bereiken voor de negatieve en positieve kalibrators zijn alleen voor door QIAGEN goedgekeurde luminometers. De negatieve en positieve kalibrators dienen voor het aantonen van aanzienlijk falen van reagentia en zullen geen precisie van de testgrens garanderen.

## INTERPRETATIE VAN MONSTERRESULTATEN

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

1. Monsters met RLU/CO-ratio's  $\geq 2,50$  worden beschouwd als "Positief voor DNA van *Chlamydia trachomatis*." Levensvatbaarheid en/of infectiviteit van *Chlamydia trachomatis* organisme kan niet hieruit niet afgeleid worden aangezien target-DNA aanwezig kan zijn bij afwezigheid van levensvatbare organismen.
2. Monsters met RLU/CO-ratio's  $< 1,00$  bevatten geen DNA van *Chlamydia trachomatis* of bevatten een DNA-hoeveelheid onder de detectielimiet van de assay. Deze moeten worden geïnterpreteerd als "Geen DNA van *Chlamydia trachomatis* gevonden". Een negatief resultaat sluit geen infectie met *Chlamydia trachomatis* uit omdat resultaten afhankelijk zijn van adequate monsterafname en voldoende DNA dat aangetoond kan worden.
3. Monsters met RLU/CO-ratio's  $\geq 1,00$  en  $< 2,50$  worden beschouwd als twijfelachtig. De resultaten kunnen vermoedelijk beschouwd worden als positief voor DNA van *Chlamydia trachomatis*. Herhaald testen van een nieuw monster van de patiënt of aanvullend testen door middel van een alternatieve testprocedure wordt geadviseerd in verband met de verlaagde voorspellende waarde van een positief resultaat met deze RLU/CO-waarden.\*

4. Geadviseerd wordt de positieve resultaten te bevestigen door middel van een andere methode wanneer de waarschijnlijkheid van infectie met *Chlamydia trachomatis* onzeker is of in twijfel wordt getrokken. Analytische studies met deze test hebben vermoedelijke kruisreactiviteit met bepaalde andere DNA-sequenties getoond die een fout-positief resultaat kunnen veroorzaken. Hoewel de frequentie waarmee pBR322 en andere DNA-sequenties worden gevonden in genitale monsters niet volledig is beoordeeld, werd geen pBR322 kruisreactiviteit opgemerkt bij een populatie van 1818 patiënten waaronder 106 CT-positieve monsters werden getest op de aanwezigheid van pBR322. Dit is een representatieve populatie en geeft aan dat deze bevindingen mogelijk geen reflectie zijn van de frequentie van optreden van pBR322 bij alle geteste populaties. Zie Analytische specificiteit voor aanvullende informatie.
- \* Tijdens de klinische evaluatie van de *digene* HC2 CT-ID DNA Test, werden 7/14 resultaten in dit twijfelachtige bereik geverifieerd als positief door middel van kweek, DFA of Polymerase Chain Reaction (PCR) tests; de andere 7 waren blijkbaar fout-positief. Deze 7 fout-positieve monsters zaten in een totaal van slechts 11 monsters die niet negatief bleken te zijn volgens de *digene* HC2 CT-ID DNA Test uit de 1643 monsters waarvan was geverifieerd dat zij geen CT bevatten met behulp van kweek (99,3% correct geïdentificeerd in relatie tot kweek/DFA bij overweging van PCR-testresultaten). Tijdens een verdere evaluatie bleken deze 7 oorspronkelijk positieve monsters een eerste RLU/CO van 1,00-2,50 te hebben, en 3 van deze monsters waren negatief in alle herhalingstests (al deze 3 monsters waren negatief nadat ze twee keer waren herhaald met de *digene* HC2 CT-ID DNA Test). Voor de resterende 4 monsters waren alle kweek/DFA/PCR positief en waren beide herhalings *digene* HC2 CT-ID DNA Test duplo's  $\geq 1,00$  RLU/CO.

## BEPERKINGEN VAN DE PROCEDURE

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

- Alleen voor *in-vitro*diagnostiek.
- Om betrouwbare testresultaten te krijgen moet de *digene* HC2 CT-ID DNA Test-procedure, kwaliteitscontrole en interpretatie van monsterresultaten nauwlettend worden gevolgd.
- De *digene* HC2 CT-ID DNA Test kan alleen worden gebruikt met cervicale monsters afgenomen met behulp van het *digene* HC2 DNA Collection Device en in STM worden geplaatst, of met cervicale monsters afgenomen met de *digene* Female Swab Specimen Collection Kit en opgenomen in STM, of monsters genomen met behulp van een spatelvormig hulpmiddel en in PreservCyt Solution opgenomen.
- De resultaten van deze test mogen alleen samen met informatie worden geïnterpreteerd die beschikbaar is uit klinische evaluatie van de patiënt en uit andere procedures.
- De *digene* HC2 CT-ID DNA Test geeft kwalitatieve resultaten. De numerieke waarde (ratio) boven de voor het patiëntenmonster bepaalde grenswaarde bleek niet overeen te komen met de hoeveelheid CT DNA aanwezig in het patiëntenmonster.
- Een negatief resultaat sluit de mogelijkheid van infectie met *Chlamydia trachomatis* niet uit omdat detectie afhangt van het aantal organismen in het monster en kan worden beïnvloed door monsterafnamemethoden, patiëntfactoren, infectiefase en/of stam van *Chlamydia trachomatis*.
- Zoals van toepassing is op alle niet-kweekmethoden kan een positief monster niet worden geïnterpreteerd als een indicatie van de aanwezigheid van levensvatbare *Chlamydia trachomatis*.
- De *digene* HC2 CT-ID DNA Test is niet bedoeld voor het bepalen van een geslaagde therapie.
- De *digene* HC2 CT-ID DNA Test is alleen gevalideerd voor gebruik met de automatische plaatwasser I met behulp van de in de test-instructies gespecificeerde instellingen. Dit validatie-onderzoek werd intern verricht en de gegevens ter ondersteuning van het gebruik ervan staan in een bestand bij QIAGEN. Andere plaatwassers of andere plaatwasserinstellingen zijn niet acceptabel voor gebruik met de hc2 CT-ID DNA Test.

- Om de variabiliteit van de met de *digene* HC2 CT-ID DNA Test verkregen resultaten tot een minimum te beperken, is het noodzakelijk dat de test wordt verricht door laboratoriummedewerkers die een acceptabel niveau van technisch vakmanschap bereiken. Elk laboratorium moet ook technische vakkundigheid met de test laten zien. Om dit te bereiken wordt voorgesteld dat in de handel verkrijgbare monstertestpanels met CT- organisme of CT DNA periodiek worden getest, in overeenstemming met de kwaliteitsprocedures van de instelling.

## VERWACHTE RESULTATEN

### PREVALENTIE

De prevalentie van monsters positief voor *Chlamydia trachomatis* varieert afhankelijk van populatiekenmerken zoals leeftijd, geslacht en risicofactoren. De prevalentie van *Chlamydia trachomatis* verkregen bij de klinische onderzoekspopulatie d.m.v. de *digene* HC2 CT-ID DNA Test varieerde van 3,3% tot 14,6%. De prevalentie werd berekend op basis van de veronderstelling dat de 14 monsters met twijfelachtige resultaten in het onderzoek positief waren voor CT DNA (tabel 4). Zeven van deze 14 monsters werden als positief geverifieerd door middel van CT-kweek/DFA of CT PCR.

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

Test-loc.	Aant. positief/Aant. getest	% Prevalentie
1	67/460	14,6
2	42/307	13,7
3	38/308	12,3
4	23/414	5,6
5	11/329	3,3
Totaal	181/1818	10,0

### POSITIEF EN NEGATIEF VOORSPELENDE WAARDEN

De hypothetische positief en negatief voorspellende waarden (PPV en NPV) voor verschillende prevalentiepercentages bij gebruik van de *digene* HC2 CT-ID DNA Test werden berekend met behulp van de algehele gevoeligheid en specificiteit met betrekking tot CT-kweek/DFA individueel bepaald voor monsters afgenomen met het *digene* HC2 DNA Collection Device (cervicale borstel) en voor monsters afgenomen met de *digene* Female Swab Specimen Collection Kit (swab). Tabel 5 toont de hypothetische PPV en NPV voor borstelmonsters (algehele gevoeligheid 97,71% en specificiteit 98,15%) en tabel 6 toont de hypothetische PPV en NPV voor swab-monsters (algehele gevoeligheid 87,50% en specificiteit 98,36%).

**Tabel 5.** *digene* HC2 CT-ID DNA Test Hypothetische predictieve waarden met verschillende prevalentiepercentages (Borstel).

Prevalentie-percentage (%)	Gevoeligheid (%)	Specificiteit (%)	PPV (%)	NPV (%)
5	97,7	98,2	73,5	99,9
10	97,7	98,2	85,4	99,7
15	97,7	98,2	90,3	96,6
20	97,7	98,2	93,0	99,4

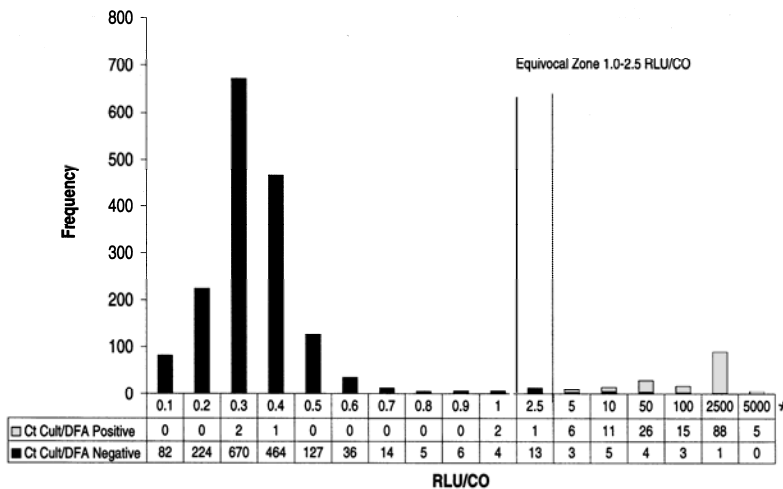
**Tabel 6.** *digene* HC2 CT-ID Test Hypothetische predictieve waarden bij verschillende Prevalentiepercentages (Swab).

Prevalentie-percentage (%)	Gevoeligheid (%)	Specificiteit (%)	PPV (%)	NPV (%)
5	87,5	98,4	73,4	99,4
10	87,5	98,4	83,2	98,9
15	87,5	98,4	87,2	98,4
20	87,5	98,4	89,3	97,9

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

De distributie van de *digene* HC2 CT-ID DNA Test RLU/CO-ratio's opgemerkt tijdens het klinische multicentrumonderzoek wordt hieronder getoond (Figuur 1). Deze gegevens omvatten monsters waarvoor de *digene* HC2 CT-ID DNA Test werd verricht en CT-kweek/DFA-resultaten beschikbaar waren (n = 1818). De interpretatie van de resultaten werd uitgevoerd volgens de volgende criteria: Monsters met RLU/CO-waarden <1,00 werden gezien als negatief. Monsters met RLU/CO-waarden  $\geq 2,50$  werden gezien als positief. Monsters met RLU/grenswaarderatio's  $\geq 1,00$  en <2,50 werden gezien als twijfelachtig.

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



Er werd een duidelijk verschil in RLU/CO-ratio's waargenomen tussen de positieve en negatieve resultaten van de *digene* HC2 CT-ID DNA Test. Negenennegentig procent (99%, 1620/1637) van de negatieve *digene* HC2 CT-ID DNA Test-resultaten hebben RLU/CO-waarden tussen 0 en 0,7. In totaal vielen <1% (14/1818) van de monsterresultaten in de twijfelachtige zone van de assay, waarvan 7,1% (1/14) positief was in CT-kweek/DFA en waarvan nog eens 6 (46%) positief waren in de CT PCR. Vijfentachtig procent (85%, 142/167) van de positieve *digene* HC2 CT-ID DNA Test-resultaten betrof RLU/CO- waarden tussen 10 en 5000.

## WERKINGSEIGENSCHAPPEN

### RESULTATEN VAN KLINISCH ONDERZOEK PER MONSTER

De werkingseigenschappen van de *digene* HC2 CT-ID DNA Test zijn bepaald door het vergelijken van de resultaten van de assay met de resultaten van Chlamydia-kweek en DFA. Er zijn achttien honderd en achttien (1818) monsters afgenomen en later getest bij patiënten op 5 verschillende locaties inclusief STD, gezinsplannings- en OB/GYN klinieken. DFA werd getest op het sediment van het CT-kweektransportmedium na centrifugering van monsters die *digene* HC2 CT-ID DNA Test-positief/kweek-negatief waren. Daarna werden PCR-tests uitgevoerd op *digene* HC2 CT-ID DNA Test-positieve/kweek-negatieve/DFA-negatieve monsters. *digene* HC2 CT-ID DNA Test-resultaten werden NIET vergeleken met PCR-testresultaten en daarom had de PCR geen invloed op de berekeningen van de werkingseigenschappen van *digene* HC2 CT-ID DNA Test. Er werden twee verschillende modellen luminometer (Dynex Model MLX en ML2200) gebruikt om de gegevens te produceren die werden gebruikt voor het bepalen van de werkingseigenschappen van de *digene* HC2 CT-ID DNA Test. De resultaten van het klinisch onderzoek voor monsters afgenomen met het *digene* HC2 DNA Collection Device (cervicale borstel) worden getoond in tabel 7 en monsters afgenomen met de *digene* Female Swab Specimen Collection Kit (swab) in tabel 8.

**Tabel 7. *digene* HC2 CT-ID DNA Test versus CT-kweek/DFA-resultaten voor borstelmonsters.**

Werkingseigenschappen berekend met behulp van RLU/CO-grenswaarden van 1,0 worden hieronder getoond. De tussen haakjes aangegeven waarden geven de prestatie weer waarbij rekening werd gehouden met de 2,5 RLU/CO-grens. De 95% betrouwbaarheidsintervallen zijn inclusief beide bereiken waarbij de punt-schattingen verschilden op elk van de geëvalueerde RLU/CO-grenswaarden.

	Loc.	CT-ID : Kweek: DFA: n.	POS POS NVT	POS NEG POS	POS NEG NEG <sup>1</sup>	NEG POS NVT	NEG NEG NVT <sup>3</sup>	Gevoeligheid	Specificiteit	NPV	PPV	CT-ID+ Kweek- DFA- PCR <sup>2</sup> +
<b>Symptomatisch</b>												
95% CI	1	351	42	5	7 (4)	2	295 (298)	95,92 86,0-99,5	97,68 (98,68) 95,3-99,6	99,33 97,6-99,9	87,04 (92,16) 75,1-97,8	5/7 (3/4)
95% CI	2	192	11	5	6 (5)	0	170 (171)	100,00 79,4-100	96,59 (97,16) 92,7-99,1	100 97,9-100	72,73 (76,19) 49,8-91,8	6/6 (5/5)
95% CI	3	219	34	0	3 (1)	1	181 (183)	97,14 81,5-100	98,38 (99,46) 94,4-100	99,45 (99,46) 97,0-100	91,89 (97,14) 78,1-99,9	1/2 <sup>4</sup> (1/1)
95% CI	4	177	6	3 (2)	0	0 (1)	168	100,00 (88,89) 51,8-100	100,00 97,8-100	100,00 (99,41) 96,8-100	100,00 63,1-100	NVT
95% CI	<b>Alle</b>	<b>939</b>	<b>93</b>	<b>13 (12)</b>	<b>16 (10)</b>	<b>3 (4)</b>	<b>814 (820)</b>	<b>97,25 (96,33)</b> <b>90,9-99,4</b>	<b>98,07 (98,80)</b> <b>96,9-98,9</b>	<b>99,63 (99,51)</b> <b>98,8-99,9</b>	<b>86,89 (91,30)</b> <b>79,6-95,8</b>	<b>12/15<sup>4</sup> (9/10)</b>
<b>Asymptomatisch</b>												
95% CI	1	101	8	0	2 (0)	0	91 (93)	100,00 63,1-100	97,85 (100,00) 92,5-100	100,00 96,0-100	80,00 (100,00) 44,4-100	0/2 (NVT)
95% CI	2	12	1	0	1	0	10	100,00 2,50-100	90,91 58,7-99,8	100,00 69,2-100	50,00 1,3-98,7	1/1
95% CI	3	81	3	0	0	0	78	100,00 29,2-100	100,00 95,4-100	100,00 95,4-100	100,00 29,2-100	NVT
95% CI	4	236	9	1	4 (2)	0	222 (224)	100,00 69,2-100	98,23 (99,12) 95,5-99,9	100,00 98,4-100	71,43 (83,33) 41,9-97,9	3/4 <sup>4</sup> (1/1 <sup>4</sup> )
95% CI	5	1	0	0	0	0	1	NVT 2,5-1,0	100,00 2,5-100	100,00 2,5-100	NVT NVT	NVT
95% CI	<b>Alle</b>	<b>431</b>	<b>21</b>	<b>1</b>	<b>7 (3)</b>	<b>0</b>	<b>402 (406)</b>	<b>100,00</b> <b>84,6-100</b>	<b>98,29 (99,27)</b> <b>96,5-99,9</b>	<b>100</b> <b>99,1-100</b>	<b>75,86 (88,00)</b> <b>56,5-97,5</b>	<b>4/7<sup>4</sup> (2/3<sup>4</sup>)</b>
<b>Totaal patiëntenpopulatie</b>												
95% CI	1	452	50	5	9 (4)	2	386 (391)	96,49 87,9-99,6	97,72 (98,99) 95,7-99,7	99,48 (99,49) 98,2-99,9	85,90 (93,22) 75,0-98,1	5/9 (3/4)
95% CI	2	204	12	5	7 (6)	0	180 (181)	100,00 80,5-100	96,26 (96,79) 92,4-98,8	100,00 98,0-100	70,83 (73,91) 48,9-89,8	7/7 (6/6)
95% CI	3	300	37	0	3 (1)	1	259 (261)	97,37 86,2-99,9	98,86 (99,62) 96,7-100	99,62 97,9-100	92,50 (97,37) 79,6-99,9	1/2 <sup>4</sup> (1/1)
95% CI	4	413	15	4 (3)	4 (2)	0 (1)	390 (392)	100,00 (94,74) 74,0-100	98,98 (99,49) 97,4-99,9	100,00 (99,75) 98,6-100	82,61 (90,00) 61,2-98,8	3/3 <sup>4</sup> (1/1 <sup>4</sup> )
95% CI	5	1	0	0	0	0	1	NVT 2,5-100	100,00 2,5-100	100,00 2,5-100	NVT NVT	NVT
95% CI	<b>Alle</b>	<b>1370</b>	<b>114</b>	<b>14 (13)</b>	<b>23 (13)</b>	<b>3 (4)</b>	<b>1216 (1226)</b>	<b>97,71 (96,85)</b> <b>92,4-99,5</b>	<b>98,15 (98,95)</b> <b>97,2-99,4</b>	<b>99,75 (99,67)</b> <b>99,2-100</b>	<b>84,77 (90,71)</b> <b>78,0-95,0</b>	<b>16/21<sup>5</sup> (11/12<sup>4</sup>)</b>

1 In twee gevallen was DFA noodzakelijk maar werd niet gedaan.

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

3 Eén *digene* HC2 CT-ID DNA Test negatieve kweek negatief monster werd onnodig getest met DFA en gaf een positief resultaat. Dit resultaat werd opgenomen in de prestatieberekeningen als een fout-negatieve *digene* HC2 CT-ID DNA Test.

4 PCR werd op één monster niet gedaan.

5 In één geval was DFA noodzakelijk maar werd niet uitgevoerd.

NVT = Niet van toepassing.

**Tabel 8.** *digene* HC2 CT-ID DNA Test versus CT-kweek/DFA-resultaten voor swab-monsters.

Werkings eigenschappen berekend met behulp van RLU/CO-grenswaarden van 1,0 worden hieronder getoond. De tussen haakjes aangegeven waarden geven de prestatie weer waarbij rekening werd gehouden met de 2,5 RLU/CO-grens. De 95% betrouwbaarheidsintervallen zijn inclusief beide bereiken waarbij de punt schattingen verschilden op elk van de geëvalueerde RLU/CO-grenswaarden.

Loc.	CT-ID : Kweek: DFA: n.	POS POS NVT	POS NEG POS	POS NEG NEG <sup>1</sup>	NEG POS NVT	NEG NEG NVT <sup>3</sup>	Gevoeligheid	Specificiteit	NPV	PPV	CT-ID+ Kweek- DFA- PCR <sup>2</sup> +
<b>Symptomatisch</b>											
1	358	31 (28)	0	5 (3)	7 (10)	315 (317)	81,58 (73,68)	98,44 (99,06)	97,83 (96,94)	86,11 (90,32)	NVT
95% CI							65,67-92,26	96,39-99,49	95,57-99,12	70,50-95,33	
2	94	10	1	3 (1)	1	79 (81)	91,67	96,34 (98,78)	98,75 (98,78)	78,57 (91,67)	2/3 (1/1)
95% CI							61,5-99,8	89,6-100	93,2-100	49,2-100	
3	5	1	0	0	0	4	100,00	100,00	100,00	100,00	NVT
95% CI							0,84-90,6	47,8-100	29,0-96,3	2,5-100	
5	152	7	0	2 (1)	0	143 (144)	100,00	98,62 (99,31)	100,00	77,78 (87,50)	0/0 <sup>4</sup> (0/0 <sup>3</sup> )
95% CI							59,0-100	95,1-100	97,5-100	40,0-99,7	
<b>Alle</b>	<b>609</b>	<b>49 (46)</b>	<b>1</b>	<b>10 (5)</b>	<b>8 (11)</b>	<b>541 (546)</b>	<b>86,21 (81,03)</b>	<b>98,19 (99,09)</b>	<b>98,54 (98,03)</b>	<b>83,33 (90,38)</b>	<b>2/3<sup>4</sup> (1/1<sup>3</sup>)</b>
<b>95% CI</b>							<b>74,62-93,85</b>	<b>96,69-99,13</b>	<b>97,15-99,37</b>	<b>71,48-91,71</b>	
<b>Asymptomatisch</b>											
1	61	4 (3)	0	2 (1)	0 (1)	55 (56)	100 (75,00)	96,49 (98,25)	100 (98,25)	66,67 (75,00)	NVT
95% CI							39,76-100	87,89-99,57	93,51-100	22,28-95,67	
2	10	0	0	0	0	10	NVT	100,00	100,00	NVT	NVT
95% CI								69,2-100	69,2-100		
3	2	0	0	1	0	1	NVT	50,00	100,00	0,00	NVT <sup>3</sup>
95% CI								1,3-98,7	2,5-100	0-97,5	
4	1	0	0	0	0	1	NVT	100,00	100,00	NVT	NVT
95% CI								2,5-100	2,5-100		
5	176	2	0	0	0	174	100,00	100,00	100,00	100,00	NVT
95% CI							15,8-100	97,9-100	97,9-100	15,8-100	
<b>Alle</b>	<b>250</b>	<b>6 (5)</b>	<b>0</b>	<b>3(2)</b>	<b>0 (1)</b>	<b>241 (242)</b>	<b>100 (83,33)</b>	<b>98,77 (99,18)</b>	<b>100 (99,59)</b>	<b>66,67 (71,43)</b>	<b>NVT<sup>3</sup></b>
<b>95% CI</b>							<b>54,07-100</b>	<b>96,45-99,75</b>	<b>98,48-100</b>	<b>29,93-92,51</b>	
<b>Totaal patiëntenpopulatie</b>											
1	419	35 (31)	0	7 (4)	7 (11)	370 (373)	83,33 (73,81)	98,14 (98,94)	98,14 (97,14)	83,33 (88,57)	NVT
95% CI							68,64-93,03	96,21-99,25	96,21-99,25	68,64-93,03	
2	104	10	1	3 (1)	1	89 (91)	91,67	96,74 (98,78)	98,89 (91,67)	78,57 (98,78)	2/3 (1/1)
95% CI							61,5-99,8	90,8-100	94,0-100	49,2-99,8	
3	7	1	0	1	0	5	100,00	83,33	100,00	50,00	NVT <sup>3</sup>
95% CI							2,5-100	35,9-99,6	47,8-100	1,3-98,7	
4	1	0	0	0	0	1	NVT	100,00	100,00	NVT	NVT
95% CI								2,5-100	2,5-100		
5	328	9	0	2 (1)	0	317 (318)	100,00	99,37 (99,69)	100,00	81,82 (90,00)	NVT <sup>4</sup>
95% CI							66,4-100	97,8-100	98,8-100	48,2-99,8	
<b>Alle</b>	<b>859</b>	<b>55 (51)</b>	<b>1</b>	<b>13 (7)</b>	<b>8 (12)</b>	<b>782 (788)</b>	<b>87,50 (81,25)</b>	<b>98,36 (99,12)</b>	<b>98,99 (98,50)</b>	<b>81,16 (88,14)</b>	<b>2/3<sup>5</sup> (1/1<sup>4</sup>)</b>
<b>95% CI</b>							<b>76,85-94,45</b>	<b>97,22-99,13</b>	<b>98,01-99,56</b>	<b>69,94-89,57</b>	

1 Elk monster waarvoor DFA nodig was maar niet werd uitgevoerd, werd in deze categorie geplaatst.

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

3 In een geval werd geen PCR gedaan.

4 In twee gevallen werd geen PCR gedaan.

5 In drie gevallen werd geen PCR gedaan.

NVT = Niet van toepassing.



De werkingseigenschappen van de *digene* HC2 CT-ID DNA Test werden berekend met behulp van zowel een 1,0 als een 2,5 grens zonder overweging van de vermoedelijke positieve monsters die in de twijfelachtige zone vallen die wordt beschreven in het deel "Interpretatie van resultaten" van deze gebruikshandleiding. De prestatie van de *digene* HC2 CT-ID DNA Test kan daarom variëren in uw laboratorium afhankelijk van de verdeling van waarden die binnen de twijfelachtige zone vallen. Hertesten van twijfelachtige positieve (twijfelachtige zone) monsters kan worden uitgevoerd als aanbevolen in het deel "Interpretatie van resultaten" van deze gebruikshandleiding (Criteria 3). Als referentiepunt viel minder dan 0,8% van de monsters (14/1818) die werden getest tijdens het klinische multicentrum onderzoek met de *digene* HC2 CT-ID DNA Test binnen deze twijfelachtige zone. Zie de frequentieverdeling van RLU/CO-resultaten in het deel verwachte resultaten van deze gebruikshandleiding voor verdere informatie.

Er zijn niet voldoende gegevens verzameld om de gevoeligheid en positief voorspellende waarde van de *digene* HC2 CT-ID DNA Test te schatten bij gebruik van de *digene* Female Swab Specimen Collection Kit in vergelijking met monsters afgenomen met behulp van de *digene* HC2 DNA Collection Device. Omdat het gebruik van de *digene* HC2 DNA Collection Device is gecontra-indiceerd bij het afnemen van cervicale monsters bij zwangere vrouwen, kan de mogelijkheid van de test om de aanwezigheid van CT DNA te bepalen verminderd zijn bij deze groep patiënten of wanneer een *digene* Female Swab Specimen Collection Kit wordt gebruikt voor het afnemen van monsters.

De klinische gevoeligheid en specificiteit van de *digene* HC2 CT-ID DNA Test voor het aantonen van die patiënten met een klinisch actieve infectie die kan worden overgedragen op partners of Chlamydia-gerelateerde gevolgen is niet bepaald in vergelijking met in de handel verkrijgbare Nucleïnezuuramplificatie (NAA) –methoden voor het opsporen van CT DNA. Klinische studies met behulp van aangepaste in de handel verkrijgbare NAA-assay hebben positiviteit aangetoond bij 12 *digene* HC2 CT-ID DNA Test-positieve en 6 vermoedelijk positieve monsters van 24 CT-kweek –DFA-negatieve patiënten; de 1637 negatieve *digene* HC2 CT-ID DNA Test-monsters in dat onderzoek en 5 van de *digene* HC2 CT-ID DNA Test-positieve/CT-kweek-DFA negatieve monsters werden echter niet getest met behulp van deze aangepaste NAA. Geschatte gevoeligheid is gebaseerd op het aantal positieve *digene* HC2 CT-ID DNA Test-resultaten bij patiënten die kweek- of DFA-positief waren voor *Chlamydia trachomatis*. De *digene* HC2 CT-ID DNA Test-gevoeligheid kan daarom alleen worden gerelateerd aan kweek/DFA positiviteit, waarvan de gevoeligheid ligt tussen 60-85%. Daarnaast zijn diverse onderzoeken uitgevoerd door verschillende onafhankelijke researchgroepen die de prestatie van de *digene* HC2 CT-ID DNA Test aantoonde in vergelijking met in de handel verkrijgbare en research NAA-tests.<sup>22</sup>

## REPRODUCEERBAARHEID

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

Een uit 10 monsters bestaand panel van gedenatureerde klinische en niet-klinische monsters, samengesteld uit 8 positieve monsters en 2 negatieve monsters, werd getest in zesvoud, tweemaal daags gedurende een periode van drie dagen op elk van vier locaties (3 externe locaties en QIAGEN). Elke locatie leverde 36 gegevenspunten voor elk geteste monster. Alle monsters werden gedenatureerd en bevroren bewaard voorafgaand aan het testen. 99,9% overeenkomst werd gevonden voor de 1152 verwachte positieve resultaten (1151/1152) en 99,6% overeenkomst voor de 288 verwachte negatieve resultaten (287/288). De algehele overeenkomst was 99,9% (1438/1440), met een 95% betrouwbaarheidsinterval van 99,5-99,9 en een kappa van 0,996. Er werd geen significante assay-tot-assay, dag-tot-dag of locatie-tot-locatie variabiliteit waargenomen; daarom werden de gegevens van alle assays op elke locatie gecombineerd, zoals hieronder weergegeven (tabel 9).

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

Target Nummer	Loc. 1		Loc. 2		Loc. 3		Loc. 4		Totaal		
	$\bar{X}$ RLU /CO	% Over-eenk.	$\bar{X}$ RLU /CO	% Over-eenk.	$\bar{X}$ RLU /CO	% Over-eenk.	$\bar{X}$ RLU /CO	% Over-eenk.	$\bar{X}$ RLU /CO	Opgemerkt/ verwacht	% Over-eenk.
1	3,7	100	3,2	100	4,1	100	4,2	100	3,8	144/144	100
2	6,7	100	6,0	100	7,4	100	9,8	100	7,5	144/144	100
3	34,2	100	29,3	100	38,6	100	42,8	100	36,2	144/144	100
4	61,9	100	55,0	100	69,4	100	79,1	100	66,4	144/144	100
5	2,7	100	2,5	100	3,2	100	3,4	100	3,0	144/144	100
6	6,4	100	5,4	100	7,4	100	7,4	100	6,6	144/144	100
7	13,9	100	12,0	100	16,0	100	16,3	100	14,5	144/144	100
8	17,3	100	14,8	100	19,2	97,2	23,2	100	18,6	143/144	99,3
9	0,3	100	0,2	100	0,2	100	0,2	100	0,2	144/144	100
10	0,3	100	0,3	97,2	0,3	100	0,2	100	0,3	143/144	99,3
TOTAAL										1438/1440	99,9

Op drie externe locaties werd een tweede vakkundigheids-/reproduceerbaarheidsonderzoek uitgevoerd met behulp van het volledige *Chlamydia trachomatis* (CT) organisme verdund in een gesimuleerde klinische monstermatrix van epitheliale cellen. De geteste monsters bevatten vertegenwoordigers van negatieve, lage (op of bijna op de detectiegrens) en mediumpositieven met 2 CT serovars, gemengde infecties met *Neisseria gonorrhoeae* (GC) en monsters die bloed bevatten. Men verwachtte dat twaalf monsters positief en dertien monsters negatief zouden zijn. De percentage-overeenkomst tussen gevonden en verwachte resultaten van de *digene* HC2 CT-ID DNA Test op de drie afzonderlijke testlocaties en voor alle locaties gecombineerd worden getoond in tabel 10. Gevoeligheid, specificiteit, overeenkomst en kappa-waarden voor elke locatie zijn opgenomen in tabel 11.

**Tabel 10.** Resultaten van *digene* HC2 CT-ID DNA Test-reproduceerbaarheidsonderzoek.

Loc.	n.	Geobserveerd vs. Verwacht			% Overeenkomst		
		Positief			Alle monsters		
		Negatief	Twijfelachtig	Positief ( $\geq 2,5$ )	@ 1,0 grens*	@ 2,5 grens	Exclusief Twijfelachtige monsters @ 2,5 grens
1	25	13	7	5	25/25 (100%)	18/25 (72%)	18/18 (100%)
2	25	13	3	9	25/25 (100%)	22/25 (88%)	22/22 (100%)
3	25	13	2	10	25/25 (100%)	23/25 (92%)	23/23 (100%)
Totaal	75	39	12	24	75/75 (100%)	63/75 (84%)	63/63 (100%)

\*Dezelfde waarden werden verkregen bij het interpreteren van resultaten als "vermoedelijk positief" op een grens van 2,5.

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

Statistische meting	Loc. 1	Loc. 2	Loc. 3	Loc. 4
Gevoeligheid	100% (73,54%-100%)*	100% (73,54%-100%)	100% (73,54%-100%)	100% (90,26%-100%)
Specificiteit	100% (75,29%-100%)	100% (75,29%-100%)	100% (75,29%-100%)	100% (90,97%-100%)
Overeenkomst	100% (86,28%-100%)	100% (86,28%-100%)	100% (86,28%-100%)	100% (95,20%-100%)
K	1,0	1,0	1,0	1,0

\*Cijfers in tussen haakjes gaf 95% betrouwbaarheidsintervallen.

Bij routine vakkundigheidstests, zouden de 12 twijfelachtige monsters gepresenteerd in tabel 11 die allemaal lage concentraties van CT-organismen ( $\sim 5 \times 10^4$  organismen/ml) bevatten, worden geïnterpreteerd volgens het deel interpretatie van resultaten van deze gebruikshandleiding als vermoedelijk positief. De assay heeft daarom het vermogen aangetoond CT DNA op te sporen in monsters met organismeconcentraties op of bij de detectiegrens van de assay. Aanvullend bewijs hiervoor werd verkregen na het testen van een beschikbaar panel dat monsters bevatte met lage aantallen organismen in een bereik bedoeld om opgemerkt te worden door nucleïnezuuramplificatie-assays. De Test uitgevoerd op drie externe locaties en bij QIAGEN leverde 100% positieve (of vermoedelijke positieve) resultaten voor het monster in het panel dat CT-organisme bevatte. In twee gevallen vielen de RLU/CO-waarden in de twijfelachtige zone van de assay (zie onderstaande tabel 12).

**Tabel 12.** Resultaten van CT en GC monsterpanel.

Loc.	Monster ID	<i>digene</i> HC2 CT/GC DNA Test- resultaat		Verwacht resultaat
		RLU/CO	Interpretatie	
1	1	3,63	<b>POS</b>	<b>POS</b>
	2	0,14	NEG	NEG
	3	0,17	NEG	NEG
	4	0,14	NEG	NEG
	5	0,21	NEG	NEG
2	1	1,79	<b>TWIJF.*</b>	<b>POS</b>
	2	0,11	NEG	NEG
	3	0,10	NEG	NEG
	4	0,09	NEG	NEG
	5	0,14	NEG	NEG
3	1	3,24	<b>POS</b>	<b>POS</b>
	2	0,15	NEG	NEG
	3	0,14	NEG	NEG
	4	0,14	NEG	NEG
	5	0,13	NEG	NEG
4	1	1,87	<b>TWIJF.*</b>	<b>POS</b>
	2	0,15	NEG	NEG
	3	0,53	NEG	NEG
	4	0,14	NEG	NEG
	5	0,15	NEG	NEG

\*Geïnterpreteerd als vermoedelijk positief.

## NAUWKEURIGHEID

Op drie locaties werd een nauwkeurigheidsonderzoek verricht om de binnen-assay en volledige nauwkeurigheid van de *digene* HC2 CT-ID DNA Test te bepalen met behulp van een panel van positieve en negatieve gemaskeerde, gesimuleerde klinische STM-monsters. Daarnaast werd met behulp van hetzelfde panel de intra- en inter-instrumentnauwkeurigheid bepaald met twee afzonderlijke luminometers. De twee luminometermodellen omvatten de DML 2000, die één van de aanbevolen luminometers is voor gebruik met de *digene* HC2 CT-ID DNA Test en de MLX-luminometer; de MLX, die niet meer verkrijgbaar is, was een van de luminometermodellen die werd gebruikt tijdens de klinische evaluatie. Na een eerste test leverden twee van de locaties acceptabele resultaten aan. Eén locatie ondervond echter problemen die toe te schrijven waren aan de assay-techniek, waarschijnlijk als gevolg van een technische fout veroorzaakt door incorrecte of inadequate training. De analist die de tests uitvoerde op deze locatie was getraind voor deze assay: deze persoon had echter in meer dan 6 maanden geen *digene* HC2 CT-ID DNA Tests uitgevoerd.

Tabel 13 toont de prestatie van de *digene* HC2 CT-ID DNA Test inclusief de locatie die technische problemen ondervond. De analist werd bijgeschoold in de juiste assaytechniek en de tests werden herhaald. De nauwkeurighedsgegevens die een aanzienlijke verbetering tonen in het uitvoeren van assays worden getoond in tabel 14.

**Tabel 13.** Binnen-instrument, tussen-instrument, binnen-assay, totale nauwkeurigheidsschattingen voor RLU/CO per target voorafgaand aan technologie-hertraining.

Panel- lid	n.	Gemid- delde RLU/C O	Binnen instrument		Tussen instrument		Binnen assay		Totaal	
			Stan- daard afwijking (SD)	(%CV)	(SD)	(%CV)	(SD)	(%CV)	(SD)	(%CV)
1	54	17,6152	2,7418	15,5647	0,6011	3,4123	45,8628	260,3593	53,8172	305,5160
2	54	6,9076	0,8102	11,7297	0,2198	3,1819	17,9588	259,9861	20,9987	303,9941
3	54	3,0293	0,0969	3,1981	0,0930	3,0685	0,6870	22,6801	0,6739	22,2459
4	54	5,4674	0,3348	6,1231	0,1485	2,7156	10,0455	183,7341	11,4415	209,2673
5	54	13,6956	0,4045	2,9536	0,5280	3,8555	1,7475	12,7599	1,8065	13,1904
6	54	16,9526	0,7011	4,1359	0,6187	3,6497	22,1095	130,4199	25,9379	153,0027

De nauwkeurigheidresultaten voor de gecombineerde locaties worden getoond in tabel 14. Hoewel niet duidelijk in de tabel, waren de kwalitatieve resultaten 100% (54/54) (93,4%-100% 95%CI) in overeenstemming met verwachte resultaten op de drie locaties na correcte training van alle analisten die de *digene* HC2 CT-ID DNA Test uitvoeren.

**Tabel 14.** Binnen-instrument, tussen-instrument, binnen-assay, totale nauwkeurigheidsschattingen voor RLU/CO per target na technologie-hertraining.

Panel-lid	n.	Gemiddeld	Binnen instrument		Tussen instrument		Binnen assay		Totaal	
			Standaardafwijking (SD)	(%CV)	(SD)	(%CV)	(SD)	(%CV)	(SD)	(%CV)
1	54	0,1441	0,0224	15,5507	0,0000	0,0000	0,0603	41,8765	0,0629	43,6874
2	54	0,1256	0,0212	16,8771	0,0000	0,0000	0,0210	16,7125	0,0234	18,6069
3	54	2,7720	0,0996	3,5933	0,0888	3,2046	0,4732	17,0719	0,4749	17,1332
4	54	1,8643	0,0647	3,4683	0,0635	3,4051	0,4015	21,5358	0,3956	21,2227
5	54	13,2050	0,4129	3,1266	0,5281	3,9989	1,7018	12,8873	1,6604	12,5743
6	54	7,8674	0,2725	3,4633	0,3946	5,0157	1,5361	19,5250	1,5118	19,2160

Voor panelleden 3 en 4, die beide lage concentraties van CT-organisme bevatten, bevonden de RLU/CO-waarden zich binnen of bij de twijfelachtige zone van 1,0-2,5.

Ten behoeve van deze gegevensanalyses, werden alle RLU/CO-waarden die binnen de twijfelachtige zone vielen of 2,5 overschreden geïnterpreteerd als positief.

Een extra nauwkeurigheidsonderzoek werd uitgevoerd bij QIAGEN om de totale nauwkeurigheid van de *digene* HC2 CT-ID DNA Test te bepalen met behulp van de DML 2000. Een uit zes monsters bestaand nauwkeurigheidspanel werd bereid met behulp van een gesimuleerde klinische monstermatrix samengesteld uit epitheliale cellen op kweek gesuspendeerd in *digene* Specimen Transport Medium (STM) en bestaand uit twee negatieve monsters, twee laagpositieve monsters en twee middenniveaumonters, allemaal een hulpmiddel voor borstelafname bevattend. Elk panel werd in de loop van 5 dagen drie keer getest, twee panels per plaat, door twee technici. Per plaat werd een pas gedenatureerd panel gebruikt. De totale nauwkeurigheidresultaten voor de *digene* HC2 CT-ID DNA Test samengesteld voor alle vijf de testdagen worden getoond in tabel 15. Hoewel niet duidelijk in deze tabellen, was de kwalitatieve interpretatie van resultaten voor 100% in overeenstemming met het verwachte resultaat (120/120; 97,0-100% 95% CI), bij gebruik van een RLU/CO van 1,00.

**Tabel 15.** Totale precisie voor *digene* HC2 CT-ID DNA Test.

Panel-lid	n.	Gemiddelde RLU/CO	SD	CV%	Gemiddelde -2xSD	Gemiddelde +2xSD
1	120	0,15	0,0326	21,24	0,09	0,22
2	120	0,16	0,0479	29,25	0,07	0,26
3	120	3,07	0,7078	23,05	1,66	4,49
4	120	4,00	0,5585	13,97	2,88	5,12
5	120	11,61	1,6955	14,60	8,22	15,00
6	120	12,01	1,9818	16,50	8,05	15,98

#### NAUWKEURIGHEID BIJ PRESERV CYT-MONSTERS

Een multicentrum studie werd uitgevoerd om de nauwkeurigheid van de assay per laboratorium en per dag te bepalen als PreservCyt Solution monsters worden getest. Op twee locaties buiten QIAGEN werd een twaalfdelig panel getest bestaande uit gesimuleerde patiëntenmonsters die in PreservCyt Solution waren afgenomen. In elk laboratorium werd het panel in drievoud getest, tweemaal per dag gedurende drie dagen waarbij reagentia uit dezelfde productieserie werden gebruikt. Het twaalfdelig panel bestaande uit gesimuleerde PreservCyt Solution-monsters werd bereid met variërende hoeveelheden CT (Serovar D; ATCC VR885) om een panel tot stand te brengen zoals in tabel 16 wordt getoond.

**Tabel 16.** Nauwkeurigheid samenstelling panel.

Bulk monster	Panelleden*	Verwacht resultaat <i>digene</i> HC2 CT/GC DNA Test	Geschatte RLU/CO
A	1P, 2P, 7P, 8P	Laag CT-positief	~5
B	3P, 4P, 9P, 10P	Middel CT-positief	~10
C	5N, 11N	Negatief	~0,20
D	6N, 12N	Hoog negatief	~0,70

\*Aanduiding van het monster geeft bekende status *C. trachomatis* aan [positief (P) of negatief (N)]

Conform de NCCLS-richtlijn EP-12A inzake de evaluatie van kwalitatieve *in-vitro* diagnostische tests zijn leden 6N en 12N die beide afkomstig zijn uit bulk monster "D", opgenomen om de nauwkeurigheid te bepalen die net onder de grenswaarde van de negatieve assay van 1,0 RLU/CO valt.

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

**Tabel 17.** *digene* HC2 CT-ID DNA Test-procedure Kwalitatieve resultaten uit bulk monster.

Gecombineerde bulk monster	CT-positief n (%)	Twijfelachtig n (%)	Negatief n (%)	Totaal
Negatief (5N, 11N)	0 (0,0)	0 (0,0)	108 (100)	108
Hoog negatief (6N, 12N)	0 (0,0)	12 (11,2)	90 (88,8)	108
Totaal negatief	0 (0,0)	12 (5,6)	204 (94,4)	216
CT Laag positief (1P, 2P, 7P, 8P)	216 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	216
CT Middel positief (3P, 4P, 9P, 10P)	216 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	216
Totaal positief	432 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	432

**Tabel 18.** Standaarddeviaties (SD) en variatiecoëfficiënten (CV) voor nauwkeurigheid per laboratorium en per dag: *digene* HC2 CT-ID DNA Test in PreservCyt

Monster	N	Gemiddelde RLU/CO	SD Binnen-run	SD binnen-run	SD Tussen dagen	SD tussen locaties	Totaal SD	%CV
Negatief (5N, 11N)	108	0,215	0,038	0,020	0,010	0,037	0,058	27,0
Hoog negatief (6N, 12N)	108	0,648	0,304	0,210	0*	0	0,370	57,1
CT Middel positief (2P,3P,8P,9P)	216	12,64	1,444	0,733	1,013	1,070	2,189	17,3
CT Laag positief (1P, 2P, 7P, 8P)	216	4,637	0,490	0,485	0,285	0,288	0,800	17,3

\*Negatieve variantiecomponenten waren op nul ingesteld.

## ANALYTISCHE GEVOELIGHEID

De analytische gevoeligheid (detectielimiet) van de *digene* HC2 CT-ID DNA Test werd bepaald door het direct testen van verdunningen van een niet-klinisch panel dat bestond uit 15 serovars van *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci* en *Chlamydia pneumoniae*. Vierpuntsverdunningsseries van elk van de serovars werden getest met behulp van de *digene* HC2 CT-ID DNA Test om de organisme-load te bepalen van de hoogste verdunning die een positief resultaat oplevert met de *digene* HC2 CT-ID DNA Test. Elke concentratie van elk targettype werd in drievoud getest volgens de gebruikshandleiding van de *digene* HC2 CT-ID DNA Test.

De detectielimiet voor elke Chlamydia-serovar is samengevat in tabel 19. De vermelde limiet was de verdunning van elk serovar dat een signaal gaf binnen of boven de twijfelachtige zone van de assay van 1,0-2,5 RLU/CO. De detectie limiet varieerde van 1.000 tot 500.000 EBs/mL afhankelijk van de geteste serovar. Detectie van 50 tot 25.000 EB's in elke test is gelijk aan 1.000 tot 500.000 EB's in het originele monster (per mL STM).

De in de Verenigde Staten meest voorkomende CT-serovars voor asymptomatische vrouwen jonger dan 30 jaar zijn E, I, en D (in aflopende volgorde)<sup>23</sup>. Voor vrouwen van 17-68 die een gynaecologische kliniek in een binnenstad bezochten, waren de meest voorkomende CT-serovars F, E en G (in afnemende volgorde). Het is belangrijk op te merken dat voor de meest voorkomende CT serovars behalve serovar E, de *digene* HC2 CT-ID DNA Test-onderlimiet voor detectie 50 EB's/assay was; serovar E heeft een hogere detectielimiet (2500 EB's/assay) als eerder beschreven. De schrijvers van dit artikel geven verder aan dat bepaalde serovars in verband gebracht zouden kunnen worden met symptomatische (d.w.z., serovar G) of asymptomatische (d.w.z., serovars D en I) infecties. Opnieuw, voor deze serovars, toonde de *digene* HC2 CT-ID DNA Test een lagere detectielimiet van 50 EB's/assay.

**Tabel 19.** Samenvatting van opmerkbare gevoeligheidslimieten voor CT-serovars.

Serovar	Detecteerbare concentratie	
	EB's/ml	EB's/test
A	1000 - >10.000	50 - >500
B	10.000 – 100.000	500 - 5000
Ba	5000 – 50.000	250 - 2500
C	10.000	500
D	1000 – 10.000	50 - 500
E	50.000	2500
F	1000	50
G	1000 – 10.000	50 - 500
H	10.000 – 100.000	500 - 5000
I	1000 – 10.000	50 - 500
J	5000 – 500.000	2500 – 25.000
K	20.000	1000
L1	2000	100
L2	2000 – 20.000	100 - 1000
L3	10.000	500

## AANVULLENDE OPMERKINGEN BIJ MONSTERS IN PRESERVCYT SOLUTION

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

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

Een gepaarde T test van de gegevens in tabel 20 toont aan dat de analytische gevoeligheid van de *digene* HC2 CT-ID DNA Test statistisch niet verschilt ( $p = 0,33$ ) als cervicale monsters uit PreservCyt Solution of STM worden getest.

**Tabel 20.** Vergelijking van analytische gevoeligheid - *digene* HC2 CT-ID DNA Test – gepaarde monsters in PreservCyt Solution en STM.

	<i>digene</i> HC2 CT-ID DNA Test RLU/CO	
	STM	PreservCyt
<b>Aantal monsters</b>	88	88
<b>Gemiddelde RLU/CO</b>	3,38	3,48
<b>RLU/CO Mediaan</b>	3,41	3,44
<b>Standaarddeviatie</b>	0,41	0,54
<b>Maximum RLU/CO</b>	4,42	5,01
<b>Minimum RLU/CO</b>	2,44	2,27

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

Een gepaarde T test van de gegevens in tabel 21 toont aan dat de analytische gevoeligheid van de *digene* HC2 CT-ID DNA Test statistisch niet verschilt ( $p = .98$ ) als cervicale monsters uit PreservCyt Solution of STM worden getest.

**Tabel 21.** Vergelijking van analytische gevoeligheid - *digene* HC2 CT-ID DNA Test – gesimuleerde patiëntenmonsters in PreservCyt Solution gepaard aan STM.

	<b><i>digene</i> HC2 CT-ID DNA Test</b>	
	<b>STM (Aliquot A)</b>	<b>PreservCyt (Aliquot B)</b>
<b>Aantal monsters</b>	10	10
<b>Gemiddelde RLU/CO</b>	30,92	24,90
<b>RLU/CO Mediaan</b>	3,56	3,00
<b>Standaarddeviatie</b>	47,27	38,91
<b>Maximum RLU/CO</b>	125,62	115,08
<b>Minimum RLU/CO</b>	1,15	1,26

### **ANALYTISCHE SPECIFICITEIT**

Een panel van bacteriën, virussen en plasmiden die aangetroffen kunnen worden in het vrouwelijke anogenitale kanaal werd getest op kruisreactiviteit met de probes die worden gebruikt voor de *digene* HC2 CT-ID DNA Test. Alle micro-organismen werden getest in concentraties van  $10^5$  en  $10^7$  organismen per ml en indien mogelijk op  $10^9$  organismen per ml, tenzij hieronder anders aangegeven. Gezuiverde DNA's van virussen en plasmiden werden getest bij een concentratie van 4 ng per ml.

De met de *digene* HC2 CT-ID DNA Test geteste bacteriën worden getoond in tabel 22. Alle bacteriën behalve *Chlamydia psittaci* testten negatief met de *digene* HC2 CT-ID DNA Test. *Chlamydia psittaci* kan worden gedetecteerd op de huid van sommige mensen die werken met vogels, of deze hanteren, maar is niet waargenomen in het anogenitale kanaal.<sup>24</sup> Daarom zal de kruisreactiviteit opgemerkt tussen *Chlamydia psittaci* en de CT Probe naar verwachting geen klinische verwarring veroorzaken voor anogenitale monsters.

De CT Probe toonde geen kruisreactie met *Neisseria gonorrhoeae*, waarmee werd aangetoond dat de probes in de *digene* HC2 CT-ID DNA Test geen kruisreactie tonen met targets van de GC-ID Probe in de *digene* HC2 GC-ID DNA Test.



**Tabel 22.** Micro-organismen getest op kruisreactiviteit.

---

<i>Acinetobacter anitratus</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Mycoplasma hyorhinis</i>
<i>Acinetobacter Iwoffii</i>	<i>Neisseria cinera</i>
<i>Achromobacter xerosis</i>	<i>Neisseria flavescens</i>
<i>Actinomyces israelii</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> <sup>c</sup>
<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Neisseria species</i> <sup>d</sup> *
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Neisseria lactamica</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>
<i>Bacteroides melaninogenicus</i>	<i>Neisseria mucosa</i>
<i>Branhamella catarrhalis</i>	<i>Neisseria polysaccharea</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Neisseria sicca</i>
<i>Candida glabrata</i>	<i>Neisseria subflava</i> (biovar flava)
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>Chlamydia psittaci</i> <sup>f</sup>	<i>Peptostreptococcus asaccharalyticus</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Peptostreptococcus productus</i>
<i>Enterococcus avium</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>Escherichia coli</i> (Klinisch isolaat) <sup>b</sup>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Escherichia coli</i> (HB101) <sup>b</sup>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Salmonella minnesota</i>
<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Gemella haemolysans</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Haemophilus ducreyi</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (ProtA +)
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Kingella denitrificans</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i> (Grp B)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i> (Grp A)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i> (Grp B)
<i>Mobiluncus curtisii</i>	<i>Streptomyces griseus</i>
<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Treponema pallidum</i>
<i>Mobiluncus mulieris</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i> <sup>e</sup>
<i>Mobiluncus mulieris</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
<i>Moraxella lacunata</i>	

---

<sup>a</sup> Geteste concentraties waren  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^7$  en  $1 \times 10^8$  organismen/ml.

<sup>b</sup> Zowel de *E. coli* stam gebruikt voor het kweken van plasmiden (HB101) als een klinisch isolaat van *E. coli* werden getest.

<sup>c</sup> Geteste concentraties waren  $2 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^7$  en  $2 \times 10^8$  organismen/ml.

<sup>d</sup> Geteste concentraties waren  $2 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^8$  en  $2 \times 10^9$  organismen/ml.

<sup>e</sup> Geteste concentraties waren  $1 \times 10^5$  en  $1 \times 10^6$  organismen/ml.

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

Virale of plasmide-DNA's en humaan serum getest met de *digene* HC2 CT-ID DNA Test zijn weergegeven in tabel 23. Vermoedelijke kruisreactiviteit werd waargenomen met plasmidevectoren pBR322, pGEM<sup>®</sup> 3Zf en pGEM<sup>®</sup> 3Zf(-). De aanwezigheid van deze homologe sequenties is gemeld in humane genitale monsters en er kunnen fout-positieve resultaten optreden in aanwezigheid van hoge concentraties van deze bacteriële plasmiden. Van 106 klinische monsters die positief werden bevonden met de *digene* HC2 CT-ID DNA Test onder een totale populatie van 1818 patiënten, werden er twee geïdentificeerd met pBR322; één monster was echter positief met CT-kweek en DFA en de met CT DNA PCR. Daardoor deden zich geen foutpositieve resultaten voor als gevolg van homologe pBR322, pGEM3Z en pGEM3Z(-) sequenties in deze 106 klinische monsters. De frequentie van het vinden van deze plasmiden in vrouwelijke genitale monsters is niet volledig bepaald. Dit is een representatieve populatie en is mogelijk geen reflectie van de frequentie van het voorkomen van pBR322 bij alle geteste populaties.

**Tabel 23.** Viraal of plasmide-DNA of humaan serum getest op kruisreactiviteit.

Cytomegalovirus	Humaan volledig bloed
Epstein-barr-virus	Humaan Papillomavirus type 6
Hepatitis B Oppervlakte-antigeen-positief serum	Humaan Papillomavirus type 11
Herpes Simplex I	Humaan Papillomavirus type 16
Herpes Simplex II	Humaan Papillomavirus type 18
Humane epitheliale cellen	pGEM <sup>®</sup> 3Z
Humaan immunodeficiëntievirus (HIV) <sup>a</sup>	pGEM <sup>®</sup> 3Zf(-)
Humaan genoom-DNA	pBR322
Human Placentair DNA	SV40

<sup>a</sup> Geteste concentraties waren  $2 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^7$ , and  $2 \times 10^8$  organismen/ml.

### EFFECT VAN BLOED EN ANDERE STOFFEN OP STM-MONSTERS

Het effect van bloed en andere mogelijk storende gedefinieerde stoffen werd geëvalueerd in de *digene* HC2 CT-ID DNA Test. Volledig bloed en één commercieel merk douche, antischimmelcrème en anticonceptiegel (stoffen die gewoonlijk worden aangetroffen in cervicale monsters) werden toegevoegd in concentraties van 1% en 5% aan negatieve en positieve monsters in STM (klinische monster-pools en niet-klinische monsters). Bij geen van de vier stoffen werden in geen enkele concentratie foutpositieve resultaten waargenomen. Een onderzoek van niet-gedefinieerde stoffen aanwezig in een populatie van 117 negatieve klinische monsters toonde dat niet-gedefinieerde stoffen het signaal van DNA van *Chlamydia trachomatis* waargenomen door middel van *digene* HC2 CT-ID DNA Test iets, maar niet sterk, kunnen verhogen. Dit effect is niet van belang daar het tegendeel is van een remmend effect.

### EFFECT VAN BLOED EN ANDERE STOFFEN OP MONSTERS IN PRESERV CYT SOLUTION

Er heeft geen evaluatie plaatsgevonden, zoals in de voorgaande sectie over STM-monsters is beschreven, van specifiek storende substanties met monsters in PreservCyt Solution. Van monsters in PreservCyt Solution wordt echter niet verwacht dat zij andere interferentieprofielen hebben dan STM-monsters, omdat de anatomische locatie voor de afname van endocervicale monsters voor zowel PreservCyt Solution als voor STM-monsters dezelfde is, en omdat een monster in PreservCyt Solution onderworpen wordt aan een conversieprocedure (zoals wordt uitgelegd in de gebruikshandleiding van de *digene* HC2 Sample Conversion Kit) waardoor het qua samenstelling vergelijkbaar is met een STM-monster; er kunnen sporen van residuaal monsterconversiebuffer (SCB)<sup>1</sup> achterblijven in volledig geconverteerde monsters in PreservCyt Solution. Daarom werd een analyserende studie uitgevoerd om de analytische werking van de *digene* HC2 CT-ID DNA Test te onderzoeken met wisselende hoeveelheden SCB. Wisselende concentraties plasmide CT DNA werden bereid in STM. Overvloedige volumes aan SCB werden vervolgens toegevoegd aan de monsters en drie aliquots van elk monster werden getest om een gemiddelde RLU/CO voor elk monster te verkrijgen bij ofwel PreservCyt Solution ofwel SCB. Vergelijking van deze gemiddelde RLU/CO-waarden van elk monster met de gemiddelde RLU/CO-waarden van elk STM-controlemonster leidde tot geen vals-positieve of vals-negatieve resultaten.

### PRECISIE AAN DE ASSAYGRENSEN VAN DE *digene* HC2 CT-ID DNA TEST BEPAALD AAN KLINISCHE MONSTERS AFGENOMEN IN STM

De reproduceerbaarheid van de *digene* HC2 CT-ID DNA Test met klinische monsters afgenomen in STM werd bepaald in een onderzoek met behulp van 30 klinische pools (15 positieve en 15 negatieve) bereid door het combineren van eerder gedenatureerde en geteste cervicale borstelmonsters afgenomen in STM. Monsters werden in viervoud getest op elk van de vijf dagen voor een totaal van 20 waarden per monster. De tests werden uitgevoerd met behulp van de *digene* HC2 CT-ID DNA Test. De gemiddelde RLU/CO-waarde, 95% betrouwbaarheidsintervallen over de gemiddelde (CI's) en procent positieve resultaten werden berekend voor elk monster gedurende vijf dagen en worden getoond in tabel 24.

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

**Tabel 24.** Gemiddelde RLU/CO met betrouwbaarheidsintervallen en procent *digene* HC2 CT-ID DNA Test-positieven (Dalende volgorde bij gemiddelde RLU/CO).

Nr.	RLU/CO	95% CI	%Positief
1	2,14	2,06-2,22	100 (20/20)
2	1,43	1,35-1,51	100 (20/20)
3	1,41	1,36-1,47	100 (20/20)
4	1,37	1,26-1,48	90 (18/20)
5	1,31	1,24-1,39	100 (20/20)
6	1,29	1,21-1,36	100 (20/20)
7	1,28	1,20-1,36	95 (19/20)
8	1,19	0,94-1,62	90 (18/20)
9	1,18	1,00-1,37	75 (15/20)
10	1,17	0,62-1,71	30 (6/20)
11	1,15	1,10-1,20	95 (19/20)
12	1,08	1,02-1,13	75 (15/20)
13	1,05	1,00-1,09	65 (13/20)
14	1,04	0,99-1,09	70 (14/20)
15	1,02	0,97-1,06	60 (12/20)
16	0,99	0,95-1,04	45 (9/20)
17	0,93	0,87-1,00	30 (6/20)
18	0,93	0,88-0,99	35 (7/20)
19	0,91	0,85-0,96	25 (5/20)
20	0,91	0,85-0,97	25 (5/20)
21	0,90	0,87-0,93	10 (2/20)
22	0,90	0,84-0,95	25 (5/20)
23	0,86	0,76-0,96	5 (1/20)
24	0,85	0,81-0,88	5 (1/20)
25	0,82	0,77-0,88	10 (2/20)
26	0,80	0,78-0,82	0 (0/20)
27	0,48	0,46-0,50	0 (0/20)
28	0,48	0,46-0,50	0 (0/20)
29	0,45	0,42-0,47	0 (0/20)
30	0,24	0,22-0,25	0 (0/20)

Monsters met een gemiddelde RLU/CO van 20% of meer boven de grens waren 98% van de tijd positief, terwijl monsters met een gemiddelde RLU/CO van 20% of meer onder de grens 100% van de tijd negatief waren. Deze resultaten geven aan dat van monsters op 20% of meer verwijderd van de grens constante resultaten kunnen worden verwacht met de *digene* HC2 CT-ID DNA Test.

Monsters met waarden in de buurt van de assaygrens bleven grotendeels positief of negatief; monsters die zich boven de assaygrens bevonden maar binnen 20% daarvan bleven 70% van de tijd positief. Monsters onder de grens maar binnen 20% daarvan bleven 79% van de tijd negatief.

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

## HISTORISCHE INFORMATIE

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

Voor het bepalen van de reproduceerbaarheid van de positieve en negatieve kalibrator werden de resultaten uit de klinische evaluaties van de *digene* HC2 CT-ID DNA Test gecombineerd. Hierbij waren 81 assayruns betrokken (tabel 25). De resultaten toonden aan dat het gemiddelde %CV voor deze 81 assays 6,4% was en geen enkele assay had gemiddelde negatieve kalibratorwaarden van meer dan 150 RLU's. Positieve kalibratorreproduceerbaarheid van meer dan 25% CV werd gevonden bij slechts 2 van de 81 assays (2,5%). Geen van de %CV van de assays bleven hoger dan 25% hetgeen erop wees dat alle assays geldig waren.

**Tabel 25.** Prestatie van de positieve en negatieve kalibrator. Gecombineerde gegevens uit de klinische multicentrum trial en het nauwkeurigheidsonderzoek (n = 81 assays).

Instrument	Aant. assays	Gem. van S/N ratio's	Kalibrator-type	Gem. van berekend gem. (RLU)		Gem. van het berekende %CV's	
				Drie replica's	Bijgesteld voor afwijkende waarden	Drie replica's	Bijgesteld voor afwijkende waarden
DML2000	9	5,49	Negatief	44,89	39,15	26,10	13,75
			Positief	231,41	231,41	7,35	7,35
MLX*	72	5,33	Negatief	0,075	0,074	16,59	12,90
			Positief	0,265	0,263	6,34	4,86

\*Niet langer verkrijgbaar voor gebruik.

## EQUIVALENTIE TUSSEN MONSTERS IN STM EN PRESERVCYT SOLUTION

Equivalentie tussen monsters in STM en PreservCyt Solution werd onderzocht in een klinische evaluatie van 1231 gepaarde cervicale monsters. Een monster in PreservCyt Solution werd verwerkt met behulp van de *digene* HC2 Sample Conversion Kit gebruikshandleiding en tezamen met een gepaard STM-monster met de *digene* HC2 CT-ID DNA Test getest. De resultaten van deze evaluatie zijn weergegeven in tabel 26. De klinische werking werd vastgesteld met behulp van PreservCyt Solution monsters met een restvolume van meer dan 6,5 ml. Het testen van monsters met een restvolume tussen 4,0 – 6,5 ml moet door het laboratorium worden gevalideerd.

**Tabel 26.** Samenvatting van statistische data van de overeenkomsten in de *digene* HC2 CT-ID DNA Test tussen gepaarde cervicale monsters afgenomen in STM en PreservCyt Solution.

Gegevensanalyse cohort	Kappa (95% CI)	Positief Overeenkomst (n/N) 95% CI	Negatief Overeenkomst (n/N) 95% CI	Totaal overeenkomst (n/N) 95% CI
Twijfelzone exclusiegegevens	0,92 (0,88, 0,96)	92,16 (94/102) 85,13, 96,55	99,36 (1092/1099) 98,69, 99,74	98,75 (1186/1201) 97,95, 99,30
Twijfelzone hertest algoritme*	0,90 (0,86, 0,94)	90,09 (100/111) 82,96, 94,95	99,20 (1111/1120) 98,48, 99,63	98,30 (1211/1231) 97,50, 99,00

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

De reproduceerbaarheid van de *digene* HC2 CT-ID DNA Test werd beoordeeld als onderdeel van een klinische evaluatie om aan te tonen dat equivalente resultaten uit de *digene* HC2 CT-ID DNA Test werden verkregen toen een panel van 20 monsters in PreservCyt Solution werd getest gedurende 3 dagen in drie laboratoria. De resultaten van deze reproduceerbaarheidsstudie zijn hieronder weergegeven in tabel 27.

**Tabel 27.** Percentage overeenkomst in *digene* HC2 CT-ID DNA Test - per locatie.

Locatie	Waargenomen vs. verwacht <sup>a</sup>	% Overeenkomst (95% CI)
1	60/60	100 (94,04-100)
2	60/60	100 (94,04-100)
3	60/60	100 (94,04-100)
Combined Sites	180/180	100 (97,97-100)

<sup>a</sup>20 leden x 3 dagen x 3 locaties.

## REFERENTIES

1. Litwin J. The growth cycle of the psittacosis group of micro-organisms. *J Infect Dis* 1959;105:129-60.
2. Matsumoto A, Higashi N. Electron microscopic observations of DNA molecules of the mature, elementary bodies of *Chlamydia psittaci*. *Ann Rep Inst Virus Res ,Kyoto Univ* 1973;16:33-9.
3. Moulder JW. Characteristics of Chlamydiae. In: Barron AL, editor. *Microbiology of Chlamydia*. 1 ed. Boca Raton,FL: CRC Press; 1988. p 3-19.
4. Schachter J. Chlamydiae (psittacosis-lymphogranuloma venereum-trachoma group). In: Lennette EH, Balows A, Hausler WJ, Jr., Shadomy HJ, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 4 ed. Washington,DC: American Society for Microbiology; 1985. p 856-62.
5. Stephens RS, Tam MR, Kuo C-C, Nowinski RC. Monoclonal antibodies to *Chlamydia trachomatis*: antibody specificities and antigen characterization. *J Immunol* 1982;128(3):1083-9.
6. Barnes RC. Laboratory diagnosis of human chlamydial infections. *Clin Microbiol Rev* 1989;2(2):119-36.
7. Stamm WE, Tam M, Koester M, Cles L. Detection of *Chlamydia trachomatis* inclusions in McCoy cell cultures with fluorescein-conjugated monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 1983;17(4):666-8.
8. Ripa KT, Mardh P-A. Cultivation of *Chlamydia trachomatis* in cycloheximide-treated McCoy cells. *J Clin Microbiol* 1977;6(4):328-31.
9. Chernesky MA, Mahony JB, Castriciano S, Mores M, Stewart IO, Landis SJ, Seidelman W, Sargeant EJ, Leman C. Detection of *Chlamydia trachomatis* antigens by enzyme immunoassay and immunofluorescence in genital specimens from symptomatic and asymptomatic men and women. *J Infect Dis* 1986;154(1):141-8.
10. Horn JE, Quinn T, Hammer M, Palmer L, Falkow S. Use of nucleic acid probes for the detection of sexually transmitted infectious agents. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1986;4:101S-9S.
11. Palmer L, Falkow S. A common plasmid of *Chlamydia trachomatis*. *Plasmid* 1986;16:52-62.
12. Bobo L, Coutlee F, Yolken RH, Quinn T, Viscidi RP. Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* cervical infection by detection of amplified DNA with an enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 1990;28(9):1968-73.
13. U.S.Department of Labor OSHA. Occupational exposure to bloodborne pathogens; final rule. *Federal Register* 1991;56(235):64175-82.
14. Centers for Disease Control, National Institutes of Health. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*. 3rd ed. Washington: U.S. Government Printing Office; 1993.
15. World Health Organization. *Laboratory biosafety manual*. Geneva: World Health Organization; 1993.
16. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Protection of laboratory workers from instrument biohazards and infectious disease transmitted by blood, body fluids, and tissue; approved guideline*. Wayne,PA: NCCLS; 1997.
17. Centers for Disease Control. Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings. *MMWR* 1987 Aug;36(suppl. 2S):3S-17S.
18. Sehulster LM, Hollinger FB, Dreesman GR, Melnick JL. Immunological and biophysical alteration of hepatitis B virus antigens by sodium hypochlorite disinfection. *Appl Environ Microbiol* 1981 Nov;42(5):762-7.
19. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Clinical laboratory waste management: approved guideline*. Villanova,PA: NCCLS; 1993. 1;-29-42 p.
20. U.S.Environmental Protection Agency. *EPA guide for infectious waste management*. Washington,DC: U.S. Environmental Protection Agency; 1986. 1-5-5, R1-R3, A1-A24 p.

21. Martin LS, McDougal JS, Loskoski SL. Disinfection and inactivation of the human T lymphotropic virus type III / lymphadenopathy-associated virus. *J Infect Dis* 1985 Aug;152(2):400-3.
22. Girdner JL, Cullen AP, Salama TG, He L, Lorincz A, Quinn TC. Evaluation of the Digene Hybrid Capture II CT-ID test for detection of *Chlamydia trachomatis* in endocervical specimens. *J Clin Microbiol* 1999 May;37(5):1579-81.
23. Lan J, Melgers I, Meijer CJLM, Walboomers JMM, Roosendaal R, Burger C, Bleker OP, van den Brule AJC. Prevalence and serovar distribution of asymptomatic cervical *Chlamydia trachomatis* infections as determined by highly sensitive PCR. *J Clin Microbiol* 1995 Dec;33(12):3194-7.
24. Schachter J. Chlamydiae. *Manual of Clinical Microbiology*. Balows, A., Hausler, William J., Jr., Herrmann, Kenneth L., Isenberg, Henry D., and Shadomy, H. Jean. 1045-53. 1991.

## PROBLEMEN OPLOSSEN

### *digene* HC2 CT-ID DNA TEST

WAARNEMING	WAARSCHIJNLIJKE OORZAKEN	OPLOSSINGEN
<b>Onjuiste of geen kleurverandering waargenomen tijdens denaturatie.</b>	Denaturatiereagens niet toegevoegd, of denaturatiereagens niet goed bereid.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Controleer of het denaturatiereagens de indicatorkleurstof bevat en een donkerpaarse kleur heeft.</li> <li>2. Controleer of denaturatiereagens aan het monster werd toegevoegd door het meten van het monstervolume (1,5 ml wordt verwacht). Wanneer het volume aangeeft dat denaturatiereagens niet werd toegevoegd, voer de juiste toevoeging uit, meng en ga door met de assay wanneer de juiste kleurverandering dan wordt geobserveerd.</li> </ol>
	Bloederig monster kan de kleurverandering maskeren.	De beschreven exacte kleurverandering wordt niet verwacht bij deze monstertypes; assaytestresultaten mogen niet nadelig worden beïnvloed.
	Monster pH kan ongewoon zuur zijn.	Het monster kan ongewoon zuur zijn, daardoor zal de verwachte kleurverandering niet optreden. Neem een nieuw monster af <u>vóór</u> het aanbrengen van azijnzuur op de cervix omdat een verkeerd monster pH de testresultaten nadelig zal beïnvloeden.
<b>Kwaliteitscontrole levert incorrecte resultaten op</b>	Verkeerd softwareprotocol gekozen voor de test.	Als het softwareprotocol incorrect blijkt voor de test die wordt uitgevoerd, moet de plaat binnen 30 minuten nadat detectiereagens 2 is toegevoegd en het correcte protocol is toegepast, opnieuw worden gelezen.
	Omgekeerde plaatsing van QC CT en QC GC	Run monsters opnieuw.
<b>Onjuiste kleurverandering waargenomen tijdens hybridisatie.</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ontoereikende menging van Probe Mix met gedenatureerde kalibrators, kwaliteitscontroles en/of monsters.</li> <li>• Probe Mix niet toegevoegd.</li> <li>• Onjuist volume reagens toegevoegd.</li> </ul>	Schud de hybridisatie-microtiterplaat gedurende nog eens 2 minuten. Voeg nog eens 25 µl Probe Mix toe wanneer er wells zijn die nog paars of grijs blijven en meng goed. Test het monster opnieuw wanneer na het toevoegen en opnieuw mengen van probe de juiste kleurverandering niet optreedt en het monster geen bloed of andere materialen bevatte.
	Bloederig monster kan de kleurverandering maskeren.	De beschreven exacte kleurverandering wordt niet verwacht bij deze monstertypes; assaytestresultaten mogen niet nadelig worden beïnvloed.
	Het monster bevatte <1000 µl <i>digene</i> Specimen Transport Medium (STM).	Controleer het volume van het oorspronkelijke monster. Het volume moet 1425 µl ± 20 µl zijn (na verwijdering van 75 µl). Wanneer het volume <1405 µl is, bevatte het oorspronkelijke monster <1000 µl STM. Neem een nieuw monster.
<b>Assay voldoet niet aan kalibratie-verificatie- criteria. Geen signaal geobserveerd in positieve kalibrator, kwaliteitscontroles of monsters.</b>	Geen probe toegevoegd aan probe-verdunningsmiddel.	Bereid CT Probe Mix als beschreven in het deel Bereiden en opslag van reagens van deze gebruikshandleiding. Goed mengen. Label de buis correct. Herhaal assay met behulp van vers bereid Probe Mix.
	Probe tijdens bereiding verontreinigd met RNase.	Gebruik aërosol-beschermende pipetpunten bij het pipetteren van probe en draag poedervrije handschoenen. Verdun probe in steriele container. Gebruik alleen schone nieuwe wegwerp reagensreservoirs.
	Ontoereikende menging van Probe Mix en probe-verdunningsmiddel.	Na toevoeging van probe aan probe-verdunningsmiddel, meng gedurende 5 seconden zeer grondig door middel van vortexen bij hoge snelheid. Er moet een zichtbare vortex ontstaan.
	Ontoereikende menging van verdund probe en gedenatureerd monster.	Na toevoeging van gedenatureerd monster aan Probe Mix de hybridisatie-microtiterplaat afdekken en gedurende 3 ± 2 minuten op roterend schudapparaat I ingesteld op 1100 ± 100 omw/min schudden, als beschreven in het onderdeel Testprocedure, Hybridisatie, stap 6 van deze gebruikshandleiding. Controleer op kleurverandering van paars tot geel in elke well.



<b><i>digene</i> HC2 CT-ID DNA TEST</b>		
<b>WAARNEMING</b>	<b>WAARSCHIJNLIJKE OORZAKEN</b>	<b>OPLOSSINGEN</b>
	Verkeerde tijd of temperatuur tijdens hybridisatiestap.	Hybridiseer gedurende 60 ± 5 minuten bij 65 ± 2 °C, als beschreven in het onderdeel Testprocedure, Hybridisatie, stap 7 van deze gebruikshandleiding. Controleer de temperatuur van de microtiterplaatverwarmer I. Controleer of de verwarming is ingesteld op het verwarmen van monsters tot de juiste temperatuur en gedurende 1 uur vóór gebruik werd voorverwarmd.
	Ontoereikende menging tijdens capture-stap.	Schud gedurende 60 ± 5 minuten bij 20-25 °C met 1100 ±100 omw/min op het roterend schudapparaat I als beschreven in het onderdeel Testprocedure, Hybridecapture, stap 4 van deze gebruikshandleiding. Controleer de snelheid van het roterend schudapparaat I door middel van kalibratie als omschreven in het onderdeel Schudsnelheidskalibratie van de gebruikshandleiding voor het roterend schudapparaat I.
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Niet de juiste hoeveelheid detectiereagens 1 toegevoegd.</li> <li>Niet gedurende de aangegeven tijd geïncubeerd.</li> </ul>	<p>Pipetteer 75 µl detectiereagens 1 in elke well met behulp van een 8-kanaalspipet.</p> <p>Incubeer gedurende 30-45 minuten bij 20-25 °C.</p>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Niet de juiste hoeveelheid detectiereagens 2 toegevoegd.</li> <li>Niet gedurende de aangegeven tijd geïncubeerd.</li> </ul>	<p>Pipetteer 75 µl detectiereagens 2 in elke well met behulp van een 8-kanaalspipet.</p> <p>Incubeer gedurende 15 tot 30 minuten bij 20-25 °C.</p>
	Luminometer defect of verkeerde programmering.	Raadpleeg de rubrieken onderhoud/service en probleemoplossing in de toepasselijke <i>digene</i> assay analyse software gebruikshandleiding voor verdere instructies, of neem contact op met de technische dienst van QIAGEN .
<b>Verhoogde RLU-waarden in kalibrators, kwaliteitscontroles en/of monsters (≥ 150 RLU's in veel of alle wells). Assay voldoet mogelijk niet aan validatiecriteria.</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Geen denaturatiereagens toegevoegd; of verkeerd volume reagens toegevoegd; of inadequate menging van denaturatiereagens met kalibrators, kwaliteitscontroles of monsters.</li> <li>Te lage temperatuur waterbad en te laag waterniveau.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Controleer voorafgaand aan het toevoegen van denaturatiereagens of het herhalingspipet nauwkeurig afgeeft. Gekalibreerde pipetten zijn uitermate belangrijk. Voeg een half volume denaturatiereagens toe aan elke buis en meng goed. Controleer om fout-positieve resultaten te vermijden of de vloeistof het gehele binnenvlak van de buis wast (keer de buis op tijd om wanneer u met de hand mengt). Na toevoeging van denaturatiereagens moeten kalibrators, kwaliteitscontroles en monsters paars worden. Controleer snelheidskalibratie van Multi-Specimen Tube Vortexer.</li> <li>Controleer het waterniveau en de temperatuur van het waterbad.</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Lichtlek in de luminometer.</li> <li>Afdichting is verbroken.</li> <li>Deur niet afgedicht.</li> </ul>	Voer een achtergrondaflezing uit (ruwe gegevensmeting) van de luminometer door het lezen van lege microtiterplaat. Een aflezing van meer dan 50 RLU's geeft aan dat er lichtlek kan bestaan. Raadpleeg de rubrieken onderhoud/service en probleemoplossing in de toepasselijke <i>digene</i> assay analyse software gebruikshandleiding voor verdere instructies, of neem contact op met de technische dienst van QIAGEN.
	Contaminatie van detectiereagens 2 of gecoate microtiterplaatwells door detectiereagens 1 of exogene alkalische fosfatase.	Raadpleeg 'Contaminatiecontrole' in dit hoofdstuk 'Problemen oplossen'.
	Wasbuffer verontreinigd.	Raadpleeg 'Contaminatiecontrole' in dit hoofdstuk 'Problemen oplossen'.
	Automatische plaatwasser I verontreinigd.	Raadpleeg 'Contaminatiecontrole' in dit hoofdstuk 'Problemen oplossen'.

**digene HC2 CT-ID DNA TEST**

WAARNEMING	WAARSCHIJNLIJKE OORZAKEN	OPLOSSINGEN
	Ontoereikende reiniging van gecoate microtiterplaatwells na incubatie van detectiereagens 1.	Was de microtiterplaatwells 6 keer grondig met wasbuffer, het vullen van wells tot overstrooming na elke keer of met behulp van de automatische plaatwasser. Na het wassen mag er geen achtergebleven roze vloeistof zichtbaar zijn in de wells. Zie het onderdeel Problemen oplossen van de <i>Gebruikshandleiding van de automatisch plaatwasser</i> voor instructies over het testen op contaminatie of defecten.
	Contaminatie van microtiterplaatwells met detectiereagens 1.	Controleer of alle werkvlakken schoon en droog zijn. Wees voorzichtig bij het gebruik van detectiereagens 1. Vermijd aërosolen.
	Vloeien van hybridisatieoplossing op dezelfde plek van Kimtowels tissues of gelijkwaardige pluisarme papieren handdoeken.  Gebruik van verkeerde vloeihanddoeken.	Niet opnieuw vloeien op dezelfde plek van de Kimtowels tissues of gelijkwaardige pluisarme papieren handdoeken.  Gebruik Kimtowels tissues of gelijkwaardig pluisarm keukenpapier om te vloeien.
	CT kwaliteitscontrole materiaal gebruikt als positieve kalibrator. Validatie assay mislukt.	Controleer of de kalibrators en kwaliteitscontroles correct geplaatst zijn.
<b>Lage PC/NC ratio's of hoog aantal laagpositieve monsters (&gt; 20% van het totaal aantal monsters) met een RLU/CO ratio &lt; 2,0. Assay voldoet mogelijk niet aan validatiecriteria.</b>	Ontoereikende monsterbereiding.	Voeg het juiste volume denaturatiereagens toe en meng grondig door middel van vortexen. Let er ter voorkoming van fout-positieve resultaten op dat de vloeistof het volledige binnenoppervlak van de buis door middel van vortexen volgens de Multi-Specimen Tube Vortexer 2-methode gedurende 5 seconden wast (voor de handmatige vortex-methode, vortex gedurende tenminste 5 seconden en keer de buis op tijd om). Er moet een duidelijke kleurverandering van transparant naar donkerpaars waarneembaar zijn. Incubeer gedurende $45 \pm 5$ minuten bij $65 \pm 2$ °C. Bij gebruikmaking van PreservCyt Solution-monsters verschijnen deze hybriden waarschijnlijk op de binnenwanden van de monsterconversiebuis. Om vermenging van dit niet-gedenatureerd celmateriaal te voorkomen mag de pipetpunt de zijkanten van de monsterconversiebuis tijdens het overbrengen van het gedenatureerde monster naar de microtiterplaatwell voor het hybridiseren van de CT-probe niet aanraken. Raadpleeg voor een gedetailleerde procedurebeschrijving de gebruikshandleiding van de <i>digene HC2 Sample Conversion Kit</i> .
	Probe ontoereikend gemengd of onvoldoende Probe Mix toegevoegd aan assays.	Bereid Probe Mix volgens beschrijving. Meng grondig door middel van vortexen en let op dat een zichtbare vortex tot stand komt. Probe Mix moet aan wells worden toegevoegd met een multikanaals- of repeterende pipet om nauwkeurige afgifte te garanderen.
	Onvoldoende volume Probe Mix toegevoegd aan elke hybridisatie-microtiterplaatwell.	Controleer of het 8-kanaalspipet nauwkeurig vult alvorens Probe Mix toe te voegen aan de hybridisatie-microtiterplaat. Op de bodem van elke microwell moet 25 µl Probe Mix aan het gedenatureerde monster worden toegevoegd. Controleer of de 8-kanaals pipet goed werkt voordat u het Probe Mix toevoegt aan de hybridisatiewells. De kleurverandering moet van donkerpaars naar geel zijn na toevoeging en grondig mengen van Probe Mix.
	Verlies van detectiereagens 1-activiteit.	Bewaar detectiereagens 1 bij 2-8 °C. Niet gebruiken na de uiterste gebruiksdatum op het label van de buitenverpakking van de kit.
	Onvoldoende capture van RNA:DNA-hybriden.	De capturestep moet worden verricht met behulp van het roterend schudapparaat I ingesteld op $1100 \pm 100$ omw/min. Controleer de snelheid van het schudapparaat als omschreven in het onderdeel Shakersnelheidskalibratie van de gebruikshandleiding voor het roterend schudapparaat I.

<b><i>digene</i> HC2 CT-ID DNA TEST</b>		
<b>WAARNEMING</b>	<b>WAARSCHIJNLIJKE OORZAKEN</b>	<b>OPLOSSINGEN</b>
	Ontoereikend wassen.	Was microtiterplaatwells 6 keer grondig met wasbuffer, vul de wells telkens tot ze overstromen bij gebruik van automatische plaatwasser.
	Wasbuffer verontreinigd.	Raadpleeg 'Contaminatiecontrole' in dit hoofdstuk 'Problemen oplossen'.
<b>Series positieve monsters met RLU-waarden die ongeveer overeenkomen.</b>	Contaminatie van gecoate microtiterplaatwells tijdens assay-manipulatie.	Dek de gecoate microtiterplaatwells af tijdens alle incubaties. Vermijd blootstelling van microtiterplaatwells aan contaminatie door aërosol tijdens het verrichten van de assay. Draag poedervrije handschoenen tijdens handelingen.
	Contaminatie van detectiereagens 2.	Pas op dat de voorraad niet wordt verontreinigd tijdens het pipetteren van detectiereagens 2 in gecoate microtiterplaatwells. Vermijd contaminatie van detectiereagens 2 door middel van aërosols uit detectiereagens 1 of uit laboratoriumstof, enz.
	Defect in de automatische plaatwasser I	Raadpleeg 'Contaminatiecontrole' in dit hoofdstuk 'Problemen oplossen' of zie het onderdeel 'Problemen oplossen van de <i>Gebruikshandleiding van de automatisch plaatwasser</i> voor instructies over het testen op contaminatie of het vaststellen van defecten
<b>Brede % CV's tussen-replicaten.</b>	Onnauwkeurige pipettering (d.w.z. , luchtballen, pipet niet gekalibreerd).	Controleer pipet om zeker te stellen dat reproduceerbare volumes worden geleverd. Kalibreer pipetten routinematig.
	Onvoldoende menging.	Bij alle stappen grondig mengen. Vortex vóór en na denaturatie-incubatie. Controleer of een zichtbare vortex tot stand komt.
	Onvolledig overbrengen van vloeistof uit hybridisatie-microtiterplaat op gecoate microtiterplaatwells.	Let tijdens transferstap van hybridisatie-microtiterplaat naar gecoate microtiterplaat op om zeker te stellen dat reproduceerbare volumes worden overgebracht.
	Verkeerde wasomstandigheden.	Was microtiterplaatwells 6 keer grondig met wasbuffer, vul de wells telkens tot ze overstromen bij gebruik van automatische plaatwasser en de juiste automatische plaatwasser protocols.
	Contaminatie van microtiterplaatwells met detectiereagens 1.	Controleer of alle werkvlakken schoon en droog zijn. Wees voorzichtig bij het gebruik van detectiereagens 1. Vermijd aërosolen.
	Verontreinigde pipetpunt met ongedenatureerd materiaal bij de verdeling van gedenatureerd monster op de microtiterplaatwell die voor CT-probe-hybridisatie wordt gebruikt.	De denaturatiestap bij de monsterverwerkingsprocedure moet overeenkomstig deze gebruikshandleiding worden uitgevoerd. Onjuist vortexen van een monster, inversie van de buis en agitatie kunnen leiden tot onvolledige denaturatie of niet-specifieke RNA:DNA-hybriden uit cervicale monsters. Met name bij monsters in PreservCyt Solution is de kans groot dat dergelijke hybriden zich aan de binnenzijde van de monsterconversiebuis bevinden. Om mogelijke vermenging met dit ongedenatureerde celmateriaal te voorkomen mag de pipetpunt de zijkanten van de monsterconversiebuis niet raken tijdens de transfer van het gedenatureerde monster naar de microbuis of microtiterplaatwell die voor CT-probe-hybridisatie wordt gebruikt.
	Vloeien op dezelfde plek van Kimtowels Tissues over diverse rijen.	Niet opnieuw vloeien op dezelfde plek van de Kimtowels tissues.
<b>Fout-positieve resultaten verkregen uit bekende negatieve monsters.</b>	Detectiereagens 2 verontreinigd.	Pas op voor kruiscontaminatie van monsters bij het toevoegen van detectiereagens 2 tussen monsters. Wanneer alleen een deel van een kit wordt gebruikt, doe dan het volume noodzakelijk voor die assay in een schoon reagensreservoir alvorens de pipet te vullen.
	Verontreiniging van microtiterplaatwells met detectiereagens 1.	Was de microtiterplaatwells 6 keer grondig met wasbuffer, vul tot overstroming na elke keer of met behulp van de automatische plaatwasser. Na het wassen mag er geen achtergebleven roze vloeistof zichtbaar zijn in de microtiterplaatwells.

**digene HC2 CT-ID DNA TEST**

WAARNEMING	WAARSCHIJNLIJKE OORZAKEN	OPLOSSINGEN
	Verontreinigde pipetpunt met ongedenatureerd materiaal bij de verdeling van gedenatureerd monster op de microtiterplaatwell die voor CT-probe-hybridisatie wordt gebruikt.	De denaturatiestap bij de monsterverwerkingsprocedure moet overeenkomstig de instructies worden uitgevoerd. Onjuist vortexen van een monster, inversie van de buis en agitatie kunnen leiden tot onvolledige denaturatie of niet-specifieke RNA:DNA-hybriden uit cervicale monsters. Met name bij monsters in PreservCyt Solution is de kans groot dat dergelijke hybriden zich aan de binnenzijde van de monsterconversiebuis bevinden. Om mogelijke vermenging met dit ongedenatureerde celmateriaal te voorkomen mag de pipetpunt de zijkanten van de monsterconversiebuis niet raken tijdens de transfer van het gedenatureerde monster naar de microbuis of microtiterplaatwell die voor CT-probe-hybridisatie wordt gebruikt.
	Ontoereikende monsterbereiding.	Voeg het juiste volume denaturatiereagens toe en meng grondig door middel van vortexen. Let ter voorkoming van fout-positieve resultaten op dat de vloeistof het volledige binnenoppervlak van de buis door middel van vortexen volgens de Multi-Specimen Tube Vortexer 2-methode gedurende 5 seconden wast (voor de handmatige vortex-methode, keer de buis op tijd om). Er moet een duidelijke kleurverandering van transparant naar donkerpaars waarneembaar zijn. Incubeer gedurende $45 \pm 5$ minuten bij $65 \pm 2$ °C. Bij gebruikmaking van PreservCyt Solution-monsters verschijnen deze hybriden waarschijnlijk op de binnenwanden van de monsterconversiebuis. Om vermenging van dit niet-gedenatureerd celmateriaal te voorkomen mag de pipetpunt de zijkanten van de monsterconversiebuis tijdens het overbrengen van het gedenatureerde monster naar de microtiterplaatwell voor het hybridiseren van de CT-probe niet aanraken. Raadpleeg voor een gedetailleerde procedurebeschrijving de gebruikshandleiding van de <i>digene HC2</i> Sample Conversion Kit.
	Verkeerde wasomstandigheden.	Was microtiterplaatwells 6 keer grondig met wasbuffer, vul de wells telkens tot ze overstromen of met behulp van automatische plaatwasser en de juiste automatische plaatwasser protocollen.
<b>Verhoogde RLU-waarden negatieve kalibrator (&gt; 150 RLU's). Restant van assay presteert naar verwachting.</b>	Detectiereagens 2 werd bij een hogere temperatuur geïncubeerd dan 20-25 °C.	Test is ongeldig als gevolg van hoog-negatieve kalibratorwaarden. Doe de test opnieuw en controleer of capture en detectiestappen incuberen bij 20-25 °C.
	Detectiereagens 2 werd langer geïncubeerd dan 30 minuten.	Lees de plaat af na een incubatietijd van 15 minuten (en niet langer dan 30 minuten incubatie) bij 20-25 °C.
	Detectiereagens 2 of wasbuffer was verontreinigd met alkalische fosfatase of detectiereagens 1.	Raadpleeg 'Contaminatiecontrole' in dit hoofdstuk 'Problemen oplossen'.

## CONTAMINATIECONTROLE

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

## QIAGEN CONTACTINFORMATIE

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

QIAGEN<sup>®</sup>, *digene*<sup>®</sup>, Hybrid Capture<sup>®</sup> en Rapid Capture<sup>®</sup> zijn gedeponeerde handelsmerken van QIAGEN

Hybrid Capture technologie valt onder Europees patent Nr. 0 667 918 geregistreerd in Oostenrijk, België, Zwitserland, Liechtenstein, Duitsland, Denemarken, Spanje, Frankrijk, Verenigd Koninkrijk, Griekenland, Ierland, Italië, Luxemburg, Nederland en Zweden.

U.S. Hybrid Capture octrooinr.: 6.228.578B1

Handelsmerkvermeldingen:

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

## SAMENVATTING VAN *digene* HC2 CT-ID DNA TEST

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

	PROCEDURE	
<b>Denaturatie</b> (Voor monsters in PreservCyt Solution, zie Bereidingsprocedure voor monsters in PreservCyt Solution)	<b>Handmatige vortex-methode</b>  -Creëer plaat-opzet. Label hybridisatie-microtiterplaten Bereid denaturatiereagens. ↓ Pipetteer denaturatiereagens (volume komt overeen met de helft van het volume) in kalibrators, kwaliteitscontroles en monsters. Vortex elke kalibrator, kwaliteitscontrole en elk monster en elke controle afzonderlijk gedurende 5 seconden bij hoge snelheid en keer om (zie deze gebruikshandleiding voor bijzonderheden). Controleer of alle buizen een paarse kleur hebben. ↓ Incubeer gedurende 45 ± 5 minuten bij 65 ± 2 °C. ↓ Bereid CT Probe Mix. ↓ ↓ ↓ ↓	<b>Methode met de Multi-Specimen Tube Vortexer 2</b>  Creëer plaat-opzet. Label hybridisatieplaat. Bereid denaturatiereagens. ↓ Pipetteer denaturatiereagens (volume komt overeen met de helft van het volume) in kalibrators, kwaliteitscontroles en monsters. Controleer of alle buizen een paarse kleur hebben. ↓ Dek rek af met folie en deksel. ↓ Vortex gedurende 10 seconden op maximumsnelheid. ↓ Incubeer gedurende 45 ± 5 minuten bij 65 ± 2 °C. ↓ Bereid CT Probe Mix. ↓ ↓
<b>Hybridisatie</b>	<b>Methode met microtiterplaat verwarmers I</b>  Meng het gedenateerde monster goed en pipetteer 75 µl gedenateerde kalibrator, kwaliteitscontrole of monster in de microtiterplaatwells. ↓ Incubeer gedurende 10 minuten bij 20-25 °C ↓ Pipetteer 25 µl CT Probe Mix in microtiterplaatwells. ↓ Dek microtiterplaat af met een plaatdeksel en schud gedurende 3 ± 2 minuten op roterend schudapparaat I bij 1100 ±100 omw/min. <i>Controleer of alle wells een gele kleur hebben.</i> (De monsters in PreservCyt Solution worden roze.) ↓ Incubeer gedurende 60 ± 5 minuten bij 65 ± 2 °C. ↓ Bereid gecoate microtiterplaat. ↓	
<b>HybrideCapture</b>	Breng de inhoud vanuit elke hybridisatieplaatwell over in overeenkomstige well in gecoate microtiterplaat met behulp van een 8-kanaals pipet. ↓ Dek af met een plaatdeksel of afdichting. Schud gedurende 60 ± 5 minuten bij 1100 ±100 omw/min bij 20-25 °C. Bereid wasbuffer. ↓ Schenk de gecoate microtiterplaat leeg en vloe af (zie deze gebruikshandleiding voor bijzonderheden). ↓	
<b>Hybridetectie</b>	Pipetteer 75 µl detectiereagens 1 in elke well van gecoate microtiterplaat. Dek de gecoate microtiterplaat af met plaatdeksel of Parafilm of gelijkwaardig. <b>Incubeer gedurende 30-45 minuten bij 20-25 °C. Was de plaat volgens de gewenste methode.</b> ↓	
<b>Wassen</b>	<b>Methode voor handmatig wassen</b>  Schenk de gecoate microtiterplaat leeg en vloe af (zie bijsluiters voor bijzonderheden). ↓ Was 6 keer. ↓ Vloe af op pluisarme papieren handdoeken. ↓	<b>Methode met de automatische plaatwasser</b>  Plaats de plaat op de wasmachine en druk op "START/STOP" om te beginnen. Ga naar de volgende stap ↓ ↓ ↓ ↓
<b>Signaal-amplificatie</b>	Pipetteer 75 µl detectiereagens 2 in elke well van gecoate microtiterplaat. <b>Bedek met plaatdeksel. Incubeer gedurende 15-30 minuten bij 20-25 °C.</b> ↓	
<b>Aflezing</b>	Lees de gecoate microtiterplaat af op door QIAGEN goedgekeurde luminometer. ↓ Valideer assay en interpreteer monsterresultaten.	