



Goffin Molecular Technologies

PRESTO CT•NG

**COMBINED CHLAMYDIA TRACHOMATIS AND
NEISSERIA GONORRHOEAE REAL-TIME
AMPLIFICATION DNA ASSAY**

INSTRUCTIONS FOR USE

GEbruiksaanwijzing | GEBRAUCHSANWEISUNG | MODE D'EMPLOI





Goffin Molecular Technologies

Presto combined qualitative real time CT/NG assay

Complies with the Directive 98/79/EC of the European Parliament
and of the Council of 27 October 1998 on in vitro diagnostic medical devices.

For In Vitro Diagnostic Use Only

Instructions for use

Combined Chlamydia trachomatis-Neisseria gonorrhoeae real time amplification DNA assay.
Real time amplification DNA assay for the qualitative in vitro detection of Chlamydia trachomatis (CT)
and Neisseria gonorrhoeae (NG) DNA in urine, urethral swab and endocervical swab specimen.

Catalogue Number: CG 160100, 4 x 25 tests
Catalogue Number: CG 160500, 5 x 100 tests

Store at -20°C upon receipt.

Contents

1.	Intended use	5
2.	Summary and explanation of the test	5
3.	Principle of the test procedure	5
4.	Reagents	6
	4.1 Components in each CT/NG assay kit	
	4.2 Additional materials and instruments required	
	4.3 Reagent preparation and storage	
	4.4 Chemical or physical indications of instability	
5.	Specimen collection and preparation	8
6.	Presto CT/NG test procedure	9
	6.1 Reagent preparation	
	6.2 Procedure	
	6.2 Procedural notes	
7.	Interpretation of results	10
8.	Limitations of the procedure	12
9.	Performance characteristics	12
10.	References	18
11.	Availability	18

1. Intended use

The Goffin Molecular Technologies Presto Chlamydia trachomatis (CT)- Neisseria gonorrhoeae (NG) Assay kit is intended to be used for in vitro qualitative detection of Chlamydia trachomatis plasmid DNA and Neisseria gonorrhoeae chromosomal DNA in urine, urethral swab specimen and endocervical swab specimen of human origin. The intended user will be a specialized molecular diagnostic laboratory. The test will be carried out by trained laboratory personnel. No special training will be required for routine laboratories performing quantitative PCR.

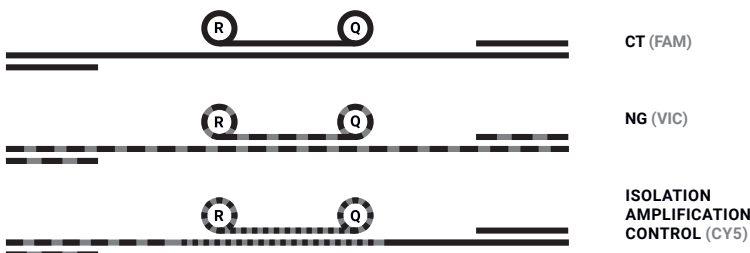
2. Summary and explanation of the test

Chlamydia trachomatis is an obligate intracellular gram-negative bacterium. Fifteen different serovars are known including eight (D-K) causing urogenital infections. Infection in females is frequently asymptomatic, and untreated infections may progress to endometritis, salpingitis and infertility. Screening for asymptomatic infections is indicated to reduce the transmission of CT and to prevent the development of severe complications¹.

Neisseria gonorrhoeae is responsible for the second most prevalent sexually transmitted disease after Chlamydia trachomatis. Infection in females is frequently asymptomatic which increases the risk of transmission. Long term undiagnosed infections may progress to pelvic inflammatory disease, chronic pelvic pain, ectopic pregnancy, neonatal conjunctivitis, and infertility. Early detection of infection is indicated to reduce the transmission and subsequent severe complications². Real time PCR has proven to be a sensitive and easy to use diagnostic tool for many micro-organisms and is a standard technique to detect CT/NG. It is known that there are specimen specific but unknown inhibitory substances present in some clinical samples, which are not always reliably removed during sample preparation. A specific designed isolation/inhibition Isolation Amplification Control is introduced which will recognize inefficient DNA isolation and/or PCR inhibition in each individual clinical sample. Combining real time PCR with the addition of an Isolation Amplification Control, which monitors both inhibition and nucleic acid extraction of clinical samples, generates the best of two worlds. The Presto CT/NG kit provides this combination and warrants a correct interpretation omitting false negative and producing true positive signals with high sensitivity and specificity. The real time format of the kit reduces the risk of contamination by amplicons. In addition, the Chlamydia trachomatis Swedish variant strain will be successfully detected. Finally, another unique feature is introduced in the Presto kit. To circumvent negative results in double infections with one prominent (highly positive) bacterium, CT and NG selectors are available. These selectors will allow detection of low load of one target in combination with high load of the other target in the same sample.

3. Principle of the test procedure

The detection of Chlamydia trachomatis (CT) and Neisseria gonorrhoeae (NG) DNA by the polymerase chain reaction (PCR) is based on the amplification of a part of the CT cryptic plasmid DNA and the opa genes of NG using specific oligonucleotides. The PCR products are detected by internal probes, each linked with a different fluorescent reporter dye ("R"). The fluorescence of the reporter is quenched by a quencher group ("Q") linked to the same probe. During formation of the PCR product, the probe is degraded and fluorescence of the reporter is no longer quenched and can be detected in real time. An Isolation Amplification Control bacterium is added before isolation and amplification of a clinical specimen. This control bacterium contains a DNA fragment with the reverse primer recognition site for CT and the forward primer recognition site for NG. The amplified sequence between the primers however is different from the CT/NG fragments. This is detected by a probe sequence with a different reporter dye. The fluorescence of the IAC reporter dye can be used to monitor both isolation and amplification efficiency.



SELECTORS

The introduction of selectors introduces a new concept in real time detection of double infections. The kit provides a CT as well as a NG selector. These selectors are meant to select for either CT or NG in a clinical sample highly positive (IAC negative) for NG or CT preventing the risk of a false negative double infection. The use of selectors is advised when a sample is positive for CT or NG. The function of the selector will restore the IAC signal so that even weak positive CT or NG signals can be detected in the presence of high loads of NG or CT DNA, respectively. For this purpose the same isolated DNA fraction can be used in a subsequent PCR while adding the selector of choice before the amplification. For high CT positive samples the NG selector should be added and for high positive NG positive samples the CT selector should be added before amplification (see protocol for volumes).

4. Reagents

All clinical samples should be regarded as infectious. These samples should be handled at the Biosafety Level 2 as recommended for any potentially infectious specimen in the Centre for Disease Control/National Institutes of Health Manual "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 1984.

Wear protective gloves.

Use sterile aerosol resistant pipette tips.

A uni-directional workflow must be adhered to in the laboratory with different rooms for sample preparation, pre-amplification area and post-amplification.

NOTE: Reagents in this assay contain **sodium azide** as a preservative (0.05%). Sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. On disposal, flush drains with generous amounts of cold water to prevent azide build-up.

4.1.1 Components in each Presto CT/NG CG 160100, 4 x 25 assays/ kit

- 1. CT/NG PCR mix MASTER MIX (CG301001)**
4 tubes with a black colour code, labelled "MASTER MIX" containing 400 µl ready to use PCR mix. This mixture contains four primers for amplification of the CT DNA, NG DNA and the Isolation Amplification Control DNA. It contains three fluorescent probes for detection of CT DNA, NG DNA and control DNA respectively. The master mix contains all ingredients for PCR amplification including DNA polymerase.
- 2. CT/NG Isolation Amplification Control Isolation Amplification Control (CG301003)**
4 tubes with a red colour code, labelled "Isolation Amplification Control" containing 150 µl Isolation Amplification Control. The Isolation Amplification Control consists of an inactivated *E. coli* modified with a genomic DNA fragment containing primer binding sites identical to the *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* sequences, but with a different intermediate probe sequence.
NOTE: resuspend before use.
- 3. CT Positive Control Positive Control CT (CG301005)**
4 tubes with a blue colour code, labelled "Positive Control CT" containing 55 µl positive control. The positive control consists of CT DNA at 4 IFU/ 10 µl.
- 4. NG Positive Control Positive Control NG (CG301006)**
4 tubes with a green colour code, labelled "Positive Control NG" containing 55 µl positive control. The positive control consists of NG DNA at 100 CFU/ 10 µl.
- 5. CT/NG Negative Control Negative Control (CG301014)**
2 tubes with a transparent colour code, labelled "Negative Control" containing 500 µl negative control.
- 6. CT Selector CT SELECTOR (CG301008)**
1 tube with a violet colour code, labelled "CT SELECTOR" containing 50 µl of CT selector for use with high NG positive samples for the detection of a weak positive CT-co-infection.



7. **NG Selector NG SELECTOR (CG301007)**

1 tube with a yellow colour code, labelled 'NG SELECTOR' containing 50 µl of NG selector for use with high CT positive samples for the detection of a weak positive NG-co-infection.

NOTE: Use all components of the same kit lot number.

4.1.2 Components in each Presto CT/NG CG 160500, 5 x 100 assays/ kit

1. **CT/NG PCR mix MASTER MIX (CG301015)**

5 tubes with a black colour code, labelled "MASTER MIX" containing 1600 µl ready to use PCR mix. This mixture contains four primers for amplification of the CT DNA, NG DNA and the Isolation Amplification Control DNA. It contains three fluorescent probes for detection of CT DNA, NG DNA and control DNA respectively. The master mix contains all ingredients for PCR amplification including DNA polymerase.

2. **CT/NG Isolation Amplification Control Isolation Amplification Control (CG301016)**

5 tubes with a red colour code, labelled "Isolation Amplification Control" containing 750 µl Isolation Amplification Control. The Isolation Amplification Control consists of an inactivated *E. coli* modified with a genomic DNA fragment containing primer binding sites identical to the *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* sequences, but with a different intermediate probe sequence. **NOTE:** resuspend before use.

3. **CT Positive Control Positive Control CT (CG301017)**

4 tubes with a blue colour code, labelled "Positive Control CT" containing 300 µl positive control. The positive control consists of CT DNA at 4 IFU/ 10 µl.

4. **NG Positive Control Positive Control NG (CG301018)**

4 tubes with a green colour code, labelled "Positive Control NG" containing 300 µl positive control. The positive control consists of NG DNA at 100 CFU/ 10 µl.

5. **CT/NG Negative Control Negative Control (CG301014)**

2 tubes with a transparent colour code, labelled "Negative Control" containing 500 µl negative control.

6. **CT Selector CT SELECTOR (CG301008)**

1 tube with a violet colour code, labelled "CT SELECTOR" containing 50 µl of CT selector for use with high NG positive samples for the detection of a weak positive CT-co-infection.

7. **NG Selector NG SELECTOR (CG301007)**

1 tube with a yellow colour code, labelled 'NG SELECTOR' containing 50 µl of NG selector for use with high CT positive samples for the detection of a weak positive NG-co-infection.

Note: Use all components of the same kit lot number.

4.2 Additional materials and instruments required

The test can be used with standard guanidine iso-thiocyanate based lysis reagents and magnetic beads capture devices for DNA isolation.

PCR amplification can be carried out with any real time PCR apparatus able to detect the fluorophores:

FAM, VIC, ROX & Cy5. Small variations in cut off values however may occur due to differences in DNA isolation and/or PCR amplification detection depending on the apparatus used. In these cases a new cut off value can be determined without loss of sensitivity and specificity.

NOTE: No specific software is required for any calculation of the ROX signal. The ROX signal is included to make the test applicable for ABI 7500 instruments (and any other instruments that needs ROX). Software of all other real-time PCR instruments can use the Presto kit without limitations (e.g. LightCyclers).

Use sterile DNase-free polypropylene disposables for all steps in the procedure.

4.3 Reagent preparation and storage

1. **CT/NG PCR mix MASTER MIX** Thaw the tube prior to opening. Opened vial can be refrozen and thawed again only twice. Remark: mix and spin down in a short 3 seconds centrifugation before use.
2. **CT/NG Isolation Amplification Control [Isolation Amplification Control]** Thaw the tube prior to opening. Opened vial can be refrozen and thawed again only twice. Remark: mix and spin down in a short 3 seconds centrifugation before use.
3. **CT Positive Control Positive Control CT** Thaw the tube prior to opening. Opened vial can be refrozen and thawed again only twice. Remark: mix and spin down in a short 3 seconds centrifugation before use.
4. **NG Positive Control Positive Control NG** Thaw the tube prior to opening. Opened vial can be refrozen and thawed again only twice. Remark: mix and spin down in a short 3 seconds centrifugation before use.
5. **Negative Control Negative Control** Thaw the tube prior to opening. Opened vial can be refrozen and thawed again only twice. Remark: mix and spin down in a short 3 seconds centrifugation before use.
6. **CT Selector CT SELECTOR** Thaw the tube prior to opening. Opened vial can be refrozen and thawed again only twice. Remark: mix and spin down in a short 3 seconds centrifugation before use.
7. **NG Selector NG SELECTOR** Thaw the tube prior to opening. Opened vial can be refrozen and thawed again only twice. Remark: mix and spin down in a short 3 seconds centrifugation before use.

Store all components at -20 °C.

All components are temperature sensitive. Thaw only the components that are going to be used. Components can be refrozen twice. Keep kit reagents at 2 – 8 °C (on ice) when in use. Store the components at 2 – 8 °C for no longer than 4 days.

4.4 Chemical or physical indications of instability

Alteration in the physical appearance of test kit materials may indicate instability or deterioration. Expiry dates shown on component labels indicate the date beyond which components should not be used.

5. Specimen collection and preparation of samples

The Presto CT/NG kit is intended to be used on endocervical and urethral swab specimens and urine specimens. General collection devices can be used for standard DNA isolation procedures according to the manufacturer's protocols.

Example swab specimen

1. Collect endocervical and urethral swab specimens and store them in 2-5 ml of 2SP transport medium.
2. Use only validated swab devices. Do not use wooden or aluminium swabs for molecular detection.
3. Keep the swabs in the transport medium. Refrigerate (2 – 8 °C) or freeze swab specimens that will not be processed immediately. Specimens can be stored for 7 days at 2 – 8 °C.

Example urine specimen

PATIENT SHOULD NOT HAVE URINATED DURING 2 HOURS PRIOR TO SAMPLE COLLECTION.

1. Collect 10 to 30 ml of first catch urine into a clean polypropylene container without any preservatives.
2. Follow the laboratories collection and transport procedures. Refrigerate (2-8 °C) urine specimens that will not be processed immediately.

Specimen Preparation

This procedure must be performed in the Specimen Preparation Area in a class 2 Biological Safety Cabinet (protection to user and material).

DNA Isolated specimen:

This kit was validated with use of Nucleic Acid extracted samples by means of BioMérieux NucliSENS® easyMAG™. Please follow the manufacturer's instructions for a description of the system features, isolation protocols and operational guidelines.

Swabs: 200 µl vortexed specimen + 5 µl resuspended IAC + 2 ml easyMAG lysis buffer and elution in 60 µl of which 10 µl is used in the CT/NG PCR.

Urine: 500 µl vortexed urine + 5 µl resuspended IAC + 2 ml easyMAG lysis and elution in 60 µl of which 10 µl is used in the CT/NG PCR.

6. Presto CT/NG assay Kit Test Procedure

This procedure must be performed in the Pre-Amplification Preparation Area. Use aerosol barrier tips during the whole test procedure.

6.1 Reagent Preparation

Thaw the mixes needed and keep them at 2-8°C.

6.2 Procedure

1. Prepare the required number of reaction tubes or wells for the number of specimens to be measured, plus two tubes for the positive controls, one tube for the negative isolation control and one tube for the negative control.
2. Add 15 µl of the master mix to each reaction to be measured.
3. Vortex and spin down all DNA extracts. Carefully open specimen containers one by one and avoid contamination of gloves and pipette. Using a new aerosol barrier tip for each extract, add 10 µl DNA (Chapter 5) to the reaction tube/well containing the master mix. Replace gloves if suspect of contamination.
4. Using a new aerosol barrier tip, add 10 µl of each positive control Positive Control to the designated reaction tubes/wells containing the master mix. Carefully open the container and avoid contamination of gloves and pipette. Replace gloves if suspect of contamination.
5. Using a new aerosol barrier tip, add 10 µl of the negative control Negative Control to the designated reaction tube/well containing the master mix.
6. Close the reaction tubes or seal the plate, spin down and move the plate to the Amplification Area.
7. Load the reaction tubes/plate into the ABI PRISM® 7500 SDS*. Program the PCR System with following settings:

Fixed threshold:	0.01
Activation polymerase:	30 seconds 95 °C
Number of cycles:	40 cycles
Denaturation:	3 seconds 95°C
Annealing, extension and exonuclease activity:	30 seconds 60°C
Manual baseline settings	

* For Roche LightCycler480 II choose detection format "3 Colour Hydrolysis Probe", when another format is used most likely a colour compensation has to be performed once according to the manufacturer protocol.

USE OF SELECTORS

In case of a positive signal with either CT or NG with Ct/p<21 (e.g. 14-21) the PCR must be repeated with 1 µl of either of the selectors and 9 µl of isolated DNA: for CT positive samples use NG selector; for NG positive samples use CT selector. Amplification conditions are as described above. By adding the selector a new signal will only appear in case of a double infection. The signal of the primary detected STD is always stronger as compared to the secondary identified STD. A weak signal for the primary positive target may still be present. In a study on 12.254 samples in a STD clinic almost 50% more double infections were detected. However, since only 2.1% double infections were detected among all CT/NG positives after the use of selectors, one can also use the selectors only in case of high risk patients like men who have sex with men (MSM) and swingers. This will reduce the number of repeated test needed.

6.3 Procedural notes

1. Use a uni-directional workflow in the laboratory.

Specimen Preparation area: Dedicated area to prepare the samples. All materials (equipment, supplies, protection, gloves, etc.) have to be dedicated to this area. Materials from this area may not be moved to the Pre-Amplification area.

Pre-Amplification area: Dedicated area to prepare the reagents. All materials (equipment, supplies, protection, gloves, etc.) have to be dedicated to this area.

Amplification area: Dedicated area for amplification. All materials (equipment, supplies, protection, gloves, etc.) have to be dedicated to this area. Materials from this area, may not be moved to the Pre-Amplification Area, and may not be moved to the Specimen Preparation Area.

2. Always use aerosol resistant tips.
3. Be extremely careful when handling materials to prevent contamination. Always mix and spin down reagents and samples before opening. In case of any suspect of contamination, discard the materials.
4. Discard all consumed reagents upon completion of procedure in compliance with local biohazardous waste regulations.
5. Careful analytical techniques and strict adherence to the directions in the Test Instructions are essential to obtain reliable results.
6. Samples with equivocal results must be verified by repeat assays or isolation.
7. Do not pool reagents from different lots.
8. If the kit is damaged upon receipt, please contact your local distributor and/or Goffin Molecular Technologies BV.

7. Interpretation of results

The following dyes are used for the different targets:

Target	Dye
CT	FAM
NG	VIC
IC	CY5

For valid runs (Valid Positive and Negative Control – See Quality Control), interpret the specimen results as follows:



C _T Specimen	C _T Specimen Control	Interpretation
> 40	≤ 37	C. trachomatis and/or N. gonorrhoeae DNA not detected. This does not necessarily indicate absence of C. trachomatis and/or N. gonorrhoeae infection, since this depends on correct specimen collection.
≤ 35 for CT or NG	ANY	C. trachomatis or N. gonorrhoeae DNA detected.* Depending on the signal C. trachomatis DNA or N. gonorrhoeae DNA present. To evaluate the presence of the other pathogen, the PCR can be repeated with 1 µl of either of the selectors (see § 6.2, Use of Selectors). CT positive: use NG selector; NG positive: use CT selector. The IAC signal will confirm proper functioning of the selector and the absence of inhibition. In case of a double infection an additional signal for the other target will be visible.
≤ 35 for CT and NG	ANY	C. trachomatis and N. gonorrhoeae DNA detected.*
> 40	> 37	Inhibitory Specimen. No diagnosis can be established. Process the original specimen again or process a newly collected specimen.
> 35, < 40	< 40	Equivocal. Conclusions cannot be drawn in respect to C. trachomatis DNA and/or N. gonorrhoeae DNA. When the detected DNA can be confirmed by repeat analysis, the specimen can be regarded as C. trachomatis and/or N. gonorrhoeae DNA detected.

* DNA detection may indicate a CT and/or NG infection but specimen may contain target DNA, without the presence of any living organisms.

Quality control

Two positive controls and one negative control are provided in each kit for quality control purposes. Additional controls may be analysed in addition to those provided.

Established statistical methods for analysing control values and trends should be employed.

If the controls do not comply with the established limits and repetition excludes errors in technique, check the following areas:

1. Expiration date on reagent package and prepared reagents
2. Temperature of the reagents
3. Settings PCR System
4. Contamination

If controls are still invalid, please contact Goffin Molecular Technologies customer service or your local distributor.

Negative Control

The CT of the Negative control should be >40. If the CT is lower, the whole run is invalid and the test procedure must be repeated.

Positive CT Control

The CT of the Positive CT control should be ≤ 37 . If the CT is outside this range, the whole run is invalid and the test procedure must be repeated.

Positive NG Control

The CT of the Positive NG control should be ≤ 37 . If the CT is outside this range, the whole run is invalid and the test procedure must be repeated.

Isolation Amplification Control

The CT of the Isolation Amplification Control should be ≤ 37 . If the CT is > 37 , the sample is invalid and must be repeated.

Negative Isolation Control

For each isolation series a negative isolation control to which IAC is added must be analysed.

The IAC CT of the Negative control should be ≤ 37 . For CT and NG the CT should be > 40 . If the CT is lower, all specimens are invalid and the test procedure must be repeated.

8. Limitations of the procedure

1. Use only endocervical swab, urethral swab and urine specimens.
Other specimen types have not been validated and may result in false positive or false negative results.
2. Specimen collection, transport and storage may affect the number of organisms present in the specimen, causing a false positive or a false negative result.
3. Good laboratory practices and strict adherence to these Test Instructions are indispensable to avoid contamination of reagents and/or specimens.
4. Plasmid-free *C. trachomatis* is not detected.
5. The user should have a laboratory education in PCR techniques or have gained appropriate experience in the field of PCR techniques.

9. Performance characteristics

Analytical specificity

The analytical specificity of the PRESTO CT/NG Test was tested against 37 bacteria, 5 yeast, 1 protozoa and 4 viral strains that may be isolated from the urogenital tract. Each isolate was tested at a concentration of at least 104 copies/test in the absence and presence of CT (CT around 30) or NG (equimolar mix of 2 distinct NG strains; CT around 30). All organisms tested (listed below), including 11 non-*N. gonorrhoeae* *Neisseria* species gave negative results by the PRESTO CT/NG Test and showed no interference with CT and NG detection.

Actinomyces israelii
Bacteroides fragilis
Branhamella catarrhalis
Chlamydomyphyla pneumoniae
Chlamydomyphyla psittaci
Candida albicans
Candida glabrata
Candida krusei
Candida parapsilosis
Candida tropicalis
Citrobacter freundii
Clostridium perfringens
Cryptococcus neoformans
Cytomegalovirus

Enterobacter cloacae
Enterococcus faecalis
Enterococcus faecium
 Epstein-Barr Virus
Escherichia coli
Gardnerella vaginalis
Haemophilus influenzae
Herpes simplex virus 1
Herpes simplex virus 2
Klebsiella pneumoniae
Lactobacillus species
Legionella pneumophila
Morganella morganii
Mycoplasma pneumoniae



Neisseria cinerea
Neisseria elongata
Neisseria flavescens
Neisseria lactamica
Neisseria meningitidis
Neisseria mucosa
Neisseria perflava
Neisseria polysaccharea
Neisseria sicca
Neisseria subflava
Neisseria denitrificans

Peptostreptococcus species
Proteus mirabilis
Pseudomonas aeruginosa
Serratia marcescens
Staphylococcus aureus
Staphylococcus epidermidis
Streptococcus agalactiae
Streptococcus pneumoniae
Streptococcus pyogenes
Trichomonas vaginalis
Yersinia enterocolitica

Analytical sensitivity

The limit of detection (LoD) of the PRESTO CT/NG Test for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* was determined using quantified stock cultures (microscopically counted for CT, quantified DNA for NG). 20 replicates were tested at the concentrations of 0.02, 0.01 and 0.005 IFU/μl of CT and at 1.0, 0.5 and 0.25 G.Eq./μl of NG. The 20 CT replicates tested positive at 0.02 IFU/μl and 0.01 IFU/μl (Table 1). The 20 NG replicates tested positive at all three concentrations (Table 2). The LoD for the PRESTO CT/NG Test for CT is 0.1 IFU/test, for NG 2.5 G.Eq./test..

Table 1. LOD determination of the PRESTO CT/NG Test for CT.

Concentration CT	C _T (mean ± SD; n = 20)
0.2 IFU/test	34.46 ± 0.42
0.1 IFU/test	36.16 ± 1.05
0.05 IFU/test	18/20 Ct < 40

Table 2. LOD determination of the PRESTO CT/NG Test for NG.

Concentration NG	C _T (mean ± SD; n = 20)	
	NG strain 1	NG strain 2
10 G. Eq./test	33,5 ± 0.5	34,8 ± 0.3
5 G. Eq./test	34.6 ± 0.4	35,7 ± 0.5
2.5 G. Eq./test	35,7 ± 0.7	36,8 ± 0.9

For double infections: To determine the detection limit of CT in the presence of a high load of NG, 100 IFU, 10 IFU, 1 IFU and 0.1 IFU of CT per test were analysed in the presence of a high NG load (equimolar mix of 2 distinct NG strains; Ct < 22) with and without the selector for CT. Tests were carried out in triplicate. When CT was present in quantities < 100 IFU/test the high load of NG (Ct 21.7) decreased or masked the CT signal (Table 3). Addition of the CT selector restored the CT signal. The analytical sensitivity of the PRESTO CT/NG Test for *Chlamydia trachomatis* in the presence of high NG is 0.1 IFU/test.

Table 3. Sensitivity of the PRESTO CT/NG Test for CT in the presence of high load of NG (CT 21.7)

	CT C _T (mean ± SD; n = 3)	
	+ IAC + NG	+ IAC + NG + CT selector
100 IFU/test	24.56 ± 0.19	24.50 ± 0.05
10 IFU/test	28.69 ± 0.46	27.75 ± 0.14
1 IFU/test	0 out of 3 Ct's < 40	31.70 ± 0.28
0.1 IFU/test	0 out of 3 Ct's < 40	36.04 ± 0.46

To determine the detection limit of NG in the presence of a high load of CT, 2500 G.Eq., 250 G.Eq., 25 G.Eq. and 2.5 G.Eq. of NG (equimolar mix of 2 distinct NG strains) per test were analysed in the presence of a high CT load (CT < 22) with and without the selector for NG. Tests were carried out in triplicate. When NG was present in quantities < 2500 G. Eq./test the high load of CT (CT 21.2) decreased or masked the NG signal (Table 4). Addition of the NG selector restored the NG signal. The analytical sensitivity of the PRESTO CT/NG Test for NG in the presence of high CT load is 2.5 G. Eq./test.

Table 4. Sensitivity of the PRESTO CT/NG Test for NG in the presence of high load of CT (CT 21,2).

	NG C _T (mean ± SD; n = 3)	
	+ IAC + CT	+ IAC + CT + NG selector
2500 G.Eq/test	26.1 ± 0.2	26.2 ± 0.2
250 G.Eq/test	2 out of 3 Ct's < 40	29.0 ± 0.5
25 G.Eq/test	1 out of 3 Ct's < 40	32.4 ± 0.1
2.5 G.Eq/test	0 out of 3 Ct's < 40	36.9 ± 1.0

Precision

The precision of the assay is shown in the table below (CV %):

NG (G.Eq/Test)	Within run n = 20	Within day 3 time points n = 3	Day to day 10 days n = 2
25	1.59	0.71	1.26
250	0.84	0.76	1.28
2500	0.97	0.43	1.77

CT (IFU/Test)			
1	0.82	0.82	1.07
10	0.75	0.80	0.57
100	0.26	0.58	0.39

Water + IAC			
83,3 CFU	0.58	0.49	0.38

Accuracy

The PRESTO CT/NG Test for Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae was evaluated in a clinical study conducted at two different sites. A total of 4036 specimens were collected, i.e. swab (endovaginal, rectal, oropharyngeal) and urine specimens. The reference method is the Roche Amplicor CT/NG test.

Accuracy was determined by comparison with the Roche method. The two tables below give an overall overview. Table below describes the results for the comparison of the Roche with the PRESTO kit for Chlamydia trachomatis. Total numbers are shown, those samples positive, negative and inhibited.

Presto CT	Total	Roche		
		Neg	Pos	Inhalibited
Neg	3016	2965	17	34
Pos	319	16	300	3

Table below describes the results for the comparison of the Roche with the PRESTO kit for Neisseria gonorrhoeae. Total numbers are shown, those samples positive, negative, and inhibited / false positive.

Presto NG	Total	Roche		
		Neg	Pos	Inhalibited / false Positive
Neg	3226	2877		349
Pos	90	8	68	14

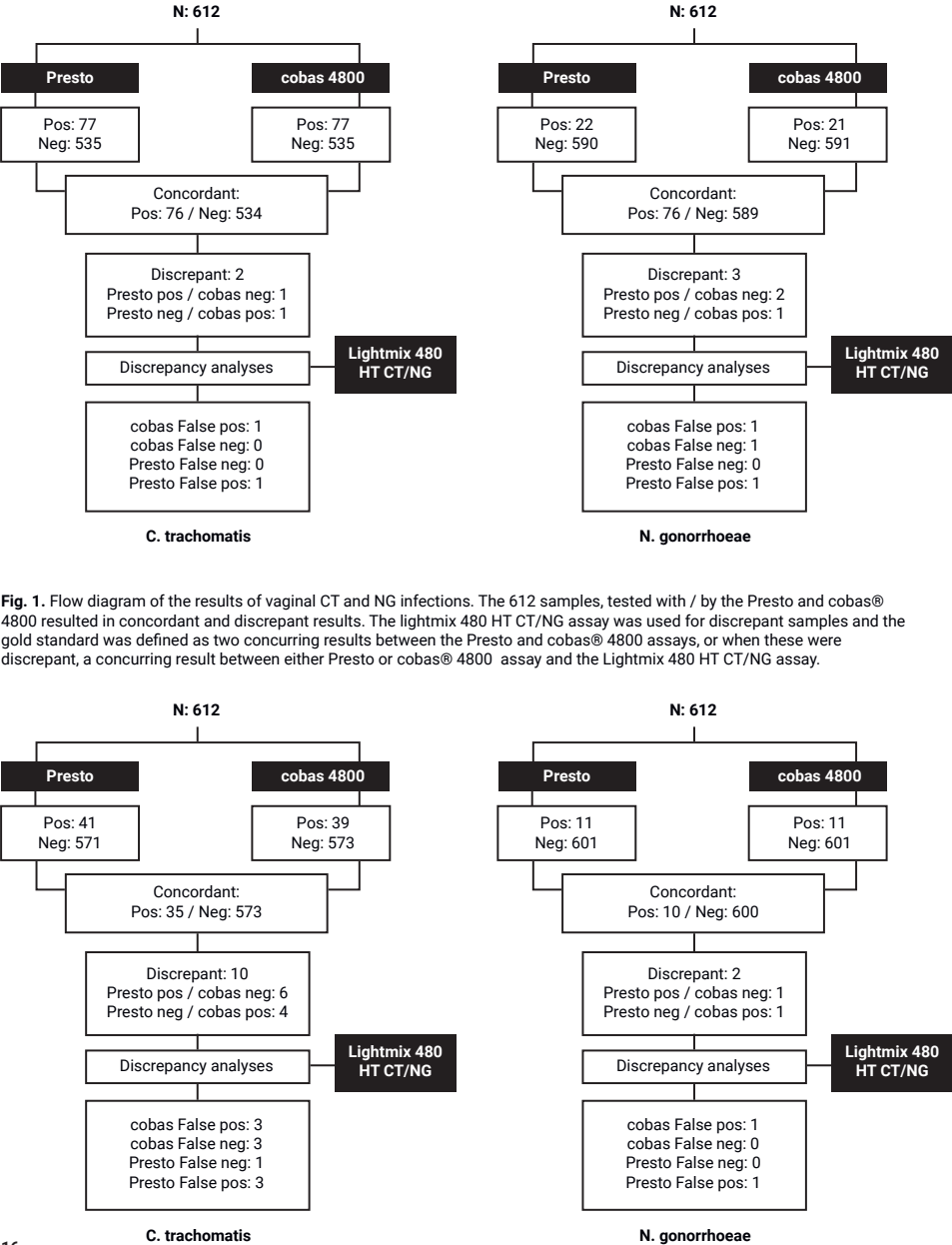


Fig. 1. Flow diagram of the results of vaginal CT and NG infections. The 612 samples, tested with / by the Presto and cobas® 4800 resulted in concordant and discrepant results. The lightmix 480 HT CT/NG assay was used for discrepant samples and the gold standard was defined as two concurring results between the Presto and cobas® 4800 assays, or when these were discrepant, a concurring result between either Presto or cobas® 4800 assay and the Lightmix 480 HT CT/NG assay.

Fig. 2. Flow diagram of the results of anal CT and NG infections. The 612 samples, tested by the Presto and cobas® 4800 resulted in concordant and discrepant results. The Lightmix 480 HT CT/NG assay was used for discrepant samples and the gold standard was defined as two concurring results between the Presto and cobas® 4800 assays, or when these were discrepant, a concurring result between either Presto or cobas® 4800 assay and the Lightmix 480 HT CT/NG assay.

Table 1

Sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value for CT and NG for cobas® 4800 versus Presto.

		SENS%	95% CI	SPEC%	95% CI	PPV%	95% CI	NPV%	95% CI
Vaginal CT	Roche	100.0	99.4-100.0	99.8	99.0-100.0	98.7	97.5-99.3	100.0	99.4-100.0
	Presto	100.0	99.4-100.0	99.8	99.0-100.0	98.7	97.5-99.3	100.0	99.4-100.0
Vaginal NG	Roche	95.2*	99.3-96.7	99.8	99.1-100.0	95.2	93.2-96.7	99.8	99.1-100.0
	Presto	100.0*	99.4-100.0	99.8	99.1-100.0	95.5	93.5-96.8	100.0	99.4-100.0
Rectal CT	Roche	92.3*	89.9-94.2	99.5	98.5-99.6	92.3	89.9-94.2	99.5	98.5-99.8
	Presto	97.4*	95.9-98.4	99.5	98.5-99.9	92.7	90.3-94.5	99.8	99.1-100.0
Rectal NG	Roche	100.0	99.4-100.0	99.8	99.1-100.0	90.9	88.4-92.9	100.0	99.4-100.0
	Presto	100.0	99.4-100.0	99.8	99.1-100.0	90.1	88.4-92.9	100.0	99.4-100.0

SENS, sensitivity; CI, confidence interval; SPEC, specificity; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value.

The alloyed gold standard was a concurring result between the Presto and cobas® 4800 assays, or when these were discrepant, a concurring result between either Presto or cobas® 4800 assay and the Lightmix 480 HT CT/NG assay. Sensitivity, PPV, and NPV for both assays and both anatomical sites were calculated against the alloyed gold standard.

* 1 sample difference in sensitivity analysis.

* 2 sample difference in sensitivity analysis.

Interfering Substances

The presence of PCR inhibitors may cause false negative results. To check whether the IAC adequately monitors inhibition, one µl of the following substances was added to the PCR together with IAC at the concentration of 83.3 CFU/µl per test.

EDTA (0,5M)
 ETOH 96%
 DMSO 4 % (v/v)
 HCl (1N)
 Silica beads (1 µl)
 Blood (1 µl)
 Ureum (40 g/100ml)
 Bilirubin (20 µM/L and 120 µM/L)
 Vitamin C (56 µM/L)
 Lysis buffer
 Ciprofloxacin hydrochloride-1-H₂O (trade name:Ciproxin) (2 mg/ml)
 Vibramycin (20 mg/ml)
 Metronidazol (5 mg/ml)

EDTA, HCl, Bilirubin (120 µM/L) and lysis buffer inhibited IAC-amplification completely, these substances were no further tested. In the presence of ethanol 96%, DMSO, silica beads, blood, ureum, bilirubin (20 µM/L), vitamin C, Ciprofloxacin hydrochloride-1- H₂O, Vibramycin and Metronidazol the IAC signal was still present. These substances were retested in the presence of CT and NG. The CT values for CT and NG in the presence of these non-inhibiting substances were all within 1 CT from the CT value of CT and NG in the presence of water. Thus, CT and NG amplification were not inhibited with these substances. The data show that IAC monitors inhibition well.

10. References

1. Morre SA, Welte R, Postma MJ. Major improvements in cost effectiveness of screening women for Chlamydia trachomatis using pooled urine specimens and high performance testing. *Sex Transm.Infect.* **2002**;**78**:74-5.
2. DiDomenico N, Link H, Knobel R, Caratsch T, Weschler W, Loewy ZG et al. COBAS AMPLICOR: fully automated RNA and DNA amplification and detection system for routine diagnostic PCR. *Clin.Chem.* **1996**;**42**:1915-23.
3. Roosendaal R, Walboomers JM, Veltman OR, Melgers I, Burger C, Bleker OP et al. Comparison of different primer sets for detection of Chlamydia trachomatis by the polymerase chain reaction. *J.Med.Microbiol.* **1993**;**38**:426-33.
4. Morre SA, van Valkengoed IG, Moes RM, Boeke AJ, Meijer CJ, Van Den Brule AJ. Determination of Chlamydia trachomatis prevalence in an asymptomatic screening population: performances of the LCx and COBAS Amplicor tests with urine specimens. *J.Clin.Microbiol.* **1999**;**37**:3092-6.
5. Eickhoff M, Laue T, Ruckes T, Cramer SO, Krupp G, Tiemann C. Ultra-rapid detection of Chlamydia trachomatis by real time PCR in the LightCycler using SYBR green technology or 5'-nuclease probes. *Clin.Lab* **2003**;**49**:217-25.
6. Jalal H, Stephen H, Curran MD, Burton J, Bradley M, Carne C. Development and Validation of a Rotor-Gene real time PCR Assay for Detection, Identification, and Quantification of Chlamydia trachomatis in a Single Reaction. *J.Clin.Microbiol.* **2006**;**44**:206-13.
7. Koenig MG, Kosha SL, Doty BL, Heath DG. Direct comparison of the BD ProbeTec ET system with in-house LightCycler PCR assays for detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae from clinical specimens. *J.Clin.Microbiol.* **2004**;**42**:5751-6.
8. van Doornum GJ, Guldemeester J, Osterhaus AD, Niesters HG. Diagnosing herpesvirus infections by real time amplification and rapid culture. *J.Clin.Microbiol.* **2003**;**41**:576-80.
9. Comparison of GMT presto assay and Roche cobas® 4800 CT/NG assay for detection of Chlamydia Trachomatis and Neisseria Gonorrhoeae in dry swabs", *Journal of Microbiological Methods* 118 (2015) 70-74.

11. Availability

For technical assistance please refer to the Catalogue Numbers:

Kit # GM CG 160500

Kit # GM CG 160100

Manufacturer: Goffin Molecular Technologies B.V.
Vijzelweg 18a
5145 NK Waalwijk
The Netherlands
Tel: +31 (0) 85 004 54 79
info@goffinmt.com
KvK: 2012 8601 0000

WARRANTY

This product is warranted to perform as described in its labeling and in the Goffin Molecular Technologies literature when used in accordance with all instructions. Goffin Molecular Technologies DISCLAIMS ANY IMPLIED WARRANTY OF SPACE MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, and in no event shall Goffin Molecular Technologies be liable for consequential damages. Replacement of the product or refund of the purchase price is the exclusive remedy for the purchaser.

THE PURCHASE OF THIS PRODUCT GRANTS THE PURCHASER RIGHTS UNDER CERTAIN ROCHE PATENTS TO USE IT SOLELY FOR PROVIDING HUMAN IN VITRO DIAGNOSTIC SERVICES. NO GENERAL PATENT OR OTHER LICENCE OF ANY KIND OTHER THAN THIS SPECIFIC RIGHT OF USE FROM PURCHASE IS GRANTED HEREBY.

DISCLAIMER:

Trademarks & licences:

ABI Prism® is a registered trade mark of Applied Biosystems Corporation or its subsidiaries in the US and/or certain other countries. FAM, VIC and ROX are trademarks of Applied Biosystems Corporation or its subsidiaries in the US and certain other countries. Registered names, trademarks, etc. used in this document, even when not specifically marked as such, are not to be considered unprotected by law.

The sequences of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* and the principle of the Isolation Amplification Control are licensed under patents WO2006014109; WO2008097082; JP2008508875.

For additional information, please visit www.goffinmt.com

LIST OF ABBREVIATIONS

Ct	Cycle threshold
CT	Chlamydia Trachomatis
IAC	Isolation Amplification Control
NG	Neisseria gonorrhoeae
PCR	Polymerase Chain Reaction

LIST OF SYMBOLS AS USED IN LABELLING



CE number



Use-by date



In vitro diagnostic medical device



Do not store above -20°C



Catalogue No.



Contains sufficient for 500 tests



Batch code



Contains sufficient for 100 tests



Legal manufacturer



Consult instructions for use

Presto gecombineerde kwalitatieve real-time CT/NG assay

Voldoet aan Richtlijn 98/79/EG van het Europees Parlement en de Raad van 27 oktober 1998 betreffende medische hulpmiddelen voor in-vitrodiagnostiek.

Alleen voor in vitro diagnostisch gebruik.

Gebruiksaanwijzing

Gecombineerde Chlamydia trachomatis-Neisseria gonorrhoeae real-time amplificatie DNA-test.
 Real time amplification DNA assay voor de kwalitatieve in vitro detectie van Chlamydia trachomatis (CT) en Neisseria gonorrhoeae (NG) DNA in urine, urethrale swab en endocervicale swab specimen.

Catalogusnummer: CG 160100, 4 x 25 tests
Catalogusnummer: CG 160500, 5 x 100 tests

Bewaren bij -20°C na ontvangst.

Inhoud

1.	Beoogd gebruik	21
2.	Samenvatting en uitleg van de test	21
3.	Principe van de testprocedure	21
4.	Reagentia	22
	4.1 Componenten in elke CT/NG-testkit	
	4.2 Aanvullende materialen en instrumenten die nodig zijn	
	4.3 Bereiding en opslag van reagentia	
	4.4 Chemische of fysische aanwijzingen van instabiliteit	
5.	Verzameling en voorbereiding van monsters	24
6.	Presto CT/NG testprocedure	25
	6.1 Bereiding van het reagens	
	6.2 Procedure	
	6.2 Procedurele opmerkingen	
7.	Interpretatie van de resultaten	26
8.	Beperkingen van de procedure	28
9.	Prestatiekenmerken	28
10.	Referenties	34
11.	Beschikbaarheid	34



1. Beoogde gebruik

De Goffin Molecular Technologies Presto Chlamydia trachomatis (CT)- Neisseria gonorrhoeae (NG) Assay kit is bedoeld voor de in vitro kwalitatieve detectie van Chlamydia trachomatis plasmide DNA en Neisseria gonorrhoeae chromosomaal DNA in urine, urethrale swabmonsters en endocervicale swabmonsters van menselijke oorsprong.

De beoogde gebruiker is een gespecialiseerd laboratorium voor moleculaire diagnose. De test zal worden uitgevoerd door opgeleid laboratoriumpersoneel. Er is geen speciale opleiding vereist voor routinelaboratoria die kwantitatieve PCR uitvoeren.

2. Samenvatting en uitleg van de test

Chlamydia trachomatis is een obligate intracellulaire gramnegatieve bacterie. Er zijn vijftien verschillende serovars bekend, waarvan er acht (D-K) urogenitale infecties veroorzaken. Infectie bij vrouwen is vaak asymptomatisch, en onbehandelde infecties kunnen leiden tot endometritis, salpingitis en onvruchtbaarheid. Screening op asymptomatische infecties is aangewezen om de overdracht van CT te beperken en de ontwikkeling van ernstige complicaties te voorkomen.¹

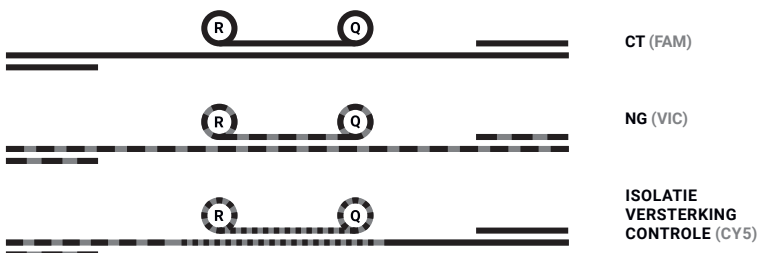
Neisseria gonorrhoeae is na Chlamydia trachomatis de meest voorkomende seksueel overdraagbare aandoening. Infectie bij vrouwen is vaak asymptomatisch, waardoor het risico van overdracht toeneemt. Langdurige ongediagnosticeerde infecties kunnen leiden tot bekkenontsteking, chronische bekkenpijn, buitenbaarmoederlijke zwangerschap, neonatale conjunctivitis, en onvruchtbaarheid. Vroegtijdige opsporing van de infectie is aangewezen om de overdracht en latere ernstige complicaties te beperken.²

Real time PCR is een gevoelig en gebruiksvriendelijk diagnostisch instrument gebleken voor vele micro-organismen en is een standaardtechniek om CT/NG op te sporen. Het is bekend dat er in sommige klinische monsters specimenspecifieke maar onbekende remmende stoffen aanwezig zijn, die tijdens de monstervoorbereiding niet altijd op betrouwbare wijze worden verwijderd. Er wordt een specifiek ontworpen isolatie/remmingscontrole geïntroduceerd die inefficiënte DNA-isolatie en/of PCR-remming in elk individueel klinisch monster herkent.

De combinatie van real time PCR met de toevoeging van een Isolatie Amplificatie Controle, die zowel remming als nucleïnezuurextractie van klinische monsters controleert, genereert het beste van twee werelden. De Presto CT/NG-kit biedt deze combinatie en garandeert een correcte interpretatie waarbij vals-negatieve signalen worden weggelaten en echt positieve signalen met een hoge gevoeligheid en specificiteit worden geproduceerd. Het real time formaat van de kit vermindert het risico van contaminatie door amplicons. Bovendien wordt de Zweedse variantstam van Chlamydia trachomatis met succes gedetecteerd. Ten slotte wordt een andere unieke functie in de Presto kit geïntroduceerd. Om negatieve resultaten bij dubbele infecties met één prominente (sterk positieve) bacterie te voorkomen, zijn CT- en NG-selectoren beschikbaar. Met deze selectoren kan een lage belasting van één target in combinatie met een hoge belasting van de andere target in hetzelfde monster worden opgespoord.

3. Principe van de testprocedure

De detectie van Chlamydia trachomatis (CT) en Neisseria gonorrhoeae (NG) DNA door de polymerase kettingreactie (PCR) is gebaseerd op de amplificatie van een deel van het cryptisch plasmide DNA van CT en de opa genen van NG met behulp van specifieke oligonucleotiden. De PCR-producten worden gedetecteerd door interne probes, elk gekoppeld aan een andere fluorescerende reporterkleurstof ("R"). De fluorescentie van de reporter wordt gedoofd door een quencher-groep ("Q") die aan dezelfde probe is gekoppeld. Tijdens de vorming van het PCR-product wordt de probe afgebroken en wordt de fluorescentie van de reporter niet langer gedoofd, zodat deze in real time kan worden gedetecteerd. Vóór de isolatie en amplificatie van een klinisch monster wordt een controlebacterie toegevoegd. Deze controlebacterie bevat een DNA-fragment met de herkenningsplaats van de omgekeerde primer voor CT en de herkenningsplaats van de voorwaartse primer voor NG. De geamplificeerde sequentie tussen de primers verschilt echter van de CT/NG-fragmenten. Dit wordt gedetecteerd door een sondesequentie met een andere reporterkleurstof. De fluorescentie van de IAC-reporterkleurstof kan worden gebruikt om zowel de isolatie als de amplificatie-efficiëntie te controleren.



SELECTEURS

De invoering van selectoren introduceert een nieuw concept in real time detectie van dubbele infecties. De kit bevat zowel een CT- als een NG-selector. Deze selectoren zijn bedoeld om te selecteren op CT of NG in een klinisch monster dat zeer positief (IAC-negatief) is voor NG of CT, waardoor het risico van een vals-negatieve dubbele infectie wordt voorkomen. Het gebruik van selectoren wordt aangeraden wanneer een monster positief is voor CT of NG. De functie van de selector zal het IAC-sigitaal herstellen, zodat zelfs zwakke positieve CT- of NG-signalen kunnen worden opgespoord in aanwezigheid van hoge ladingen NG- respectievelijk CT-DNA. Daartoe kan dezelfde geïsoleerde DNA-fractie in een volgende PCR worden gebruikt, terwijl vóór de amplificatie de selector van keuze wordt toegevoegd. Voor sterk CT-positieve monsters moet de NG-selector worden toegevoegd en voor sterk NG-positieve monsters de CT-selector vóór de amplificatie (zie protocol voor volumes).

4. Reagentia

Alle klinische monsters moeten als infectieus worden beschouwd. Deze monsters moeten worden behandeld op het bioveiligheidsniveau 2 dat in het handboek "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" van 1984 van het Centre for Disease Control/National Institutes of Health wordt aanbevolen voor alle potentieel besmettelijke monsters.

Draag beschermende handschoenen.

Gebruik steriele aerosolbestendige pipetpunten.

In het laboratorium moet een eenrichtingsworkflow worden gevolgd met verschillende ruimten voor de monstervoorbereiding, het gedeelte vóór de monsterneming en het gedeelte na de monsterneming.

LET OP: Reagentia in deze assay bevatten natriumazide als conserveermiddel (0,05%). Natriumazide kan reageren met lood- en koperleidingen tot zeer explosieve metaalaziden. Spoel de afvoer bij verwijdering met een ruime hoeveelheid koud water om ophoping van azide te voorkomen.

4.1.1 Onderdelen in elke Presto CT/NG CG 160100, 4 x 25 assays/kit

- 1. CT/NG PCR mix MASTER MIX (CG301001)**
4 buisjes met een zwarte kleurcode, met het opschrift "MASTER MIX", die 400 µl gebruiksklare PCR-mix bevatten. Dit mengsel bevat vier primers voor amplificatie van het CT DNA, NG DNA en het Isolatie Amplificatie Controle DNA. Het bevat drie fluorescerende probes voor de detectie van respectievelijk CT DNA, NG DNA en controle-DNA. De mastermix bevat alle ingrediënten voor PCR-amplificatie, inclusief DNA-polymerase.
- 2. CT/NG Isolatieversterkingsregeling Isolatieversterkingsregeling (CG301003)**
4 buisjes met een rode kleurcode, met het opschrift "Isolation Amplification Control" die 150 µl Isolation Amplification Control bevatten. De Isolatie Amplificatie Controle bestaat uit een geïnactiveerde *E. coli* gemodificeerd met een genomisch DNA-fragment dat primerbindingsplaatsen bevat die identiek zijn aan de sequenties van *C. trachomatis* en *N. gonorrhoeae*, maar met een andere tussenliggende sondesequentie.
OPMERKING: resuspendeer vóór gebruik.
- 3. CT Positieve controle Positieve controle CT (CG301005)**
4 buisjes met een blauwe kleurcode, gelabeld "Positieve controle CT", die 55 µl positieve controle bevatten. De positieve controle bestaat uit CT-DNA in 4 IFU/10 µl.
- 4. NG Positieve controle Positieve controle NG (CG301006)**
4 buisjes met een groene kleurcode, met het opschrift "Positive Control NG", die 55 µl positieve controle bevatten. De positieve controle bestaat uit NG-DNA met 100 CFU/10 µl.
- 5. CT/NG Negatieve controle Negatieve controle (CG301014)**
2 buisjes met een transparante kleurcode, gelabeld "Negatieve controle", die 500 µl negatieve controle bevatten.
- 6. CT Selector (CG301008)**
1 buisje met een paarse kleurcode, gelabeld "CT SELECTOR", dat 50 µl CT-selector bevat voor gebruik met hoge NG-positieve monsters voor de opsporing van een zwak positieve CT-co-infectie.

**7. NG Selector NG SELECTOR (CG301007)**

1 buisje met gele kleurcode "NG SELECTOR" met 50 µl NG-selector voor gebruik met hoog CT-positieve monsters voor de opsporing van een zwak positieve NG-co-infectie.

OPMERKING: Gebruik alle onderdelen van hetzelfde kit-lotnummer.

4.1.2 Onderdelen in elke Presto CT/NG CG 160500, 5 x 100 assays/kit

1. CT/NG PCR mix MASTER MIX (CG301015)

5 buisjes met een zwarte kleurcode, met het opschrift "MASTER MIX", die 1600 µl gebruiksklare PCR-mix bevatten. Dit mengsel bevat vier primers voor amplificatie van het CT DNA, NG DNA en het Isolatie Amplificatie Controle DNA. Het bevat drie fluorescerende probes voor de detectie van respectievelijk CT DNA, NG DNA en controle-DNA. De mastermix bevat alle ingrediënten voor PCR-amplificatie, inclusief DNA-polymerase.

2. CT/NG Isolatieversterkingsregeling Isolatieversterkingsregeling (CG301016)

5 buisjes met een rode kleurcode, gemerkt "Isolation Amplification Control", die 750 µl Isolation Amplification Control bevatten. De Isolatie Amplificatie Controle bestaat uit een geïnactiveerde *E. coli* gemodificeerd met een genomisch DNA-fragment dat primerbindingsplaatsen bevat die identiek zijn aan de sequenties van *C. trachomatis* en *N. gonorrhoeae*, maar met een andere tussenliggende sondesequentie. **OPMERKING:** resuspendeer vóór gebruik.

3. CT Positieve controle Positieve controle CT (CG301017)

4 buisjes met een blauwe kleurcode, gelabeld "Positieve controle CT", die 300 µl positieve controle bevatten. De positieve controle bestaat uit CT-DNA in 4 IFU/10 µl.

4. NG Positieve controle Positieve controle NG (CG301018)

4 buisjes met een groene kleurcode, met het opschrift "Positive Control NG", die 300 µl positieve controle bevatten. De positieve controle bestaat uit NG-DNA met 100 CFU/10 µl.

5. CT/NG Negatieve controle Negatieve controle (CG301014)

2 buisjes met een transparante kleurcode, gelabeld "Negatieve controle", die 500 µl negatieve controle bevatten.

6. CT Selector CT SELECTOR (CG301008)

1 buisje met een paarse kleurcode, gelabeld "CT SELECTOR", dat 50 µl CT-selector bevat voor gebruik met hoge NG-positieve monsters voor de opsporing van een zwak positieve CT-co-infectie.

7. NG Selector NG SELECTOR (CG301007)

1 buisje met gele kleurcode "NG SELECTOR" met 50 µl NG-selector voor gebruik met hoog CT-positieve monsters voor de opsporing van een zwak positieve NG-co-infectie.

OPMERKING: Gebruik alle onderdelen van hetzelfde kit-lotnummer.

4.2 Aanvullende materialen en instrumenten die nodig zijn

De test kan worden gebruikt met standaard lysisreagentia op basis van guanidine-iso-thiocynaat en vangapparaten met magnetische korrels voor DNA-isolatie.

PCR-amplificatie kan worden uitgevoerd met elk real time PCR-apparaat dat de fluoroforen kan detecteren: FAM, VIC, ROX & Cy5. Kleine variaties in afkapwaarden kunnen echter optreden als gevolg van verschillen in DNA-isolatie en/of PCR-amplificatiedetectie, afhankelijk van de gebruikte apparatuur. In die gevallen kan een nieuwe afkapwaarde worden bepaald zonder verlies van gevoeligheid en specificiteit. **OPMERKING:** Er is geen specifieke software nodig voor de berekening van het ROX-sigitaal. Het ROX-sigitaal is opgenomen om de test toepasbaar te maken voor ABI 7500-instrumenten (en andere instrumenten die ROX nodig hebben). Software van alle andere real-time PCR-instrumenten kan de Presto-kit zonder beperkingen gebruiken (bijv. LightCyclers).

Gebruik voor alle stappen van de procedure steriele DNase-vrije polypropyleen disposables.

4.3 Bereiding en opslag van de reagentia

1. **CT/NG PCR mix MASTER MIX** Ontdooi de buis vóór opening. Geopende flacon kan slechts twee keer opnieuw worden ingevroren en ontdooit. Opmerking: vóór gebruik mengen en kort centrifugeren (3 seconden).
2. **CT/NG Isolatie Amplificatiecontrole Isolatie Amplificatiecontrole** Ontdooi de buis vóór opening. Geopende flacon kan slechts twee keer opnieuw worden ingevroren en ontdooit. Opmerking: vóór gebruik mengen en kort centrifugeren (3 sec.).
3. **CT Positieve controle Positieve controle CT** Ontdooi de flacon vóór opening. Geopende flacon kan slechts twee keer opnieuw worden ingevroren en ontdooit. Opmerking: vóór gebruik mengen en kort centrifugeren (3 seconden).
4. **NG Positieve controle Positieve controle NG** Ontdooi de buis vóór opening. Geopende flacon kan slechts twee keer opnieuw worden ingevroren en ontdooit. Opmerking: vóór gebruik mengen en kort centrifugeren (3 seconden).
5. **Negatieve controle Negatieve controle** Ontdooi de buis vóór opening. Geopende flacon kan slechts tweemaal opnieuw worden ingevroren en ontdooit. Opmerking: vóór gebruik mengen en kort centrifugeren (3 seconden).
6. **CT SELECTOR CT SELECTOR** Ontdooi de flacon vóór opening. Geopende flacon kan slechts twee keer opnieuw ingevroren en ontdooit. Opmerking: mengen en centrifugeren in een korte 3 seconden centrifugeren voor gebruik.
7. **NG Selector NG SELECTOR** Ontdooi de buis vóór opening. Geopende flacon kan slechts tweemaal opnieuw worden ingevroren en ontdooit. Opmerking: mengen en centrifugeren in een korte 3 seconden centrifugeren voor gebruik.

Bewaar alle componenten bij -20 °C.

Alle onderdelen zijn temperatuurgevoelig. Ontdooi alleen de onderdelen die u gaat gebruiken. De componenten kunnen tweemaal opnieuw worden ingevroren. Bewaar kitreagentia bij 2 - 8 °C (op ijs) wanneer ze worden gebruikt. Bewaar de componenten niet langer dan 4 dagen bij 2 - 8 °C.

4.4 Chemische of fysische indicaties van instabiliteit

Veranderingen in het uiterlijk van het testmateriaal kunnen wijzen op instabiliteit of achteruitgang. De uiterste gebruiksdatum op de etiketten van de componenten geeft aan na welke datum de componenten niet meer mogen worden gebruikt.

5. Monsternamen en bereiding van monsters

De Presto CT/NG-kit is bedoeld voor gebruik op endocervicale en urethrale swabmonsters en urinemonsters. Algemene afnameapparatuur kan worden gebruikt voor standaard DNA-isolatieprocedures volgens de protocollen van de fabrikant.

Voorbeeld van een uitstrijkje

1. Verzamel endocervicale en urethrale uitstrijkjes en bewaar ze in 2-5 ml 2SP-transportmedium.
2. Gebruik alleen gevalideerde swabs. Gebruik geen houten of aluminium swabs voor moleculaire detectie.
3. Bewaar de swabs in het transportmedium. Koel (2 - 8 °C) of bevries swabs die niet onmiddellijk worden verwerkt. Monsters kunnen 7 dagen bij 2 - 8 °C worden bewaard.

Voorbeeld urinemonster

DE PATIËNT MAG 2 UUR VOOR DE MONSTERNAAM NIET HEBBEN GEPLAST.

1. Verzamel 10 tot 30 ml urine van de eerste vangst in een schoon polypropyleenpotje zonder bewaarmiddelen.
2. Volg de verzamel- en transportprocedures van het laboratorium. Koel urinemonsters die niet onmiddellijk worden verwerkt (2-8 °C).

Monstervoorbereiding

Deze procedure moet worden uitgevoerd in de preparatieruimte in een biologisch veiligheidskabinet van klasse 2 (bescherming van gebruiker en materiaal).

DNA Geïsoleerd specimen:

Deze kit is gevalideerd met gebruik van monsters die met behulp van BioMérieux NucliSENS® easyMAG™ zijn geëxtraheerd. Volg de instructies van de fabrikant voor een beschrijving van de systeemfuncties, isolatieprotocollen en operationele richtlijnen.

Swabs: 200 µl vortexed specimen + 5 µl resuspended IAC + 2 ml easyMAG lysis buffer en elutie in 60 µl waarvan 10 µl wordt gebruikt in de CT/NG PCR.

Urine: 500 µl vortexed urine + 5 µl geresuspendeerde IAC + 2 ml easyMAG lysis en elutie in 60 µl waarvan 10 µl wordt gebruikt in de CT/NG PCR.

6. Presto CT/NG assay Kit Testprocedure

Deze procedure moet worden uitgevoerd in de voorbereidingsruimte vóór de vermenigvuldiging. Gebruik gedurende de gehele testprocedure aerosolbarriëretips.

6.1 Bereiding van de reagentia

Ontdooi de benodigde mixen en bewaar ze bij 2-8°C.

6.2 Procedure

1. Bereid het vereiste aantal reageerbuisen of putjes voor het aantal te meten monsters, plus twee buizen voor de positieve controles, één buis voor de negatieve isolatiecontrole en één buis voor de negatieve controle.
2. Voeg aan elke te meten reactie 15 µl van de mastermix toe.
3. Vortex en centrifugeer alle DNA-extracten. Open de monsterhouders één voor één voorzichtig en voorkom verontreiniging van handschoenen en pipet. Voeg met een nieuwe aerosolbarriëretip voor elk extract 10 µl DNA (hoofdstuk 5) toe aan de reageerbuis/het putje met de mastermix. Vervang de handschoenen indien besmetting wordt vermoed.
4. Voeg met een nieuwe aerosolbarriëretip 10 µl van elke positieve controle Positieve controle toe aan de aangewezen reageerbuisen/putjes met de mastermix. Open de container voorzichtig en voorkom verontreiniging van handschoenen en pipet. Vervang de handschoenen indien besmetting wordt vermoed.
5. Voeg met een nieuwe aerosolbarriëretip 10 µl van de negatieve controle Negatieve controle toe aan de aangewezen reageerbuis/het aangewezen putje met de mastermix.
6. Sluit de reactiebuisjes of verzegel de plaat, centrifugeer en verplaats de plaat naar het Amplificatiegebied.
7. Laad de reactiebuisjes/platen in de ABI PRISM® 7500 SDS*. Programmeer het PCR-systeem met de volgende instellingen::

Vaste drempel:	0.01
Activerend polymerase:	30 seconden 95 °C
Aantal cycli:	40 cycli
Denaturatie:	3 seconden 95°C
Annealing, extensie en exonuclease activiteit:	30 seconden 60°C
Handmatige basislijnininstellingen	

*Voor Roche LightCycler480 II kiest u detectieformaat "3 Colour Hydrolyse Probe"; bij gebruik van een ander formaat moet waarschijnlijk eenmaal een kleurcompensatie worden uitgevoerd volgens het protocol van de fabrikant.

GEBRUIK VAN SELECTEURS

Bij een positief signaal met CT of NG met Ct/p <21 (bijv. 14-21) moet de PCR worden herhaald met 1 µl van een van beide selectors en 9 µl geïsoleerd DNA: voor CT-positieve monsters gebruikt u de NG-selector; voor NG-positieve monsters gebruikt u de CT-selector. De amplificatievoorwaarden zijn zoals hierboven beschreven. Door toevoeging van de selector verschijnt alleen een nieuw signaal in geval van een dubbele infectie. Het signaal van de primair gedetecteerde SOA is altijd sterker dan dat van de secundair geïdentificeerde SOA. Een zwak signaal voor het primaire positieve doelwit kan nog steeds aanwezig zijn. In een studie van 12.254 monsters in een SOA-kliniek werden bijna 50% meer dubbele infecties ontdekt. Aangezien echter onder alle CT/NG-positieven na het gebruik van selectoren slechts 2,1% dubbele infecties werden opgespoord, kan men de selectoren ook alleen gebruiken bij hoogrisicopatiënten zoals mannen die seks hebben met mannen (MSM) en swingers. Dit zal het aantal herhaalde tests verminderen.

6.3 Procedurele opmerkingen

1. Gebruik een eenrichtingsworkflow in het laboratorium.

Ruimte voor monstervoorbereiding: Speciale ruimte om de monsters voor te bereiden. Alle materialen (apparatuur, benodigdheden, bescherming, handschoenen, enz. Materialen uit deze zone mogen niet naar de zone vóór de vermenigvuldiging worden overgebracht.

Zone voor pre-amplificatie: Speciale ruimte om de reagentia voor te bereiden. Alle materialen (apparatuur, benodigdheden, bescherming, handschoenen, enz.

Versterkingsruimte: Speciale ruimte voor versterking. Alle materialen (apparatuur, benodigdheden, bescherming, handschoenen, enz. Materiaal uit deze zone mag niet worden verplaatst naar de zone vóór de amplificatie en niet naar de zone voor de preparatie van het monster.

2. Gebruik altijd spuitbusbestendige tips.
3. Wees uiterst voorzichtig bij het hanteren van materialen om besmetting te voorkomen. Reagentia en monsters altijd mengen en centrifugeren alvorens ze te openen. In geval van een vermoeden van verontreiniging moeten de materialen worden weggegooid.
4. Gooi alle verbruikte reagentia na afloop van de procedure weg in overeenstemming met de plaatselijke voorschriften inzake biologisch afval.
5. Zorgvuldige analysetechnieken en strikte naleving van de aanwijzingen in de testinstructies zijn essentieel voor het verkrijgen van betrouwbare resultaten.
6. Monsters met onduidelijke resultaten moeten worden geverifieerd door herhalings tests of isolatie.
7. Voeg geen reagentia van verschillende partijen samen.
8. Als de kit bij ontvangst beschadigd is, neem dan contact op met uw plaatselijke distributeur en/of Goffin Molecular Technologies BV.

7. Interpretatie van de resultaten

De volgende kleurstoffen worden gebruikt voor de verschillende doelen:

Doel	Kleurstof
CT	FAM
NG	VIC
IC	CY5

Voor geldige runs (Geldige positieve en negatieve controle - zie Kwaliteitscontrole), de monsterresultaten als volgt interpreteren:

C _T Monster	C _T Intern Controle	Interpretatie
> 40	≤ 37	C. trachomatis en/of N. gonorrhoeae DNA niet gedetecteerd. Dit wijst niet noodzakelijk op de afwezigheid van infectie met C. trachomatis en/of N. gonorrhoeae, aangezien dit afhangt van een correcte monsterafname.
≤ 35 for CT of NG	ANY	C. trachomatis of N. gonorrhoeae DNA gedetecteerd.* Afhankelijk van het aanwezige signaal C. trachomatis DNA of N. gonorrhoeae DNA. Om de aanwezigheid van het andere pathogeen te evalueren, kan de PCR worden herhaald met 1 µl van één van beide selectors (zie § 6.2, Gebruik van selectors). CT positief: gebruik NG selector; NG positief: gebruik CT selector. Het IAC-signaal bevestigt de goede werking van de selector en de afwezigheid van remming. In geval van een dubbele infectie zal een extra signaal voor het andere doel zichtbaar zijn.
≤ 35 for CT en NG	ANY	C. trachomatis en N. gonorrhoeae DNA gedetecteerd.*
> 40	> 37	Remmend exemplaar. Er kan geen diagnose worden gesteld. Verwerk het oorspronkelijke monster opnieuw of verwerk een nieuw verzameld monster.
> 35, < 40	< 40	Dubbelzinnig. Ten aanzien van het DNA van C. trachomatis en/of N. gonorrhoeae kunnen geen conclusies worden getrokken. Wanneer het gedetecteerde DNA door herhaalde analyse kan worden bevestigd, kan het specimen worden beschouwd als gedetecteerd C. trachomatis en/of N. gonorrhoeae DNA.

*DNA-detectie kan wijzen op een CT- en/of NG-infectie, maar het monster kan doel-DNA bevatten zonder de aanwezigheid van levende organismen.

Kwaliteitscontrole

Elke kit bevat twee positieve en één negatieve controle voor kwaliteitscontrole. Naast de meegeleverde controles kunnen nog andere controles worden geanalyseerd. Voor de analyse van de controlewaarden en tendensen moeten de gebruikelijke statistische methoden worden gebruikt.

Als de controles niet voldoen aan de vastgestelde limieten en herhaling fouten in de techniek uitsluit, controleer dan de volgende gebieden:

1. Vervaldatum op reagensverpakking en bereide reagentia
2. Temperatuur van de reagentia
3. Instellingen PCR-systeem
4. Verontreiniging

Als de controles nog steeds ongeldig zijn, neem dan contact op met de klantenservice van Goffin Molecular Technologies of met uw plaatselijke distributeur.

Negatieve controle

De CT van de negatieve controle moet >40 zijn. Als de CT lager is, is de hele run ongeldig en moet de testprocedure worden herhaald.

Positieve CT-controle

De CT van de positieve CT-controle moet ≤ 37 zijn. Indien de CT buiten dit bereik ligt, is de hele run ongeldig en moet de testprocedure worden herhaald.

Positieve NG controle

De CT van de positieve NG-controle moet ≤ 37 zijn. Als de CT buiten dit bereik ligt, is de hele run ongeldig en moet de testprocedure worden herhaald.

Isolatie Versterkingscontrole

De CT van de Isolation Amplification Control moet ≤ 37 zijn. Als de CT > 37 is, is het monster ongeldig en moet het worden herhaald.

Negatieve isolatiecontrole

Voor elke isolatiereeks moet een negatieve isolatiecontrole worden geanalyseerd waaraan IAC is toegevoegd. De IAC CT van de negatieve controle moet ≤ 37 zijn. Voor CT en NG moet de CT > 40 zijn. Als de CT lager is, zijn alle monsters ongeldig en moet de testprocedure worden herhaald.

8. Beperkingen van de procedure

1. Gebruik alleen endocervicale, urethrale en urinemonsters. Andere soorten monsters zijn niet gevalideerd en kunnen leiden tot vals-positieve of vals-negatieve resultaten.
2. Verzameling, vervoer en opslag van het monster kunnen van invloed zijn op het aantal in het monster aanwezige organismen, waardoor een vals-positief of vals-negatief resultaat kan ontstaan.
3. Goede laboratoriumpraktijken en strikte naleving van deze testinstructies zijn onontbeerlijk om verontreiniging van reagentia en/of specimina te voorkomen.
4. Plasmide-vrije *C. trachomatis* wordt niet gedetecteerd.
5. De gebruiker moet een laboratoriumopleiding in PCR-technieken hebben genoten of passende ervaring hebben opgedaan op het gebied van PCR-technieken.

9. Prestatiekenmerken

Analytische specificiteit

De analytische specificiteit van de PRESTO CT/NG-test werd getest tegen 37 bacteriën, 5 gisten, 1 protozoa en 4 virusstammen die uit het urogenitale kanaal kunnen worden geïsoleerd. Elk isolaat werd getest in een concentratie van ten minste 104 kopieën/test in afwezigheid en aanwezigheid van CT (CT rond 30) of NG (equimolaire mix van 2 verschillende NG-stammen; CT rond 30). Alle geteste organismen (hieronder vermeld), waaronder 11 niet-N. gonorrhoeae Neisseria-soorten gaven negatieve resultaten met de PRESTO CT/NG-test en vertoonden geen interferentie met CT- en NG-detectie.

Actinomyces israelii
Bacteroides fragilis
Branhamella catarrhalis
Chlamydomyphyla pneumoniae
Chlamydomyphyla psittaci
Candida albicans
Candida glabrata
Candida krusei
Candida parapsilosis

Candida tropicalis
Citrobacter freundii
Clostridium perfringens
Cryptococcus neoformans
Cytomegalovirus
Enterobacter cloacae
Enterococcus faecalis
Enterococcus faecium
Epstein-Barr Virus

Escherichia coli
Gardnerella vaginalis
Haemophilus influenzae
Herpes simplex virus 1
Herpes simplex virus 2
Klebsiella pneumoniae
Lactobacillus-soorten
Legionella pneumophila
Morganella morganii
Mycoplasma pneumoniae
Neisseria cinerea
Neisseria elongata
Neisseria flavescens
Neisseria lactamica
Neisseria meningitidis
Neisseria mucosa

Neisseria perflava
Neisseria polysaccharea
Neisseria sicca
Neisseria subflava
Neisseria denitrificans
Peptostreptococcus soorten
Proteus mirabilis
Pseudomonas aeruginosa
Serratia marcescens
Staphylococcus aureus
Staphylococcus epidermidis
Streptococcus agalactiae
Streptococcus pneumoniae
Streptococcus pyogenes
Trichomonas vaginalis
Yersinia enterocolitica

Analytische gevoeligheid

De aantoonbaarheids grens (LoD) van de PRESTO CT/NG-test voor *Chlamydia trachomatis* en *Neisseria gonorrhoeae* werd bepaald met behulp van gekwantificeerde voorraadkweken (microscopisch geteld voor CT, gekwantificeerd DNA voor NG). Er werden 20 herhalingen getest bij de concentraties 0,02, 0,01 en 0,005 IFU/μl CT en bij 1,0, 0,5 en 0,25 G.Eq./μl NG. De 20 CT-replicaten testten positief bij 0,02 IFU/μl en 0,01 IFU/μl (tabel 1). De 20 NG-replicaten testten positief bij alle drie de concentraties (tabel 2). De LoD voor de PRESTO CT/NG-test voor CT is 0,1 IFU/test, voor NG 2,5 G.Eq./test.

Tabel 1. LOD-bepaling van de PRESTO CT/NG-test voor CT.

Concentratie CT	C _T (gemiddelde ± SD; n = 20)
0.2 IFU/test	34.46 ± 0.42
0.1 IFU/test	36.16 ± 1.05
0.05 IFU/test	18/20 Ct < 40

Tabel 2. LOD-bepaling van de PRESTO CT/NG-test voor NG.

Concentratie NG	C _T (gemiddelde ± SD; n = 20)	
	NG stam 1	NG stam 2
10 G. Eq./test	33,5 ± 0.5	34,8 ± 0.3
5 G. Eq./test	34.6 ± 0.4	35,7 ± 0.5
2.5 G. Eq./test	35,7 ± 0.7	36,8 ± 0.9

Voor dubbele infecties: Om de detectielimiet van CT in aanwezigheid van een hoge NG-belasting te bepalen, werden 100 IFU, 10 IFU, 1 IFU en 0,1 IFU CT per test geanalyseerd in aanwezigheid van een hoge NG-belasting (equimolaire mix van 2 verschillende NG-stammen; Ct < 22) met en zonder de selector voor CT. De tests werden in drievoud uitgevoerd. Wanneer CT aanwezig was in hoeveelheden < 100 IFU/test verminderde of maskeerde de hoge belasting met NG (Ct 21,7) het CT-signaal (tabel 3). Toevoeging van de CT-selector herstelde het CT-signaal. De analytische gevoeligheid van de PRESTO CT/NG-test voor *Chlamydia trachomatis* in aanwezigheid van hoge NG is 0,1 IFU/test.

Tabel 3. Gevoeligheid van de PRESTO CT/NG-test voor CT in aanwezigheid van een hoge belasting met NG (CT 21,7)

	CT C _T (gemiddelde ± SD; n = 3)	
	+ IAC + NG	+ IAC + NG + CT selector
100 IFU/test	24.56 ± 0.19	24.50 ± 0.05
10 IFU/test	28.69 ± 0.46	27.75 ± 0.14
1 IFU/test	0 van de 3 Ct's < 40	31.70 ± 0.28
0.1 IFU/test	0 van de 3 Ct's < 40	36.04 ± 0.46

Om de aantoonbaarheidsgrens van NG in aanwezigheid van een hoge CT-belasting te bepalen, werden 2500 G.Eq., 250 G.Eq., 25 G.Eq. en 2,5 G.Eq. NG (equimolaire mix van 2 verschillende NG-stammen) per test geanalyseerd in aanwezigheid van een hoge CT-belasting (CT < 22) met en zonder de selector voor NG. De tests werden in drievoud uitgevoerd. Wanneer NG aanwezig was in hoeveelheden < 2500 G. Eq./test verminderde of maskeerde de hoge CT-belasting (CT 21,2) het NG-sigitaal (tabel 4). Toevoeging van de NG-selector herstelde het NG-sigitaal. De analytische gevoeligheid van de PRESTO CT/NG-test voor NG in aanwezigheid van een hoge CT-belasting is 2,5 G. Eq./test.

Tabel 4. Gevoeligheid van de PRESTO CT/NG-test voor NG bij hoge belasting met CT (CT 21,2).

	NG C _T (gemiddelde ± SD; n = 3)	
	+ IAC + CT	+ IAC + CT + NG selector
2500 G.Eq/test	26.1 ± 0.2	26.2 ± 0.2
250 G.Eq/test	2 van de 3 Ct's < 40	29.0 ± 0.5
25 G.Eq/test	1 van de 3 Ct's < 40	32.4 ± 0.1
2.5 G.Eq/test	0 van de 3 Ct's < 40	36.9 ± 1.0

Precisie

De precisie van de test staat in onderstaande tabel (CV %):

NG (G.Eq/Test)	Binnen lopen n = 20	Binnen de dag 3 tijdstippen n = 3	Van dag tot dag 10 dagen n = 2
25	1.59	0.71	1.26
250	0.84	0.76	1.28
2500	0.97	0.43	1.77

CT (IFU/Test)			
1	0.82	0.82	1.07
10	0.75	0.80	0.57
100	0.26	0.58	0.39

Water + IAC			
83,3 CFU	0.58	0.49	0.38

Nauwkeurigheid

De PRESTO CT/NG-test voor Chlamydia trachomatis en Neisseria gonorrhoeae werd geëvalueerd in een klinische studie die op twee verschillende locaties werd uitgevoerd. In totaal werden 4036 specimens verzameld, te weten swabs (endovaginaal, rectaal, orofaryngeaal) en urinemonsters. De referentiemethode is de Roche Amplicor CT/NG-test.

De nauwkeurigheid werd bepaald door vergelijking met de methode van Roche. De twee onderstaande tabellen geven een algemeen overzicht.

Onderstaande tabel beschrijft de resultaten van de vergelijking van de Roche met de PRESTO-kit voor Chlamydia trachomatis. De totale aantallen worden getoond, de monsters positief, negatief en geremd.

Presto CT	Total	Roche		
		Neg	Pos	Geremd
Neg	3016	2965	17	34
Pos	319	16	300	3

Onderstaande tabel beschrijft de resultaten van de vergelijking van de Roche met de PRESTO-kit voor Neisseria gonorrhoeae. De totale aantallen worden getoond, de monsters positief, negatief en geremd / vals positief.

Presto NG	Total	Roche		
		Neg	Pos	Geremd / vals Positief
Neg	3226	2877		349
Pos	90	8	68	14

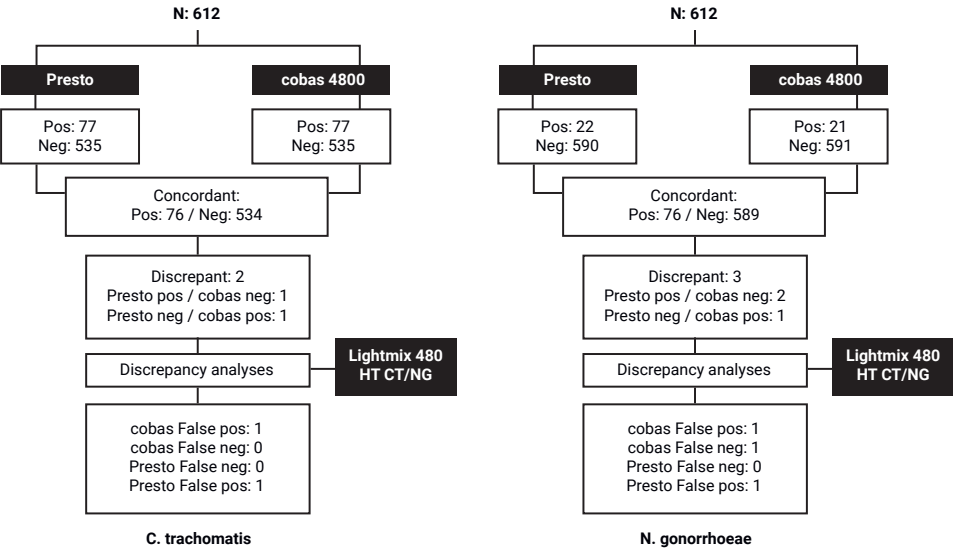


Fig. 1. Stroomdiagram van de resultaten van vaginale CT en NG-infecties. De 612 monsters, getest met de PRESTO en Cobas® 4800 leverden concordante en discrepante resultaten op. De Lightmix 480 HT CT/NG assay werd gebruikt voor discrepante monsters en de gouden standaard werd gedefinieerd als twee overeenstemmende resultaten tussen de Presto en Cobas® 4800 assays, of wanneer deze discrepant waren, een overeenstemmend resultaat tussen de Presto of Cobas® 4800 assay en de Lightmix 480 HT CT/NG assay.

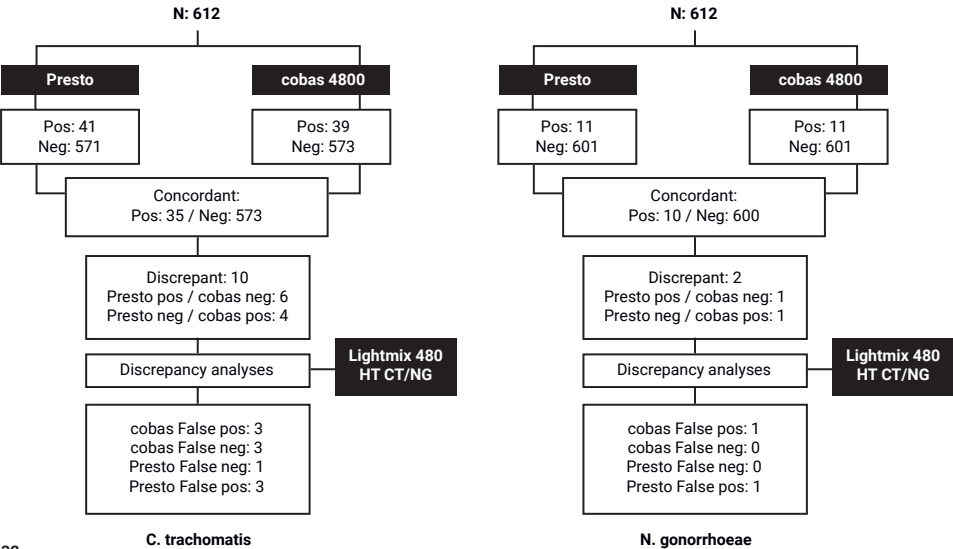


Fig. 2. Stroomdiagram van de resultaten van anale CT en NG-infecties. De 612 monsters, getest met de PRESTO en Cobas® 4800 leverden concordante en discrepante resultaten op. De Lightmix 480 HT CT/NG assay werd gebruikt voor discrepante monsters en de gouden standaard werd gedefinieerd als twee overeenstemmende resultaten tussen de Presto en Cobas® 4800 assays, of wanneer deze discrepant waren, een overeenstemmend resultaat tussen de Presto of Cobas® 4800 assay en de light mix 480 HT CT/NG assay.

Tabel 1

Sensitiviteit, specificiteit, positieve voorspellende waarde, en negatieve voorspellende waarde voor VT en NG voor Cobas® 4800 versus Presto. SENS, gevoeligheid; CI, betrouwbaarheidsinterval; SPEC, specificiteit; PPV, positieve voorspellende waarde; NPV, negatieve voorspellende waarde.

		SENS%	95% CI	SPEC%	95% CI	PPV%	95% CI	NPV%	95% CI
Vaginal CT	Roche	100.0	99.4-100.0	99.8	99.0-100.0	98.7	97.5-99.3	100.0	99.4-100.0
	Presto	100.0	99.4-100.0	99.8	99.0-100.0	98.7	97.5-99.3	100.0	99.4-100.0
Vaginal NG	Roche	95.2*	99.3-96.7	99.8	99.1-100.0	95.2	93.2-96.7	99.8	99.1-100.0
	Presto	100.0*	99.4-100.0	99.8	99.1-100.0	95.5	93.5-96.8	100.0	99.4-100.0
Rectal CT	Roche	92.3*	89.9-94.2	99.5	98.5-99.6	92.3	89.9-94.2	99.5	98.5-99.8
	Presto	97.4*	95.9-98.4	99.5	98.5-99.9	92.7	90.3-94.5	99.8	99.1-100.0
Rectal NG	Roche	100.0	99.4-100.0	99.8	99.1-100.0	90.9	88.4-92.9	100.0	99.4-100.0
	Presto	100.0	99.4-100.0	99.8	99.1-100.0	90.1	88.4-92.9	100.0	99.4-100.0

De gelegerde gouden standaard was een overeenstemmend resultaat tussen de Presto en Cobas® 4800-tests, of, wanneer deze afweken, een overeenstemmend resultaat tussen de Presto of Cobas® 4800-test en de Lightmix 480 HT CT/NG-test. Gevoeligheid, specificiteit, PPV en NPV voor beide tests en beide anatomische locaties werden berekend ten opzichte van de gelegerde gouden standaard.

1 monster verschil in gevoeligheidsanalyses.

* 2 monsters verschil in gevoeligheidsanalyses.

Storende stoffen

De aanwezigheid van PCR-remmers kan vals-negatieve resultaten veroorzaken.

Om na te gaan of de IAC de remming adequaat controleert, werd aan de PCR samen met de IAC één µl van de volgende stoffen toegevoegd in een concentratie van 83,3 CFU/µl per test.

EDTA (0,5M)
 ETOH 96%
 DMSO 4 % (v/v)
 HCl (1N)
 Silicaballetjes (1 µl)
 Bloed (1 µl)
 Ureum (40 g/100ml)
 Bilirubine (20 µM/L en 120 µM/L)
 Vitamine C (56 µM/L)
 Lysisbuffer
 Ciprofloxacin hydrochloride-1-H₂O (handelsnaam: Ciproxin) (2 mg/ml)
 Vibramycine (20 mg/ml)
 Metronidazol (5 mg/ml)

EDTA, HCl, Bilirubine (120 µM/L) en lysisbuffer remden de IAC-amplificatie volledig, deze stoffen werden niet verder getest. In aanwezigheid van ethanol 96%, DMSO, silicakorrels, bloed, ureum, bilirubine (20 µM/L), vitamine C, Ciprofloxacin hydrochloride-1-H₂O, Vibramycine en Metronidazol was het IAC-sigitaal nog steeds aanwezig. Deze stoffen werden opnieuw getest in aanwezigheid van CT en NG. De CT waarden voor CT en NG in aanwezigheid van deze niet-remmende stoffen lagen alle binnen 1 CT van de CT waarde van CT en NG in aanwezigheid van water. De versterking van CT en NG werd dus niet geremd door deze stoffen. Uit deze gegevens blijkt dat IAC de remming goed controleert.

10. Referenties

1. Morre SA, Welte R, Postma MJ. Major improvements in cost effectiveness of screening women for Chlamydia trachomatis using pooled urine specimens and high performance testing. *Sex Transm.Infect.* **2002**;**78**:74-5.
2. DiDomenico N, Link H, Knobel R, Caratsch T, Weschler W, Loewy ZG et al. COBAS AMPLICOR: volledig geautomatiseerd RNA- en DNA-amplificatie- en detectiesysteem voor routinediagnostische PCR. *Clin.Chem.* **1996**;**42**:1915-23.
3. Roosendaal R, Walboomers JM, Veltman OR, Melgers I, Burger C, Bleker OP et al. Comparison of different primer sets for detection of Chlamydia trachomatis by the polymerase chain reaction. *J.Med.Microbiol.* **1993**;**38**:426-33.
4. Morre SA, van Valkengoed IG, Moes RM, Boeke AJ, Meijer CJ, Van Den Brule AJ. Determination of Chlamydia trachomatis prevalence in an asymptomatic screening population: performances of the LCx and COBAS Amplicor tests with urine specimens. *J.Clin.Microbiol.* **1999**;**37**:3092-6.
5. Eickhoff M, Laue T, Ruckes T, Cramer SO, Krupp G, Tiemann C. Ultra-rapid detection of Chlamydia trachomatis by real time PCR in the LightCycler using SYBR green technology or 5'-nuclease probes. *Clin.Lab* **2003**;**49**:217-25.
6. Jalal H, Stephen H, Curran MD, Burton J, Bradley M, Carne C. Development and Validation of a Rotor-Gene real time PCR Assay for Detection, Identification, and Quantification of Chlamydia trachomatis in a Single Reaction. *J.Clin.Microbiol.* **2006**;**44**:206-13.
7. Koenig MG, Kosha SL, Doty BL, Heath DG. Directe vergelijking van het BD ProbeTec ET systeem met in-house LightCycler PCR assays voor detectie van Chlamydia trachomatis en Neisseria gonorrhoeae uit klinische monsters. *J.Clin.Microbiol.* **2004**;**42**:5751-6.
8. van Doornum GJ, Guldemeester J, Osterhaus AD, Niesters HG. Diagnose van herpesvirusinfecties door real time amplificatie en snelle kweek. *J.Clin.Microbiol.* **2003**;**41**:576-80.
9. Vergelijking van GMT presto assay en Roche cobas® 4800 CT/NG assay voor de detectie van Chlamydia Trachomatis en Neisseria Gonorrhoeae in droge swabs", *Journal of Microbiological Methods* 118 (2015) 70-74.

11. Beschikbaarheid

Voor technische hulp verwijzen wij u naar de catalogusnummers:

Kit # GM CG 160500

Kit # GM CG 160100

Fabrikant: Goffin Molecular Technologies B.V.
Vijzelweg 18a
5145 NK Waalwijk
The Netherlands
Tel: +31 (0) 85 004 54 79
info@goffinmt.com
KvK: 2012 8601 0000

GARANTIE

Dit product garandeert de prestaties zoals beschreven op het etiket en in de literatuur van Goffin Molecular Technologies wanneer het volgens alle instructies wordt gebruikt. Goffin Molecular Technologies wijst elke impliciete garantie van verkoopbaarheid of geschiktheid voor een bepaald doel af en Goffin Molecular Technologies is in geen geval aansprakelijk voor gevolgschade. Vervanging van het product of terugbetaling van de aankoopprijs is het exclusieve rechtsmiddel voor de koper.

DE AANKOOP VAN DIT PRODUCT VERLEENT DE KOPER OP GROND VAN BEPAALDE ROCHE-OCTROOIEN HET RECHT OM HET UITSLUITEND TE GEBUIKEN VOOR HET VERLENEN VAN IN-VITRODIAGNOSTISCHE DIENSTEN BIJ DE MENS. HIERBIJ WORDT GEEN ALGEMEEN OCTROOI OF ANDERE LICENTIE VAN WELKE AARD DAN OOK VERLEEND, ANDERS DAN DIT SPECIFIEKE GEBRUIKSRECHT UIT DE AANKOOP.

DISCLAIMER:

Handelsmerken en licenties:

ABI Prism® is een geregistreerd handelsmerk van Applied Biosystems of haar dochterondernemingen in de VS en/of bepaalde andere landen. FAM, VIC en ROX zijn handelsmerken van Applied Biosystems of haar dochterondernemingen in de VS en bepaalde andere landen. Geregistreerde namen, handelsmerken, enz. die in dit document worden gebruikt, zelfs wanneer zij niet specifiek als zodanig zijn aangeduid, mogen niet als onbeschermd door de wet worden beschouwd.

De sequenties van *Neisseria gonorrhoeae* en *Chlamydia trachomatis* en het principe van de Isolatie Amplificatie Controle zijn in licentie gegeven onder de octrooien WO2006014109; WO2008097082; JP2008508875.

Ga voor meer informatie naar www.goffinmt.com

LIJST VAN AFKORTINGEN

Ct	Cyclisdrempel
CT	Chlamydia Trachomatis
IAC	Isolatie Versterkings Controle
NG	Neisseria gonorrhoeae
PCR	Polymerase Chain Reaction

LIJST VAN DE BIJ DE ETIKETTERING GEBRUIKTE SYMBOLEN



CE nummer



Uiterste gebruiksdatum



Alleen voor in vitro diagnostisch gebruik



Niet bewaren boven -20°C



Catalogusnummer



Bevat voldoende voor 500 tests



Batchcode



Bevat voldoende voor 100 tests



Fabrikant



Raadpleeg de gebruiksaanwijzing

Presto kombinierter qualitativer Echtzeit-CT/NG-Assay

Entspricht der Richtlinie 98/79/EG des Europäischen Parlaments und desRat vom 27. Oktober 1998 über In-vitro-Diagnostika.

Nur für die In-vitro-Diagnostik geeignet

Gebrauchsanweisung

Kombinierter Chlamydia trachomatis-Neisseria gonorrhoeae DNA-Amplifikationstest in Echtzeit.
 DNA-Amplifikationstest in Echtzeit für den qualitativen In-vitro-Nachweis von Chlamydia trachomatis (CT) und Neisseria gonorrhoeae (NG) DNA in Urin-, Harnröhrenabstrich- und endozervikalen Abstrichproben.

Katalognummer: CG 160100, 4 x 25 tests
Katalognummer: CG 160500, 5 x 100 tests

Nach Erhalt bei -20°C lagern.

Inhalt

1.	Verwendungszweck	37
2.	Zusammenfassung und Erläuterung des Tests	37
3.	Prinzip des Prüfverfahrens	37
4.	Reagenzien	38
	4.1 Komponenten in jedem CT/NG-Testkit	
	4.2 Zusätzlich benötigte Materialien und Instrumente	
	4.3 Vorbereitung und Lagerung von Reagenzien	
	4.4 Chemische oder physikalische Anzeichen von Instabilität	
5.	Probenentnahme und -vorbereitung	41
6.	Presto CT/NG Testverfahren	41
	6.1 Reagenzienvorbereitung	
	6.2 Verfahren	
	6.2 Hinweise zum Verfahren	
7.	Auswertung der Ergebnisse	43
8.	Beschränkungen des Verfahrens	45
9.	Leistungsmerkmale	45
10.	Referenzen	51
11.	Verfügbarkeit	51



1. Bestimmungsgemäße Verwendung

Das Goffin Molecular Technologies Presto Chlamydia trachomatis (CT)- Neisseria gonorrhoeae (NG) Assay Kit ist für den qualitativen In-vitro-Nachweis von Chlamydia trachomatis Plasmid-DNA und Neisseria gonorrhoeae chromosomaler DNA in Urin, Harnröhrenabstrichproben und endozervikalen Abstrichproben menschlichen Ursprungs bestimmt. Der vorgesehene Anwender ist ein spezialisiertes molekulardiagnostisches Labor. Der Test wird von geschultem Laborpersonal durchgeführt. Für Routinelaboratorien, die quantitative PCR durchführen, ist keine besondere Schulung erforderlich.

2. Zusammenfassung und Erläuterung des Tests

Chlamydia trachomatis ist ein obligat intrazelluläres, gramnegatives Bakterium. Es sind fünfzehn verschiedene Serovare bekannt, von denen acht (D-K) urogenitale Infektionen verursachen. Die Infektion bei Frauen verläuft häufig asymptomatisch, und unbehandelte Infektionen können zu Endometritis, Salpingitis und Unfruchtbarkeit führen. Ein Screening auf asymptomatische Infektionen ist angezeigt, um die Übertragung von CT zu verringern und die Entwicklung schwerer Komplikationen zu verhindern¹.

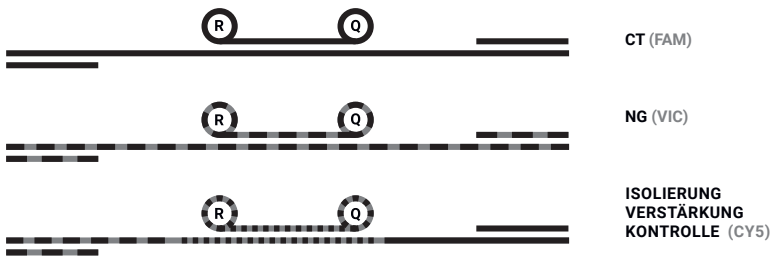
Neisseria gonorrhoeae ist nach Chlamydia trachomatis für die zweithäufigste sexuell übertragbare Krankheit verantwortlich. Bei Frauen verläuft die Infektion häufig asymptomatisch, was das Risiko einer Übertragung erhöht. Langfristig nicht diagnostizierte Infektionen können zu Beckenentzündungen, chronischen Beckenschmerzen, ektopischen Schwangerschaften, Bindehautentzündungen bei Neugeborenen, und Unfruchtbarkeit führen. Eine frühzeitige Erkennung der Infektion ist angezeigt, um die Übertragung und nachfolgende schwere Komplikationen zu verringern.²

Die Echtzeit-PCR hat sich als empfindliches und einfach zu handhabendes Diagnoseinstrument für viele Mikroorganismen erwiesen und ist ein Standardverfahren zum Nachweis von CT/NG. Es ist bekannt, dass in einigen klinischen Proben probenspezifische, aber unbekannte hemmende Substanzen vorhanden sind, die bei der Probenvorbereitung nicht immer zuverlässig entfernt werden. Es wird eine speziell entwickelte Isolations-/Inhibitions-Isolations-Amplifikationskontrolle eingeführt, die eine ineffiziente DNA-Isolation und/oder PCR-Inhibition in jeder einzelnen klinischen Probe erkennt.

Die Kombination von Echtzeit-PCR mit dem Zusatz einer Isolations-Amplifikationskontrolle, die sowohl die Inhibition als auch die Nukleinsäureextraktion von klinischen Proben überwacht, bietet das Beste aus zwei Welten. Der Presto CT/NG-Kit bietet diese Kombination und gewährleistet eine korrekte Interpretation, indem er falsch negative und echte positive Signale mit hoher Sensitivität und Spezifität erzeugt. Das Echtzeitformat des Kits verringert das Risiko einer Kontamination durch Amplikons. Darüber hinaus wird der schwedische Variantenstamm von Chlamydia trachomatis erfolgreich nachgewiesen. Schließlich bietet der Presto-Kit eine weitere einzigartige Funktion. Um negative Ergebnisse bei Doppelinfektionen mit einem auffälligen (hochpositiven) Bakterium zu vermeiden, sind CT- und NG-Selektoren verfügbar. Diese Selektoren ermöglichen den Nachweis einer niedrigen Belastung eines Targets in Kombination mit einer hohen Belastung des anderen Targets in derselben Probe.

3. Principle of the test procedure

Der Nachweis von Chlamydia trachomatis (CT) und Neisseria gonorrhoeae (NG) DNA durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) basiert auf der Amplifikation eines Teils der kryptischen CT-Plasmid-DNA und der opa-Gene von NG unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide. Die PCR-Produkte werden durch interne Sonden nachgewiesen, die jeweils mit einem anderen fluoreszierenden Reporterfarbstoff ("R") verbunden sind. Die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs wird durch eine Quencher-Gruppe ("Q"), die an dieselbe Sonde gebunden ist, gelöscht. Während der Bildung des PCR-Produkts wird die Sonde abgebaut und die Fluoreszenz des Reporters wird nicht mehr gequencht und kann in Echtzeit nachgewiesen werden. Vor der Isolierung und Amplifikation einer klinischen Probe wird ein Isolations-Amplifikations-Kontrollbakterium hinzugefügt. Dieses Kontrollbakterium enthält ein DNA-Fragment mit der Reverse-Primer-Erkennungsstelle für CT und der Forward-Primer-Erkennungsstelle für NG. Die amplifizierte Sequenz zwischen den Primern unterscheidet sich jedoch von den CT/NG-Fragmenten. Dies wird durch eine Sondensequenz mit einem anderen Reporterfarbstoff nachgewiesen. Die Fluoreszenz des IAC-Reporterfarbstoffs kann zur Überwachung sowohl der Isolierung als auch der Amplifikationseffizienz verwendet werden.



SELEKTOREN

Mit der Einführung von Selektoren wird ein neues Konzept für den Echtzeit-Nachweis von Doppelinfektionen eingeführt. Das Kit enthält sowohl einen CT- als auch einen NG-Selektor. Diese Selektoren dienen dazu, in einer klinischen Probe, die stark positiv (IAC negativ) für NG oder CT ist, entweder auf CT oder NG zu selektieren, um das Risiko einer falsch negativen Doppelinfektion zu vermeiden. Die Verwendung von Selektoren wird empfohlen, wenn eine Probe positiv für CT oder NG ist. Durch die Funktion des Selektors wird das IAC-Signal wiederhergestellt, so dass selbst schwache positive CT- oder NG-Signale in Anwesenheit einer hohen Belastung mit NG- bzw. CT-DNA nachgewiesen werden können. Zu diesem Zweck kann dieselbe isolierte DNA-Fraktion in einer nachfolgenden PCR verwendet werden, wobei der Selektor der Wahl vor der Amplifikation hinzugefügt wird. Bei stark CT-positiven Proben sollte der NG-Selektor und bei stark NG-positiven Proben der CT-Selektor vor der Amplifikation zugesetzt werden (siehe Protokoll für die Mengen).

4. Reagenzien

Alle klinischen Proben sollten als infektiös angesehen werden. Diese Proben sollten gemäß der Biosicherheitsstufe 2 behandelt werden, die im Handbuch "Biosicherheit in mikrobiologischen und biomedizinischen Laboratorien" des Centre for Disease Control/National Institutes of Health, 1984, für alle potenziell infektiösen Proben empfohlen wird.

Schutzhandschuhe tragen

Verwenden Sie sterile aerosolfeste Pipettenspitzen

Im Labor muss ein unidirektionaler Arbeitsablauf mit verschiedenen Räumen für die Probenvorbereitung, den Voramplifikationsbereich und die Nachamplifikation eingehalten werden.

HINWEIS: Die Reagenzien in diesem Test enthalten Natriumazid als Konservierungsmittel (0,05 %). Natriumazid kann mit Blei- und Kupferleitungen reagieren und hochexplosive Metallazide bilden. Spülen Sie bei der Entsorgung die Abflüsse mit reichlich kaltem Wasser, um die Bildung von Aziden zu verhindern.

4.1.1 Components in each Presto CT/NG CG 160100, 4 x 25 assays/ kit

1. **CT/NG PCR-Mischung MASTER MIX (CG301001)**
4 Röhrchen mit schwarzem Farbcode und der Aufschrift "MASTER MIX" mit 400 µl gebrauchsfertiger PCR-Mischung. Diese Mischung enthält vier Primer für die Amplifikation der CT-DNA, der NG-DNA und der Isolations-Amplifikations-Kontroll-DNA. Er enthält drei Fluoreszenzsonden für den Nachweis von CT-DNA, NG-DNA bzw. Kontroll-DNA. Der Mastermix enthält alle Zutaten für die PCR-Amplifikation einschließlich der DNA-Polymerase.
2. **CT/NG Isolationsverstärkungssteuerung Isolationsverstärkungssteuerung (CG301003)**
4 Röhrchen mit einem roten Farbcode, beschriftet mit "Isolation Amplification Control", die 150 µl Isolation Amplification Control enthalten. Die Isolations-Amplifikationskontrolle besteht aus einem inaktivierten *E. coli*, der mit einem genomischen DNA-Fragment modifiziert wurde, das Primer-Bindungsstellen enthält, die mit den *C. trachomatis*- und *N. gonorrhoeae*-Sequenzen identisch sind, aber eine andere Sonden-Zwischensequenz aufweisen. **HINWEIS:** vor der Verwendung resuspendieren.



3. **CT-Positivkontrolle** *Positivkontrolle CT (CG301005)*
4 Röhrchen mit blauem Farbcode und der Aufschrift "Positive Control CT", die 55 µl Positivkontrolle enthalten. Die Positivkontrolle besteht aus CT-DNA mit 4 IFU/10 µl.
4. **NG Positive Kontrolle** *Positive Kontrolle NG (CG301006)*
4 Röhrchen mit grünem Farbcode und der Aufschrift "Positivkontrolle NG", die 55 µl Positivkontrolle enthalten. Die Positivkontrolle besteht aus NG-DNA mit 100 KBE/10 µl.
5. **CT/NG Negative Control** *Negative Control (CG301014)*
2 Röhrchen mit einem transparenten Farbcode, beschriftet mit "Negative Control", enthalten 500 µl Negativkontrolle.
6. **CT-Wahlschalter** *CT SELECTOR (CG301008)*
1 Röhrchen mit violetterm Farbcode und der Aufschrift "CT SELECTOR" mit 50 µl CT-Selektor zur Verwendung mit hoch NG-positiven Proben für den Nachweis einer schwach positiven CT-Koinfektion.
7. **NG-Wähler** *NG-WÄHLER (CG301007)*
1 Röhrchen mit gelbem Farbcode und der Aufschrift "NG SELECTOR" mit 50 µl NG-Selektor zur Verwendung mit hoch CT-positiven Proben für den Nachweis einer schwach positiven NG-Koinfektion.

HINWEIS: Verwenden Sie alle Komponenten mit der gleichen Chargennummer des Kits.

4.1.2 Bestandteile jedes Presto CT/NG CG 160500, 5 x 100 Assays/Kit

1. **CT/NG PCR-Mischung** *MASTER MIX (CG301015)*
5 Röhrchen mit schwarzem Farbcode und der Aufschrift "MASTER MIX", die 1600 µl gebrauchsfertige PCR-Mischung enthalten. Diese Mischung enthält vier Primer für die Amplifikation der CT-DNA, der NG-DNA und der Isolationsamplifikationskontroll-DNA. Er enthält drei Fluoreszenzsonden für den Nachweis von CT-DNA, NG-DNA bzw.
2. **CT/NG Isolationsverstärkungssteuerung** *Isolationsverstärkungssteuerung (CG301016)*
5 Röhrchen mit rotem Farbcode und der Aufschrift "Isolation Amplification Control" mit 750 µl Isolation Amplification Control. Die Isolations-Amplifikationskontrolle besteht aus einem inaktivierten E. coli, der mit einem genomischen DNA-Fragment modifiziert wurde, das Primer-Bindungsstellen enthält, die mit den C. trachomatis- und N. gonorrhoeae-Sequenzen identisch sind, aber eine andere intermediäre Sondensequenz aufweisen. **HINWEIS:** vor der Verwendung resuspendieren.
3. **CT-Positivkontrolle** *Positivkontrolle CT (CG301017)*
4 Röhrchen mit blauem Farbcode und der Aufschrift "Positive Control CT", die 300 µl Positivkontrolle enthalten. Die Positivkontrolle besteht aus CT-DNA mit 4 IFU/10 µl.
4. **NG Positive Kontrolle** *Positive Kontrolle NG (CG301018)*
4 Röhrchen mit grünem Farbcode und der Aufschrift "Positivkontrolle NG", die 300 µl Positivkontrolle enthalten. Die Positivkontrolle besteht aus NG-DNA mit 100 KBE/10 µl.
5. **CT/NG Negative Control** *Negative Control (CG301014)*
2 Röhrchen mit einem transparenten Farbcode, beschriftet mit "Negative Control", enthalten 500 µl Negativkontrolle.
6. **CT-Wahlschalter** *CT SELECTOR (CG301008)*
1 Röhrchen mit violetterm Farbcode und der Aufschrift "CT SELECTOR" mit 50 µl CT-Selektor zur Verwendung mit hoch NG-positiven Proben für den Nachweis einer schwach positiven CT-Koinfektion.
7. **NG-Wähler** *NG-WÄHLER (CG301007)*
1 Röhrchen mit gelbem Farbcode und der Aufschrift "NG SELECTOR" mit 50 µl NG-Selektor zur Verwendung mit hoch CT-positiven Proben für den Nachweis einer schwach positiven NG-Koinfektion.

HINWEIS: Verwenden Sie alle Komponenten mit der gleichen Chargennummer des Kits.

4.2.2 Zusätzlich benötigte Materialien und Instrumente

Der Test kann mit Standard-Lysereagenzien auf Guanidin-Iso-Thiocyanat-Basis und Magnetbeads für die DNA-Isolierung verwendet werden.

Die PCR-Amplifikation kann mit jedem Echtzeit-PCR-Gerät durchgeführt werden, das die Fluorophore FAM, VIC, ROX und Cy5 erkennen kann: FAM, VIC, ROX & Cy5. Geringe Abweichungen bei den Cut-Off-Werten können jedoch aufgrund von Unterschieden bei der DNA-Isolierung und/oder dem Nachweis der PCR-Amplifikation je nach verwendetem Gerät auftreten. In diesen Fällen kann ein neuer Cut-off-Wert ohne Verlust an Sensitivität und Spezifität bestimmt werden.

HINWEIS: Für die Berechnung des ROX-Signals ist keine spezielle Software erforderlich. Das ROX-Signal ist enthalten, damit der Test für ABI 7500-Geräte (und alle anderen Geräte, die ROX benötigen) geeignet ist. Die Software aller anderen Echtzeit-PCR-Geräte kann das Presto-Kit ohne Einschränkungen verwenden (z. B. LightCycler).

Verwenden Sie für alle Schritte des Verfahrens sterile DNase-freie Polypropylen-Einmalartikel.

4.3 Vorbereitung und Lagerung von Reagenzien

1. **CT/NG PCR-Mischung MASTER MIX** Das Gefäß vor dem Öffnen auftauen. Geöffnete Fläschchen können nur zweimal wieder eingefroren und aufgetaut werden. **HINWEIS:** Vor der Verwendung mischen und in einer kurzen 3-Sekunden-Zentrifugation abschleudern.
2. **CT/NG Isolierung Amplifikationskontrolle Isolierung Amplifikationskontrolle** Tauen Sie das Röhrchen vor dem Öffnen auf. Geöffnete Fläschchen können nur zweimal wieder eingefroren und aufgetaut werden. Hinweis: Vor der Verwendung mischen und in einer kurzen 3-Sekunden-Zentrifugation abschleudern.
3. **CT Positive Kontrolle Positive Kontrolle CT** Das Röhrchen vor dem Öffnen auftauen. Geöffnete Fläschchen können nur zweimal wieder eingefroren und aufgetaut werden. Hinweis: Vor der Verwendung mischen und in einer kurzen 3-Sekunden-Zentrifugation abschleudern.
4. **NG Positive Kontrolle Positive Kontrolle NG** Das Röhrchen vor dem Öffnen auftauen. Geöffnete Fläschchen können nur zweimal wieder eingefroren und aufgetaut werden. Hinweis: Vor der Verwendung mischen und in einer kurzen 3-Sekunden-Zentrifugation abschleudern.
5. **Negativkontrolle Negativkontrolle** Das Röhrchen vor dem Öffnen auftauen. Geöffnetes Fläschchen kann nur zweimal wieder eingefroren und aufgetaut werden. Hinweis: Vor der Verwendung mischen und in einer kurzen 3-Sekunden-Zentrifugation abschleudern.
6. **CT Selector CT SELECTOR** Tauen Sie das Röhrchen vor dem Öffnen auf. Geöffnetes Fläschchen kann nur zweimal wieder eingefroren und wieder aufgetaut werden. Bemerkung: mischen und schleudern in einer kurzen 3 Sekunden Zentrifugation vor der Verwendung.
7. **NG Selector NG SELECTOR** Das Röhrchen vor dem Öffnen auftauen. Geöffnete Fläschchen können nur zweimal wieder eingefroren und aufgetaut werden. Bemerkung: Mischen und Schleudern in einer kurzen 3 Sekunden Zentrifugation vor der Verwendung.

Alle Komponenten bei -20 °C aufbewahren.

Alle Komponenten sind temperaturempfindlich. Tauen Sie nur die Komponenten auf, die verwendet werden sollen. Die Komponenten können zweimal wieder eingefroren werden. Die Reagenzien des Kits bei 2 - 8 °C (auf Eis) aufbewahren, wenn sie verwendet werden. Lagern Sie die Komponenten nicht länger als 4 Tage bei 2 - 8 °C.



4.4 Chemische oder physikalische Anzeichen für Instabilität

Eine Veränderung des Aussehens der Materialien des Testkits kann auf Instabilität oder Verschlechterung hinweisen. Die auf den Etiketten der Komponenten angegebenen Verfallsdaten geben an, nach welchem Datum die Komponenten nicht mehr verwendet werden sollten.

5. Probenentnahme und Vorbereitung der Proben

Das Presto CT/NG-Kit ist für endozervikale und urethrale Abstrichproben und Urinproben bestimmt. Allgemeine Entnahmegesetze können für Standard-DNA-Isolierungsverfahren gemäß den Protokollen des Herstellers verwendet werden.

Beispiel einer Abstrichprobe

1. Endozervikale und urethrale Abstrichproben entnehmen und in 2-5 ml 2SP-Transportmedium aufbewahren.
2. Verwenden Sie nur validierte Abstrichgeräte. Verwenden Sie keine Holz- oder Aluminiumtupfer für den molekularen Nachweis.
3. Bewahren Sie die Abstriche im Transportmedium auf. Tupferproben, die nicht sofort verarbeitet werden sollen, kühlen (2 - 8 °C) oder einfrieren.

Example urine specimen

DER PATIENT SOLLTE IN DEN 2 STUNDEN VOR DER PROBENAHME NICHT URINIERT HABEN.

1. Fangen Sie 10 bis 30 ml des ersten Harnstrahls in einem sauberen Polypropylenbehälter ohne Konservierungsmittel auf.
2. Befolgen Sie die Entnahme- und Transportverfahren des Labors. Kühlen Sie Urinproben, die nicht sofort verarbeitet werden sollen, im Kühlschrank (2-8 °C). Die Proben können bei dieser Temperatur 7 Tage lang aufbewahrt werden.

Vorbereitung der Probe

Dieses Verfahren muss im Probenvorbereitungsbereich in einer biologischen Sicherheitswerkbank der Klasse 2 durchgeführt werden (Schutz für Benutzer und Material).

DNA Isoliertes Exemplar::

Dieses Kit wurde unter Verwendung von Nukleinsäure-extrahierten Proben mit Hilfe des BioMérieux NucliSENS® easyMAG™ validiert. Bitte beachten Sie die Anweisungen des Herstellers für eine Beschreibung der Systemfunktionen, Isolationsprotokolle und Betriebsrichtlinien.

Abstriche: 200 µl vortexte Probe + 5 µl resuspendierte IAC + 2 ml easyMAG-Lysepuffer und Elution in 60 µl, von denen 10 µl für die CT/NG-PCR verwendet werden.

Urin: 500 µl vortexter Urin + 5 µl resuspendierte IAC + 2 ml easyMAG Lyse und Elution in 60 µl, von denen 10 µl für die CT/NG-PCR verwendet werden.

6. Presto CT/NG assay Kit Testverfahren

Dieses Verfahren muss im Vorbereitungsbereich vor der Amplifikation durchgeführt werden. Verwenden Sie während des gesamten Testverfahrens Aerosolbarrierespitzen.

6.1 Reagenzienvorbereitung

Tauen Sie die benötigten Mischungen auf und bewahren Sie sie bei 2-8°C auf.

6.2 Verfahren

1. Bereiten Sie die erforderliche Anzahl von Reaktionsgefäßen oder Vertiefungen für die Anzahl der zu messenden Proben vor, plus zwei Gefäße für die positiven Kontrollen, ein Gefäß für die negative Isolationskontrolle und ein Gefäß für die negative Kontrolle.
2. Geben Sie 15 µl des Mastermixes zu jeder zu messenden Reaktion.
3. Alle DNA-Extrakte vortexen und ausschleudern. Öffnen Sie die Probenbehälter vorsichtig nacheinander und vermeiden Sie eine Kontamination der Handschuhe und der Pipette. Mit einer neuen Aerosolbarrierespitze für jeden Extrakt 10 µl DNA (Kapitel 5) in das Reaktionsgefäß/die Vertiefung mit dem Mastermix geben. Tauschen Sie die Handschuhe aus, wenn Sie eine Kontamination vermuten.
4. Geben Sie mit einer neuen Aerosolbarrierespitze 10 µl jeder Positivkontrolle Positivkontrolle in die vorgesehenen Reaktionsgefäße/Vertiefungen, die den Mastermix enthalten. Öffnen Sie den Behälter vorsichtig und vermeiden Sie eine Kontamination der Handschuhe und der Pipette. Tauschen Sie die Handschuhe aus, wenn Sie eine Kontamination vermuten.
5. Geben Sie mit einer neuen Aerosol-Barrierespitze 10 µl der Negativkontrolle Negative Control in das vorgesehene Reaktionsgefäß/Vertiefung mit der Mastermischung.
6. Verschließen Sie die Reaktionsgefäße oder versiegeln Sie die Platte, schleudern Sie sie ab und bringen Sie die Platte in den Amplifikationsbereich.
7. Laden Sie die Reaktionsgefäße/Platten in das ABI PRISM® 7500 SDS*. Programmieren Sie das PCR-System mit den folgenden Einstellungen:

Fester Schwellenwert:	0.01
Aktivierung der Polymerase:	30 Sekunden 95 °C
Anzahl der Zyklen:	40 Zyklen
Denaturierung:	3 Sekunden 95°C
Glühen, Verlängerung und Exonuklease-Aktivität:	30 Sekunden 60°C
Manuelle Basislinieneinstellungen	

* Für den Roche LightCycler480 II ist das Detektionsformat "3 Colour Hydrolysis Probe" zu wählen, bei Verwendung eines anderen Formats muss höchstwahrscheinlich einmalig ein Farbausgleich gemäß dem Herstellerprotokoll durchgeführt werden.

VERWENDUNG VON SELEKTOREN

Im Falle eines positiven Signals mit CT oder NG mit Ct/p <21 (z. B. 14-21) muss die PCR mit 1 µl eines der Selektoren und 9 µl isolierter DNA wiederholt werden: für CT-positive Proben den NG-Selektor verwenden; für NG-positive Proben den CT-Selektor verwenden. Die Amplifikationsbedingungen sind wie oben beschrieben. Durch die Zugabe des Selektors wird nur im Falle einer Doppelinfektion ein neues Signal erzeugt. Das Signal der primär nachgewiesenen STD ist immer stärker als das der sekundär identifizierten STD. Ein schwaches Signal für das primär positive Ziel kann dennoch vorhanden sein. In einer Studie an 12.254 Proben in einer STD-Klinik wurden fast 50 % mehr Doppelinfektionen festgestellt. Da jedoch unter allen CT/NG-Positiven nach Verwendung von Selektoren nur 2,1 % Doppelinfektionen festgestellt wurden, kann man die Selektoren auch nur bei Hochrisikopatienten wie Männern, die Sex mit Männern haben (MSM), und Swingern verwenden. Dadurch wird die Zahl der erforderlichen Wiederholungstests verringert.

6.3 Anmerkungen zum Verfahren

1. Verwenden Sie einen unidirektionalen Arbeitsablauf im Labor.

Bereich für die Probenvorbereitung: Spezieller Bereich für die Vorbereitung der Proben. Alle Materialien (Ausrüstung, Zubehör, Schutz, Handschuhe usw.) müssen in diesem Bereich untergebracht werden. Materialien aus diesem Bereich dürfen nicht in den Bereich für die Vor-Amplifikation gebracht werden.

Vor-Amplifikationsbereich: Spezieller Bereich für die Vorbereitung der Reagenzien. Alle Materialien (Ausrüstung, Zubehör, Schutz, Handschuhe usw.) müssen in diesem Bereich untergebracht werden.

Verstärkerbereich: Spezieller Bereich für die Verstärkung. Alle Materialien (Ausrüstung, Zubehör, Schutz, Handschuhe usw.) müssen in diesem Bereich untergebracht werden. Materialien aus diesem Bereich dürfen nicht in den Vor-Amplifikationsbereich und nicht in den Probenvorbereitungsbereich verbracht werden.

2. Verwenden Sie immer aerosolfeste Spitzen.
3. Seien Sie beim Umgang mit den Materialien äußerst vorsichtig, um Verunreinigungen zu vermeiden. Reagenzien und Proben vor dem Öffnen immer mischen und ausschleudern. Bei Verdacht auf Verunreinigung sind die Materialien zu verwerfen.
4. Entsorgen Sie alle verbrauchten Reagenzien nach Abschluss des Verfahrens unter Beachtung der örtlichen Vorschriften für biologisch gefährlichen Abfall.
5. Sorgfältige Analysetechniken und die strikte Befolgung der Anweisungen in den Prüfanweisungen sind für zuverlässige Ergebnisse unerlässlich.
6. Proben mit nicht eindeutigen Ergebnissen müssen durch Wiederholung des Tests oder Isolierung überprüft werden.
7. Verwenden Sie keine Reagenzien aus verschiedenen Chargen.
8. Sollte das Kit bei Erhalt beschädigt sein, wenden Sie sich bitte an Ihren örtlichen Händler und/oder an Goffin Molecular Technologies BV.

7. Auswertung der Ergebnisse

Die folgenden Farbstoffe werden für die verschiedenen Ziele verwendet:

Ziel	Färben
CT	FAM
NG	VIC
IC	CY5

Bei gültigen Läufen (gültige Positiv- und Negativkontrolle - siehe Qualitätskontrolle) interpretieren Sie die Probenergebnisse wie folgt:

C _T Probe	C _T Intern Kontrolle	Auslegung
> 40	≤ 37	C. trachomatis und/oder N. gonorrhoeae DNA nicht nachgewiesen. Dies bedeutet nicht unbedingt, dass keine Infektion mit C. trachomatis und/oder N. gonorrhoeae vorliegt, da dies von einer korrekten Probenentnahme abhängt.
≤ 35 for CT oder NG	ANY	C. trachomatis- oder N. gonorrhoeae-DNA nachgewiesen.* Je nach Signal ist C. trachomatis-DNA oder N. gonorrhoeae-DNA vorhanden. Um das Vorhandensein des anderen Erregers festzustellen, kann die PCR mit 1 µl eines der Selektoren wiederholt werden (siehe § 6.2, Verwendung von Selektoren). CT positiv: NG-Selektor verwenden; NG positiv: CT-Selektor verwenden. Das IAC-Signal bestätigt das ordnungsgemäße Funktionieren des Selektors und das Fehlen einer Hemmung. Im Falle einer Doppelinfektion wird ein zusätzliches Signal für das andere Target angezeigt.
≤ 35 for CT und NG	ANY	Nachweis von C. trachomatis und N. gonorrhoeae-DNA*.
> 40	> 37	Hemmende Probe. Es kann keine Diagnose gestellt werden. Bearbeiten Sie die ursprüngliche Probe erneut oder bearbeiten Sie eine neu gesammelte Probe.
> 35, < 40	< 40	Zweideutig. In Bezug auf C. trachomatis-DNA und/oder N. gonorrhoeae-DNA können keine Schlussfolgerungen gezogen werden. Wenn die nachgewiesene DNA durch eine Wiederholungsanalyse bestätigt werden kann, kann die Probe als nachgewiesene C. trachomatis- und/oder N. gonorrhoeae-DNA betrachtet werden.

* Der DNA-Nachweis kann auf eine CT- und/oder NG-Infektion hinweisen, aber die Probe kann auch Ziel-DNA enthalten, ohne dass lebende Organismen vorhanden sind.

Qualitätskontrolle

In jedem Kit sind zwei Positivkontrollen und eine Negativkontrolle zur Qualitätskontrolle enthalten. Zusätzlich zu den mitgelieferten Kontrollen können weitere Kontrollen analysiert werden. Für die Analyse der Kontrollwerte und der Trends sollten etablierte statistische Methoden verwendet werden.

Wenn die Kontrollen die festgelegten Grenzwerte nicht einhalten und eine Wiederholung technische Fehler ausschließt, sind folgende Bereiche zu überprüfen:

1. Verfallsdatum auf Reagenzienpackung und zubereiteten Reagenzien
2. Temperatur der Reagenzien
3. Einstellungen PCR-System
4. Verunreinigung

Wenn die Kontrollen immer noch ungültig sind, wenden Sie sich bitte an den Kundendienst von Goffin Molecular Technologies oder an Ihren örtlichen Händler.

Negative Kontrolle

Der CT der Negativkontrolle sollte >40 sein. Ist der CT niedriger, ist der gesamte Lauf ungültig und das Testverfahren muss wiederholt werden.

**Positive CT-Kontrolle**

Der CT der positiven CT-Kontrolle sollte ≤ 37 sein. Liegt der CT außerhalb dieses Bereichs, ist der gesamte Lauf ungültig und das Testverfahren muss wiederholt werden.

Positive NG-Kontrolle

Der CT der positiven NG-Kontrolle sollte ≤ 37 sein. Liegt der CT außerhalb dieses Bereichs, ist der gesamte Lauf ungültig und das Testverfahren muss wiederholt werden.

Isolierung Verstärkung Kontrolle

Der CT der Isolations-Amplifikationskontrolle sollte ≤ 37 sein. Wenn der CT > 37 ist, ist die Probe ungültig und muss wiederholt werden.

Negative Isolierungskontrolle

Für jede Isolierungsserie muss eine negative Isolierungskontrolle, der IAC zugesetzt wird, analysiert werden. Die IAC CT der Negativkontrolle sollte ≤ 37 sein. Für CT und NG sollte der CT > 40 sein. Ist der CT niedriger, sind alle Proben ungültig und das Testverfahren muss wiederholt werden.

8. die Grenzen des Verfahrens

1. Verwenden Sie nur endozervikale Abstriche, urethrale Abstriche und Urinproben. Andere Probenotypen wurden nicht validiert und können zu falsch positiven oder falsch negativen Ergebnissen führen.
2. Probenentnahme, -transport und -lagerung können die Anzahl der in der Probe vorhandenen Organismen beeinflussen und zu einem falsch positiven oder falsch negativen Ergebnis führen.
3. Eine gute Laborpraxis und die strikte Einhaltung dieser Testanleitung sind unerlässlich, um eine Kontamination der Reagenzien und/oder Proben zu vermeiden.
4. Plasmidfreie *C. trachomatis* wird nicht nachgewiesen.
5. Der Anwender sollte über eine Laborausbildung in PCR-Techniken verfügen oder entsprechende Erfahrungen auf dem Gebiet der PCR-Techniken gesammelt haben.

9. leistungsmerkmale

Analytische Spezifität

Die analytische Spezifität des PRESTO CT/NG-Tests wurde an 37 Bakterien, 5 Hefen, 1 Protozoon und 4 Virusstämmen getestet, die aus dem Urogenitaltrakt isoliert werden können. Jedes Isolat wurde in einer Konzentration von mindestens 104 Kopien/Test in Abwesenheit und Anwesenheit von CT (CT um 30) oder NG (äquimolare Mischung von 2 verschiedenen NG-Stämmen; CT um 30) getestet. Alle getesteten Organismen (siehe unten), einschließlich 11 *Neisseria*-Spezies, die nicht zu den *N. gonorrhoeae* gehören, ergaben negative Ergebnisse mit dem PRESTO CT/NG-Test und zeigten keine Interferenzen mit dem CT- und NG-Nachweis.

Actinomyces israelii
Bacteroides fragilis
Branhamella catarrhalis
Chlamydomyphyla pneumoniae
Chlamydomyphyla psittaci
Candida albicans
Candida glabrata
Candida krusei
Candida parapsilosis
Candida tropicalis
Citrobacter freundii
Clostridium perfringens
Cryptococcus neoformans
Cytomegalovirus

Enterobacter cloacae
Enterococcus faecalis
Enterococcus faecium
Epstein-Barr Virus
Escherichia coli
Gardnerella vaginalis
Haemophilus influenzae
Herpes simplex virus 1
Herpes simplex virus 2
Klebsiella pneumoniae
Lactobacillus species
Legionella pneumophila
Morganella morganii
Mycoplasma pneumoniae

Neisseria cinerea	Peptostreptococcus species
Neisseria elongata	Proteus mirabilis
Neisseria flavescens	Pseudomonas aeruginosa
Neisseria lactamica	Serratia marcescens
Neisseria meningitidis	Staphylococcus aureus
Neisseria mucosa	Staphylococcus epidermidis
Neisseria perflava	Streptococcus agalactiae
Neisseria polysaccharea	Streptococcus pneumoniae
Neisseria sicca	Streptococcus pyogenes
Neisseria subflava	Trichomonas vaginalis
Neisseria denitrificans	Yersinia enterocolitica

Analytische Empfindlichkeit

Die Nachweisgrenze (LoD) des PRESTO CT/NG-Tests für Chlamydia trachomatis und Neisseria gonorrhoeae wurde anhand quantifizierter Stammkulturen (mikroskopisch ausgezählt für CT, quantifizierte DNA für NG) bestimmt. Es wurden 20 Replikate in den Konzentrationen 0,02, 0,01 und 0,005 IFU/µl von CT und 1,0, 0,5 und 0,25 G.Eq./µl von NG getestet. Die 20 CT-Wiederholungen wurden mit 0,02 IFU/µl und 0,01 IFU/µl positiv getestet (Tabelle 1). Die 20 NG-Replikate waren bei allen drei Konzentrationen positiv (Tabelle 2). Der LoD für den PRESTO CT/NG Test beträgt für CT 0,1 IFU/Test, für NG 2,5 G.Eq./Test.

Tabelle 1. LOD-Bestimmung des PRESTO CT/NG-Tests für CT.

Konzentration CT	C _T (Mittelwert ± SD; n = 20)
0.2 IFU/test	34,46 ± 0.42
0.1 IFU/test	36,16 ± 1.05
0.05 IFU/test	18/20 C _t < 40

Tabelle 2. LOD-Bestimmung des PRESTO CT/NG-Tests für NG.

Konzentration NG	C _T (Mittelwert ± SD; n = 20)	
	NG-Stamm 1	NG-Stamm 2
10 G. Gleichwertig/Prüfung	33,5 ± 0.5	34,8 ± 0.3
5 G. Gleichung/Prüfung	34,6 ± 0.4	35,7 ± 0.5
2,5 G. Äquivalent/Prüfung	35,7 ± 0.7	36,8 ± 0.9

Bei Doppelinfektionen: Um die Nachweisgrenze von CT in Gegenwart einer hohen NG-Belastung zu bestimmen, wurden 100 IFU, 10 IFU, 1 IFU und 0,1 IFU CT pro Test in Gegenwart einer hohen NG-Belastung (äquimolare Mischung aus 2 verschiedenen NG-Stämmen; C_t < 22) mit und ohne den Selektor für CT analysiert. Die Tests wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt. Wenn CT in Mengen < 100 IFU/Test vorhanden war, verringerte oder überdeckte die hohe NG-Belastung (C_t 21,7) das CT-Signal (Tabelle 3). Die Zugabe des CT-Selektors stellte das CT-Signal wieder her. Die analytische Sensitivität des PRESTO CT/NG-Tests für Chlamydia trachomatis in Gegenwart von hohem NG beträgt 0,1 IFU/Test.

Tabelle 3. Empfindlichkeit des PRESTO CT/NG-Tests für CT bei hoher NG-Belastung (CT 21.7)

	CT C _T (Mittelwert ± SD; n = 3)	
	+ IAC + NG	+ IAC + NG + CT Wahlschalter
100 IFU/test	24.56 ± 0.19	24.50 ± 0.05
10 IFU/test	28.69 ± 0.46	27.75 ± 0.14
1 IFU/test	0 von of 3 Ct's < 40	31.70 ± 0.28
0.1 IFU/test	0 von of 3 Ct's < 40	36.04 ± 0.46

Um die Nachweisgrenze von NG in Gegenwart einer hohen CT-Belastung zu bestimmen, wurden pro Test 2500 G.Äq., 250 G.Äq., 25 G.Äq. und 2,5 G.Äq. NG (äquimolare Mischung von 2 verschiedenen NG-Stämmen) in Gegenwart einer hohen CT-Belastung (CT < 22) mit und ohne den Selektor für NG analysiert. Die Tests wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt. Wenn NG in Mengen < 2500 G.Äq./Test vorhanden war, verringerte die hohe CT-Belastung (CT 21,2) das NG-Signal oder maskierte es (Tabelle 4). Die Zugabe des NG-Selektors stellte das NG-Signal wieder her. Die analytische Empfindlichkeit des PRESTO CT/NG-Tests für NG bei hoher CT-Belastung beträgt 2,5 G. Äq./Test.

Tabelle 4. Empfindlichkeit des PRESTO CT/NG-Tests für NG bei hoher Belastung mit CT (CT 21,2).

	NG C _T (Mittelwert ± SD; n = 3)	
	+ IAC + CT	+ IAC + Stromwandler + NG-Wahlschalter
2500 G.Eq/test	26.1 ± 0.2	26.2 ± 0.2
250 G.Eq/test	2 von of 3 Ct's < 40	29.0 ± 0.5
25 G.Eq/test	1 von of 3 Ct's < 40	32.4 ± 0.1
2.5 G.Eq/test	0 von of 3 Ct's < 40	36.9 ± 1.0

Präzision

Die Präzision des Assays ist in der nachstehenden Tabelle angegeben (CV %):

	Im Lauf n = 20	Innerhalb eines Tages 3 Zeitpunkte n = 3	Tag für Tag 10 Tage n = 2
NG (G.Eq/Test)			
25	1.59	0.71	1.26
250	0.84	0.76	1.28
2500	0.97	0.43	1.77

CT (IFU/Test)			
1	0.82	0.82	1.07
10	0.75	0.80	0.57
100	0.26	0.58	0.39

Wasser + IAC			
83,3 KBE	0.58	0.49	0.38

Genauigkeit

Der PRESTO CT/NG-Test für Chlamydia trachomatis und Neisseria gonorrhoeae wurde in einer klinischen Studie an zwei verschiedenen Standorten evaluiert. Insgesamt wurden 4036 Proben gesammelt, d. h. Abstriche (endovaginal, rektal, oropharyngeal) und Urinproben. Als Referenzmethode diente der Roche Amplicor CT/NG-Test.

Die Genauigkeit wurde durch Vergleich mit der Roche-Methode ermittelt. Die beiden folgenden Tabellen geben einen Gesamtüberblick.

Die nachstehende Tabelle beschreibt die Ergebnisse des Vergleichs zwischen dem Roche- und dem PRESTO-Kit für Chlamydia trachomatis. Es werden die Gesamtzahlen der positiven, negativen und gehemmten Proben angegeben.

Presto CT	Insgesamt	Roche		
		Neg	Pos	Gehemmt
Neg	3016	2965	17	34
Pos	319	16	300	3

Die folgende Tabelle beschreibt die Ergebnisse des Vergleichs zwischen dem Roche- und dem PRESTO-Kit für Neisseria gonorrhoeae. Es werden die Gesamtzahlen der positiven, negativen und gehemmten/falsch positiven Proben angegeben.

Presto NG	Insgesamt	Roche		
		Neg	Pos	Gehemmt / falsch Positiv
Neg	3226	2877		349
Pos	90	8	68	14



Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer prädiktiver Wert
(D.J. de Waaij et al. / Journal of Microbiological Methods 118 (2015) 70-74)

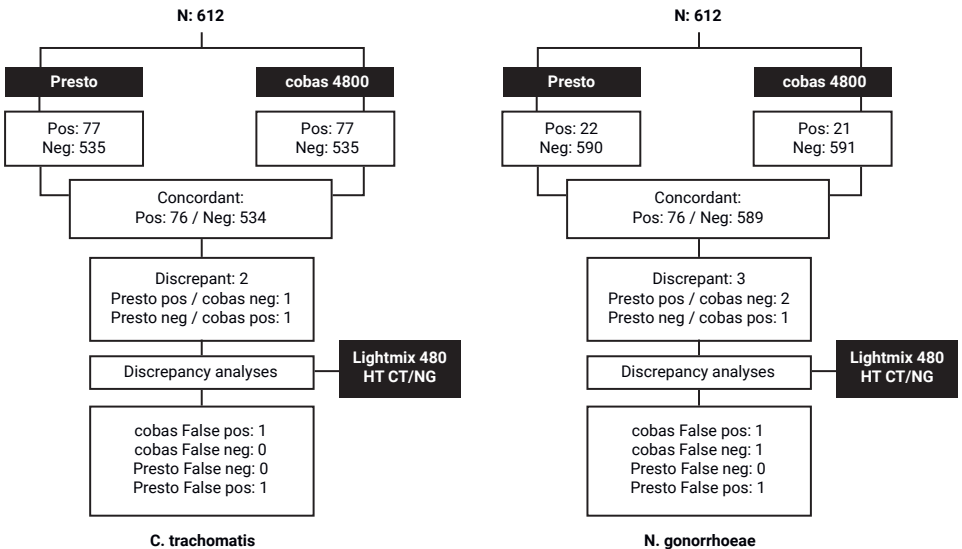


Abb. 1. Flussdiagramm der Ergebnisse der vaginalen CT und NG-Infektionen. Die 612 Proben, die mit dem PRESTO und dem cobas® 4800 getestet wurden, ergaben übereinstimmende und abweichende Ergebnisse. Der Lightmix 480 HT CT/NG Assay wurde für diskrepante Proben verwendet, und der Goldstandard wurde definiert als zwei übereinstimmende Ergebnisse zwischen dem Presto und dem cobas® 4800 Assay, oder, wenn sie nicht übereinstimmten, ein übereinstimmendes Ergebnis zwischen dem Presto oder cobas® 4800 Assay und dem Lightmix 480 HT CT/NG Assay.

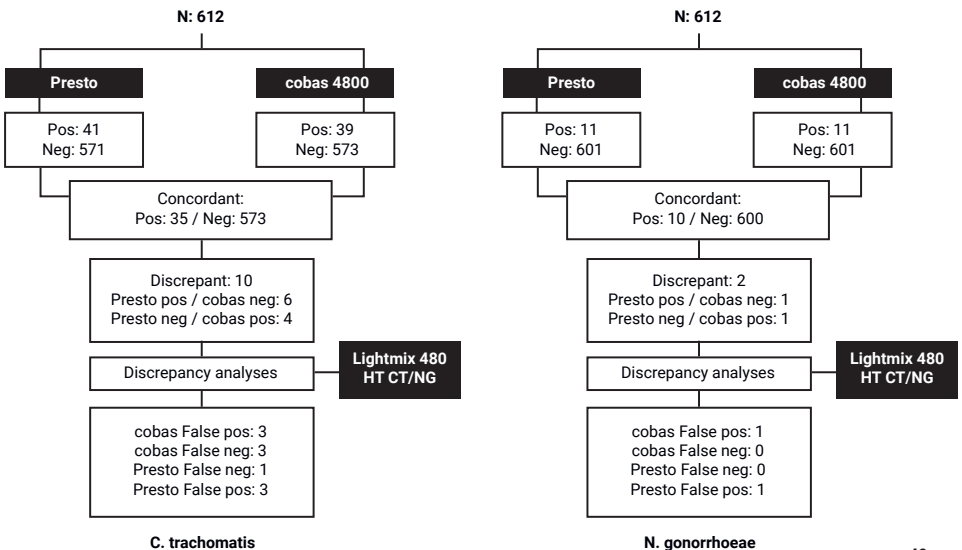


Abb. 2. Flussdiagramm der Ergebnisse der analen CT und NG-Infektionen. Die 612 Proben, die mit dem PRESTO und dem cobas® 4800 getestet wurden, ergaben übereinstimmende und abweichende Ergebnisse. Der Light Mix 480 HT CT/NG Assay wurde für diskrepante Proben verwendet, und der Goldstandard wurde definiert als zwei übereinstimmende Ergebnisse zwischen dem Presto und dem cobas® 4800 Assay, oder, wenn diese nicht übereinstimmen, ein übereinstimmendes Ergebnis zwischen dem Presto oder cobas® 4800 Assay und dem Light Mix 480 HT CT/NG Assay.

Tabelle 1
Sensitivität, Spezifität, positiver prädiktiver Wert und negativer prädiktiver Wert für VT und NG für Cobas 4800Æ gegenüber Presto.

		SENS%	95% CI	SPEC%	95% CI	PPV%	95% CI	NPV%	95% CI
Vaginal CT	Roche	100.0	99.4-100.0	99.8	99.0-100.0	98.7	97.5-99.3	100.0	99.4-100.0
	Presto	100.0	99.4-100.0	99.8	99.0-100.0	98.7	97.5-99.3	100.0	99.4-100.0
Vaginal NG	Roche	95.2*	99.3-96.7	99.8	99.1-100.0	95.2	93.2-96.7	99.8	99.1-100.0
	Presto	100.0*	99.4-100.0	99.8	99.1-100.0	95.5	93.5-96.8	100.0	99.4-100.0
Rectal CT	Roche	92.3*	89.9-94.2	99.5	98.5-99.6	92.3	89.9-94.2	99.5	98.5-99.8
	Presto	97.4*	95.9-98.4	99.5	98.5-99.9	92.7	90.3-94.5	99.8	99.1-100.0
Rectal NG	Roche	100.0	99.4-100.0	99.8	99.1-100.0	90.9	88.4-92.9	100.0	99.4-100.0
	Presto	100.0	99.4-100.0	99.8	99.1-100.0	90.1	88.4-92.9	100.0	99.4-100.0

SENS, Sensitivität; CI, Konfidenzintervall; SPEC, Spezifität; PPV, positiver prädiktiver Wert; NPV, negativer prädiktiver Wert.
Der legierte Goldstandard war ein übereinstimmendes Ergebnis zwischen dem Presto und dem cobas® 4800 Assay, oder, wenn diese nicht übereinstimmen, ein übereinstimmendes Ergebnis zwischen dem Presto oder dem cobas® 4800 Assay und dem Lightmix 480 HT CT/NG Assay. Sensitivität, Spezifität, PPV und NPV für beide Assays und beide anatomischen Stellen wurden anhand des legierten Goldstandards berechnet.

1 Probe Unterschied in der Sensitivitätsanalyse.
* 2 Proben Unterschied in den Sensitivitätsanalysen.

Störende Substanzen

Das Vorhandensein von PCR-Inhibitoren kann zu falsch negativen Ergebnissen führen. Um zu prüfen, ob die IAC die Hemmung angemessen überwacht, wurde ein µl der folgenden Substanzen zusammen mit der IAC in einer Konzentration von 83,3 KBE/µl pro Test zur PCR hinzugefügt.

EDTA (0,5M)
 ETOH 96%
 DMSO 4 % (v/v)
 HCl (1N)
 Kieselgelperlen (1 µl)
 Blut (1 µl)
 Ureum (40 g/100ml)
 Bilirubin (20 µM/L und 120 µM/L)
 Vitamin C (56 µM/L)
 Lysepuffer
 Ciprofloxacin-Hydrochlorid-1-H2 O (Handelsname: Ciproxin) (2 mg/ml)
 Vibramycin (20 mg/ml)
 Metronidazol (5 mg/ml)

EDTA, HCl, Bilirubin (120 µM/L) und Lysepuffer hemmten die IAC-Amplifikation vollständig, diese Substanzen wurden nicht weiter getestet. In Anwesenheit von Ethanol 96%, DMSO, Kiesel säurekügelchen, Blut, Harnstoff, Bilirubin (20 µM/L), Vitamin C, Ciprofloxacinhydrochlorid-1- H2 O, Vibramycin und Metronidazol war das IAC-Signal weiterhin vorhanden. Diese Substanzen wurden in Gegenwart von CT und NG erneut getestet. Die CT Werte für CT und NG in Anwesenheit dieser nicht hemmenden Substanzen lagen alle innerhalb von 1 CT von dem CT Wert von CT und NG in Anwesenheit von Wasser. Die CT- und NG-Verstärkung wurde also durch diese Substanzen nicht gehemmt. Die Daten zeigen, dass die IAC die Hemmung gut überwacht.



10. Referenzen

1. Morre SA, Welte R, Postma MJ. Wesentliche Verbesserungen der Kosteneffizienz des Screenings von Frauen auf Chlamydia trachomatis unter Verwendung gepoolter Urinproben und Hochleistungstests. Sex Transm.Infect. **2002**;**78**:74-5.
2. DiDomenico N, Link H, Knobel R, Caratsch T, Weschler W, Loewy ZG et al. COBAS AMPLICOR: vollautomatisches RNA- und DNA-Amplifikations- und Detektionssystem für die diagnostische Routine-PCR. Clin.Chem. **1996**;**42**:1915-23.
3. Roosendaal R, Walboomers JM, Veltman OR, Melgers I, Burger C, Bleker OP et al. Comparison of different primer sets for detection of Chlamydia trachomatis by the polymerase chain reaction. J.Med.Microbiol. **1993**;**38**:426-33.
4. Morre SA, van Valkengoed IG, Moes RM, Boeke AJ, Meijer CJ, Van Den Brule AJ. Bestimmung der Prävalenz von Chlamydia trachomatis in einer asymptomatischen Screening-Population: Leistung der LCx- und COBAS Amplicor-Tests mit Urinproben. J.Clin.Microbiol. **1999**;**37**:3092-6.
5. Eickhoff M, Laue T, Ruckes T, Cramer SO, Krupp G, Tiemann C. Ultra-rapid detection of Chlamydia trachomatis by real time PCR in the LightCycler using SYBR green technology or 5'-nuclease probes. Clin.Lab **2003**;**49**:217-25.
6. Jalal H, Stephen H, Curran MD, Burton J, Bradley M, Carne C. Development and Validation of a Rotor-Gene real time PCR Assay for Detection, Identification, and Quantification of Chlamydia trachomatis in a Single Reaction. J.Clin.Microbiol. **2006**;**44**:206-13.
7. Koenig MG, Kosha SL, Doty BL, Heath DG. Direkter Vergleich des BD ProbeTec ET Systems mit hauseigenen LightCycler PCR-Assays zum Nachweis von Chlamydia trachomatis und Neisseria gonorrhoeae aus klinischen Proben. J.Clin.Microbiol. **2004**;**42**:5751-6.
8. van Doornum GJ, Guldemeester J, Osterhaus AD, Niesters HG. Diagnose von Herpesvirus-Infektionen durch Echtzeit-Amplifikation und Schnellkultur. J.Clin.Microbiol. **2003**;**41**:576-80.
9. Comparison of GMT presto assay and Roche cobas® 4800 CT/NG assay for detection of Chlamydia Trachomatis and Neisseria Gonorrhoeae in dry swabs", Journal of Microbiological Methods 118 (2015) 70-74

11. Verfügbarkeit

Technische Unterstützung finden Sie unter den Katalognummern:

Bausatznummer GM CG 160500

Bausatznummer GM CG 160100

Hersteller: Goffin Molecular Technologies B.V.
Vijzelweg 18a
5145 NK Waalwijk
Die Niederlande
Tel: +31 (0) 85 004 54 79
info@goffinmt.com
KvK: 2012 8601 0000

GARANTIE

Goffin Molecular Technologies garantiert, dass dieses Produkt die auf dem Etikett und in der Literatur beschriebenen Leistungen erbringt, wenn es in Übereinstimmung mit allen Anweisungen verwendet wird. Goffin Molecular Technologies LEHNT JEDE STILLSCHWEIGENDE GARANTIE DER VERKEHRSFÄHIGKEIT ODER DER EIGNUNG FÜR EINEN BESTIMMTEN ZWECK AB, und in keinem Fall ist Goffin Molecular Technologies für Folgeschäden haftbar. Ersatz des Produkts oder Rückerstattung des Kaufpreises ist das einzige Rechtsmittel des Käufers.

DER KAUF DIESES PRODUKTS GEWÄHRT DEM KÄUFER DAS RECHT, ES IM RAHMEN BESTIMMTER ROCHE-PATENTE AUSSCHLIESSLICH FÜR DIE ERBRINGUNG VON IN-VITRO-DIAGNOSTISCHEN DIENSTLEISTUNGEN AM MENSCHEN ZU VERWENDEN. NEBEN DIESEM SPEZIFISCHEN NUTZUNGSRECHT AUS DEM KAUF WIRD HIERMIT KEINE ALLGEMEINE PATENT- ODER SONSTIGE LIZENZ JEGLICHER ART GEWÄHRT.

DISCLAIMER:

Warenzeichen und Lizenzen:

ABI Prism® ist ein eingetragenes Warenzeichen der Applera Corporation oder ihrer Tochtergesellschaften in den USA und/oder bestimmten anderen Ländern. FAM, VIC und ROX sind Marken der Applera Corporation oder ihrer Tochtergesellschaften in den USA und bestimmten anderen Ländern.
Eingetragene Namen, Warenzeichen usw., die in diesem Dokument verwendet werden, auch wenn sie nicht ausdrücklich als solche gekennzeichnet sind, sind nicht als gesetzlich ungeschützt zu betrachten.

Die Sequenzen von *Neisseria gonorrhoeae* und *Chlamydia trachomatis* und das Prinzip der Isolations-Amplifikationskontrolle sind lizenziert unter den Patenten WO2006014109; WO2008097082; JP2008508875.

Für weitere Informationen besuchen Sie bitte www.goffinmt.com

LISTE DER ABKÜRZUNGEN

Ct	Zyklus-Schwelle
CT	Chlamydia Trachomatis
IAC	Isolationsverstärkungssteuerung
NG	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

LISTE DER SYMBOLE, DIE BEI DER KENNZEICHNUNG VERWENDET WERDEN



CE nummer



Verwendbar bis



Nur für die In-vitro-Diagnostik geeignet.



Nicht über -20 °C lagern



Katalognummer



Inhalt ausreichend für 500 Untersuchungen



Chargennummer



Inhalt ausreichend für 100 Untersuchungen



Hersteller



Gebrauchsanweisung beachten
oder elektronischen Anweisungen folgen



Test Presto combiné qualitatif en temps réel CT/NG

Conforme à la directive 98/79/CE du Parlement européen et de la Conseil
du 27 octobre 1998 relatif aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro.

Pour un usage de diagnostic in vitro uniquement

Mode d’emploi

Test d’amplification de l’ADN en temps réel combiné Chlamydia trachomatis-Neisseria gonorrhoeae.
 Test d’amplification de l’ADN en temps réel pour la détection qualitative in vitro de l’ADN de Chlamydia trachomatis (CT)
 et de Neisseria gonorrhoeae (NG) dans les échantillons d’urine, d’écouvillon urétral et d’écouvillon endocervical.

Numéro de catalogue: CG 160100, 4 x 25 tests
Numéro de catalogue: CG 160500, 5 x 100 tests

Stocker à -20°C dès réception

Contenu

1.	Utilisation prévue	55
2.	Résumé et explication du test	55
3.	Principe de la procédure d’essai	55
4.	Réactifs	56
	4.1 Composants de chaque kit de test CT/NG	
	4.2 Matériel et instruments supplémentaires requis	
	4.3 Préparation et stockage des réactifs	
	4.4 Indications chimiques ou physiques d’instabilité	
5.	Collecte et préparation des échantillons	58
6.	Procédure de test Presto CT/NG	59
	6.1 Préparation des réactifs	
	6.2 Procédure	
	6.2 Notes de procédure	
7.	Interprétation des résultats	61
8.	Limites de la procédure	62
9.	Caractéristiques des performances	63
10.	Références	68
11.	Disponibilité	68



1. Utilisation prévue

Le kit de test Presto Chlamydia trachomatis (CT)- Neisseria gonorrhoeae (NG) de Goffin Molecular Technologies est destiné à être utilisé pour la détection qualitative in vitro de l'ADN plasmidique de Chlamydia trachomatis et de l'ADN chromosomique de Neisseria gonorrhoeae dans l'urine, les prélèvements urétraux et les prélèvements endocervicaux d'origine humaine.

L'utilisateur prévu sera un laboratoire de diagnostic moléculaire spécialisé. Le test sera effectué par du personnel de laboratoire formé. Aucune formation spéciale ne sera nécessaire pour les laboratoires de routine effectuant la PCR quantitative.

2. Résumé et explication du test

Chlamydia trachomatis est une bactérie gram-négative intracellulaire obligatoire. Quinze sérovars différents sont connus, dont huit (D-K) provoquant des infections urogénitales. L'infection chez les femmes est souvent asymptomatique, et les infections non traitées peuvent évoluer vers une endométrite, une salpingite et une infertilité. Le dépistage des infections asymptomatiques est indiqué pour réduire la transmission de la CT et prévenir le développement de complications graves.¹

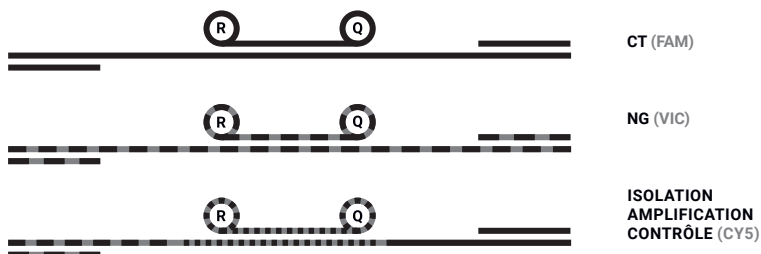
Neisseria gonorrhoeae est responsable de la deuxième maladie sexuellement transmissible la plus répandue après Chlamydia trachomatis. L'infection chez les femmes est souvent asymptomatique, ce qui augmente le risque de transmission. Les infections non diagnostiquées à long terme peuvent évoluer vers une maladie inflammatoire pelvienne, des douleurs pelviennes chroniques, une grossesse extra-utérine, une conjonctivite néonatale, et l'infertilité. La détection précoce de l'infection est indiquée pour réduire la transmission et les complications graves qui en découlent.²

La PCR en temps réel s'est révélée être un outil de diagnostic sensible et facile à utiliser pour de nombreux micro-organismes et constitue une technique standard pour détecter les CT/NG. On sait que certains échantillons cliniques contiennent des substances inhibitrices spécifiques mais inconnues, qui ne sont pas toujours éliminées de manière fiable lors de la préparation des échantillons. Un contrôle d'amplification de l'isolation/inhibition spécifiquement conçu est introduit pour reconnaître l'isolation inefficace de l'ADN et/ou l'inhibition de la PCR dans chaque échantillon clinique individuel.

La combinaison de la PCR en temps réel avec l'ajout d'un contrôle d'amplification de l'isolement, qui contrôle à la fois l'inhibition et l'extraction des acides nucléiques des échantillons cliniques, génère le meilleur des deux mondes. Le kit Presto CT/NG offre cette combinaison et garantit une interprétation correcte en évitant les faux négatifs et en produisant de vrais signaux positifs avec une sensibilité et une spécificité élevées. Le format en temps réel du kit réduit le risque de contamination par des amplicons. En outre, la souche variante suédoise de Chlamydia trachomatis sera détectée avec succès. Enfin, une autre caractéristique unique est introduite dans le kit Presto. Pour éviter les résultats négatifs en cas de double infection par une bactérie importante (hautement positive), des sélecteurs CT et NG sont disponibles. Ces sélecteurs permettent de détecter une faible charge d'une cible en combinaison avec une charge élevée de l'autre cible dans le même échantillon.

3. Principe de la procédure d'essai

La détection de l'ADN de Chlamydia trachomatis (CT) et de Neisseria gonorrhoeae (NG) par la réaction en chaîne par polymérase (PCR) est basée sur l'amplification d'une partie de l'ADN du plasmide cryptique de CT et des gènes opa de NG à l'aide d'oligonucléotides spécifiques. Les produits de la PCR sont détectés par des sondes internes, chacune liée à un colorant rapporteur fluorescent différent ("R"). La fluorescence du rapporteur est éteinte par un groupe quencher ("Q") lié à la même sonde. Pendant la formation du produit PCR, la sonde est dégradée et la fluorescence du rapporteur n'est plus éteinte et peut être détectée en temps réel. Une bactérie témoin d'isolement et d'amplification est ajoutée avant l'isolement et l'amplification d'un spécimen clinique. Cette bactérie témoin contient un fragment d'ADN avec le site de reconnaissance de l'amorce inverse pour CT et le site de reconnaissance de l'amorce avant pour NG. La séquence amplifiée entre les amorces est cependant différente des fragments CT/NG. Elle est détectée par une séquence sonde avec un colorant rapporteur différent. La fluorescence du colorant rapporteur IAC peut être utilisée pour contrôler l'efficacité de l'isolement et de l'amplification.



SÉLECTEURS

L'introduction des sélecteurs introduit un nouveau concept de détection en temps réel des infections doubles.

Le kit comprend un sélecteur CT et un sélecteur NG. Ces sélecteurs sont destinés à sélectionner le CT ou le NG dans un échantillon clinique fortement positif (IAC négatif) pour le NG ou le CT, évitant ainsi le risque d'une double infection faussement négative. L'utilisation de sélecteurs est conseillée lorsqu'un échantillon est positif pour le CT ou le NG. La fonction du sélecteur rétablit le signal IAC de sorte que même les signaux positifs faibles pour CT ou NG peuvent être détectés en présence de charges élevées d'ADN NG ou CT, respectivement. À cette fin, la même fraction d'ADN isolée peut être utilisée dans une PCR ultérieure en ajoutant le sélecteur de son choix avant l'amplification. Pour les échantillons fortement positifs en CT, le sélecteur NG doit être ajouté et pour les échantillons fortement positifs en NG, le sélecteur CT doit être ajouté avant l'amplification (voir le protocole pour les volumes).

4. Réactifs

Tous les échantillons cliniques doivent être considérés comme infectieux. Ces échantillons doivent être manipulés au niveau de biosécurité 2, comme recommandé pour tout spécimen potentiellement infectieux dans le manuel du Centre for Disease Control/National Institutes of Health intitulé "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 1984.

Portez des gants de protection

Utilisez des embouts de pipette stériles résistant aux aérosols.

Un flux de travail unidirectionnel doit être respecté dans le laboratoire, avec différentes salles pour la préparation des échantillons, la zone de pré-amplification et la post-amplification.

REMARQUE: Les réactifs de ce test contiennent de l'azide de sodium comme conservateur (0,05%). L'azide de sodium peut réagir avec la plomberie en plomb et en cuivre pour former des azides métalliques hautement explosifs. Lors de l'élimination, rincer les canalisations avec de grandes quantités d'eau froide pour éviter l'accumulation d'azide.

4.1.1 Composants de chaque kit Presto CT/NG CG 160100, 4 x 25 essais/kit

1. Mélange PCR CT/NG MASTER MIX (CG301001)

4 tubes avec un code couleur noir, étiquetés "MASTER MIX" contenant 400 µl de mélange PCR prêt à l'emploi. Ce mélange contient quatre amorces pour l'amplification de l'ADN CT, de l'ADN NG et de l'ADN témoin d'amplification d'isolement. Il contient trois sondes fluorescentes pour la détection de l'ADN CT, de l'ADN NG et de l'ADN de contrôle respectivement. Le mélange maître contient tous les ingrédients nécessaires à l'amplification par PCR, y compris l'ADN polymérase.

2. Contrôle d'amplification de l'isolement CT/NG Contrôle d'amplification de l'isolement (CG301003)

4 tubes avec un code de couleur rouge, étiquetés "Isolation Amplification Control" contenant 150 µl Isolation Amplification Control. Le contrôle d'amplification d'isolement consiste en un *E. coli* inactivé modifié avec un fragment d'ADN génomique contenant des sites de liaison d'amorces identiques aux séquences de *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae*, mais avec une séquence de sonde intermédiaire différente.

NOTE: remettre en suspension avant utilisation.



3. **CT Contrôle positif Contrôle positif CT (CG301005)**
4 tubes avec un code couleur bleu, étiquetés "Positive Control CT" contenant 55 µl de contrôle positif.
Le contrôle positif est constitué d'ADN CT à 4 IFU/ 10 µl.
4. **NG Contrôle positif Contrôle positif NG (CG301006)**
4 tubes avec un code couleur vert, étiquetés "Positive Control NG" contenant 55 µl de contrôle positif.
Le contrôle positif consiste en de l'ADN NG à 100 CFU/ 10 µl.
5. **CT/NG Negative Control Negative Control (CG301014)**
2 tubes avec un code couleur transparent, étiquetés "Negative Control" contenant 500 µl de contrôle négatif.
6. **Sélecteur de CT SÉLECTEUR DE CT (CG301008)**
1 tube avec un code couleur violet, étiqueté "CT SELECTOR" contenant 50 µl de CT selector à utiliser avec des échantillons positifs NG élevés pour la détection d'une co-infection CT faiblement positive..
7. **Sélecteur NG SÉLECTEUR NG (CG301007)**
1 tube avec un code couleur jaune, étiqueté "NG SELECTOR" contenant 50 µl de NG selector à utiliser avec des échantillons positifs à CT élevé pour la détection d'une co-infection NG faiblement positive.

REMARQUE: utilisez tous les composants du même numéro de lot du kit.

4.1.2 Composants de chaque kit Presto CT/NG CG 160500, 5 x 100 essais/kit

1. **Mélange PCR CT/NG MASTER MIX (CG301015)**
5 tubes avec un code couleur noir, étiquetés "MASTER MIX" contenant 1600 µl de mélange PCR prêt à l'emploi.
Ce mélange contient quatre amorces pour l'amplification de l'ADN CT, de l'ADN NG et de l'ADN témoin d'amplification d'isolement. Il contient trois sondes fluorescentes pour la détection de l'ADN CT, de l'ADN NG et de l'ADN de contrôle respectivement. Le mélange maître contient tous les ingrédients nécessaires à l'amplification par PCR, y compris l'ADN polymérase.
2. **Contrôle d'amplification de l'isolement CT/NG Contrôle d'amplification de l'isolement (CG301016)**
5 tubes avec un code couleur rouge, étiquetés "Isolation Amplification Control" contenant 750 µl de Isolation Amplification Control. Le contrôle d'amplification d'isolement consiste en un E. coli inactivé modifié avec un fragment d'ADN génomique contenant des sites de liaison d'amorces identiques aux séquences de C. trachomatis et N. gonorrhoeae, mais avec une séquence de sonde intermédiaire différente. **NOTE:** remettre en suspension avant utilisation.
3. **CT Contrôle positif Contrôle positif CT (CG301017)**
4 tubes avec un code couleur bleu, étiquetés "Positive Control CT" contenant 300 µl de contrôle positif.
Le contrôle positif est constitué d'ADN CT à 4 IFU/ 10 µl.
4. **NG Contrôle positif Contrôle positif NG (CG301018)**
4 tubes avec un code couleur vert, étiquetés "Positive Control NG" contenant 300 µl de contrôle positif.
Le contrôle positif consiste en de l'ADN NG à 100 CFU/ 10 µl.
5. **CT/NG Negative Control Negative Control (CG301014)**
2 tubes avec un code couleur transparent, étiquetés "Negative Control" contenant 500 µl de contrôle négatif.
6. **Sélecteur de CT SÉLECTEUR DE CT (CG301008)**
1 tube avec un code couleur violet, étiqueté "CT SELECTOR" contenant 50 µl de CT selector à utiliser avec des échantillons positifs NG élevés pour la détection d'une co-infection CT faiblement positive.
7. **Sélecteur NG SÉLECTEUR NG (CG301007)**
1 tube avec un code couleur jaune, étiqueté "NG SELECTOR" contenant 50 µl de NG selector à utiliser avec des échantillons positifs à CT élevé pour la détection d'une co-infection NG faiblement positive.

REMARQUE: utilisez tous les composants du même numéro de lot du kit.

4.2 Matériel et instruments supplémentaires requis

Le test peut être utilisé avec des réactifs de lyse standard à base d'iso-thiocyanate de guanidine et des dispositifs de capture à billes magnétiques pour l'isolement de l'ADN.

L'amplification par PCR peut être effectuée avec n'importe quel appareil de PCR en temps réel capable de détecter les fluorophores FAM, VIC, ROX et Cy5 : De légères variations des valeurs limites peuvent toutefois se produire en raison de différences dans l'isolement de l'ADN et/ou la détection de l'amplification PCR selon l'appareil utilisé. Dans ces cas, une nouvelle valeur seuil peut être déterminée sans perte de sensibilité et de spécificité.

Note : Aucun logiciel spécifique n'est requis pour le calcul du signal ROX. Le signal ROX est inclus pour rendre le test applicable aux instruments ABI 7500 (et tout autre instrument qui nécessite le ROX). Les logiciels de tous les autres instruments de PCR en temps réel peuvent utiliser le kit Presto sans limitations (par exemple, les LightCyclers).

Utilisez des produits jetables stériles en polypropylène sans DNase pour toutes les étapes de la procédure.

4.3 Préparation et stockage des réactifs

1. **CT/NG PCR mix MASTER MIX** Décongeler le tube avant de l'ouvrir. Le flacon ouvert ne peut être recongelé et décongelé à nouveau que deux fois. Remarque : mélanger et essorer dans une courte centrifugation de 3 secondes avant utilisation.
2. **CT/NG Isolation Amplification Contrôle Isolation Amplification Contrôle** Dégeler le tube avant de l'ouvrir. Le flacon ouvert ne peut être recongelé et décongelé à nouveau que deux fois. Remarque : mélanger et essorer dans une courte centrifugation de 3 secondes avant utilisation.
3. **CT Contrôle positif Contrôle positif CT** Décongeler le tube avant de l'ouvrir. Le flacon ouvert ne peut être recongelé et décongelé à nouveau que deux fois. Remarque : mélanger et essorer dans une courte centrifugation de 3 secondes avant utilisation.
4. **NG Contrôle positif Contrôle positif NG** Décongeler le tube avant de l'ouvrir. Le flacon ouvert ne peut être recongelé et décongelé à nouveau que deux fois. Remarque : mélanger et essorer dans une courte centrifugation de 3 secondes avant utilisation.
5. **Contrôle négatif Contrôle négatif** Décongeler le tube avant de l'ouvrir. Le flacon ouvert ne peut être recongelé et décongelé à nouveau que deux fois. Remarque : mélanger et essorer dans une courte centrifugation de 3 secondes avant utilisation.
6. **CT Selector CT SELECTOR** Décongeler le tube avant de l'ouvrir. Le flacon ouvert peut être recongelé et décongelé à nouveau deux fois seulement. Remarque : mélanger et essorer dans un court laps de temps 3 centrifugation de quelques secondes avant utilisation.
7. **SÉLECTEUR NG SÉLECTEUR NG** Décongeler le tube avant de l'ouvrir. Un flacon ouvert ne peut être recongelé et décongelé à nouveau que deux fois. Remarque : mélanger et essorer dans un court laps de temps. centrifugation de quelques secondes avant utilisation.

Conservez tous les composants à -20 °C.

Tous les composants sont sensibles à la température. Décongelez uniquement les composants qui vont être utilisés.

Les composants peuvent être recongelés deux fois. Conserver les réactifs du kit à 2 - 8 °C (sur de la glace) lorsqu'ils sont utilisés. Conservez les composants à 2 - 8 °C pendant 4 jours maximum.

4.4 Indications chimiques ou physiques d'instabilité

Une altération de l'aspect physique des matériaux du kit de test peut indiquer une instabilité ou une détérioration.

Les dates de péremption figurant sur les étiquettes des composants indiquent la date au-delà de laquelle les composants ne doivent pas être utilisés.

5. Collecte et préparation des échantillons

Le kit Presto CT/NG est destiné à être utilisé sur des échantillons endocervicaux et urétraux prélevés par écouvillon et des échantillons d'urine. Les dispositifs de prélèvement généraux peuvent être utilisés pour les procédures standard d'isolement de l'ADN conformément aux protocoles du fabricant.



Exemple d'échantillon d'écouvillon

1. Prélever des échantillons par écouvillonnage endocervical et urétral et les conserver dans 2-5 ml de milieu de transport 2SP.
2. N'utilisez que des dispositifs d'écouvillonnage validés. N'utilisez pas d'écouvillons en bois ou en aluminium pour la détection moléculaire.
3. Conservez les écouvillons dans le milieu de transport. Réfrigérez (2 - 8 °C) ou congelez les échantillons d'écouvillons qui ne seront pas traités immédiatement. Les spécimens peuvent être conservés pendant 7 jours à 2 - 8 °C.

Exemple d'échantillon d'urine

LE PATIENT NE DOIT PAS AVOIR URINÉ DANS LES 2 HEURES PRÉCÉDANT LE PRÉLÈVEMENT DE L'ÉCHANTILLON.

1. Recueillir 10 à 30 ml d'urine de première prise dans un récipient en polypropylène propre et sans conservateur.
2. Suivez les procédures de collecte et de transport du laboratoire. Réfrigérez (2-8 °C) les échantillons d'urine qui ne seront pas traités immédiatement.

Préparation de l'échantillon

Cette procédure doit être effectuée dans la zone de préparation des échantillons dans une enceinte de sécurité biologique de classe 2 (protection de l'utilisateur et du matériel).

ADN Spécimen isolé:

Ce kit a été validé avec l'utilisation d'échantillons d'acides nucléiques extraits au moyen de BioMérieux NucliSENS® easyMAG™. Veuillez suivre les instructions du fabricant pour une description des caractéristiques du système, des protocoles d'isolement et des directives opérationnelles.

Ecouvillons : 200 µl d'échantillon vortexé + 5 µl de CAI resuspendu + 2 ml de tampon de lyse easyMAG et élution dans 60 µl dont 10 µl sont utilisés dans la PCR CT/NG.

Urine : 500 µl d'urine vortexée + 5 µl d'IAC resuspendu + 2 ml de lyse et d'élution easyMAG dans 60 µl dont 10 µl sont utilisés dans la PCR CT/NG.

6. Procédure de test du kit de test Presto CT/NG

Cette procédure doit être effectuée dans la zone de préparation à la préamplification. Utilisez des embouts à barrière anti-aérosols pendant toute la procédure de test..

6.1 Préparation des réactifs

Décongelez les mélanges nécessaires et conservez-les à 2-8°C.

6.2 Procédure

1. Préparez le nombre requis de tubes ou de puits de réaction pour le nombre d'échantillons à mesurer, plus deux tubes pour les contrôles positifs, un tube pour le contrôle d'isolement négatif et un tube pour le contrôle négatif.
2. Ajoutez 15 µl du master mix à chaque réaction à mesurer.
3. Vortexer et essorer tous les extraits d'ADN. Ouvrez délicatement les récipients d'échantillons un par un et évitez de contaminer les gants et la pipette. À l'aide d'une nouvelle pointe à barrière aérosol pour chaque extrait, ajoutez 10 µl d'ADN (chapitre 5) dans le tube/puits de réaction contenant le mélange maître. Remplacez les gants si vous soupçonnez une contamination.
4. À l'aide d'une nouvelle pointe à barrière aérosol, ajoutez 10 µl de chaque contrôle positif dans les tubes/puits de réaction désignés contenant le mélange maître. Ouvrir soigneusement le récipient et éviter la contamination des gants et de la pipette. Remplacez les gants si vous soupçonnez une contamination.

5. À l'aide d'une nouvelle pointe à barrière aérosol, ajoutez 10 µl du contrôle négatif Negative Control dans le tube/puits de réaction désigné contenant le master mix.
6. Fermez les tubes de réaction ou scellez la plaque, faites tourner et déplacez la plaque vers la zone d'amplification.
7. Chargez les tubes/plaques de réaction dans le système ABI PRISM® 7500 SDS*. Programmer le système PCR avec les paramètres suivants:

Seuil fixe :	0.01
Activation de la polymérase:	30 secondes 95 °C
Nombre de cycles :	40 cycles
Dénaturation:	3 secondes 95°C
Recuit, extension et activité exonucléasique:	30 secondes 60°C
Réglages manuels de la ligne de base	

* Pour le LightCycler480 II de Roche, choisissez le format de détection "3 Colour Hydrolysis Probe", lorsqu'un autre format est utilisé, il est probable qu'une compensation des couleurs doit être effectuée une fois conformément au protocole du fabricant.

UTILISATION DES SÉLECTEURS

En cas de signal positif avec CT ou NG avec Ct/p <21 (par exemple 14-21), la PCR doit être répétée avec 1 µl de l'un ou l'autre des sélecteurs et 9 µl d'ADN isolé : pour les échantillons positifs CT, utiliser le sélecteur NG ; pour les échantillons positifs NG, utiliser le sélecteur CT. Les conditions d'amplification sont celles décrites ci-dessus. En ajoutant le sélecteur, un nouveau signal n'apparaîtra qu'en cas de double infection. Le signal de la MST primaire détectée est toujours plus fort que celui de la MST secondaire identifiée. Un signal faible pour la cible primaire positive peut toujours être présent. Dans une étude portant sur 12 254 échantillons prélevés dans un dispensaire pour MST, près de 50 % de plus de doubles infections ont été détectées. Cependant, étant donné que seulement 2,1 % de doubles infections ont été détectées parmi tous les CT/NG positifs après l'utilisation de sélecteurs, on peut également utiliser les sélecteurs uniquement dans le cas de patients à haut risque comme les hommes ayant des rapports sexuels avec des hommes (HSH) et les échangistes. Cela permettra de réduire le nombre de tests répétés nécessaires.

6.3 Notes de procédure

1. Utilisez un flux de travail unidirectionnel dans le laboratoire.

Zone de préparation des échantillons: Zone dédiée à la préparation des échantillons. Tout le matériel (équipement, fournitures, protection, gants, etc.) doit être affecté à cette zone. Le matériel de cette zone ne peut pas être déplacé vers la zone de pré-amplification.

Zone de pré-amplification: Zone dédiée à la préparation des réactifs. Tout le matériel (équipement, fournitures, protection, gants, etc.) doit être dédié à cette zone.

Zone d'amplification: Zone dédiée à l'amplification. Tout le matériel (équipement, fournitures, protection, gants, etc.) doit être affecté à cette zone. Le matériel de cette zone ne peut pas être déplacé vers la zone de préamplification, ni vers la zone de préparation des échantillons.

2. Utilisez toujours des embouts résistants aux aérosols.
3. Soyez extrêmement prudent lors de la manipulation des matériaux pour éviter toute contamination. Mélangez et essorez toujours les réactifs et les échantillons avant de les ouvrir. En cas de suspicion de contamination, jetez les matériaux.
4. Jetez tous les réactifs consommés à la fin de la procédure, conformément à la réglementation locale sur les déchets biologiques dangereux.
5. Pour obtenir des résultats fiables, il est essentiel de recourir à des techniques d'analyse rigoureuses et de respecter strictement les instructions figurant dans les instructions de test.
6. Les échantillons dont les résultats sont équivoques doivent être vérifiés en répétant les tests ou en les isolant.
7. Ne pas regrouper les réactifs de différents lots.
8. Si le kit est endommagé à la réception, veuillez contacter votre distributeur local et/ou Goffin Molecular Technologies BV.

7. Interprétation des résultats

Les colorants suivants sont utilisés pour les différentes cibles:

Cible	Teinture
CT	FAM
NG	VIC
IC	CY5

Pour les séries valides (contrôle positif et négatif valide - voir contrôle de qualité), interprétez les résultats de l'échantillon comme suit:

C _T Echantillon	C _T Interne Contrôle	Interprétation
> 40	≤ 37	ADN de C. trachomatis et/ou N. gonorrhoeae non détecté. Cela n'indique pas nécessairement l'absence d'une infection par C. trachomatis et/ou N. gonorrhoeae, car cela dépend du prélèvement correct de l'échantillon.
≤ 35 for CT ou NG	ANY	ADN de C. trachomatis ou de N. gonorrhoeae détecté.* En fonction du signal ADN de C. trachomatis ou ADN de N. gonorrhoeae présent. Pour évaluer la présence de l'autre pathogène, la PCR peut être répétée avec 1 µl de l'un ou l'autre des sélecteurs (voir § 6.2, Utilisation des sélecteurs). CT positif : utiliser le sélecteur NG ; NG positif : utiliser le sélecteur CT. Le signal IAC confirmera le bon fonctionnement du sélecteur et l'absence d'inhibition. En cas de double infection, un signal supplémentaire pour l'autre cible sera visible.
≤ 35 for CT et le NG	ANY	ADN de C. trachomatis et N. gonorrhoeae détecté.*
> 40	> 37	Spécimen inhibiteur. Aucun diagnostic ne peut être établi. Traitez à nouveau le spécimen original ou traitez un nouveau spécimen collecté.
> 35, < 40	< 40	Equivoque. Aucune conclusion ne peut être tirée en ce qui concerne l'ADN de C. trachomatis et/ou de N. gonorrhoeae. Lorsque l'ADN détecté peut être confirmé par une analyse répétée, le spécimen peut être considéré comme un ADN de C. trachomatis et/ou de N. gonorrhoeae détecté.

* La détection d'ADN peut indiquer une infection par CT et/ou NG mais l'échantillon peut contenir de l'ADN cible, sans la présence d'organismes vivants.

Contrôle de la qualité

Deux contrôles positifs et un contrôle négatif sont fournis dans chaque kit à des fins de contrôle de la qualité. Des contrôles supplémentaires peuvent être analysés en plus de ceux fournis. Les méthodes statistiques établies pour analyser les valeurs et les tendances des contrôles doivent être utilisées.

Si les contrôles ne sont pas conformes aux limites établies et que la répétition exclut les erreurs de technique, vérifiez les domaines suivants :

1. Date de péremption sur l'emballage des réactifs et les réactifs préparés
2. Température des réactifs
3. Paramètres Système PCR
4. Contamination

Si les contrôles ne sont toujours pas valides, veuillez contacter le service clientèle de Goffin Molecular Technologies ou votre distributeur local.

Contrôle négatif

Le CT du contrôle négatif doit être >40 . Si la CT est inférieure, l'ensemble de l'essai est invalide et la procédure de test doit être répétée.

Contrôle positif CT

Le CT du contrôle positif CT doit être ≤ 37 . Si le CT est en dehors de cette plage, l'ensemble de l'essai n'est pas valide et la procédure de test doit être répétée.

Contrôle positif NG

Le CT du contrôle NG positif doit être ≤ 37 . Si le CT est en dehors de cette plage, l'ensemble de l'essai n'est pas valide et la procédure de test doit être répétée.

Isolation Amplification Contrôle

Le CT du contrôle d'amplification de l'isolement doit être ≤ 37 . Si le CT est > 37 , l'échantillon n'est pas valide et doit être répété.

Contrôle d'isolement négatif

Pour chaque série d'isolement, il faut analyser un contrôle négatif d'isolement auquel on ajoute l'IAC. Le CT de l'IAC du contrôle négatif doit être ≤ 37 . Pour CT et NG, le CT doit être > 40 . Si le CT est inférieur, tous les spécimens sont invalides et la procédure de test doit être répétée.

8. Limites de la procédure

1. N'utilisez que des échantillons d'écouvillon endocervical, d'écouvillon urétral et d'urine. Les autres types d'échantillons n'ont pas été validés et peuvent donner des résultats faussement positifs ou faussement négatifs.
2. Le prélèvement, le transport et le stockage des échantillons peuvent affecter le nombre d'organismes présents dans l'échantillon, entraînant un résultat faussement positif ou faussement négatif.
3. De bonnes pratiques de laboratoire et le strict respect de ces instructions de test sont indispensables pour éviter la contamination des réactifs et/ou des échantillons.
4. Le C. trachomatis sans plasmide n'est pas détecté.
5. L'utilisateur doit avoir suivi une formation en laboratoire sur les techniques de PCR ou avoir acquis une expérience appropriée dans le domaine des techniques de PCR.



9. Caractéristiques de performance

Spécificité analytique

La spécificité analytique du test PRESTO CT/NG a été testée contre 37 bactéries, 5 levures, 1 protozoaire et 4 souches virales qui peuvent être isolées du tractus urogénital. Chaque isolat a été testé à une concentration d'au moins 104 copies/test en l'absence et en présence de CT (CT environ 30) ou de NG (mélange équimolaire de 2 souches NG distinctes ; CT environ 30). Tous les organismes testés (énumérés ci-dessous), y compris 11 espèces de *Neisseria* non *N. gonorrhoeae*, ont donné des résultats négatifs au test PRESTO CT/NG et n'ont présenté aucune interférence avec la détection du CT et du NG.

<i>Actinomyces israelii</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Morganella morganii</i>
<i>Branhamella catarrhalis</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
<i>Chlamydomyxa pneumoniae</i>	<i>Neisseria cinerea</i>
<i>Chlamydomyxa psittaci</i>	<i>Neisseria elongata</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Neisseria flavescens</i>
<i>Candida glabrata</i>	<i>Neisseria lactamica</i>
<i>Candida krusei</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>
<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Neisseria mucosa</i>
<i>Candida tropicalis</i>	<i>Neisseria perflava</i>
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Neisseria polysaccharea</i>
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Neisseria sicca</i>
<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Neisseria subflava</i>
<i>Cytomégalo virus</i>	<i>Neisseria denitrificans</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Espèce Peptostreptococcus</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Virus d'Epstein-Barr</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Herpès simplex virus 1</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Herpès simplex virus 2</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i>
Espèces de <i>Lactobacillus</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>

Sensibilité analytique

La limite de détection (LD) du test PRESTO CT/NG pour *Chlamydia trachomatis* et *Neisseria gonorrhoeae* a été déterminée en utilisant des cultures mères quantifiées (comptage microscopique pour CT, ADN quantifié pour NG). 20 réplicats ont été testés aux concentrations de 0,02, 0,01 et 0,005 IFU/μl de CT et à 1,0, 0,5 et 0,25 G.Eq./μl de NG. Les 20 réplics de CT ont été testées positives à 0,02 IFU/μl et 0,01 IFU/μl (Tableau 1). Les 20 réplics de NG ont été testées positives aux trois concentrations (Tableau 2). La limite de détection du test PRESTO CT/NG est de 0,1 IFU/test pour le CT et de 2,5 G.Eq./test pour le NG.

Tableau 1. Détermination de la limite de détection du test PRESTO CT/NG pour le CT.

Concentration CT	C _T (moyenne ± SD; n = 20)
0.2 IFU/test	34.46 ± 0.42
0.1 IFU/test	36.16 ± 1.05
0.05 IFU/test	18/20 C _T < 40

Tableau 2. Détermination de la limite de détection du test PRESTO CT/NG pour le GN.

Concentration NG	Cr (moyenne $\pm$ SD; n = 20)	
	Souche NG 1	Souche NG 2
10 G. Eq./test	33,5 $\pm$ 0.5	34,8 $\pm$ 0.3
5 G. Eq./test	34.6 $\pm$ 0.4	35,7 $\pm$ 0.5
2.5 G. Eq./test	35,7 $\pm$ 0.7	36,8 $\pm$ 0.9

Pour les infections doubles : Pour déterminer la limite de détection de CT en présence d'une charge élevée de NG, 100 IFU, 10 IFU, 1 IFU et 0,1 IFU de CT par test ont été analysés en présence d'une charge élevée de NG (mélange équimolaire de 2 souches distinctes de NG ; Ct < 22) avec et sans le sélecteur pour CT. Les tests ont été effectués en triplicata. Lorsque la CT était présente en quantités < 100 IFU/test, la charge élevée de NG (Ct 21,7) a diminué ou masqué le signal de la CT (tableau 3). L'ajout du sélecteur de CT a rétabli le signal CT. La sensibilité analytique du test PRESTO CT/NG pour Chlamydia trachomatis en présence d'une forte charge de NG est de 0,1 IFU/test.

Tableau 3. Sensibilité du test PRESTO CT/NG pour le CT en présence d'une charge élevée de NG (CT 21.7)

	CT Cr (moyenne $\pm$ SD; n = 3)	
	+ IAC + NG	+ IAC + NG + sélecteur CT
100 IFU/test	24.56 $\pm$ 0.19	24.50 $\pm$ 0.05
10 IFU/test	28.69 $\pm$ 0.46	27.75 $\pm$ 0.14
1 IFU/test	0 sur 3 Ct's < 40	31.70 $\pm$ 0.28
0.1 IFU/test	0 sur 3 Ct's < 40	36.04 $\pm$ 0.46

Pour déterminer la limite de détection du NG en présence d'une charge élevée de CT, 2500 G.Eq., 250 G.Eq., 25 G.Eq. et 2,5 G.Eq. de NG (mélange équimolaire de 2 souches distinctes de NG) par test ont été analysés en présence d'une charge élevée de CT (Ct < 22) avec et sans le sélecteur pour NG. Les tests ont été effectués en triplicata. Lorsque le NG était présent en quantités < 2500 G. Eq./test, la charge élevée de CT (CT 21,2) a diminué ou masqué le signal du NG (Tableau 4). L'ajout du sélecteur de NG a rétabli le signal NG. La sensibilité analytique du test PRESTO CT/NG pour le NG en présence d'une charge élevée de CT est de 2,5 G. Eq./test.

Tableau 4. Sensibilité du test PRESTO CT/NG pour le NG en présence d'une charge élevée de CT (CT 21,2).

	NG Cr (moyenne $\pm$ SD; n = 3)	
	+ IAC + CT	+ IAC + CT + Sélecteur NG
2500 G.Eq/test	26.1 $\pm$ 0.2	26.2 $\pm$ 0.2
250 G.Eq/test	2 sur 3 Ct's < 40	29.0 $\pm$ 0.5
25 G.Eq/test	1 sur 3 Ct's < 40	32.4 $\pm$ 0.1
2.5 G.Eq/test	0 sur 3 Ct's < 40	36.9 $\pm$ 1.0

Précision

La précision de l'essai est indiquée dans le tableau ci-dessous (CV %):

	Dans le cadre d'une course n = 20	Dans la journée 3 points dans le temps n = 3	Au jour le jour 10 jours n = 2
NG (G.Eq/Test)			
25	1.59	0.71	1.26
250	0.84	0.76	1.28
2500	0.97	0.43	1.77

CT (IFU/Test)			
1	0.82	0.82	1.07
10	0.75	0.80	0.57
100	0.26	0.58	0.39

Eau + IAC			
83,3 CFU	0.58	0.49	0.38

Précision

Le test PRESTO CT/NG pour Chlamydia trachomatis et Neisseria gonorrhoeae a été évalué dans le cadre d'une étude clinique menée sur deux sites différents. Au total, 4036 échantillons ont été collectés, à savoir des écouvillons (endovaginaux, rectaux, oropharyngés) et des échantillons d'urine. La méthode de référence est le test Roche Amplicor CT/NG.

La précision a été déterminée par comparaison avec la méthode Roche. Les deux tableaux ci-dessous donnent une vue d'ensemble. Le tableau ci-dessous décrit les résultats de la comparaison entre le kit Roche et le kit PRESTO pour Chlamydia trachomatis. Les nombres totaux sont indiqués, les échantillons positifs, négatifs et inhibés.

Presto CT	Total	Roche		
		Négatif	Pos	Inhibé
Négatif	3016	2965	17	34
Pos	319	16	300	3

Table below describes the results for the comparison of the Roche with the PRESTO kit for Neisseria gonorrhoeae. Total numbers are shown, those samples positive, negative, and inhibited / false positive.

Presto NG	Total	Roche		
		Négatif	Pos	Inhibé / faux Positif
Négatif	3226	2877		349
Pos	90	8	68	14

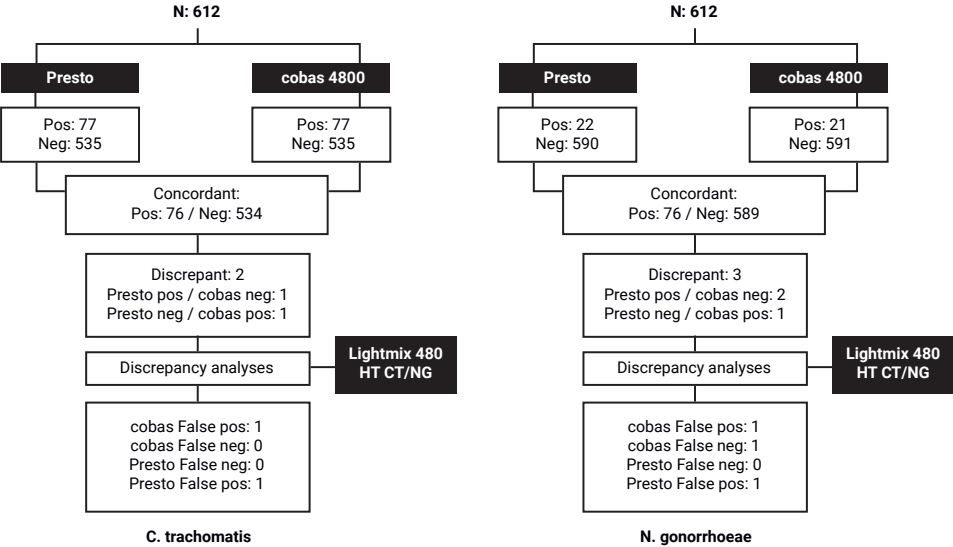


Fig. 1. Organigramme des résultats de la TDM vaginale et des infections à GN. Les 612 échantillons testés avec le PRESTO et le cobas® 4800 ont donné des résultats concordants et discordants. Le test Lightmix 480 HT CT/NG a été utilisé pour les échantillons discordants et l'étalon-or a été défini comme deux résultats concordants entre le test Presto et le test cobas® 4800 ou, s'ils ne concordait pas, un résultat concordant entre le test Presto ou cobas® 4800 et le test Lightmix 480 HT CT/NG.

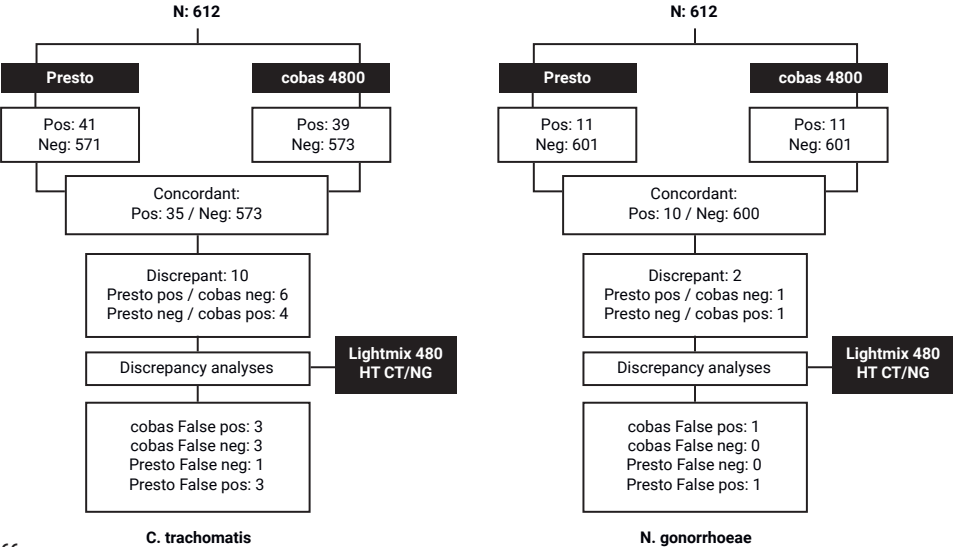


Fig. 2. Organigramme des résultats de la TDM anale et des infections à GN. Les 612 échantillons testés avec le PRESTO et le cobas® 4800 ont donné des résultats concordants et discordants. Le test Light Mix 480 HT CT/NG a été utilisé pour les échantillons discordants et l'étalon-or a été défini comme deux résultats concordants entre le test Presto et le test Cobas 4800.Æ ou, s'ils ne concordait pas, un résultat concordant entre le test Presto ou cobas® 4800 et le test Light Mix 480 HT CT/NG.

Tableau 1

Sensibilité, spécificité, valeur prédictive positive et valeur prédictive négative pour VT et NG pour cobas® 4800 par rapport à Presto. SENS, sensibilité ; CI, intervalle de confiance ; SPEC, spécificité ; PPV, valeur prédictive positive ; NPV, valeur prédictive négative.

		SENS%	95% CI	SPEC%	95% CI	PPV%	95% CI	NPV%	95% CI
Vaginal CT	Roche	100.0	99.4-100.0	99.8	99.0-100.0	98.7	97.5-99.3	100.0	99.4-100.0
	Presto	100.0	99.4-100.0	99.8	99.0-100.0	98.7	97.5-99.3	100.0	99.4-100.0
Vaginal NG	Roche	95.2*	99.3-96.7	99.8	99.1-100.0	95.2	93.2-96.7	99.8	99.1-100.0
	Presto	100.0*	99.4-100.0	99.8	99.1-100.0	95.5	93.5-96.8	100.0	99.4-100.0
Rectal CT	Roche	92.3*	89.9-94.2	99.5	98.5-99.6	92.3	89.9-94.2	99.5	98.5-99.8
	Presto	97.4*	95.9-98.4	99.5	98.5-99.9	92.7	90.3-94.5	99.8	99.1-100.0
Rectal NG	Roche	100.0	99.4-100.0	99.8	99.1-100.0	90.9	88.4-92.9	100.0	99.4-100.0
	Presto	100.0	99.4-100.0	99.8	99.1-100.0	90.1	88.4-92.9	100.0	99.4-100.0

L'étalon-or allié était un résultat concordant entre le test Presto et le test cobas® 4800 ou, s'ils ne concordait pas, un résultat concordant entre le test Presto ou le test cobas® 4800 et le test Lightmix 480 HT CT/NG. La sensibilité, la spécificité, la VPP et la VPN pour les deux dosages et les deux sites anatomiques ont été calculées en utilisant l'étalon-or allié.

1 échantillon de différence dans l'analyse de sensibilité.

* 2 Différence d'échantillon dans les analyses de sensibilité.

Substances interférentes

La présence d'inhibiteurs de la PCR peut entraîner des résultats faussement négatifs. Pour vérifier si la CAI contrôle correctement l'inhibition, un µl des substances suivantes a été ajouté à la PCR avec la CAI à la concentration de 83,3 CFU/µl par test.

EDTA (0,5M)
 ETOH 96%
 DMSO 4 % (v/v)
 HCl (1N)
 Billes de silice (1 µl)
 Sang (1 µl)
 Ureum (40 g/100ml)
 Bilirubine (20 µM/L et 120 µM/L)
 Vitamine C (56 µM/L)
 Tampon de lyse
 Chlorhydrate de ciprofloxacine-1-H₂O (nom commercial : Ciproxin) (2 mg/ml)
 Vibramycine (20 mg/ml)
 Métronidazol (5 mg/ml)

L'EDTA, le HCl, la bilirubine (120 µM/L) et le tampon de lyse ont complètement inhibé l'amplification IAC, ces substances n'ont pas été testées plus avant. En présence d'éthanol 96%, de DMSO, de billes de silice, de sang, d'urée, de bilirubine (20 µM/L), de vitamine C, de chlorhydrate de ciprofloxacine-1-H₂O, de vibramycine et de métronidazol, le signal IAC était toujours présent. Ces substances ont été testées à nouveau en présence de CT et de NG. Les valeurs de CT pour CT et NG en présence de ces substances non inhibitrices étaient toutes à moins de 1 CT de la valeur de CT de CT et NG en présence d'eau. Ainsi, l'amplification du CT et du NG n'était pas inhibée par ces substances. Ces données montrent que la CAI contrôle bien l'inhibition.

10. Références

1. Morre SA, Welte R, Postma MJ. Major improvements in cost effectiveness of screening women for Chlamydia trachomatis using pooled urine specimens and high performance testing. *Sex Transm.Infect.* **2002**;**78**:74-5.
2. DiDomenico N, Link H, Knobel R, Caratsch T, Weschler W, Loewy ZG et al. COBAS AMPLICOR : système entièrement automatisé d'amplification et de détection de l'ARN et de l'ADN pour le diagnostic de routine par PCR. *Clin.Chem.* **1996**;**42**:1915-23.
3. Roosendaal R, Walboomers JM, Veltman OR, Melgers I, Burger C, Bleker OP et al. Comparaison de différents ensembles d'amorces pour la détection de Chlamydia trachomatis par la réaction en chaîne par polymérase. *J.Med.Microbiol.* **1993**;**38**:426-33.
4. Morre SA, van Valkengoed IG, Moes RM, Boeke AJ, Meijer CJ, Van Den Brule AJ. Détermination de la prévalence de Chlamydia trachomatis dans une population de dépistage asymptomatique : performances des tests LCx et COBAS Amplicor avec des échantillons d'urine. *J.Clin.Microbiol.* **1999**;**37**:3092-6.
5. Eickhoff M, Laue T, Ruckes T, Cramer SO, Krupp G, Tiemann C. Ultra-rapide detection of Chlamydia trachomatis by real time PCR in the LightCycler using SYBR green technology or 5'-nuclease probes. *Clin.Lab* **2003**;**49**:217-25.
6. Jalal H, Stephen H, Curran MD, Burton J, Bradley M, Carne C. Development and Validation of a Rotor-Gene real time PCR Assay for Detection, Identification, and Quantification of Chlamydia trachomatis in a Single Reaction. *J.Clin.Microbiol.* **2006**;**44**:206-13.
7. Koenig MG, Kosha SL, Doty BL, Heath DG. Direct comparison of the BD ProbeTec ET system with in-house LightCycler PCR assays for detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae from clinical specimens. *J.Clin.Microbiol.* **2004**;**42**:5751-6.
8. van Doornum GJ, Guldemeester J, Osterhaus AD, Niesters HG. Diagnostic des infections à herpèsvirus par amplification en temps réel et culture rapide. *J.Clin.Microbiol.* **2003**;**41**:576-80.
9. Comparaison du test presto GMT et du test Roche cobas® 4800 CT/NG pour la détection de Chlamydia Trachomatis et Neisseria Gonorrhoeae dans les écouvillons secs", *Journal of Microbiological Methods* 118 (2015) 70-74.

11. Disponibilité

Pour une assistance technique, veuillez vous référer aux numéros de catalogue :

Kit # GM CG 160500

Kit # GM CG 160100

Fabricant: Goffin Molecular Technologies B.V.
Vijzelweg 18a
5145 NK Waalwijk
Les Pays-Bas
Tel: +31 (0) 85 004 54 79
info@goffinmt.com
KvK: 2012 8601 0000

GARANTIE

Ce produit est garanti pour fonctionner comme décrit dans son étiquetage et dans la littérature de Goffin Molecular Technologies lorsqu'il est utilisé conformément à toutes les instructions. Goffin Molecular Technologies décline toute garantie implicite de qualité marchande ou d'adéquation à un usage particulier, et en aucun cas Goffin Molecular Technologies ne sera responsable des dommages indirects. Le remplacement du produit ou le remboursement du prix d'achat est le recours exclusif de l'acheteur.

L'ACHAT DE CE PRODUIT DONNE A L'ACHETEUR LE DROIT, EN VERTU DE CERTAINS BREVETS DE ROCHE, DE L'UTILISER UNIQUEMENT POUR FOURNIR DES SERVICES DE DIAGNOSTIC IN VITRO CHEZ L'HOMME. AUCUN BREVET GÉNÉRAL OU AUTRE LICENCE DE QUELQUE NATURE QUE CE SOIT AUTRE QUE CE DROIT D'UTILISATION SPÉCIFIQUE À L'ACHAT N'EST ACCORDÉ PAR LA PRÉSENTE.

CLAUSE DE NON-RESPONSABILITÉ:

Marques et licences:

ABI Prism® est une marque déposée d'Applied Biosystems Corporation ou de ses filiales aux États-Unis et/ou dans certains autres pays. FAM, VIC et ROX sont des marques commerciales d'Applied Biosystems Corporation ou de ses filiales aux États-Unis et dans certains autres pays. Les noms déposés, les marques commerciales, etc., utilisés dans ce document, même s'ils ne sont pas spécifiquement marqués comme tels, ne doivent pas être considérés comme non protégés par la loi.

Les séquences de *Neisseria gonorrhoeae* et de *Chlamydia trachomatis* ainsi que le principe du contrôle d'amplification de l'isolement font l'objet de licences sous les brevets WO2006014109 ; WO2008097082 ; JP2008508875.

Pour de plus amples informations, veuillez consulter le site www.goffinmt.com

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Ct	Seuil de cycle
CT	Chlamydia Trachomatis
IAC	Contrôle de l'amplification de l'isolement
NG	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
PCR	Réaction en chaîne par polymérase

LISTE DES SYMBOLES UTILISÉS DANS L'ÉTIQUETAGE



CE number



Date limite d'utilisation



Pour un usage de diagnostic in vitro uniquement.



Ne pas stocker au dessus de -20°C



Numéro de catalogue



Contient suffisamment pour 500 tests



Code de lot



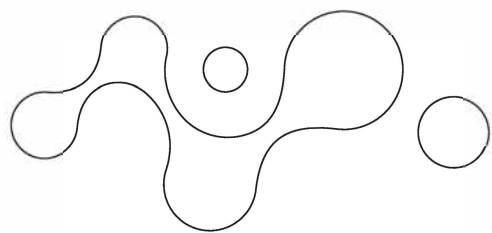
Contient suffisamment pour 100 tests



Fabricant



Consulter le mode d'emploi ou consulter le mode d'emploi électronique





Goffin Molecular Technologies

Taking Technology Personally.



Go in Molecular Technologies B.V. | Vijzelweg 18a | 5145NK Waalwijk | The Netherlands



+31(0) 85 004 54 79



info@goffinmt.com



goffinmolartechologies.com