Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD
Gruppe-B-Streptokokken Real-time PCR Kit, IVD

REF MD04941, 96 Reaktionen

Nur für den professionellen Gebrauch in der* In-vitro-*Diagnostik

CE IVD

DE

Gebrauchsanweisung

MD0494_IM_de

VERSION 2401, Januar 2024

NZYtech genes & enzymes
Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar - Edifício E, R/C, 1649-038 Lisboa, Portugal
Tel.: +351.213643514 Fax: +351.217151168
www.nzytech.com

Inhalt

1. Einleitung ... 3
2. Bestimmungsgemäße Verwendung ... 3
3. Grundsätze des Testverfahrens ... 3
4. Kit-Zusammensetzung ... 3
5. Lagerungs-, Stabilitäts- und Handhabungsbedingungen ... 4
6. Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien und Instrumente ... 4
7. Probenentnahme und -vorbereitung ... 4
8. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise ... 4
   8.1. Sicherheitshinweise ... 4
   8.2. Handhabung und verfahrenstechnische Anforderungen ... 4
9. Prüfverfahren ... 5
   9.1. Vorbereitung der Reaktion ... 5
   9.2. Programmierung des Echtzeit-PCR-Geräts ... 5
10. Datenanalyse ... 6
   10.1. Kriterien für die Laufvalidierung ... 6
   10.2. Interpretation der Testergebnisse ... 6
11. Bewertung der Leistung ... 7
   11.1. Erwartete Ergebnisse ... 7
   11.2. Nachweisgrenze (LoD) - Analytische Sensitivität ... 7
   11.3. Analytische Spezifität ... 8
   11.3.1 Kreuzreaktivität (Ausschluss) und Spezifität ... 8
   11.3.2 Mikrobielle Interferenzstudien ... 8
   11.3.3 Störende Substanzen ... 8
   11.4 Präzision ... 9
   11.4.1. Wiederholbarkeit ... 10
   11.4.2. Tägliche Reproduzierbarkeit ... 10
   11.4.3. Reproduzierbarkeit von Charge zu Charge ... 10
   11.4.4. Reproduzierbarkeit durch den Bediener ... 10
   11.4.5. Reproduzierbarkeit zwischen den Instrumenten ... 10
   11.5 Klinische Bewertung ... 10
12. Qualitätskontrolle ... 11
13. Technische Unterstützung ... 11
14. Markenzeichen und Haftungsausschlüsse ... 11
15. Erläuterung von Symbolen ... 11
16. Konformitätserklärung ... 12
17. Referenzen ... 13

1. Einleitung

Streptococcus agalactiae, auch bekannt als *Streptococcus* der Gruppe B (GBS), ist der Erreger, der die schwersten bakteriellen Infektionen bei Neugeborenen verursacht. Dieses Bakterium besiedelt bei 10 bis 40% der schwangeren Frauen den Magen-Darm-Trakt und den unteren Genitaltrakt, und es besteht die Gefahr, dass sich das Baby während der Geburt infiziert. Eine GBS-Infektion bei Neugeborenen kann zu Sepsis, Lungenentzündung und Meningitis führen. Um einer GBS-Infektion bei Neugeborenen vorzubeugen, werden schwangere Frauen spät in der Schwangerschaft (zwischen der 35. und 37. Schwangerschaftswoche) routinemäßig auf GBS getestet. Ein positiver Test auf GBS erfordert die Verabreichung von Antibiotika während der Geburt, um das Risiko einer Infektion des Babys zu verringern. Frauen, die Frühgeburten zur Welt bringen, haben jedoch in der Regel nicht die Möglichkeit, sich auf GBS untersuchen zu lassen, so dass das Vorhandensein dieses Bakteriums während der Geburt nicht kontrolliert ist. Daher besteht in diesen Fällen ein erhöhtes Risiko für schwere Infektionen bei Neugeborenen, was zur Verabreichung von Antibiotika während der Geburt führt und mit dem Auftreten resistenter Bakterienstämme in Verbindung gebracht wird. Jüngste Studien haben gezeigt, dass bis zu zwei Drittel der Neugeborenen, die eine frühe GBS-Septikämie entwickelten, von Müttern geboren wurden, deren pränatales Screening mit routinemäßigen mikrobiologischen Kulturmethoden ergab, dass sie GBS-negativ waren. Obwohl die mikrobiologische Kultur als Standardmethode für den Nachweis von GBS gilt, weist sie Einschränkungen auf, die mit ihrer geringen Empfindlichkeit und der Dauer von bis zu 72 Stunden bis zum Ergebnis zusammenhängen. Der Echtzeit-PCR-Test stellt eine schnelle, leistungsfähige und robuste Methode dar, mit der sich das Vorhandensein von *Streptococcus* der Gruppe B nachweisen lässt.

2. Bestimmungsgemäße Verwendung

Das Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, von NZYtech ist ein molekularer Test, der auf der Echtzeit-PCR-Technologie basiert und für den schnellen Nachweis und die qualitative Diagnose spezifischer GBS-Nukleinsäuren aus vaginalen und/oder perianalen Abstrichen bestimmt ist, die in einem Transport Kit mit Liquid Amies gesammelt wurden. Dieser Test ist für den Nachweis einer GBS-Kolonisierung bei Frauen im Wochenbett bestimmt. Es gibt keine Kontraindikationen für die Verwendung des Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, von NZYtech Die Tests müssen von spezialisierten und qualifizierten Labortechnikern durchgeführt werden, die insbesondere Erfahrung mit der Echtzeit-PCR-Technik und der molekularen *In-vitro*-Diagnostik haben. Das Kit sollte nur wie in dieser Gebrauchsanweisung angegeben verwendet werden.

3. Grundsätze des Testverfahrens

Das Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, von NZYtech bietet den Satz von Reagenzien, Enzymen und Oligonukleotiden (Primer und Sonden) für den qualitativen Nachweis des GBS-Genoms mittels Echtzeit-PCR (siehe Anforderungen an die Ausrüstung in **Abschnitt 6**). Die Zielsequenz des Kits wurde zuvor als ein guter genetischer Marker für GBS identifiziert. Das Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, von NZYtech wurde so konzipiert, dass es ein breites Nachweisprofil aufweist und dennoch spezifisch für den GBS-Nachweis ist. Darüber hinaus wurde der Oligonukleotidsatz speziell für den Nachweis dieses Organismus entwickelt und weist keine signifikante Homologie mit anderen Genomen auf, was die hohe Spezifität und Nachweisempfindlichkeit des Tests widerspiegelt. Daher wurde das Kit so konzipiert, dass es spezifisch für GBS ist und den Nachweis anderer Organismen, die ähnliche Infektionen verursachen, vermeidet. Die im Kit enthaltene interne Kontrolle validiert die Wirksamkeit des Extraktionsverfahrens sowie die Abwesenheit von PCR-Inhibitoren, die möglicherweise in den menschlichen biologischen Proben vorhanden sind. In regelmäßigen Abständen überprüft NZYtech die GBS-Zielgensequenz und kann bei Bedarf eine neue Version dieses Kit anbieten. Zusätzlich enthält das Kit zwei externe Kontrollen (eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle), wie unten beschrieben. Die Positivkontrolle besteht aus einem Nukleinsäurefragment, das die mit dem Kit nachgewiesene Zielsequenz enthält.

In diesem Kit basiert die qualitative Bestimmung der DNA auf der Echtzeit-PCR-Technologie, einer Referenzmethode in der Labordiagnostik. Es handelt sich dabei um eine hochempfindliche und spezifische Methode, mit der das Vorhandensein dieses Organismus genau nachgewiesen werden kann. Das Prinzip des Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, von NZYtech besteht in der Verwendung von durch ein Extraktionssystem isolierter und gereinigter DNA, um das Vorhandensein von bakterieller DNA nachzuweisen. Die extrahierte DNA wird in einer einzigen Reaktion einer PCR-Amplifikation unterzogen, wobei eine Reihe hochspezifischer Primer-Sonden-Sets verwendet wird, die das TaqMan®-Prinzip nutzen. In Anwesenheit von GBS-DNA bindet die TaqMan®-Sonde spezifisch an konservierte Regionen des spezifischen GBS-Gens, das von einem spezifischen Primerpaar flankiert wird. Ein zweites Primer-/Sondenpaar dient als interne Kontrolle, die das menschliche β-Actin-Gen (ACTB) nachweist. Der Nachweis der internen Kontrolle bestätigt die Wirksamkeit des Extraktionsverfahrens und ermöglicht auch die Bestätigung, ob die PCR-Reaktion durch das Vorhandensein von Inhibitoren in den klinischen Proben beeinträchtigt wurde oder nicht. Um die Amplifikation der beiden spezifischen Ziele in einer einzigen Reaktion identifizieren zu können, werden spezifische Sonden für GBS und für menschliches β-Aktin unterschiedlich mit FAM™ und HEX™ Reporterfarbstoffen markiert. Somit besteht dieses Kit aus einem Duplex-Assay, bei dem das GBS-Ziel im optischen Kanal FAM und das menschliche Zielgen im optischen Kanal VIC nachgewiesen wird (siehe **Abschnitt 9.2**). Diese Oligonukleotide/Sondensätze werden in optimierten Konzentrationen bereitgestellt, um sicherzustellen, dass menschliche DNA, selbst wenn sie in extrem hohen Konzentrationen vorhanden ist, die Effizienz der GBS-Primer-/Sondensätze nicht einschränkt.

4. Kit-Zusammensetzung

Das Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, von NZYtech bietet einen umfassenden Satz von Reagenzien, die ausreichen, um 96 Real-time PCR-Reaktionen in einem einzigen Schritt durchzuführen.

BESTANDTEILE DES KITS		**VOLUMEN** (PRO FLÄSCHCHEN)	**ANZAHL DER RÖHRCHEN**	**FARBE DES DECKELS**
GBS MMix	NZYSupreme qPCR Probe Master Mix (2x)	1050 µL	1	Neutral
GBS PPMix	GBS/ACTB Primer- & Sondenmischung (10x)	205 µL	1	Braun
GBS POS	GBS/ACTB-Positivkontrolle	105 µL	1	Rot
NTC	No-Template Control (Kontrolle ohne Vorlage)	105 µL	1	Neutral

5. Lagerungs-, Stabilitäts- und Handhabungsbedingungen

Das Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, von NZYtech wird gekühlt versandt. Alle Komponenten sollten sofort nach Ankunft bei -85 °C bis -15 °C gelagert werden. Bei Verwendung sollten die Kit-Komponenten sofort nach Gebrauch in den Gefrierschrank zurückgelegt werden, um die Zeit in Raumtemperatur-Umgebung zu minimieren. Außerdem sollte Folgendes beachtet werden:

- Die Anzahl der Gefrier-/Auftauzyklen durch Lagerung in Arbeitsaliquots minimieren. Gegebenenfalls können die Kit-Komponenten nach dem Auftauen in kleineren Volumina aliquotiert werden. Das Kit ist über mindestens 6 Gefrier-/Auftauzyklen stabil.
- Die GBS PPMix-Komponente sollte vor Licht geschützt gelagert werden. Insbesondere GBS MMix nach der Kombination mit GBS PPMix nicht direkter Sonneneinstrahlung aussetzen.
- Sollte die Verpackung, die das Kit schützt, beschädigt ankommen, kontaktieren Sie bitte NZYtech.
- Achten Sie auf das auf der Verpackung angegebene Verfallsdatum. NZYtech rät davon ab, das Kit nach Ablauf des Verfallsdatums zu verwenden. Nach Ablauf des Verfallsdatums muss das Kit gemäß den Anweisungen in **Abschnitt 8.2** entsorgt werden.

6. Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien und Instrumente

- Echtzeit-PCR-Instrument zum Nachweis von FAM™ und VIC™ (bei Emissionswellenlängen von 520 bzw. 556 nm). Siehe in **Abschnitt 11** die Gerätemodelle, für die das Kit validiert wurde
- Geräte und Verbrauchsmaterialien für die Isolierung von DNA aus biologischen/klinischen Proben.
- RNase/DNase-freie Real-time PCR-Plastikgeräte: PCR-Röhrchen, Streifen, Kappen, 96-Well-Platten und Klebefolien.
- Pipetten und Filterspitzen (RNase/DNase-frei).
- Kühlblock.
- Einweghandschuhe.
- Vortex und Zentrifuge.

7. Probenentnahme und -vorbereitung

Das Kit dient zum Nachweis von DNA, die aus vaginalen und/oder perianalen Abstrichen extrahiert wurde. Verschiedene Faktoren, wie das biologische Probenentnahmeverfahren, der Transport, die Lagerung und die Probenverarbeitungszeit sind entscheidend, um die Probenintegrität zu gewährleisten und optimale Ergebnisse zu erzielen. Vaginale und/oder perianale Proben sollten mit einem einzigartigen Abstrich (ESwab®, Copan) entnommen werden. Die Proben sollten in geeigneten Röhrchen oder Behältern dicht verschlossen, korrekt etikettiert und dann umgehend zum Labor transportiert werden. Die entnommenen Proben sollten so schnell wie möglich getestet werden. Eine unsachgemäße Probenentnahme, Handhabung und/oder unsachgemäßer Transport der Proben kann zu einem falschen Ergebnis führen. Extrahierte Nukleinsäuren bilden das Ausgangsmaterial für den Test mit dem Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, von NZYtech. NZYtech empfiehlt die Verwendung eines der folgenden Nukleinsäure-Reinigungskits auf Basis der magnetischen Bead-Technologie: NZY Mag Viral RNA/DNA Isolation Kit, IVD (MD0488, NZYtech) oder chemagic Pathogenic NA gDNA Kit H96 (PerkinElmer). Darüber hinaus kann die Extraktion von Nukleinsäuren mithilfe von Spin-Säulen auf Silicabasis durchgeführt werden, insbesondere mit dem NZY Tissue gDNA Isolation Kit (MB135, NZYtech). Diese drei Kits wurden für die Extraktion klinischer GBS-Proben und den anschließenden Nachweis mit dem Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD validiert. DNA-Extraktionsmethoden auf Silicabasis können aufgrund der manuellen Probenhandhabung anfälliger für Kontaminationen sein als automatisierte Extraktionssysteme. Bitte stellen Sie sicher, dass keine Kreuzkontaminationen aufgetreten sind und dass die DNA-Proben hinsichtlich Reinheit, Konzentration und Nukleinsäureintegrität geeignet sind. Da Ethanol ein starker Inhibitor der Echtzeit-PCR ist, ist es notwendig, diese Komponente vor der Elution von Nukleinsäuren während des Extraktionsprozesses zu eliminieren. Das Kit von NZYtech enthält eine interne Kontrolle, die auf menschliche DNA abzielt, die zusammen mit bakterieller GBS-DNA gereinigt wurde. Die menschliche DNA wird mit dem Oligonukleotidsatz (Primer und Sonde) aus dem menschlichen β-Actin-Gen amplifiziert. Die Einführung einer internen Kontrolle ist nützlich, um die Effizienz der DNA-Extraktion und -Isolierung zu bewerten und/oder um das Vorhandensein potenzieller Inhibitoren während der Probenverarbeitung nachzuweisen.

8. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise

Befolgen Sie sorgfältig die in diesem Handbuch beschriebenen Verfahren und Richtlinien, um sicherzustellen, dass der Test korrekt durchgeführt wird. Überprüfen Sie vor der Verwendung des Tests die Integrität des Produkts, insbesondere die Menge und Art der Kit-Komponenten und deren korrekte Kennzeichnung. Wie bei jedem analytischen Testverfahren ist eine gute Laborpraxis unerlässlich. Jede Abweichung von der guten Laborpraxis kann zum Versagen des Tests oder zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Jegliche Abweichung davon kann zum Versagen des Tests oder zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit des Kits muss besonders darauf geachtet werden, dass die Reagenzien und PCR-Amplifikationsmischungen frei von Verunreinigungen sind.

8.1. Sicherheitshinweise

Vor der Verwendung des Kits lesen Sie bitte das Sicherheitsdatenblatt (SDB), das auf der NZYtech-Website (www.nzytech.com) verfügbar ist. Der Nachweis mit diesem Kit sollte nur von Personal durchgeführt werden, das in den entsprechenden technischen und sicherheitstechnischen Verfahren in entsprechend ausgestatteten Laboren geschult ist. Die internationalen und nationalen Richtlinien zur biologischen Sicherheit im Labor sollten unter allen Umständen befolgt werden.

8.2. Handhabung und verfahrenstechnische Anforderungen

- Nur für den professionellen Einsatz in der *In-vitro*-Diagnostik.
- Dieses Kit darf nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Verwenden Sie die Testkomponenten nicht wenn die Versiegelung des Kits beschädigt ist.
- Reagenzien verschiedener Produktionschargen dürfen nicht ausgetauscht werden.
- Es dürfen keine Reagenzien anderer Hersteller zusammen mit Reagenzien dieses Testkits verwendet werden.
- Bei allen Verfahren sollten DNase/RNase-freie Einweg-Plastikartikel und -Pipetten verwendet werden.

- Die Probenvorbereitung, der Reaktionsaufbau und die Amplifikation sollten in verschiedenen Arbeitsbereichen durchgeführt werden. Die Reihenfolge der Aufgaben im Labor sollte unidirektional sein. Tragen Sie in jedem Bereich Einweghandschuhe und wechseln Sie diese, bevor Sie einen anderen Bereich betreten. Wenn möglich, wechseln Sie Ihren Kittel.
- Wählen Sie für jeden einzelnen Arbeitsbereich spezifische Materialien und Ausrüstungen aus und übertragen Sie diese nicht von einem Bereich in einen anderen.
- Die Extraktion von Nukleinsäuren mithilfe von Silica-Säulen kann anfälliger für Kreuzkontaminationen sein als die Extraktion mit automatisierten Extraktionssystemen.
- Verwenden Sie immer die im Kit enthaltene NTC (No-Template Control; Kontrolle ohne Vorlage).
- Biologische Proben müssen so behandelt werden, als ob sie infektiös wären, und zwar unter Beachtung der entsprechenden biologischen Sicherheitsvorkehrungen.
- Die Positivkontrolle enthält eine große Anzahl von Vorlagen. Sie sollte geöffnet und außerhalb der Testproben und Kit-Komponenten verarbeitet werden, um eine Kreuzkontamination zu vermeiden.
- Gehen Sie mit den Post-Amplifikationsplatten vorsichtig um und entsorgen Sie sie sofort nach Beendigung des Tests; die Platten sollten nach Gebrauch immer in einem geeigneten Behälter für biologische Gefahrenstoffe entsorgt werden. Öffnen Sie die Reaktionsgefäße/Platten nach der Amplifikation nicht, um eine Kontamination des Amplikons zu vermeiden.
- Reinigen Sie am Ende jedes Tests die Arbeitsflächen und Geräte mit einem DNA-/RNA-Entferner.
- Rückstände von Chemikalien und Zubereitungen gelten allgemein als gefährlicher Abfall. Die Entsorgung dieser Art von Abfall wird durch nationale und regionale Gesetze und Vorschriften geregelt.
- Alle Ergebnisse sollten von medizinischem Fachpersonal im Zusammenhang mit der Krankengeschichte und den klinischen Symptomen des Patienten interpretiert werden.
- Dieser Test kann Krankheiten, die durch andere Krankheitserreger verursacht werden, nicht ausschließen.
- Ein negatives Ergebnis bei einem PCR-Test schließt die Möglichkeit einer Infektion nicht endgültig aus.
- Befolgen Sie die gute Laborpraxis, tragen Sie Schutzkleidung, tragen Sie dauerhaft puderfreie Einweghandschuhe und verwenden Sie eine Schutzbrille und eine Maske. Essen, trinken und rauchen Sie nicht im Arbeitsbereich.

9. Prüfverfahren

Bitte lesen Sie die Gebrauchsanweisung sorgfältig durch, bevor Sie den Test durchführen. Beachten Sie, dass alle Pipettierschritte und die Platteneinrichtung gemäß guter Real-time PCR-Praktiken durchgeführt werden sollten. Nach dem Ausgießen der Platte sofort mit dem Echtzeit-PCR-Protokoll beginnen. Eine längere Inkubation von Reaktionsmischungen bei Raumtemperatur kann zu PCR-Artefakten führen, die die Nachweisempfindlichkeit verringern. Mischen Sie vor dem Experiment die mitgelieferten Reaktionsgefäße vorsichtig mit dem Finger und zentrifugieren Sie fünf Sekunden lang, um den Inhalt am Boden des Gefäßes aufzufangen. Stellen Sie die Röhrchen auf Eis. **Wir empfehlen dringend, GBS POS zuletzt zu pipettieren, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.**

9.1. Vorbereitung der Reaktion

1. Bereiten Sie eine Real-time PCR-Mischung vor, die für die Anzahl der durchzuführenden Tests ausreicht, mit einem zusätzlichen Volumen von 5% für Pipettiersverluste. Gehen Sie gemäß der folgenden Tabelle vor, die die Volumina für 1 und *n* Tests angibt (wobei *n* der Gesamtzahl der Reaktionen entspricht):

KOMPONENTE	1 TESTVOLUMEN (µL)	*n* PRÜFUNGEN* VOLUMEN + 5% (µL)
GBS MMIX **	10	*n* x 10,5
GBS PPMIX	2	*n* x 2,1
ENDVOLUMEN	**12**	***n* x 12,6**

** Um die Gesamtzahl der für jeden Test benötigten Reaktionen zu berechnen, zählen Sie die Anzahl der Proben und fügen Sie zwei weitere hinzu, um die Negativ- bzw. die Positivkontrolle aufzunehmen.*
*** Bitte beachten Sie, dass insbesondere nach mehreren Gefrier-/Auftauzyklen ein Präzipitat am Boden des Master-Mix-Röhrchens beobachtet werden kann. Um eine optimale Leistung zu gewährleisten, stellen Sie bitte sicher, dass alle Komponenten vor der Verwendung aufgetaut und resuspendiert werden. In diesem Fall darf der Master-Mix vor dem Pipettieren nicht zentrifugiert werden.*

2. Pipettieren Sie 12 µL der Real-time PCR-Mischung in die einzelnen Vertiefungen entsprechend dem Aufbau Ihrer Echtzeit-PCR-Versuchsplatte.
3. Für die Negativkontrolle geben Sie 8 µL NTC anstelle der DNA-Vorlage in die Vertiefung für die Negativkontrolle. Das Endvolumen sollte 20 µL betragen.
4. Für die biologischen Proben fügen Sie 8 µL jeder DNA-Probe in die Probenvertiefungen hinzu, entsprechend dem Aufbau Ihrer Versuchsplatte. Das Endvolumen in jeder Vertiefung sollte 20 µL betragen.
5. Für die Positivkontrolle werden 8 µL GBS POS anstelle der DNA-Vorlage in die Vertiefungen der Positivkontrolle gegeben. Das Endvolumen sollte 20 µL betragen.
6. Bedecken und versiegeln Sie die Platte mit einem geeigneten optischen Klebefilm oder mit geeigneten optischen Kappen, bevor Sie mit den Real-time PCR- und Detektionsschritten fortfahren.
7. Legen Sie die Reaktionsplatte in das Echtzeit-PCR-Gerät und führen Sie das Echtzeit-PCR-Protokoll gemäß dem folgenden Abschnitt aus.

9.2. Programmierung des Echtzeit-PCR-Geräts

Die folgende Tabelle zeigt ein Standardprotokoll, das für einige Plattformen optimiert wurde. Diese Bedingungen können jedoch angepasst und validiert werden, um für verschiedene maschinenspezifische Protokolle geeignet zu sein.

ZYKLEN	TEMPERATUR	ZEIT	SCHRITT
1	95 °C	3 min	Polymerase-Aktivierung
45	95 °C	5 s	Denaturierung
	60 °C	30 s	Anlagerung/Verlängerung*

** Je nach Real-time PCR-Gerät geeignete Detektionskanäle auswählen. Fluorogene Daten sollten während dieses Schritts über die Kanäle FAM und HEX erfasst werden.*

Die in diesem Kit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe und ihre entsprechenden Detektionskanäle sind die folgenden:

Fluoreszierende Farbstoffe & Detektionskanäle

ZIELE	FLUORESZIERENDER FARBSTOFF	DETEKTIONSKANÄLE
GBS-spezifisches Gen	FAM™	FAM
Menschliches β-Actin (ACTB) Gen	HEX™	HEX/VIC/JOE
GBS POS	FAM™ & HEX™	FAM & HEX/VIC/JOE

Dasc Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, von NZYtech wurde für die folgenden Echtzeit-PCR-Systeme validiert: Applied Biosystems™ QuantStudio 5, Applied Biosystems™ 7500 FAST, Applied Biosystems™ StepOne Plus, Roche Lightcycler® 96 Instrument, Bio-Rad® CFX Opus Real-Time PCR und Bio-Rad® CFX96 Touch Real-Time PCR. Wenn andere Geräte verwendet werden, sollte der Benutzer das Kit mit zuvor charakterisierten Proben (sowohl positiv als auch negativ) validieren.

10. Datenanalyse

10.1. Kriterien für die Laufvalidierung

Vor der Analyse der Ergebnisse empfehlen wir, das Benutzerhandbuch des jeweiligen Echtzeit-PCR-Geräts zu konsultieren. Überprüfen Sie dann, ob der Echtzeit-PCR-Test gültig ist. Prüfen Sie daher für jede Platte, ob die Ergebnisse der Positiv- und Negativkontrollen gemäß den folgenden Kriterien wie erwartet ausfallen:

Negativkontrolle (keine Vorlage-Reaktion): Es wird keine Amplifikation festgestellt. Eine Probenkontamination kann aufgetreten sein, wenn die Negativkontrolle Amplifikationskurven (FAM und HEX) mit einer sigmoidalen Form aufweist. Wiederholen Sie den Test nach guter Real-time PCR-Praxis.

Positivkontrolle: Die Amplifikationskurven der FAM (GBS) und HEX (ACTB) Kurven sind positiv. Von der Positivkontrolle wird erwartet, dass sie bei Ct < 32 in beiden Kanälen FAM und HEX amplifiziert. Wird dieses Qualitätskontrollkriterium nicht erfüllt, ist dies ein deutlicher Hinweis darauf, dass das Experiment beeinträchtigt wurde.

Wenn die Kontrollen mit den Erwartungen übereinstimmen, ist der Test **gültig**. Fahren Sie bitte mit der Auswertung der Ergebnisse für die getesteten Proben fort.
Wenn eine der Kontrollen nicht die erwartete Leistung zeigt, wurde der Test beeinträchtigt oder unsachgemäß durchgeführt und sollte als **ungültig** betrachtet werden.
Bitte wiederholen Sie den Test. Wenn das Problem weiterhin besteht, wenden Sie sich an den Hersteller.

10.2. Interpretation der Testergebnisse

Das Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, von NZYtechverwendet die folgenden Ct-Grenzwerte für die Ergebnisinterpretation

CT-WERT	INTERPRETATION DER ERGEBNISSE
Ct ≤38	Erkannt (+) → **POSITIV**
Ct >38	Nicht erkannt (-) → **NEGATIV**

GBS wird nachgewiesen, wenn die FAM-Amplifikationskurve eine sigmoidale Form mit einem Ct ≤ 38 aufweist, unabhängig davon, welches Ergebnis für den ACTB-Test (HEX) erhalten wird. Das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein eines Signals im HEX-Kanal ist für die Validität des Tests nicht von Bedeutung.

GBS wird nicht nachgewiesen, wenn die FAM-Kurve nicht amplifiziert (Ct>38), während der ACTB-Test (HEX) eine positive Sigmoidalkurve mit Ct≤45 anzeigt.

Der **Test ist ungültig**, wenn die Tests für GBS und ACTB negativ sind. Der Test sollte mit aus der Probe neu aufgereinigter Nukleinsäure wiederholt werden.

Die folgende Tabelle fasst die Interpretation der wichtigsten Ergebnisse zusammen (bewerten Sie die Gesamtform der Amplifikationskurven; **nur sigmoidale Amplifikationskurven sind ein Hinweis auf eine echte Amplifikation; +**: Amplifikationskurve erkannt; **-**: keine Amplifikationskurve).

GBS (FAM)	ACTB (HEX)	NEGATIVKONTROLLE	POSITIVKONTROLLE	INTERPRETATION DER ERGEBNISSE
+	+	-	+	**GBS → POSITIV**
+	- [1]	-	+	**GBS → POSITIV**
-	+	-	+	**GBS → NEGATIV**
-	-	-	+	**UNGÜLTIGER TEST [2]**

[1] *Eine hohe Konzentration/Beladung an nachweisbarer GBS-DNA in der Probe kann zu einem reduzierten oder fehlenden internen Kontrollsignal auf dem HEX-Kanal führen.*
[2] *Wiederholen Sie die DNA-Extraktion und führen Sie den Real-time PCR-Test erneut durch.*

Anmerkung: *Bei der Interpretation der Ergebnisse muss die Möglichkeit falsch negativer und falsch positiver Ergebnisse berücksichtigt werden.*

- Falsch negative Ergebnisse können verursacht werden durch:
  - Ungeeignete Entnahme, Handhabung und/oder Lagerung der Proben.
  - Zersetzung der Probe.
  - Vorhandensein von Real-time PCR-Inhibitoren.
  - Mutationen im Genom des pathogenen Organismus.
  - Nichteinhaltung der in diesem Handbuch beschriebenen Verfahren.
  - Verwendung eines nicht zugelassenen Extraktionskits oder einer nicht zugelassenen Echtzeit-PCR-Plattform.
- Falsch positive Ergebnisse können verursacht werden durch:
  - Kreuzkontamination mit der Positivkontrolle aufgrund ihrer ungeeigneten Handhabung.
  - Ungeeignete Handhabung von Proben, die eine hohe Konzentration von GBS-DNA enthalten. Aufgrund der hohen Anfälligkeit der Real-time PCR-Methode für Kreuzkontaminationen sollte bei der DNA-Isolierung besondere Vorsicht walten.
  - Ungeeignete Handhabung des amplifizierten Produkts (Post-Amplifikationsplatte).

Negative Ergebnisse schließen eine GBS-Infektion nicht aus, und das Testergebnis sollte nicht als alleinige Grundlage für die Behandlung oder andere Entscheidungen über das Patientenmanagement verwendet werden. Darüber hinaus kann dieser Test Krankheiten, die durch andere Erreger verursacht werden, nicht ausschließen.

11. Bewertung der Leistung

Die Leistung dieses Kits wurde für die in **Abschnitt 9.2** (siehe oben) angegebene Ausrüstung validiert. Wenn andere Geräte verwendet werden, sollte der Benutzer das Kit mit zuvor charakterisierten Proben (sowohl positiv als auch negativ) validieren.

11.1. Erwartete Ergebnisse

Ein typisches Amplifikationsdiagramm, das für eine klinische GBS-positive Probe beobachtet wurde, ist in Abbildung 1 dargestellt. In Situationen, in denen die Probe große Mengen an GBS-DNA enthält, kann die VIC-Kanalkurve, die dem humanen β-Actin-Ziel entspricht, fehlen oder eine atypische Form aufweisen.

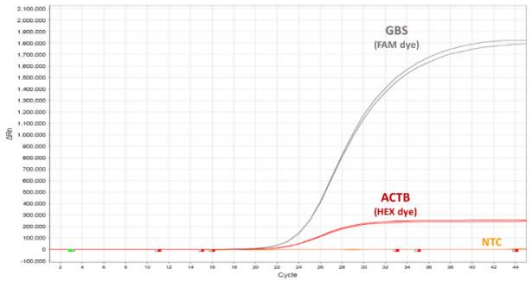

Abbildung 1. Nachweis von Zielen für GBS und humanes β-Aktin (ACTB) in einer klinisch positiven Probe. Graue Kurve: Nachweis der GBS-Zielsequenz durch den FAM-Kanal. Rote Kurve: Nachweis des humanen β-Actin-Targets (ACTB) durch den VIC-Kanal. Orange Kurve: Kontrolle ohne Vorlage (NTC).

11.2. Nachweisgrenze (LoD) - Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität wurde als die niedrigste Konzentration des Analyten definiert, die mit 95%iger Sicherheit zuverlässig nachgewiesen werden konnte. Dies wurde durch Testen von GBS-Nukleinsäuren mit unterschiedlichen Kopienzahlen, die in DNA gespickt wurden, die aus negativen vaginalen/perianalen Proben extrahiert wurde, unter Verwendung von drei verschiedenen Kit-Chargen unter Verwendung typischer Testreaktionsbedingungen bewertet. Die Tests wurden zweimal täglich über zwei Tage wiederholt, wobei 48 Wiederholungen für jede getestete Konzentration erzeugt wurden. Zusammengenommen ergaben die Daten, dass das Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, von NZYtech 5 Kopien/Reaktion oder 0,250 Kopien/µL GBS-DNA mit einer Sicherheit von ≥95% nachweist. Somit wurde die vorläufige Nachweisgrenze (LoD) für GBS auf 250 Kopien/mL festgelegt. Alle Tests wurden mit dem Applied Biosystems™ QuantStudio 5 Echtzeit-PCR-Gerät durchgeführt, und die Analyse erfolgte mit der Software des Geräts.

Das Kit LoD wurde von zwei verschiedenen Anwendern unter Verwendung von drei Kit-Chargen und drei alternativen Nukleinsäure-Isolierungsmethoden (nämlich NZY Mag Viral RNA/DNA Isolation Kit, IVD (MD0488, NZYtech), NZY Tissue gDNA Isolation Kit (MB135, NZYtech) und Chemagic Pathogenic NA gDNA Kit H96 (PerkinElmer)), in drei Experimenten mit insgesamt 48 Tests für jedes Isolationskit, neu bewertet. Die Daten zeigen, dass bei der Extraktion von Nukleinsäuren mit dem NZY Mag Viral RNA/DNA Isolation Kit, IVD (MD0488, NZYtech) oder dem

NZY Tissue gDNA Isolation Kit (MB135, NZYtech) die LoD 250 Kopien/mL beträgt, und dass bei der Extraktion von Nukleinsäuren bei Verwendung des chemagic Pathogenic NA gDNA Kit H96 (PerkinElmer) die LoD 500 Kopien/mL beträgt.

Die Fähigkeit des Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, den Erreger in verschiedenen Konzentrationen (von 5 x 10^5 bis 5 Kopien pro Reaktion) nachzuweisen, ist in Abbildung 2 dargestellt.

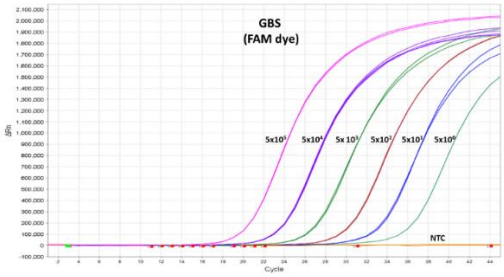

Abbildung 2. Empfindlichkeit des Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, von NZYtech. Amplifikationsdiagramm (Zykluszahl gegen Fluoreszenz - ΔRn) von 1:10 seriellen Verdünnungen der GBS-DNA, von 5 x 10^5 Kopien bis 5 Kopien pro Reaktion durch den FAM-Kanal. NTC, No-Template Control (negative Kontrolle).

11.3. Analytische Spezifität

11.3.1. Kreuzreaktivität (Ausschließlichkeit) und Spezifität

Inklusivität und Kreuzreaktivität wurden *In-silico* bewertet, indem alle im Kit enthaltenen Oligonukleotidsonden und Primer gegen mit GBS verwandte Krankheitserreger bzw. normale Krankheitserreger, die Infektionen mit ähnlichen Symptomen verursachen, analysiert wurden. Die Primer und Sonden des Tests wurden mit veröffentlichten Genomsequenzen verglichen. Die *In-silico*-Analyse ergab, dass das Testdesign spezifisch GBS nachweist und keine Reaktivität mit nicht verwandten Spezies aufweist.

In-vitro-Kreuzreaktivitätstests (Exklusivität) wurden durchgeführt, um zu bestätigen, dass das Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, nicht mit anderen kolonisierenden und pathogenen Mikroorganismen reagiert, die üblicherweise in menschlichen vaginalen/perianalen Proben vorkommen. Diese Studie wurde mit einem kommerziellen Panel vaginaler Pathogene (NATtrol™ Vaginal Panel®, ZeptoMetrix®) und genomischer DNA (DSMZ) der ausgewählten Mikroorganismen durchgeführt. Die Tests wurden mit genomischer DNA der folgenden 29 Mikroorganismen durchgeführt: *Atopobium vaginae Z242, Bacillus cereus ATCC 14579, Bifidobacterium breve ATCC 15700, BVAB2 recombinant, Candida albicans Z006, Candida glabrata 14/73657, Candida krusei Z009, Candida tropicalis ATCC 13803, Chlamydia trachomatis ATCC VR-902B, Clostridium perfringens VPI No.5, Enterobacter cloacae ATCC 13047, Enterococcus avium R 6566, Enterococcus faecium E980, Escherichia coli K-12, Fusobacterium nucleatum ATCC 25586, Gardnerella vaginalis CCUG 792, Klebsiella oxytoca 1028, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus crispatus Z246, Mesomycoplasma lagogenitalium ATCC 700289, Mycoplasma hominis ZK-CU2, Neisseria gonorrhoeae ATCC 19424, Proteus mirabilis ATCC 12453, Pseudomonas aeruginosa BWKH 8, Staphylococcus aureus BWKH 152, Staphylococcus epidermidis K2-4, Streptococcus pneumoniae ATCC 33400, Streptococcus pyogenes ATCC 12344* und *Trichomonas vaginalis strain Z070.* Alle Tests wurden in dreifacher Ausführung mit drei Kit-Chargen durchgeführt. Keiner der getesteten Erreger erbrachte ein falsch-positives Real-time PCR-Signal. Der *Streptococcus agalactiae*-Stamm Z019 wurde ebenfalls getestet und lieferte erwartungsgemäß ein echt-positives Real-time PCR-Signal.

11.3.2. Mikrobielle Interferenzstudien

Es wurden mikrobielle Interferenzstudien durchgeführt, um festzustellen, ob das Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, von NZYtech mit anderen Krankheitserregern und/oder Mikroorganismen reagiert, die wahrscheinlich in den klinischen Proben vorkommen und ein falsch-negatives Testergebnis erzeugen. Negative vaginale/perianale Proben wurden mit GBS-Nukleinsäuren in 3x LoD und mit einer hohen genomischen DNA-Konzentration jedes potenziell hemmenden Organismus versetzt. Der Test wurde mit drei Kit-Chargen und unter typischen Testreaktionsbedingungen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass bei den folgenden 24 Mikroorganismen keine Interferenzen beobachtet wurden: *Bacillus cereus ATCC 14579, Bifidobacterium breve ATCC 15700, Candida albicans Z006, Candida glabrata 14/73657, Candida tropicalis ATCC 13803, Chlamydia trachomatis ATCC VR-902B, Clostridium perfringens VPI No.5, Enterobacter cloacae ATCC 13047, Enterococcus avium R 6566 Enterococcus faecium E980, Escherichia coli K-12, Fusobacterium nucleatum ATCC 25586, Gardnerella vaginalis CCUG 792, Klebsiella oxytoca 1028, Lactobacillus acidophilus, Mesomycoplasma lagogenitalium ATCC 700289, Mycoplasma hominis ZK-CU2, Neisseria gonorrhoeae ATCC 19424, Proteus mirabilis ATCC 12453, Pseudomonas aeruginosa BWKH 8, Staphylococcus aureus BWKH 152, Staphylococcus epidermidis K2-4, Streptococcus pneumoniae ATCC 33400* und *Streptococcus pyogenes ATCC 12344.*

11.3.3. Störende Substanzen

Die Leistung des Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, von NZYtech wurde mit 25 potenziell störenden Substanzen, die in Vaginal-/Perianalproben vorhanden sein können, bewertet. Die Tests wurden mit negativen vaginalen/perianalen Proben durchgeführt, die mit GBS-positiven Proben bei 3x LoD und 30x LoD versetzt wurden. Potenziell störende Substanzen wurden in Konzentrationen getestet, die den höchsten in künstlichen Vaginal-/Perianalproben zu erwartenden Konzentrationen auf der Grundlage der Literaturanalyse entsprechen. Alle Tests wurden in dreifacher Ausführung mit drei Kit-Chargen durchgeführt und mit den Daten eines Kontrolltests ohne Störsubstanzen verglichen. Die nachstehende Tabelle fasst die bei diesen Experimenten gesammelten Daten zusammen. Die Daten zeigen, dass keine der getesteten Substanzen die Empfindlichkeit des GBS-Nachweises mit dem Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD beeinträchtigt.

POTENZIELLE INTERFERENZEN	AKTIVE INHALTSSTOFFE	ENDKONZENTRATION IN DER PROBE	INTERFERENZ JA (Y) ODER NEIN (N)
Antazida (Gaviscon®)	Natriumalginat (250 m) + Natriumbicarbonat (133,5 mg) + Calciumcarbonat (80 mg)	5 mg/mL	N
Medikamente gegen Durchfall (Imodium®)	Loperamidhydrochlorid (2 mg)	10 mg/mL	N
Abführmittel (Bekunis®)	Senna (105 mg) + Bisacodyl (5 mg)	10 mg/mL	N
Anti-Hämorrhoiden-Cremes/-Salben (Scheriproct®)	Prednisolon (1,9 mg/g) + Cinchocain (5 mg/g)	10% Gew./Vol.	N
Antazida (Kompensan® Trieffect)	Natriumaluminiumdihydroxidcarbonat (340 mg) und Dimethicon (30 mg)	5 mg/mL	N
Antimikrobielle Mittel (Gino-Canesten®)	Clotrimazol (10 mg/g)	10% Gew./Vol.	N
Medikamente gegen Durchfall (UL-250 ®)	Saccharomyces boulardii (250 mg)	10 mg/mL	N
Abführmittel (Microlax®)	Natriumcitratdihydrat (450 mg) + Natriumlaurylsulfoacetat (45 mg)	5% V/V	N
Antimikrobielle Mittel (Lomexin®)	Fenticonazolnitrat	10% Gew./Vol.	N
Medizin (Progeffik®)	Progesteron	5 mg/mL	N
Anti-Pilzmittel	Flucytosin	5 mg/mL	N
Anti-Pilzmittel	Amphotericin B (20 µg/mL)	10% V/V	N
Samenflüssigkeit	-	5% V/V	N*
Vollblut	Glukose, Hormone, Enzyme, Ionen, Eisen usw	10% V/V	N
Urin	-	10% V/V	N
Stuhl	-	1% Gew./Vol.	N*
Waschmittel	Verseiftes Fett + Silikate	10 mg/mL	N
Topische Produkte (Lauroderme®)	Zinkoxid (23 mg/g) + Salicylsäure (2 mg/g)	10 mg/mL	N
Topische Produkte (Bepanthene® Salbe)	Dexpanthenol (50 mg/g)	10% Gew./Vol.	N
Topische Produkte (Halibut®)	Zinkoxid (150 mg/g)	10% Gew./Vol.	N
Topische Produkte (ClimaCare® Vaginalgel)	Hyaluronsäure + Milchsäure	10% V/V	N
Topische Produkte (WOMAN ISDIN® Vaginale Feuchtigkeitscreme)	Glycerin (11%), Glycerylpolyacrylat, Polyacrylsäure	10% V/V	N
Waschmittel (BETADINE® Vaginal)	Povidon-Jod	10% V/V	N*
Waschmittel	Milchsäure	10% V/V	N
Absolutes Ethanol	Alkohol	5% V/V	N

* Höhere Konzentrationen dieser Störsubstanz können die Empfindlichkeit des Kits verringern oder zu falsch negativen Ergebnissen führen.

11.4. Präzision

Die Testpräzision für das Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, von NZYtech wurde durch wiederholtes Testen positiver Proben bestimmt, die zwei bakterielle Belastungsniveaus repräsentieren, 3x LoD und 30x LoD Kopien pro Reaktion, die mit DNA aus negativen vaginalen/perianalen Proben versetzt wurden, unter Verwendung von 3 verschiedenen Kit-Chargen und unter typischen Testreaktionsbedingungen. Die Präzision wurde durch Messung des Cq-Mittelwerts, des Cq-Variationskoeffizienten und des prozentualen Anteils der Wiederholungsdetektion bewertet, wie unten für jeden Fall beschrieben. Die Daten sind in der nachstehenden Tabelle wiedergegeben.

Präzision des Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD von NZYtech

VARIABLE		GBS (KOPIEN/REAKTION)	
		3x LOD	30x LOD
WIEDERHOLBARKEIT	n	12	12
	Mittlerer Cq	35,23	31,26
	Variationskoeffizient (%)	2,01	0,95
	% Replikat-Erkennung	100	100
TÄGLICHE REPRODUZIERBARKEIT	n	48	48
	Mittlerer Cq	34,85	31,25
	Variationskoeffizient (%)	2,40	1,10
	% Replikat-Erkennung	100	100
REPRODUZIERBARKEIT VON CHARGE ZU CHARGE	n	72	72
	Mittlerer Cq	35,03	31,45
	Variationskoeffizient (%)	2,42	1,34
	% Replikat-Erkennung	100	100
BEDIENER-REPRODUZIERBARKEIT	n	36	36
	Mittlerer Cq	35,35	31,64
	Variationskoeffizient (%)	2,09	1,25
	% Replikat-Erkennung	100	100
REPRODUZIERBARKEIT ZWISCHEN INSTRUMENTEN	n	60	60
	Mittlerer Cq	35,20	31,69
	Variationskoeffizient (%)	2,18	1,02
	% Replikat-Erkennung	100	100

11.4.1. Wiederholbarkeit

Die Wiederholbarkeit wurde von einem Bediener durch die Analyse von 12 Wiederholungen jeder Probe (3x LoD und 30x LoD Kopien pro Reaktion) bewertet, was einer endgültigen Anzahl von 24 durchgeführten Tests pro Ziel entspricht.

11.4.2. Tägliche Reproduzierbarkeit

Die tägliche Reproduzierbarkeit wurde von einem Bediener durch die Analyse von 48 Wiederholungen jeder Probe (3x LoD und 30x LoD-Kopien pro Reaktion) über 4 Tage mit 12 Wiederholungen jeder Konzentration pro Tag (insgesamt wurden 96 Tests durchgeführt) bewertet.

11.4.3. Reproduzierbarkeit von Charge zu Charge

Die Reproduzierbarkeit zwischen den Chargen wurde von einem Bediener durch die Analyse von 72 Wiederholungen jeder Probe (3x LoD und 30x LoD Kopien pro Reaktion) unter Verwendung von 3 verschiedenen Kit-Chargen mit 24 Wiederholungen pro Charge bewertet.

11.4.4. Bediener-Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit durch den Bediener wurde bewertet, indem 36 Wiederholungen jeder Probe (3x LoD und 30x LoD Kopien pro Reaktion) von drei verschiedenen Bedienernmit 12 Wiederholungen pro Bediener getestet wurden.

11.4.5. Reproduzierbarkeit zwischen den Instrumenten

Die Reproduzierbarkeit zwischen den Geräten wurde von einem Bediener durch die Prüfung von 12 Wiederholungen jeder Probe (3x LoD und 30x LoD Kopien pro Reaktion) in sechs verschiedenen Real-time PCR-Geräten gemessen:

HERSTELLER DER ECHTZEIT-PCR-GERÄTE	MODELL DER ECHTZEIT-PCR-PLATTFORM
Applied Biosystems®	7500 Fast
	StepOne Plus
	QuantStudio™ 5
Roche®	LightCycler 96™ instrument
Bio-Rad®	CFX Opus 96 Real-time PCR
	CFX96 Touch Real-time PCR

11.5. Klinische Bewertung

Die klinische Leistung des Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD von NZYtech wurde anhand von 186 vaginalen und/oder perianalen Abstrichproben bewertet, die von schwangeren Frauen entnommen und zuvor mit routinemäßiger mikrobiologischer Kultur charakterisiert wurden. Die Nukleinsäuren wurden mit dem NZY Mag Viral RNA/DNA Isolation Kit, IVD (MD0488, NZYtech) extrahiert und dann mit dem Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, amplifiziert. Die Daten zeigten, dass 93,1% der klinischen Sensitivität (PPA) und 97,0% der klinischen Spezifität (NPA) für alle getesteten positiven bzw. negativen Proben erreicht wurden.

		VERGLEICHSTEST - MIKROBIOLOGISCHE KULTUR		
		GBS Positiv	**GBS Negativ**	**Gesamt**
GROUP B STREPTOCOCCUS REAL-TIME PCR KIT, IVD	**GBS Positiv**	81	3*	84
	GBS Negativ	6	96	102
	Gesamt	87	99	186

PPA (Positive prozentuale Übereinstimmung): 93,1% Gruppe B *Streptococcus*
NPA (Negative prozentuale Übereinstimmung): 97,0% Gruppe B *Streptococcus*

* Eine mögliche Erklärung für diese negativen Kulturproben ist der Verlust der bakteriellen Lebensfähigkeit während der Probenentnahme und/oder des Transports, wobei die nicht lebensfähige bakterielle DNA für die Amplifikation verfügbar blieb. Darüber hinaus lässt sich dieser Unterschied durch die Tatsache rechtfertigen, dass die Real-time PCR-Technik empfindlicher ist als Kulturmethoden.

Darüber hinaus wurde ein Vergleich der klinischen Leistung des Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, von NZYtech, und eines Echtzeit-PCR-Vergleichstests durchgeführt. Die Daten zeigten, dass 98,8% der klinischen Sensitivität (PPA) und 98,1% der klinischen Spezifität (NPA) für alle getesteten positiven bzw. negativen Proben erreicht wurden.

		VERGLEICHSTEST - ECHTZEIT-PCR-KIT		
		GBS Positiv	**GBS Negativ**	**Gesamt**
GROUP B STREPTOCOCCUS REAL-TIME PCR KIT, IVD	**GBS Positiv**	82	2	84
	GBS Negativ	1	101	102
	Gesamt	83	103	186

PPA (Positive prozentuale Übereinstimmung): 98,8% Gruppe B *Streptococcus*
NPA (Negative prozentuale Übereinstimmung): 98,1% Gruppe B *Streptococcus*

Zusätzlich wurde die klinische Leistung des Kits bei Verwendung von zwei alternativen Nukleinsäureextraktionsmethoden bewertet, nämlich dem NZY Tissue gDNA Isolation Kit (MB135, NZYtech) und dem chemagic Pathogen NA gDNA Kit H96 (PerkinElmer). Für das NZY Tissue gDNA Isolation Kit (MB135, NZYtech) ergaben die Daten einen PPA von 100% und einen NPA von 100% im Vergleich zum Nachweis von Nukleinsäuren,

die mit dem NZY Mag Viral RNA/DNA Isolation Kit, IVD (MD0488, NZYtech) extrahiert wurden. Für das chemagic Pathogen NA gDNA Kit H96 (PerkinElmer) ergaben die Daten einen PPA von 95,8% und einen NPA von 100%. Insgesamt zeigen die Ergebnisse eine hohe Sensitivität und Spezifität beim Nachweis von GBS mit dem Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD.

12. Qualitätskontrolle

Alle Komponenten des Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, von NZYtech werden gemäß den oben beschriebenen Protokollen getestet. Das Duplex-Real-time PCR-System ermöglicht den Nachweis von Zielen, die für die Identifizierung von GBS-DNA sowie humaner ACTB DNA beschrieben wurden. Positive Amplifikationen werden für Zielgene, Positivkontrollen und interne Kontrollen durch FAM und HEX entsprechend den jeweiligen Primer-/Sondensatz-Reporterfarbstoffen beobachtet.

13. Technische Unterstützung

Für technische Unterstützung wenden Sie sich bitte an unser engagiertes technisches Support-Team unter der Telefonnummer: +351 (0) 21 364 35 14 oder per E-Mail: info@nzytech.com.

14. Markenzeichen und Haftungsausschlüsse

Alle Marken, die in diesem Handbuch erscheinen, sind Eigentum der jeweiligen Inhaber.

15. Erläuterung von Symbolen

IVD	*In-vitro*-Diagnostisches Medizinprodukt		Gebrauchsan-weisung beachten
REF	Katalognummer		Hersteller
LOT	Chargen-Code		Verwendet von
	Temperaturgrenzen		Ausreichend für
CONTROL +	Positivkontrolle		Vor Sonnenlicht fernhalten (Primer-/Sonden-Mix)
CONTROL –	Negativkontrolle		

16. Konformitätserklärung

Produktname: Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD

Katalognummer: MD04941

Verwendungszweck: Qualitativer Nachweis von *Streptococcus agalactiae*

Einstufung: Andere (nicht abgedeckt durch Anhang II oder nicht zum Eigenanwendung bestimmt) laut der Richtlinie 98/79/EG.

Hersteller: NZYtech - Gene & Enzymes,

Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar

Edifício E, R/C,

1649-038, Lisboa

Portugal

Wir, NZYtech, Lda – Genes & Enzymes, erklären hiermit, dass dieses Produkt, auf das sich diese Konformitätserklärung bezieht, mit den folgenden Normen und anderen normativen Dokumenten ISO 9001:2015 und ISO 13485:2016 gemäß den Bestimmungen der Richtlinie 98/79/EG und der Verordnung (EU) 2017/746 über *In-vitro*-Diagnostika, wie sie in nationales Recht der Mitgliedstaaten der Europäischen Union umgesetzt wurde, konform ist.

Die technische Dokumentation wird gepflegt bei NZYtech, Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar - Edifício E, R/C, 1649-038 Lisboa, Portugal.

Joana Brás, PhD

Technische Direktorin

17. Referenzen

Florindo C, Ferreira R, Borges V, Spellerberg B, Gomes JP, Borrego MJ. Auswahl von Referenzgenen für Echtzeit-Expressionsstudien in Streptococcus agalactiae. J Microbiol Methods. 2012 Sep;90(3):220-7. doi: 10.1016/j.mimet.2012.05.011. Epub 2012 Mai 23. PMID: 22634000.

CDC. +() Prävention von perinatalen Streptokokken-Erkrankungen der Gruppe B, überarbeitete Leitlinien. Wöchentlicher Bericht über Morbidität und Mortalität, Bd. 59.

ACOG, A.C. (2011). Prävention von früh auftretenden Gruppe-B-Streptokokken-Erkrankungen bei Neugeborenen. Committee Opinion, 1

Paolucci M, Landini MP, Sambri V. Wie kann der Mikrobiologe bei der Diagnose der neonatalen Sepsis helfen? Int J Pediatr. 2012;2012:120139. doi:10.1155/2012/120139

Alfa MJ, Sepehri S, De Gagne P, Helawa M, Sandhu G, Harding GK. Real-Time PCR-Assay ermöglicht eine zuverlässige Bewertung der intrapartalen Übertragung von Streptokokken der Gruppe B. J Clin Microbiol. 2010;48(9):3095-3099. doi:10.1128/JCM.00594-10

Steer PJ, Russell AB, Kochhar S, Cox P, Plumb J, Gopal Rao G. Streptokokken-Erkrankungen der Gruppe B bei Mutter und Neugeborenem - ein Überblick Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2020 Sep;252:526-533. doi: 10.1016/j.ejogrb.2020.06.024. Epub 2020 Jun 15. PMID: 32586597; PMCID: PMC7295463.

NZYtech
genes & enzymes

Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar - Edifício E, R/C, 1649-038 Lisboa, Portugal
Tel.: +351.213643514 Fax: +351.217151168
www.nzytech.com