



# Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD

## PCR komplet za otkrivanje streptokoka grupe B u stvarnom vremenu, IVD

**REF**

MD04941, 96 reakcija

*Samo za profesionalnu in vitro dijagnostičku uporabu*



**HR**

**Upute za uporabu**

**MD0494\_IM\_hr**

VERZIJA 2401, siječnja 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](http://www.nzytech.com)

## Sadržaj

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 1.     | Uvod .....  | 3  |
| 2.     | Namjena .....   | 3  |
| 3.     | Načela testiranja .....   | 3  |
| 4.     | Sastav kompleta .....   | 3  |
| 5.     | Uvjeti pohrane, stabilnosti i rukovanja .....                               | 3  |
| 6.     | Potrebni materijali i instrumenti koji nisu isporučeni .....                | 4  |
| 7.     | Prikupljanje i priprema uzoraka .....                                       | 4  |
| 8.     | Upozorenja i mjere opreza .....   | 4  |
| 8.1.   | Informacije o sigurnosti .....  | 4  |
| 8.2.   | Zahtjevi za rukovanje i postupak .....                                      | 4  |
| 9.     | Postupak testiranja .....   | 5  |
| 9.1.   | Postavljanje reakcije .....   | 5  |
| 9.2.   | Programiranje instrumenta za PCR u stvarnom vremenu .....                   | 5  |
| 10.    | Analiza podataka .....  | 6  |
| 10.1.  | Kriteriji provjere reakcije .....   | 6  |
| 10.2.  | Tumačenje rezultata testa .....   | 6  |
| 11.    | Procjena učinkovitosti .....  | 7  |
| 11.1.  | Očekivani rezultati .....   | 7  |
| 11.2.  | Granica detekcije (Limit of Detection, LoD) – Analitička osjetljivost ..... | 7  |
| 11.3.  | Analitička specifičnost .....   | 7  |
| 11.3.1 | Križna reaktivnost (isključivost) i specifičnost .....                      | 7  |
| 11.3.2 | Ispitivanja mikrobne interferencije .....                                   | 8  |
| 11.3.3 | Interferirajuće tvari .....   | 8  |
| 11.4.  | Preciznost .....  | 9  |
| 11.4.1 | Ponovljivost .....  | 9  |
| 11.4.2 | Dnevna obnovljivost .....   | 9  |
| 11.4.3 | Obnovljivost između serija .....  | 9  |
| 11.4.4 | Obnovljivost između rukovatelja .....                                       | 9  |
| 11.4.5 | Obnovljivost između instrumenata .....                                      | 9  |
| 11.5.  | Klinička procjena .....   | 10 |
| 12.    | Kontrola kvalitete .....  | 10 |
| 13.    | Tehnička podrška .....  | 10 |
| 14.    | Zaštitni znakovi i izjave o odricanju odgovornosti .....                    | 10 |
| 15.    | Objašnjenje simbola .....   | 11 |
| 16.    | Izjava o sukladnosti .....  | 12 |
| 17.    | Reference .....   | 13 |

## 1. Uvod

*Streptococcus agalactiae*, poznat i kao streptokok grupe B (Group B *Streptococcus*, GBS), patogen je koji uzrokuje najozbiljnije bakterijske infekcije u novorođenčadi. Ta bakterija kolonizira gastrointestinali i donji genitalni trakt u 10 do 40 % trudnica te postoji opasnost od zaraze djeteta tijekom poroda. Infekcija GBS-om u novorođenčadi može dovesti do sepsa, upale pluća i meningitisa. Kako bi se spriječila infekcija GBS-om u novorođenčadi, trudnice se u kasnoj trudnoći (između 35. i 37. tjedna gestacije) rutinski podvrgavaju probiru na GBS. Pozitivan test na GBS zahtijeva primjenu antibiotika tijekom poroda kako bi se smanjila opasnost od zaraze djeteta. Međutim, žene koje rađaju prijevremeno rođenu djecu obično nemaju priliku obaviti probir na GBS, pa prisutnost ove bakterije tijekom poroda nije pod kontrolom. U tim slučajevima postoji povećan rizik od ozbiljnih infekcija novorođenčadi pa se tijekom porođaja primjenjuje antibiotik, a to se povezuje s pojavom otpornih bakterijskih sojeva. Nedavna su istraživanja otkrila da do dvije trećine novorođenčadi koja je razvila ranu septikemiju uzrokovanoj GBS-om potječe od majki koje su rutinski testirane na GBS putem mikrobiološke kulture, a čiji su rezultati bili negativni na GBS. Stoga, iako se mikrobiološka kultura smatra standardnom metodom za otkrivanje GBS-a, ima određena ograničenja, kao što su niža osjetljivost i vrijeme do dobivanja rezultata koje može potrajati do 72 sata. PCR test u stvarnom vremenu predstavlja brzu, učinkovitu i pouzdanu metodu koja se može upotrebljavati za otkrivanje prisutnosti streptokoka grupe B.

## 2. Namjena

NZYtech Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, molekularni je test zasnovan na PCR tehnologiji u stvarnom vremenu, namijenjen za brzo otkrivanje i kvalitativnu dijagnozu specifičnih nukleinskih kiselina GBS-a iz vaginalnih i/ili perianalnih brišova priključenih u transportni komplet koji sadržava tekući medij Amies. Ovaj je test namijenjen otkrivanju kolonizacije GBS-a u trudnica prije poroda. Nema kontraindikacija za uporabu NZYtech Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD. Testiranje moraju obavljati specijalizirani i kvalificirani laboratorijski tehničari koji imaju iskustva s PCR tehnikom u stvarnom vremenu i molekularnom *in vitro* dijagnostikom. Komplet se smije upotrebljavati samo kako je navedeno u ovom korisničkom priručniku.

## 3. Načela testiranja

NZYtech Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, sadržava komplet reagensa, enzima i oligonukleotida (početnica i proba) za kvalitativnu detekciju genoma GBS-a, koristeći se PCR tehnologijom u stvarnom vremenu (pogledajte zahtjeve u pogledu specifikacija opreme u **odjeljku 6**). Ciljna sekvenca kompleta prethodno je identificirana kao dobar genetski marker za GBS. Premda je NZYtech Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, osmišljen tako da ima širok raspon detekcije, specifičan je za otkrivanje GBS-a. Osim toga, komplet oligonukleotida posebno je osmišljen za detekciju ovog organizma i ne pokazuje značajnu homologiju s drugim genomima, što se odražava u visokoj specifičnosti i osjetljivosti testa. Kao takav, komplet je osmišljen tako da otkriva specifično GBS i izbjegava detekciju drugih organizama koji uzrokuju slične infekcije. Unutarnja kontrola, uključena u komplet, služi za potvrdu učinkovitosti procesa izdvajanja i odsutnosti PCR inhibitora koji mogu biti prisutni u ljudskim biološkim uzorcima. Tvrta NZYtech povremeno ponovno proučava ciljnu sekvencu gena GBS-a i po potrebi može osigurati novu verziju ovog kompleta. Dodatno, komplet sadržava dvije vanjske kontrole (pozitivnu kontrolu i negativnu kontrolu) opisane u nastavku. Pozitivna kontrola sastoji se od fragmenta nukleinske kiseline koji sadržava ciljnu sekvencu koja se otkriva kompletom.

U ovom kompletu, kvalitativno određivanje DNK temelji se na PCR tehnici u stvarnom vremenu, referentnoj metodologiji u laboratorijskoj dijagnostici. Radi se o izuzetno osjetljivoj i specifičnoj metodi kojom se precizno otkriva prisutnost ovog organizma. Načelo NZYtech Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, temelji se na uporabi izolirane i pročišćene DNK putem sustava za izdvajanje kako bi se utvrdila prisutnost bakterijskog DNK. Izdvojeni DNK podvrgava se PCR amplifikaciji, u jednoj reakciji, s pomoću skupova početnica/proba visoke specifičnosti koji počivaju na načelu rada TaqMan®. U prisutnosti DNK GBS-a, TaqMan® proba specifično se veže na konzervirana područja određenog gena GBS-a koji je okružen specifičnim parom početnica. Drugi skup početnica/proba služi kao unutarnja kontrola koja detektira ljudski gen za β-aktin (ACTB). Detekcijom unutarnje kontrole potvrđuje se učinkovitost procesa izdvajanja te se može utvrditi je li prisutnost/odsutnost inhibitora u kliničkim uzorcima narušila PCR reakciju. Da bi se omogućilo prepoznavanje amplifikacije dviju specifičnih ciljnih struktura u jednoj reakciji, proba specifična za GBS i proba za ljudski β-aktin različito su označene reporterskim bojama FAM™ odnosno HEX™. Ovaj komplet sastoji se od dvostrukog testa, pri čemu se ciljni gen GBS-a detektira u optičkom kanalu FAM, a ljudski ciljni gen u optičkom kanalu VIC (vidjeti **Odjeljku 9.2**). Ovi skupovi oligonukleotida/proba isporučeni su u optimiziranim koncentracijama kako bi se osiguralo da ljudski DNK, čak i kada je prisutan u izuzetno visokim koncentracijama, ne ograničava učinkovitost skupova početnica/proba za GBS.

## 4. Sastav kompleta

NZYtech Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, sadržava sveobuhvatan komplet reagensa dovoljan za izvođenje 96 Real-time PCR reakcija u jednom koraku.

| KOMPONENTE KOMPLETA | VOLUMEN (PO BOČICI)                            | BROJ EPRUVETA | BOJA ČEPA |          |
|---------------------|--|---------------|-----------|----------|
| GBS MMix            | NZYSupreme glavna mješavina proba za qPCR (2x) | 1050 µl       | 1         | Prozirni |
| GBS PPPMix          | GBS/ACTB mješavina početnica i proba (10x)     | 205 µl        | 1         | Smeđi    |
| GBS POS             | GBS/ACTB pozitivna kontrola                    | 105 µl        | 1         | Crveni   |
| NTC                 | Kontrola bez predloška                         | 105 µl        | 1         | Prozirni |

## 5. Uvjeti pohrane, stabilnosti i rukovanja

NZYtech Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, isporučuje se rashlađen. Po primitku kompleta sve komponente odmah treba pohraniti na temperaturi od -85 °C do -15 °C. Kada se upotrebljavaju, komponente kompleta odmah nakon uporabe trebaju se staviti u zamrzivač kako bi se smanjilo vrijeme izloženosti sobnoj temperaturi. Osim toga:

- Smanjite broj ciklusa smrzavanja i odmrzavanja pohranom u radne alikvote. Ako je potrebno, nakon odmrzavanja komponente kompleta mogu se podijeliti u manje volumene. Komplet ostaje stabilan tijekom minimalno 6 ciklusa smrzavanja i odmrzavanja.

- Komponentu GBS PPMix treba pohraniti podalje od svjetlosti. GBS MMix naročito nemojte izlagati izravnom sunčevom svjetlu nakon miješanja s komponentom GBS PPMix.
- Ako pakiranje koje štiti komplet stigne oštećeno, obratite se tvrtki NZYtech.
- Pazite na datum isteka valjanosti naznačen na ambalaži. NZYtech ne preporučuje uporabu kompleta nakon datuma isteka valjanosti. Na taj datum komplet se mora odložiti u otpad u skladu s uputama za odlaganje u otpad u **odjeljku 8.2**.

## 6. Potrebni materijali i instrumenti koji nisu isporučeni

- Instrument za PCR u stvarnom vremenu koji detektira FAM™ i VIC™ (na valnim duljinama emisije od 520 odnosno 556 nm). Modele opreme za koje je komplet potvrđen potražite u **odjeljku 11**.
- Oprema i potrošni materijal za izolaciju DNK iz bioloških/kliničkih uzoraka.
- Plastični pribor za Real-time PCR bez RNaze/DNaze: PCR epruvete, trakice, čepovi, pločice s 96 jažica i ljepljive folije.
- Pipete i vrhovi s filtrom (bez RNaze/DNaze).
- Rashladni blok.
- Jednokratne rukavice.
- Vortex miješalica i centrifuga.

## 7. Prikupljanje i priprema uzorka

Komplet je osmišljen za otkrivanje DNK izdvojenog iz vaginalnih i/ili perianalnih brisova. Različiti čimbenici, kao što su postupak prikupljanja bioloških uzoraka, transport, skladištenje i vrijeme obrade uzorka, od ključne su važnosti kako bi se osigurala cjelovitost uzorka i postigli optimalni rezultati. Vaginalni i/ili perianalni uzorci trebaju se prikupiti s pomoću posebnog brisa (ESwab®, Copan). Uzorke treba čvrsto zatvoriti u odgovarajuće epruvete ili spremnike, pravilno označiti te zatim odmah prevesti u laboratorij. Prikupljene uzorke treba testirati što je prije moguće. Neodgovarajuće prikupljanje, rukovanje i/ili transport uzorka mogu rezultirati lažnim rezultatom. Izdvojene nukleinske kiseline polazni su materijal za testiranje NZYtech Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD. NZYtech preporučuje uporabu jednog od sljedećih kompleta za pročišćavanje nukleinskih kiselina na temelju tehnologije magnetnih kuglica: NZY Mag Viral RNA/DNA Isolation Kit, IVD (MD0488, NZYtech) ili chemagic Pathogenic NA gDNA Kit H96 (PerkinElmer). Osim toga, izdvajanje nukleinskih kiselina može se obaviti s pomoću spin kolona sa silikagelom, naročito s pomoću kompleta NZY Tissue gDNA Isolation Kit(MB135, NZYtech). Ta tri kompleta potvrđena su za izdvajanje kliničkih uzoraka GBS-a i naknadnu detekciju uporabom NZYtech Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD. Metode izdvajanja DNK temeljene na silikagelu mogu biti podložnije kontaminaciji od automatskih sustava za izdvajanje zbog ručnog rukovanja uzorcima. Uvjerite se da nije došlo do križne kontaminacije i da su uzorci DNK prikladni u smislu čistoće, koncentracije i cjelovitosti nukleinskih kiselina. Budući da je etanol snažan inhibitor PCR-a u stvarnom vremenu, potrebno je eliminirati tu komponentu prije elucije nukleinskih kiselina tijekom procesa izdvajanja. Komplet tvrtke NZYtech sadržava unutarnju kontrolu koja za cilj ima ljudski DNK pročišćen zajedno s bakterijskim DNK-om GBS-a. Ljudski DNK amplificira se s pomoću skupa oligonukleotida (početnica i proba) iz gena ljudskog β-aktina. Uvođenje unutarnje kontrole korisno je za procjenu učinkovitosti izdvajanja i izolacije DNK i/ili za otkrivanje prisutnosti potencijalnih inhibitora tijekom obrade uzorka.

## 8. Upozorenja i mjere opreza

Pažljivo slijedite postupke i smjernice navedene u ovom priručniku kako biste osigurali ispravno izvođenje testa. Prije uporabe testa provjerite cjelovitost proizvoda, to jest količinu i vrstu komponenti kompleta te jesu li ispravno označeni. Kao i kod svakog analitičkog ispitivanja, važno je pridržavati se dobre laboratorijske prakse. Svako odstupanje od dobre laboratorijske prakse može rezultirati neuspjehom testiranja ili dovesti do netočnih rezultata. Zbog visoke osjetljivosti kompleta posebna pažnja mora se posvetiti čuvanju reagensa i amplifikacijskih mješavina za PCR od kontaminacija.

### 8.1. Informacije o sigurnosti

Prije uporabe kompleta pogledajte sigurnosno-tehnički list (engl. Safety Data Sheet, SDS) koji je dostupan na web-stranici tvrtke NZYtech ([www.nzytech.com](http://www.nzytech.com)). Detekciju kita kompletom treba izvoditi samo osoblje koje je obučeno o odgovarajućim tehničkim i sigurnosnim postupcima u prikladno opremljenim laboratorijima. U svim okolnostima moraju se slijediti međunarodne i nacionalne smjernice o biološkoj sigurnosti laboratorija.

### 8.2. Zahtjevi za rukovanje i postupak

- Samo za profesionalnu *in vitro* dijagnostičku uporabu.
- Nemojte upotrebljavati ovaj komplet nakon datuma isteka valjanosti.
- Nemojte upotrebljavati komponente testa ako je oštećen zatvarač pakiranja kompleta.
- Ne izmenjujte reagense iz različitih proizvodnih serija.
- Nemojte upotrebljavati reagense drugih proizvođača zajedno s reagensima iz ovog kompleta.
- U svim postupcima upotrebljavajte jednokratni plastični pribor i pipete bez DNaze i RNaze.
- Priprema uzorka, postavljanje reakcije i amplifikacija trebaju se izvoditi u različitim radnim područjima. Redoslijed zadatka u laboratoriju treba biti jednosmjeran. U svakom području uvijek nosite jednokratne rukavice i mijenjajte ih prije ulaska u drugo područje. Ako je moguće, promijenite svoju odjeću.
- Odaberite određeni materijal i opremu za svako pojedinačno radno područje i nemojte ih prenosi s jednog područja na drugo.
- Izdvajanje nukleinskih kiselina s pomoću kolona sa silikagelom može biti podložnije križnoj kontaminaciji u usporedbi s izdvajanjem koje se izvodi s pomoću automatskih sustava za izdvajanje.
- Uvijek upotrebljavajte NTC (kontrolu bez predloška) koja je isporučena u kompletu.
- Biološkim uzorcima treba rukovati kao da su zarazni uz pridržavanje odgovarajućih mjera biološke sigurnosti.
- Pozitivna kontrola sadržava velik broj predložaka broja kopija; treba je otvoriti i obrađivati podalje od testnih uzoraka i komponenti kompleta kako bi se izbjegla križna kontaminacija.

- Pažljivo rukujte pločicama koje se upotrebljavaju nakon amplifikacije i odmah ih odložite u otpad nakon završetka testiranja; pločice nakon uporabe uvijek treba odložiti u odgovarajući spremnik za biološki opasan otpad. Nemojte otvarati reakcijske epruvete / pločice koje se upotrebljavaju nakon amplifikacije kako biste izbjegli kontaminaciju amplikona.
- Na kraju svakog testa očistite radne površine i opremu sredstvom za uklanjanje DNK/RNK.
- Ostaci kemikalija i pripravaka općenito se smatraju opasnim otpadom. Odlaganje te vrste otpada regulirano je nacionalnim i regionalnim zakonima i propisima.
- Sve rezultate trebaju tumačiti zdravstveni stručnjaci u kontekstu povijesti bolesti pacijenta i kliničkih simptoma
- Ovaj test ne može isključiti bolesti uzrokovane drugim patogenima.
- Negativan rezultat bilo kojeg PCR testa ne isključuje u potpunosti mogućnost infekcije.
- Slijedite dobru laboratorijsku praksu, nosite zaštitnu odjeću, stalno nosite jednokratne rukavice bez praha, te nosite zaštitne naočale i masku. Nemojte jesti, piti ni pušiti u radnom području.

## 9. Postupak testiranja

Pažljivo pročitajte upute za uporabu prije izvođenja testa. Pazite da se svi koraci pipetiranja i postavljanja pločica izvode u skladu s dobrim praksama za Real-time PCR. Nakon što se u pločicu ulije materijal, odmah započnite protokol PCR-a u stvarnom vremenu. Produljena inkubacija reakcijskih mješavina na sobnoj temperaturi može dovesti do PCR artefakata koji smanjuju osjetljivost detekcije. Prije eksperimenta započnite pažljivo miješajući reakcijske epruvete prstima i centrifugirajte ih pet sekundi kako biste pokupili sadržaj na dnu epruvete. Stavite epruvete na led. **Izričito preporučujemo da GBS POS pipetirate u posljednjem koraku kako biste izbjegli križnu kontaminaciju.**

### 9.1. Postavljanje reakcije

1. Pripremite mješavinu za Real-time PCR dovoljnu za broj testova koji će se izvoditi s dodatnom količinom od 5 % za gubitke pri pipetiranju. Nastavite prema tablici u nastavku u kojoj su navedeni volumeni za 1 i  $n$  testova (pri čemu  $n$  odgovara ukupnom broju reakcija):

| KOMPONENTA             | VOLUMEN ZA 1 TEST ( $\mu\text{L}$ ) | VOLUMEN ZA $N$ TESTOVA * + 5 % ( $\mu\text{L}$ ) |
|------------------------|-------------------------------------|--|
| GBS MMIX **            | 10                                  | $n \times 10,5$                                  |
| GBS PPMIX              | 2                                   | $n \times 2,1$                                   |
| <b>KONAČNI VOLUMEN</b> | <b>12</b>                           | <b><math>n \times 12,6</math></b>                |

\* Kako biste izračunali ukupan broj reakcija potrebnih za svaki test, prebrojite broj uzoraka i dodajte još dva da biste uključili negativnu odnosno pozitivnu kontrolu.

\*\* Imajte na umu da se može primijetiti talog na dnu epruvete s glavnom mješavinom, posebno nakon višestrukih ciklusa smrzavanja/odmrzavanja. Da biste osigurali optimalnu učinkovitost, pobrinite se da su sve komponente odmrznute i resuspendirane prije uporabe. U tom slučaju nemojte centrifugirati glavnu mješavinu prije pipetiranja.

2. Pipetirajte 12  $\mu\text{L}$  Real-time PCR mješavine u pojedinačne jažice u skladu s vašom konfiguracijom eksperimentalnih pločica za PCR u stvarnom vremenu.
3. Za negativnu kontrolu, dodajte 8  $\mu\text{L}$  NTC-a umjesto DNK predloška u jažicu za negativnu kontrolu. Konačni volumen treba biti 20  $\mu\text{L}$ .
4. Za biološke uzorke, dodajte 8  $\mu\text{L}$  svakog uzorka DNK uzorka u jažice za uzorke, u skladu s vašom konfiguracijom eksperimentalnih pločica. Konačni volumen u svakoj jažici treba biti 20  $\mu\text{L}$ .
5. Za pozitivnu kontrolu, dodajte 8  $\mu\text{L}$  uzorka GBS POS umjesto DNK predloška u jažice za pozitivnu kontrolu. Konačni volumen treba biti 20  $\mu\text{L}$ .
6. Prekrijte i zatvorite pločicu odgovarajućom optičkom ljepljivom folijom ili čepovima prije nego što prijeđete na korake Real-time PCR-a i detekcije.
7. Stavite reakcijsku pločicu u instrument za PCR u stvarnom vremenu i pokrenite protokol PCR-a u stvarnom vremenu prema uputama u odjeljku koji slijedi.

### 9.2. Programiranje instrumenta za PCR u stvarnom vremenu

Tablica u nastavku prikazuje standardni protokol optimiziran na nekoliko platformi. Međutim, ovi se uvjeti mogu prilagoditi i potvrditi kako bi odgovarali protokolima različitih uređaja.

| CIKLUSI | TEMPERATURA | VRIJEME | KORAK                               |
|---------|-------------|---------|-------------------------------------|
| 1       | 95 °C       | 3 min   | Aktivacija polimeraze               |
| 45      | 95 °C       | 5 s     | Denaturacija                        |
|         | 60 °C       | 30 s    | Vezanje početnica / produljivanje * |

\* Ovisno o instrumentu za Real-time PCR, odaberite odgovarajuće kanale za otkrivanje. Fluorogeni podaci trebaju se prikupljati tijekom ovog koraka putem kanala FAM i HEX.

Fluorescentne boje koje se upotrebljavaju u ovom kompletu i njihovi odgovarajući kanali za otkrivanje su sljedeći:

#### Fluorescentne boje i kanali za otkrivanje

| CILJNE STRUKTURE                     | FLUORESCENTNA BOJA | KANALI DETEKCIJE |
|--------------------------------------|--------------------|------------------|
| Gen specifičan za GBS                | FAM™               | FAM              |
| Gen za ljudski $\beta$ -aktin (ACTB) | HEX™               | HEX/VIC/JOE      |

|         |             |                   |
|---------|-------------|-------------------|
| GBS POS | FAM™ i HEX™ | FAM i HEX/VIC/JOE |
|---------|-------------|-------------------|

Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, potvrđen je za sljedeće sustave za PCR u stvarnom vremenu: Applied Biosystems™ QuantStudio 5, Applied Biosystems™ 7500 FAST, Applied Biosystems™ StepOne Plus, instrument Roche Lightcycler® 96, Bio-Rad® CFX Opus Real-Time PCR i Bio-Rad® CFX96 Touch Real-Time PCR. Ako se upotrebljava druga oprema, korisnik treba potvrditi valjanost kompleta koristeći se prethodno karakteriziranim uzorcima (i pozitivnim i negativnim).

## 10. Analiza podataka

### 10.1. Kriteriji provjere reakcije

Prije analize rezultata preporučujemo da proučite korisnički priručnik odgovarajućeg uređaja za PCR u stvarnom vremenu. Zatim provjerite je li PCR test u stvarnom vremenu valjan. Dakle, za svaku pločicu potvrdite jesu li rezultati za pozitivnu i negativnu kontrolu izvedeni kako je očekivano, prema sljedećim kriterijima:

**Negativna kontrola (reakcija bez predloška):** nema otkrivene amplifikacije. Možda je došlo do kontaminacije uzorka ako negativna kontrola ima krivulje amplifikacije (FAM i HEX) sigmoidnog oblika. Ponovite test slijedeći dobru praksu za Real-time PCR.

**Pozitivna kontrola:** krivulje amplifikacije za FAM (GBS) i HEX (ACTB) su pozitivne. Očekuje se da će pozitivna kontrola amplificirati pri vrijednosti Ct < 32 u kanalima FAM i HEX. Ako ovaj kriterij kontrole kvalitete nije zadovoljen, to je snažan pokazatelj da je eksperiment kompromitiran.

Ako su kontrole u skladu s očekivanjima, test je **valjan**. Nastavite s tumačenjem rezultata za testirane uzorke.

Ako bilo koja od kontrola ne pokazuje očekivani radni učinak, test je kompromitiran ili nije ispravno izведен i treba ga smatrati **nevažećim**. **Ponovite test.** Ako se problem nastavi, kontaktirajte proizvođača.

### 10.2. Tumačenje rezultata testa

NZYtech Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, upotrebljava sljedeće granične vrijednosti Ct za tumačenje rezultata:

| CT VRIJEDNOST | TUMAČENJE REZULTATA                     |
|---------------|---|
| Ct ≤ 38       | Detektirano (+) → <b>POZITIVNO</b>      |
| Ct > 38       | Nije detektirano (-) → <b>NEGATIVNO</b> |

**GBS je detektiran** ako krivulja amplifikacije FAM prikazuje sigmoidni oblik s vrijednošću Ct ≤ 38, bez obzira na rezultat dobiven za test ACTB (HEX). Prisutnost ili odsutnost signala u kanalu HEX nije značajna za valjanost testa.

**GBS nije detektiran** ako se krivulja FAM ne amplificira (Ct > 38), dok test ACTB (HEX) prikazuje pozitivnu sigmoidnu krivulju uz vrijednost Ct ≤ 45.

**Test je nevažeći** ako su testovi za GBS i ACTB negativni. Test treba ponoviti s nukleinskom kiselinom ponovno pročišćenom iz uzorka.

Slijedeća tablica sažima tumačenje glavnih rezultata (procijenite opći oblik krivulja amplifikacije; **samo sigmoidne krivulje amplifikacije pokazatelj su stvarne amplifikacije**; +: detektirana krivulja amplifikacije; -: nema krivulje amplifikacije).

| GBS<br>(FAM) | ACTB<br>(HEX)  | NEGATIVNA<br>KONTROLA | POZITIVNA<br>KONTROLA | TUMAČENJE REZULTATA              |
|--------------|----------------|-----------------------|-----------------------|----------------------------------|
| +            | +              | -                     | +                     | <b>GBS → POZITIVNO</b>           |
| +            | - <sup>1</sup> | -                     | +                     | <b>GBS → POZITIVNO</b>           |
| -            | +              | -                     | +                     | <b>GBS → NEGATIVNO</b>           |
| -            | -              | -                     | +                     | <b>NEVAŽEĆI TEST<sup>2</sup></b> |

<sup>1</sup> Visoka koncentracija/opterećenje DNK GBS-a koji se može detektirati u uzorku može dovesti do smanjenja ili odsutnosti signala unutarne kontrole na kanalu HEX.

<sup>2</sup> Ponovite izdvajanje DNK i ponovno pokrenite Real-time PCR test.

**Napomena:** pri tumačenju rezultata mora se uzeti u obzir mogućnost lažno negativnih i lažno pozitivnih rezultata.

■ Lažno negativni rezultati mogu biti uzrokovani:

- Neodgovarajućim prikupljanjem, rukovanjem i/ili čuvanjem uzorka.
- Degradacijom uzorka.
- Prisutnošću inhibitora Real-time PCR-a.
- Mutacijama u genomu patogenog organizma.
- Nepridržavanjem postupaka u ovom priručniku.
- Uporabom nevalidiranih kompleta za izdvajanje ili platformi za PCR u stvarnom vremenu.

■ Lažno pozitivni rezultati mogu biti uzrokovani:

- Križnom kontaminacijom s pozitivnom kontrolom zbog neodgovarajućeg rukovanja.
- Neodgovarajućim rukovanjem uzorcima koji sadržavaju visoku koncentraciju DNK GBS-a. Budući da je Real-time PCR metoda vrlo podložna križnoj kontaminaciji, potrebno je posebno paziti tijekom izolacije DNK.
- Neodgovarajućim rukovanjem amplificiranim proizvodom (pločica koja se upotrebljava nakon amplifikacije).

Negativni rezultati ne isključuju infekciju GBS-om, te se rezultat testa ne bi trebao upotrebljavati kao jedini temelj za liječenje ili druge odluke o

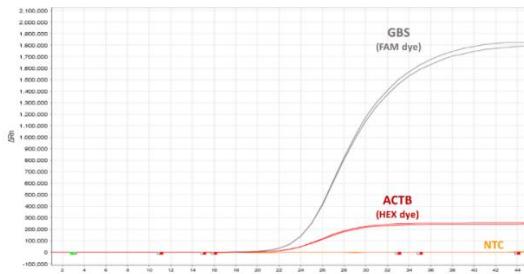
skrbi pacijenta. Osim toga, ovaj test ne može isključiti bolesti uzrokovane drugim patogenima.

## 11. Procjena učinkovitosti

Učinkovitost ovog kompleta potvrđena je za opremu navedenu u **odjeljku 9.2** (pogledajte gore). Ako se upotrebljava druga oprema, korisnik treba potvrditi valjanost kompleta koristeći se prethodno karakteriziranim uzorcima (i pozitivnim i negativnim).

### 11.1. Očekivani rezultati

Tipične krivulje amplifikacije koje su uočene za klinički uzorak pozitivan na GBS prikazane su na slici 1. U situacijama kada uzorak sadržava veliku količinu DNK GBS-a, krivulje na kanalu VIC, koje odgovaraju ciljnoj strukturi ljudskog  $\beta$ -aktina, možda neće biti ili krivulja može biti atipičnog oblika.



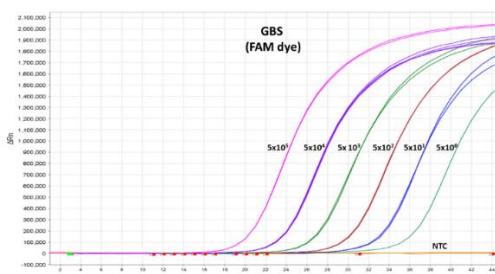
**Slika 1.** Detekcija ciljnih sekvenci GBS-a i ljudskog  $\beta$ -aktina (ACTB) u kliničkom pozitivnom uzorku. Siva krivulja: detekcija ciljne sekvence GBS-a putem kanala FAM. Crvena krivulja: detekcija ciljnog ljudskog  $\beta$ -aktina (ACTB) putem kanala VIC. Narančasta krivulja: kontrola bez predloška (NTC).

### 11.2. Granica detekcije (Limit of Detection, LoD) – Analitička osjetljivost

Analitička osjetljivost definirana je kao najniža koncentracija analita koja se može pouzdano detektirati s 95 % pouzdanosti. To je procijenjeno testiranjem nukleinskih kiselina GBS-a pri različitim brojevima kopija, dodanih u DNK izdvojen iz negativnih vaginalnih/perianalnih uzoraka, koristeći se trima različitim serijama kompleta uz tipične uvjete reakcije testiranja. Testovi su ponovljeni dvaput dnevno tijekom dva dana, čime je dobiveno 48 ponavljanja za svaku testiranu koncentraciju. Podaci su ukupno pokazali da NZYtech Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, detektira 5 kopija po reakciji ili 0,250 kopija/ $\mu$ l DNK GBS-a s pouzdanosću  $\geq 95\%$ . Prema tome, utvrđena je privremena granica detekcije (LoD) od 250 kopija/ml za GBS. Svi testovi izvedeni su s pomoću instrumenta za PCR u stvarnom vremenu Applied Biosystems™ QuantStudio 5, a analiza je izvedena s pomoću softvera instrumenta.

Granicu detekcije kompleta ponovno su procijenila dva različita rukovatelja s pomoću triju serija kompleta i tri alternativne metode izolacije nukleinskih kiselina, odnosno s pomoću kompleta NZY Mag Viral RNA/DNA Isolation Kit, IVD (MD0488, NZYtech), NZY Tissue gDNA Isolation Kit (MB135, NZYtech) i chemagic Pathogenic NA gDNA Kit H96 (PerkinElmer), u trima eksperimentima s ukupno 48 testova za svaki komplet za izolaciju. Podaci pokazuju da kada se nukleinske kiseline izdvoje s pomoću kompleta NZY Mag Viral RNA/DNA Isolation Kit, IVD (MD0488, NZYtech) ili kompleta NZY Tissue gDNA Isolation Kit (MB135, NZYtech), LoD je 250 kopija/ml, a kada se nukleinska kiselina izdvoji s pomoću kompleta chemagic Pathogenic NA gDNA Kit H96 (PerkinElmer), LoD je 500 kopija/ml.

Sposobnost detekcije patogena NZYtech Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, pri različitim koncentracijama (od  $5 \times 10^5$  do 5 kopija po reakciji) prikazana je na slici 2.



**Slika 2.** Osjetljivost NZYtech Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD. Dijagram amplifikacije (broj ciklusa u odnosu na fluorescenciju –  $\Delta Rn$ ) serijskih razrjeđenja DNK GBS-a u omjeru 1:10, od  $5 \times 10^5$  kopija do 5 kopija po reakciji putem kanala FAM. NTC, kontrola bez predloška (negativna kontrola).

### 11.3. Analitička specifičnost

#### 11.3.1 Križna reaktivnost (isključivost) i specifičnost

Uključivost i križna reaktivnost procijenjene su *in silico* analizom svih oligonukleotidnih proba i početnica sadržanih u kompletu u odnosu na patogene povezane s GBS-om odnosno normalne patogene koji uzrokuju infekciju sličnih simptoma. Početnice i probe testa provjerene su prema objavljenim sekvcencama genoma. Analiza *in silico* pokazala je da test specifično detektira GBS i da ne pokazuje reaktivnost s nepovezanim vrstama.

*In vitro* testovi križne reaktivnosti (isključivost) provedeni su kako bi se potvrdilo da NZYtech Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, ne reagira s drugim kolonizirajućim i patogenim mikroorganizmima koji se često nalaze u ljudskim vaginalnim/perianalnim uzorcima. Ovo ispitivanje provedeno je s pomoću komercijalnog panela vaginalnih patogena (NATtrol™ Vaginal Panel®, ZeptoMetrix®) i genomske DNK (DSMZ) odabranih mikroorganizama. Testovi su izvedeni s pomoću genomske DNK sljedećih 29 mikroorganizama: *Atopobium vaginæ* Z242, *Bacillus cereus* ATCC

14579, *Bifidobacterium breve* ATCC 15700, rekombinantni BVAB2, *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 i *Trichomonas vaginalis* soj Z070. Sva testiranja izvedena su s trima ponavljanjima s pomoću triju serija kompleta. Nijedan od testiranih patogena nije pokazao lažno pozitivan Real-time PCR signal. Testiran je i *Streptococcus agalactiae* Z019 te je sukladno očekivanjima dobiven pravi pozitivan Real-time PCR signal.

### 11.3.2 Ispitivanja mikrobne interferencije

Provđena su ispitivanja mikrobne interferencije kako bi se utvrdilo reagira li NZYtech Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, s drugim patogenima i/ili mikroorganizmima koji se mogu nalaziti u kliničkim uzorcima te tako generirati lažno negativne testne rezultate. Negativnim vaginalnim/perianalnim uzorcima dodane su nukleinske kiseline GBS-a s vrijednošću 3x LoD i visokom koncentracijom genomske DNK svakog potencijalno inhibitornog organizma. Test je izведен s pomoću triju serija kompleta i u uobičajenim uvjetima reakcije testiranja. Rezultati su pokazali da nije bilo interferencije sa sljedeća 24 mikroorganizma: *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 i *Streptococcus pyogenes* ATCC 12344.

### 11.3.3 Interferirajuće tvari

Učinkovitost NZYtech Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, procijenjena je s pomoću 25 potencijalno interferirajućih tvari koje mogu biti prisutne u vaginalnim/perianalnim uzorcima. Testovi su izvedeni s pomoću negativnih vaginalnih/perianalnih uzoraka u koje su dodani uzorci pozitivni na GBS s vrijednošću od 3x LoD i 30x LoD. Potencijalno interferirajuće tvari testirane su pri koncentracijama koje predstavljaju najviše razine očekivane u umjetnim vaginalnim/perianalnim uzorcima na temelju pregleda literature. Svi testovi izvedeni su tri puta s pomoću triju serija kompleta te su podaci uspoređeni s podacima dobivenim kontrolnim testom bez interferenata. U tablici u nastavku sažeto su prikazani podaci prikupljeni tijekom tih eksperimenata. Podaci su pokazali da nijedna od testiranih tvari nije interferirala s osjetljivošću detekcije GBS-a Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD.

| POTENCIJALNI INTERFERENT                    | AKTIVNI SASTOJCI   | KONAČNA KONCENTRACIJA U UZORKU | INTERFERENCIJA DA (D) ILI NE (N) |
|---|--|--------------------------------|----------------------------------|
| antacidi (Gaviscon®)                        | natrijev alginat (250 mg) + natrijev bikarbonat (133,5 mg) + kalcijev karbonat (80 mg) | 5 mg/ml                        | N                                |
| lijekovi protiv proljeva (Imodium®)         | loperamid hidroklorid (2 mg)   | 10 mg/ml                       | N                                |
| laksativi (Bekunis®)                        | sena (105 mg) + bisakodil (5 mg)   | 10 mg/ml                       | N                                |
| kreme/masti protiv hemoroida (Scheriproct®) | prednizolon (1,9mg/g) + cinhokain (5 mg/g)   | 10 % masenog udjela            | N                                |
| antacidi (Kompensan® Trieffect)             | natrijev aluminijev dihidroksid karbonat (340 mg) i dimetikon (30 mg)                  | 5 mg/ml                        | N                                |
| antimikrobnna sredstva (Gino-Canesten®)     | klotrimazol (10 mg/g)  | 10% masenog udjela             | N                                |
| lijekovi protiv proljeva (UL-250®)          | Saccharomyces boulardii (250 mg)   | 10 mg/m                        | N                                |
| laksativi (Microlax®)                       | natrijev citrat dihidrat (450 mg) + natrijev lauril sulfoacetat (45 mg)                | 5 % volumnog udjela            | N                                |
| antimikrobnna sredstva (Lomexin®)           | fentikonazolnitrat   | 10 % masenog udjela            | N                                |
| lijekovi (Progeffik®)                       | progesteron  | 5 mg/ml                        | N                                |
| protugljivična sredstva                     | flucitozin   | 5 mg/ml                        | N                                |
| protugljivična sredstva                     | amfotericinB (20 µg/ml)  | 10 % volumnog udjela           | N                                |
| seminalna tekućina                          | -  | 5 % volumnog udjela            | N*                               |
| puna krv                                    | glukoza, hormoni, enzimi, ioni, željezo, itd.  | 10 % volumnog udjela           | N                                |
| urin  | -  | 10 % volumnog udjela           | N                                |
| stolica                                     | -  | 1 % masenog udjela             | N*                               |
| proizvodi za pranje                         | saponificirana mast + silikati   | 10 mg/ml                       | N                                |
| topikalni proizvodi (Lauroderme®)           | cinkov oksid (23 mg/g) + salicilna kiselina (2 mg/g)                                   | 10 mg/ml                       | N                                |
| topikalni proizvodi (Bepanthene®)           | dekspantenol (50 mg/g)   | 10 % masenog udjela            | N                                |
| topikalni proizvodi (Halibut®)              | cinkov oksid (150 mg/g)  | 10 % masenog udjela            | N                                |
| topikalni proizvodi (ClimaCare®)            | hijaluronska kiselina + mlječna kiselina   | 10 % volumnog udjela           | N                                |
| topikalni proizvodi (WOMAN ISDIN®)          | glicerol (11 %), gliceril poliakrilat, poliakrilna kiselina                            | 10 % volumnog udjela           | N                                |
| proizvodi za pranje (BETADINE® Vaginal)     | povidon jod  | 10 % volumnog udjela           | N*                               |
| proizvodi za pranje                         | mlječna kiselina   | 10 % volumnog udjela           | N                                |
| apsolutni etanol                            | alkohol  | 5 % volumnog udjela            | N                                |

\* Veće koncentracije ovog interferenta mogu smanjiti osjetljivost kompleta ili dovesti do lažno negativnih rezultata.

#### 11.4. Preciznost

Preciznost testa za NZYtech Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, određena je ponovljenim testiranjem pozitivnih uzoraka koji predstavljaju dvije razine bakterijskog opterećenja, 3x LoD i 30x LoD kopija po reakciji, dodanih u DNK izdvojenu iz negativnih vaginalnih/perianalnih uzoraka, s pomoću triju različitih serija kompleta i u uobičajenim uvjetima reakcije testiranja. Mjerjenjem prosječne vrijednosti Cq, koeficijenta varijacije Cq i postotka detekcije replikata procijenjena je preciznost kako je opisano u nastavku za svaki slučaj. Podaci su sažeti u tablici koja je prikazana u nastavku.

##### Preciznost NZYtech Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD

| VARIJABLA                               | GBS (KOPIJA/REAKCIJA)      |         |
|---|----------------------------|---------|
|   | 3x LOD                     | 30x LOD |
| <b>PONOVLJIVOST</b>                     | n                          | 12      |
|   | Prosječna vrijednost Cq    | 35,23   |
|   | Koeficijent varijacije (%) | 2,01    |
|   | % detekcije replikata      | 100     |
| <b>DNEVNA OBNOVLJIVOST</b>              | n                          | 48      |
|   | Prosječna vrijednost Cq    | 34,85   |
|   | Koeficijent varijacije (%) | 2,40    |
|   | % detekcije replikata      | 100     |
| <b>OBNOVLJIVOST IZMEĐU SERIJA</b>       | n                          | 72      |
|   | Prosječna vrijednost Cq    | 35,03   |
|   | Koeficijent varijacije (%) | 2,42    |
|   | % detekcije replikata      | 100     |
| <b>OBNOVLJIVOST IZMEĐU RUKOVATELJA</b>  | n                          | 36      |
|   | Prosječna vrijednost Cq    | 35,35   |
|   | Koeficijent varijacije (%) | 2,09    |
|   | % detekcije replikata      | 100     |
| <b>OBNOVLJIVOST IZMEĐU INSTRUMENATA</b> | n                          | 60      |
|   | Prosječna vrijednost Cq    | 35,20   |
|   | Koeficijent varijacije (%) | 2,18    |
|   | % detekcije replikata      | 100     |

#### 11.4.1 Ponovljivost

Ponovljivost je procijenio jedan rukovatelj analizom 12 replikata svakog uzorka (3x LoD i 30x LoD kopija po reakciji), što je rezultiralo ukupnim brojem od 24 izvedena testa po cilojnjoj sekvenci.

#### 11.4.2 Dnevna obnovljivost

Dnevnu obnovljivost procijenio je jedan rukovatelj analizom 48 replikata svakog uzorka (3x LoD i 30x LoD kopija po reakciji) tijekom 4 dana, s 12 replikata za svaku koncentraciju po danu (ukupno je provedeno 96 testova).

#### 11.4.3 Obnovljivost između serija

Obnovljivost između serija procijenio je jedan rukovatelj analizom 72 replikata svakog uzorka (3x LoD i 30x LoD kopija po reakciji) s pomoću triju različitih serija kompleta i s po 24 replikata po seriji.

#### 11.4.4 Obnovljivost između rukovatelja

Obnovljivost između rukovatelja procijenjena je testiranjem 36 replikata svakog uzorka (3x LoD i 30x LoD kopija po reakciji), a procjenu su provela tri različita rukovatelja, s 12 replikata po rukovatelju.

#### 11.4.5 Obnovljivost između instrumenata

Obnovljivost između instrumenata izmjerio je jedan rukovatelj testiranjem 12 replikata svakog uzorka (3x LoD i 30x LoD kopija po reakciji) na šest različitih Real-time PCR instrumenata:

| PROIZVOĐAČ OPREME ZA PCR U STVARNOM VREMENU | MODEL PLATFORME ZA PCR U STVARNOM VREMENU |
|---|---|
| Applied Biosystem®                          | 7500 Fast                                 |
|   | StepOne Plus                              |
|   | QuantStudio™ 5                            |
| Roche®                                      | Instrument LightCycler 96™                |
| Bio-Rad®                                    | CFX Opus 96 Real-Time PCR                 |
|   | CFX96 Touch Real-Time PCR                 |

### 11.5. Klinička procjena

Klinička učinkovitost NZYtech Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, procijenjena je s pomoću 186 vaginalnih i/ili perianalnih brisova prikupljenih od trudnica i prethodno karakteriziranih rutinskom mikrobiološkom kulturom. Nukleinske kiseline izdvojene su s pomoću kompleta NZY Mag Viral RNA/DNA Isolation Kit, IVD (MD0488, NZYtech), a zatim amplificirane s pomoću Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD. Podaci su pokazali da je postignuta klinička osjetljivost (PPA) od 93,1 % i klinička specifičnost (NPA) od 97,0 % za sve pozitivne odnosno negativne testirane uzorke.

|  |                  | USPOREDNI TEST – MIKROBIOLOŠKA KULTURA |                  |        |
|--|------------------|--|------------------|--------|
|  |                  | Pozitivno na GBS                       | Negativno na GBS | Ukupno |
| GROUP B STREPTOCOCCUS REAL-TIME PCR KIT, IVD | Pozitivno na GBS | 81                                     | 3*               | 84     |
|  | Negativno na GBS | 6                                      | 96               | 102    |
|  | Ukupno           | 87                                     | 99               | 186    |

PPA (postotak pozitivnog podudaranja): 93,1 % za streptokok grupe B

NPA (postotak negativnog podudaranja): 97,0 % za streptokok grupe B

\* Moguće objašnjenje za te negativne uzorke kulture gubitak je vrijabilnosti bakterija tijekom prikupljanja i/ili transporta uzorka, pri čemu je nevijabilna bakterijska DNK ostala dostupna za amplifikaciju. Osim toga, ta razlika može se opravdati činjenicom da je Real-time PCR tehnika osjetljivija od metode kultura.

Nadalje, provedena je i usporedba kliničke učinkovitosti NZYtech Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, i usporednog PCR testa u stvarnom vremenu. Podaci su pokazali da je za sve pozitivne odnosno negativne testirane uzorke postignut postotak pozitivnog podudaranja (PPA) za kliničku osjetljivost od 98,8 % i postotak negativnog podudaranja (NPA) za kliničku specifičnost od 98,1 % .

|  |                  | USPOREDNI TEST – PCR KOMPLET U STVARNOM VREMENIU |                  |        |
|--|------------------|--|------------------|--------|
|  |                  | Pozitivno na GBS                                 | Negativno na GBS | Ukupno |
| GROUP B STREPTOCOCCUS REAL-TIME PCR KIT, IVD | Pozitivno na GBS | 82   | 2                | 84     |
|  | Negativno na GBS | 1  | 101              | 102    |
|  | Ukupno           | 83   | 103              | 186    |

PPA (postotak pozitivnog podudaranja): 98,8 % za streptokok grupe B

NPA (postotak negativnog podudaranja): 98,1 % za streptokok grupe B

Dodatno je procijenjena klinička učinkovitost kompleta pri uporabi dviju alternativnih metoda izdvajanja nukleinskih kiselina, tj. kompleta NZY Tissue gDNA Isolation Kit (MB135, NZYtech) i kompleta chemagic Pathogenic NA gDNA Kit H96 (PerkinElmer). Za NZY Tissue gDNA Isolation Kit (MB135, NZYtech) podaci su pokazali 100 %-tni PPA i 100 %-tni NPA u usporedbi s detekcijom nukleinskih kiselina izdvojenih s pomoću kompleta NZY Mag Viral RNA/DNA Isolation Kit, IVD (MD0488, NZYtech). Za chemagic Pathogenic NA gDNA Kit H96 (PerkinElmer) podaci su pokazali 95,8 %-tni PPA i 100 %-tni NPA. Sveukupno, rezultati pokazuju visoku osjetljivost i specifičnost za detekciju GBS-a s pomoću NZYtech Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD.

### 12. Kontrola kvalitete

Sve komponente NZYtech Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, testirane su prema gore opisanim protokolima. Dupleksni Real-time PCR sustav omogućuje detekciju ciljnih sekvenci opisanih za identifikaciju DNK GBS-a, kao i DNK ljudskog ACTB-a. Pozitivne amplifikacije uočene su za ciljne gene, pozitivne i unutarnje kontrole putem kanala FAM i HEX, u skladu s odgovarajućim reporterskim bojama skupa početnica/proba.

### 13. Tehnička podrška

Za tehničku podršku obratite se našem timu za tehničku podršku putem telefonskog broja: +351 (0) 21 364 35 14 ili e-pošte: info@nzytech.com.

### 14. Zaštitni znakovi i izjave o odricanju odgovornosti

Svi zaštitni znakovi koji se pojavljuju u ovom priručniku vlasništvo su odgovarajućih vlasnika.

## 15. Objasnjenje simbola

|                  |   |  |  |
|------------------|---|--|--|
| <b>IVD</b>       | <i>In vitro</i> dijagnostički medicinski proizvod |  | Pogledati upute za uporabu                                       |
| <b>REF</b>       | Kataloški broj                                    |  | Proizvođač   |
| <b>LOT</b>       | Šifra serije                                      |  | Upotrijebiti do  |
|                  | Ograničenje temperature                           |  | Dostatno za  |
| <b>CONTROL +</b> | Pozitivna kontrola                                |  | Držati podalje od sunčeve svjetlosti (mješavina početnica/proba) |
| <b>CONTROL -</b> | Negativna kontrola                                |  |  |

## 16. Izjava o sukladnosti

**Naziv proizvoda:** Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD

**Kataloški broj:** MD04941

**Namjena:** kvalitativna detekcija mikroorganizma *Streptococcus agalactiae*.

**Klasifikacija:** Ostalo (nije obuhvaćeno Prilogom II. ili nije namijenjeno za samotestiranje) u skladu s Direktivom EZ-a 98/79/EZ.

**Proizvođač:** NZYtech – Genes & Enzymes,

Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar Edifício E, R/C,

1649-038, Lisboa

Portugal

Mi, NZYtech, Lda – Genes & Enzymes, ovime izjavljujemo da je ovaj proizvod, na koji se odnosi ova izjava o sukladnosti, u skladu sa sljedećim normama i drugim normativnim dokumentima ISO 9001:2015 i ISO 13485:2016, te da je sukladan s odredbama Direktive 98/79/EZ o *in vitro* dijagnostičkim medicinskim proizvodima kako je prenesena u nacionalne zakone država članica Europske unije.

Tehnička datoteka proizvoda čuva se u tvrtki NZYtech, Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar – Edifício E, R/C, 1649-038 Lisboa, Portugal.



Joana Brás, PhD

Tehnički direktor

## 17. Reference

- Florindo C, Ferreira R, Borges V, Spellerberg B, Gomes JP, Borrego MJ. Selection of reference genes for real-time expression studies in *Streptococcus agalactiae*. *J Microbiol Methods*. 2012 Sep;90(3):220-7. doi: 10.1016/j.mimet.2012.05.011. Epub 2012 May 23. PMID: 22634000.
- CDC. +() Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease, Revised Guidelines. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, Vol.59.
- ACOG, A.C. (2011). Prevention of Early-Onset Group B Streptococcal Disease in Newborns. Committee Opinion, 1
- Paolucci M, Landini MP, Sambri V. How can the microbiologist help in diagnosing neonatal sepsis?. *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 provides reliable assessment of intrapartum carriage of group B *Streptococcus*. *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. Group B streptococcal disease in the mother and newborn-A review. *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.



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](http://www.nzytech.com)