

For use with the Revogene®

REF 410200

IVD For *in vitro* Diagnostic Use



Rx Only

INTENDED USE

The Revogene® GBS LB assay performed on the Revogene instrument is a qualitative *in vitro* diagnostic test designed to detect Group B *Streptococcus* (GBS) DNA from 18-24 hour LIM broth enrichments of vaginal/rectal specimen swabs obtained from pregnant women. The Revogene GBS LB assay utilizes automated sample processing and real-time polymerase chain reaction (PCR) to detect a *cbf* gene sequence specific to the *Streptococcus agalactiae* genome.

The Revogene GBS LB assay is indicated for the identification of antepartum GBS colonization and does not provide susceptibility results. It is not intended to diagnose or monitor treatment of GBS infection. Culture isolates are needed for performing susceptibility testing as recommended for penicillin-allergic women.

SUMMARY AND EXPLANATION

Group B *Streptococcus* is a Gram-positive bacterium commonly found in the gastrointestinal, genital, and urinary tract of healthy adults. Approximately 10-30% of all pregnant women are colonized with GBS in the vagina or rectum.¹

GBS colonized mothers typically show no symptoms or health effects. However, this type of bacterial infection is associated with serious illnesses in newborns from women who are colonized with the microorganism. This type of disease in newborns frequently causes sepsis (blood infection), pneumonia (lungs infection), and sometimes meningitis (fluid and lining around the brain infection). The fatality rate for infants with early on-set Group B Streptococcal disease (during the first week of life) is currently estimated at 4% to 6%.¹ Surviving infants may experience long-term disabilities including hearing loss, vision loss or mental retardation.²

Transmission of GBS mainly occurs from the mother to her newborn during labor and birth (*intrapartum*).² Screening for GBS colonization in antepartum women between 35 and 37 weeks' gestation, followed by *intrapartum* prophylactic antibiotic treatment for women with positive colonization status, has proven to be an effective mechanism for prevention of perinatal Group B Streptococcal disease. As colonization may be transient, intermittent or persistent throughout pregnancy, screening is most effective when specimens are collected no more than five weeks (35-37 weeks' gestation) prior to delivery and performed after enrichment with selective broth medium.¹

Most GBS testing is performed by culture and can take up to 48 hours for definitive identification of GBS following the initial 18 to 24 hours of incubation of vaginal/rectal swab in a selective broth medium.

The GBS LB assay can provide results from up to eight specimens in approximately one hour once the LIM broth culture sample is available. The assay minimizes operator intervention from the time the single-use disposable microfluidic cartridge (PIE) containing the sample is placed into the Revogene carousel until results are available. The assay minimizes operator intervention from the time the single-use disposable microfluidic cartridge (PIE) containing the sample is placed into the Revogene carousel until results are available.

PRINCIPLES OF THE PROCEDURE

The Revogene automates sample homogenization, sample dilution, cell lysis, DNA amplification, and detection of the amplified PCR products. User intervention is only required for discharging the patient specimen into the Sample Buffer Tube (SBT), transferring the sample into the PIE, and loading/unloading the PIEs into the Revogene carousel.

Each PIE is a completely integrated closed device in which a sample is dispensed and processed through different microfluidic chambers and channels which allow for the sample processing (i.e. homogenization, sample dilution and cell lysis). The liquid from a single sample is transferred by centrifugation from one chamber to the next in sequence and all reagents specific for the PCR reaction are incorporated and dried within the PCR well(s). A Process Control (PrC) is also incorporated into each PIE to control sample processing and amplification steps (Figure 1). The PrC allows for the monitoring of potentially inhibitory substances as well as microfluidic, instrument or reagent failure. No operator intervention is necessary once a PIE is loaded into the Revogene. The amplified products are detected in real time using target-specific TaqMan® chemistry- based probes.

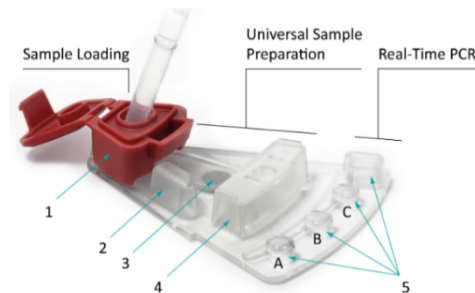


Figure 1 Top View of an example of PIE
1: Sample Loading chamber, 2: Overflow chamber,
3: Homogenization chamber, 4: Dilution/Lysis chamber,
5: Three PCR wells (A to C from left to right) and one Waste Chamber (at the right end).

The Revogene can process from one up to a maximum of eight samples simultaneously in the same run. The carousel must contain eight PIEs to maintain thermodynamic balance within the run. On completion of a run, the results are interpolated by the system from measured fluorescent signals and embedded calculation algorithms. Results that are displayed on the touchscreen may be printed, transferred and/or stored by the user using the USB port or the connectivity option.

REAGENTS AND MATERIALS

The GBS LB kit contains sufficient reagents and material to process 24 specimens. The kit contains the following materials:

- 24 **Sample Buffer Tubes (SBT)**: Barcode-labeled tube containing TE 1X buffered solution (Tris-HCl pH 8.0/EDTA.Na₂) as a dilution and preservation buffer for sample.
- 24 **Disposable Transfer Tools (DTT)**: DTT consists of a single-use transfer pipette for transferring the sample from the SBT to the PIE.
- 24 individual pouches containing one (1) **GBS LB PIE**: Integrated device which comprises dried reagents allowing sample process and real-time PCR steps for GBS amplification and detection. Each PIE contains PrC, PrC-specific primers and probe, GBS *cbf* gene-specific primers and probe, dNTPs, buffer and DNA polymerase.

MATERIALS/EQUIPMENTS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. Revogene® (cat# 610210)
2. Disposable gloves; powderless
3. Vortex Mixer (cat# 131132 or an equivalent)
4. Sample rack (cat# 132539; optional)
5. Swab compatible with vaginal/rectal specimen collection and recommended transport media (e.g. Liquid Stuart or Liquid Amies)
6. Selective enrichment LIM broth (Todd Hewitt broth supplemented with colistin (10 µg/mL) and nalidixic acid (15 µg/mL) (Alere cat# L57 or equivalent)
7. Calibrated micropipette (P20 recommended, VWR cat# 89079-964 or equivalent)
8. DNase/RNase-free, aerosol resistant extended length micropipette tips (Sarstedt cat# 70.1189.215 or equivalent)
9. MOCK PIE (cat# 610208; optional)

WARNING AND PRECAUTIONS

1. This product can only be used with the Revogene.
2. Do not use the kit if the label that seals the outer box is broken upon arrival.
3. Do not use GBS LB reagents if the protective pouches are open or broken upon arrival.
4. Do not interchange DTT, SBT and PIE between kit lots.
5. Each single-use GBS LB PIE and DTT are used to process one sample at a time. Do not reuse PIE and DTT.
6. Always handle specimens as if they are infectious and in accordance with safe laboratory procedures such as those described in Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories⁴ and in CLSI Document M29-A4.⁵
7. Wear disposable gloves while handling patient specimens and thoroughly wash hands afterwards.
8. The GBS LB PIE contains dried reagents. The protective pouch should not be opened until ready to perform the test.
9. Dispose of unused reagents and waste in accordance with country, federal, provincial, state and local regulations.
10. Do not open or break apart the PIE after use. The cap and the seals in the PIE prevent contamination with amplification products and/or infectious particles.
11. Do not use a PIE that has been dropped, shaken or inverted after the sample has been loaded as this may cause invalid results.
12. The GBS LB assay does not provide susceptibility results. Additional time is required to culture isolates and perform susceptibility testing as recommended for penicillin-allergic women.
13. Do not use kits or kit components that have passed their stated expiration date(s).
14. Do not refrigerate the loaded PIE.

HAZARD AND PRECAUTIONARY STATEMENTS

There are no known hazards associated with this product.

STORAGE AND STABILITY

1. Vaginal/rectal swab specimens should be stored according to established guidelines.¹
2. Enriched LIM broth can be kept at 25 C for up to 2 days, or at 2-8 C for up to 3 days.
3. Store the GBS LB kit at 2-25 C. The expiration date is indicated on the kit box label. Do not open a pouch until ready to perform testing. Use the PIE within 1 hour after opening the pouch.
4. Inoculated SBT can be kept at 25 C for up to 3 days, or at 2-8 C for up to 5 days.

INSTRUCTION FOR USE

SPECIMEN COLLECTION AND TRANSPORT

Specimen type: Vaginal/rectal swab taken from antepartum woman at 35-37 weeks of gestation.

Vaginal/rectal sample collection from the same patient should be performed in accordance with published guidelines for collection of clinical specimens for culture of GBS.¹

1. Collect the vaginal-rectal swab according to CDC recommendations.¹ Briefly:
 - a. Swab the lower vagina (vaginal introitus), followed by the rectum (i.e. insert swab through the anal sphincter) using the same swab or two different swabs. Take care not to mix stool, water, urine or soap in the sample.
 - b. Place the swab(s) into a non-nutritive transport medium (e.g. Liquid Stuart or Liquid Amies) right after sample collection. If vaginal-rectal swabs are collected separately from the same patient, both swabs can be placed in the same transport container.
2. Label the transport container with the sample or patient ID and transport to the laboratory for testing (refer to the "Storage and Stability" section).

SPECIMEN ENRICHMENT

3. Remove vaginal/rectal swab(s) from the transport medium and inoculate into selective enrichment LIM broth.
4. Incubate inoculated LIM broth at 35-37 C for 18-24 hours at ambient air or 5% CO₂.
5. Enriched LIM broth can be kept at 25 C for up to 2 days or at 2-8 C for up to 3 days.
6. Proceed to Specimen Preparation.

SPECIMEN PREPARATION

NOTE 1: Start the test within 1 hour after opening the pouch containing the PIE.

1. For each specimen to be tested, obtain one SBT from the kit box.
2. Label the SBT with the appropriate specimen identification without obscuring or writing over the label barcodes.
3. Vortex the enriched LIM broth specimen at high speed for 15 seconds.
4. Using a calibrated micropipette and an aerosol resistant extended length tip, aspirate 15 µL of the enriched LIM broth specimen.
5. Remove the cap from the SBT and dispense the enriched specimen aliquot into the SBT, taking care not to aerosolize the specimen. Pipet liquid up and down to ensure complete transfer of the specimen aliquot.
6. Close the SBT cap tightly, and place it on the Sample rack, if used. Make sure that only one SBT is open at once.
7. Prepare any additional specimens for testing by repeating steps 1 to 6 then proceed to step 8.
8. Mix the SBT for 15 seconds at maximum speed using a vortex mixer.
9. Unseal the PIE pouch and remove the PIE.
10. Obtain one DTT from the kit box and aspirate the SB by squeezing the entire bulb. The liquid level into the DTT must be anywhere between the two marks (Figure 2). If the liquid level is not between the two marks, discharge completely the SB in the SBT and repeat step 10.
11. Discharge completely the SB into the sample injection chamber of the PIE (Figure 1).
12. Close the cap of the PIE tightly, making sure the cap seals the chamber completely. Place the PIE on the Sample rack, if used. Do not refrigerate the loaded PIE.
13. Prepare all additional samples for testing by repeating steps 8 to 11, then proceed to step 13, making sure only one PIE is open at once.
14. Store the enriched LIM broth specimens and the inoculated SBT according to the "Storage and Stability" section.

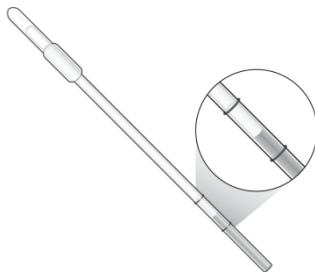


Figure 2.
Representation of an appropriate Sample Buffer (SB) level using the Disposable Transfer Tool (DTT)

REVOGENE SYSTEM OPERATION

NOTE 1: A maximum of eight samples can be processed simultaneously in a single run (including external controls).

NOTE 2: Each run must be performed with eight PIEs in the Revogene. When less than eight samples are processed, fill the empty places with MOCK PIEs*.

1. Ensure that the Revogene is powered on. The software will launch automatically. Refer to the Revogene Operator's Manual³ for further information regarding instrument set-up and operation.
2. Enter Username and Password and press **<Login>**.
3. Press the **<Setup Run>** menu.
4. Enter the sample identification number using either the barcode scanner or manual entry.
5. Enter the SBT and PIE barcodes manually or using the barcode scanner by gently positioning the PIE almost vertically in front of the scanner. Handle the PIE carefully without shaking or dropping it.
6. (Optional) Enter the patient identification number using either the barcode scanner or manual entry.
7. (Optional) Press **<Add Comments>** and type a comment.
8. Insert the PE into the instrument, at any position of the carousel, and press **<OK>**. The software will automatically associated sample and SBT to the correct PIE.
9. To add another sample, press **<+Add>** and repeat steps 4 to 8.
10. When all samples are placed on the carousel, press **<Next>**.
11. Scan the retention ring and proceed to its installation. Close the instrument lid.
12. Initiate the test run by pressing **<Start>**.

*If MOCK PIEs are not available, use assay PIEs filled with SB or with External Controls.

VIEWING AND EXPORTING RESULTS

1. Once the run is completed, the lid unlocks automatically.
2. If the Revogene has logged out, re-enter Username and Password and press **<Login>**.
3. Press the **<Results>** menu to access test results.
4. Press **<Last Run>** to see the latest test results.
5. From the **<Last Run>** menu, select samples for which results report(s) has (have) to be exported. All samples can be selected at one time by clicking the first box above.
6. Press **<Export>** and save where appropriate (e.g. USB key).
7. Remove the retention ring and PIEs from the Revogene.

NOTE: When Indeterminate (IND) or Unresolved (UNR) results are obtained, or when an external control failure occurs, a repeat test from the prepared SBT must be performed within the specified timeframe (refer to the Repeat Testing Procedure section).

REPEAT TESTING PROCEDURE

NOTE: Only one repeat testing from the original corresponding enriched LIM broth specimen or the corresponding inoculated SBT is allowed.

1. If retesting is performed directly from the remaining enriched LIM broth specimen stored at 25 C for up to 2 days, or at 2-8 C for up to 3 days, refer to steps 1 to 11 of the Specimen Preparation section. Then follow the Revogene System Operation section.
2. If retesting is performed from the inoculated SBT stored at 25 C for up to 3 days, or at 2-8 C for up to 5 days following sample preparation, vortex the sample for 15 seconds at maximum speed using a vortex mixer, and follow steps 10 and 11 of the Specimen Preparation section for each sample. Then follow the Revogene System Operation section.













QUALITY CONTROL

Quality control procedures monitor the accuracy and precision of the analytical process. Each laboratory must establish the number, type and frequency of testing control materials per applicable regulations or accrediting agencies. The procedure described below may be employed, if appropriate, based on local policies and procedures.

1. Each PIE contains a Process Control (PrC) that monitors for sample homogenization, sample dilution, cell lysis, DNA amplification inhibition and assay reagents failure.
2. Good laboratory practice recommends the use of control materials. Users should follow the appropriate guidelines concerning running of external quality controls. It is recommended that one Positive External Control and one Negative External Control should be run at least on a daily basis until adequate process validation is achieved on the Revogene in each laboratory setting. External control materials are not provided by Meridian Bioscience, Inc.
3. Commercial control material (e.g. *Streptococcus agalactiae* ATCC® 13813) can be used as a Positive External Control. It is recommended that bacterial strains be freshly prepared in LIM broth. Transfer a 15 µL aliquot of a 18-24 hours culture in LIM broth into a SBT and proceed from step 6 of the Specimen Preparation section.
4. Pure LIM broth is recommended for use as a Negative External Control. Transfer a 15 µL aliquot of LIM broth into an SBT and proceed from step 6 of the Specimen Preparation section.
5. Separate DTT, SBT and PIE must be used for each external control reagent.

RESULTS INTERPRETATION

The results are computed by the Revogene from measured fluorescent signals and embedded calculation algorithms and are available on the Results window of the Revogene. Possible results are:

Sample	Symbol displayed on user screen	Overall reported result	Interpretation
Patient Specimen		Positive	Sample contains GBS target DNA.
		Negative	No GBS target DNA detected or number of organisms may be below the limit of detection of the assay.
		Indeterminate	No reportable result due to possible Revogene detection error during the assay treatment, or the data analysis, or if the run is interrupted by the user. Repeat testing must be performed using the original corresponding enriched LIM broth specimen or corresponding inoculated SBT within the timeframe defined above.
		Unresolved	Amplification/detection failure for the Process Control as well as for the GBS target. Could be caused by inhibitory specimens, microfluidic or reagent failure. Repeat testing must be performed using the original corresponding enriched LIM broth specimen or corresponding inoculated SBT within the timeframe defined above.
Positive External Control		Positive	Valid Positive External Control result.
		Negative	Incorrect Positive External Control result. The run is invalid. Repeat testing must be performed for all samples of the run, using the original corresponding enriched LIM broth specimen or corresponding inoculated SBT with a new set of external controls within the timeframe defined above.
		Indeterminate	Incorrect Positive External Control result. No reportable result due to possible Revogene detection error during the assay treatment, or the data analysis, or if the run is interrupted by the user. The run is invalid. Repeat testing must be performed for all samples of the run, using the original corresponding enriched LIM broth specimens or corresponding inoculated SBTs with a new set of external controls within the timeframe defined above.
		Unresolved	Incorrect Positive External Control result. Amplification/detection failure for the Process Control as well as for the GBS target. Could be caused by inhibitory specimens, microfluidic or reagent failure. The run is invalid. Repeat testing must be performed for all samples of the run, using the original corresponding enriched LIM broth specimens or corresponding inoculated SBTs with a new set of external controls within the timeframe defined above.
Negative External Control		Positive	Incorrect Negative External Control result due to specimen handling and/or a contamination problem. The run is invalid. Repeat testing must be performed for all samples of the run, using the original corresponding enriched LIM broth specimens or corresponding inoculated SBTs with a new set of external controls within the timeframe defined above.
		Negative	Valid Negative External Control result.
		Indeterminate	Incorrect Negative External Control result. No reportable result due to possible Revogene detection error during the assay treatment, or the data analysis, or if the run is interrupted by the user. The run is invalid. Repeat testing must be performed for all samples of the run, using the original corresponding enriched LIM broth specimens or corresponding inoculated SBTs with a new set of external controls within the timeframe defined above.
		Unresolved	Incorrect Negative External Control result. Amplification/detection failure for the Process Control. Could be caused by inhibitory specimens, microfluidic or reagent failure. The run is invalid. Repeat testing must be performed for all samples of the run, using the original corresponding enriched LIM broth specimens or corresponding inoculated SBTs with a new set of external controls within the timeframe defined above.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- The GBS LB assay can only be used with the Revogene by trained personnel.
- A positive test result does not necessarily indicate the presence of viable organisms. It is, however, indicative for the presence of GBS DNA.
- Performance of the GBS LB assay was established with vaginal/rectal swab specimens collected from antepartum women, transported in non-nutritive medium (e.g., Liquid Stuart) and enriched in selective LIM broth. Use of the GBS LB assay for clinical specimen types other than those specified has not been evaluated and performance characteristics are not established.
- Cervical, perianal, perirectal or perineal specimens are not acceptable, and a speculum should not be used for culture collection.
- The GBS LB assay does not provide susceptibility results. Antimicrobial susceptibility testing should be performed on antenatal GBS isolates from penicillin-allergic women at high risk for anaphylaxis.
- The use of enrichment broths different than LIM broth was not evaluated.
- Erroneous test results may occur from improper specimen collection, handling or storage, technical error, or sample mix-up. Careful compliance to the instructions in this insert and to established guidelines is necessary to avoid erroneous results.
- Erroneous assay results may occur if a PIE cap is incorrectly closed.
- While there are no known strains/isolates of GBS lacking the *cfb* gene, the occurrence of such a strain would lead to an erroneous result (false negative) using the GBS LB assay.
- Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus* can potentially inhibit the detection of GBS if individually present at > 10⁴ CFU/mL of SB.
- Potentially inhibitory effect of fecal fat has not been evaluated.
- A combination of loperamide hydrochloride (e.g. Imodium®), bismuth subsalicylate (e.g. Pepto-Bismol™) and sennosides (e.g. Senokot®), while highly unlikely, may potentially inhibit the detection of GBS when these substances are present in SBT at concentrations of 0.023 µg/mL, 0.675 µg/mL and 0.011 µg/mL respectively.
- Mutations or polymorphisms in primer- or probe-binding regions may affect detection of GBS *cfb* gene variants, resulting in a false negative result with the GBS LB assay.
- Results from the GBS LB assay should be used as an adjunct to clinical observations and other information available to the physician.
- A negative result does not rule out the possibility of GBS colonization. False negative results may occur when the GBS concentration is below limit of detection of the assay.
- The test is not intended to differentiate carriers of GBS from those with streptococcal disease.
- Test results may be affected by concurrent antimicrobial therapy as GBS DNA may continue to be detected.

EXPECTED VALUES

In the investigational study for the Revogene GBS LB assay, a total of 771 reportable results from specimens compliant at the culture and PCR levels were obtained from 4 geographically diverse regions. Overall, GBS prevalence rate was 22.0 % (170/771) with a 95 % CI of 19.3 – 25.1 %.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

CLINICAL PERFORMANCE

Performance of the GBS LB assay was established during a prospective investigational study involving two Canadian and two American sites using the Revogene.

Prospectively collected and tested specimens consisted of excess leftover deidentified enriched LIM broth specimens collected for standard of care antepartum GBS testing from women at 35-37 weeks of gestation. The leftover LIM broth was used for the GBS LB assay and for the reference culture testing performed on each site.

The GBS LB assay performance was compared to a composite reference method consisting of LIM broth enrichment of the vaginal/rectal swab followed by a subculture on sheep blood agar plates and biochemical identification of GBS. All specimens with a negative bacterial culture result were re-tested at a single independent core laboratory using the same standard operating procedures required for bacterial culture.

A total of 839 specimens were enrolled in the study. Of those, 63 specimens were regarded as noncompliant per reference method and/or GBS LB assay protocol criteria, 1 specimen was regarded as noncompliant in terms of transport and storage conditions and 4 specimens were regarded as noncompliant due to missing test results. Two (2) fully compliant specimens gave final non-reportable PCR results. A total of 771 specimen results were used to determine the clinical performance of the GBS LB assay in comparison to the composite reference method (Tables 1 and 2).

Overall performance characteristics of the GBS LB assay demonstrated 95.9% sensitivity (163/170, 95%CI 91.7%- 98.0%) and 95.5% specificity (574/601), 95%CI 93.5% - 96.9%) in comparison to the composite reference method. Of the 812 specimens tested with the GBS LB assay that were compliant at the specimen and PCR level, 6 (0.74%) were reported as Unresolved after initial testing. The unresolved rate after repeat testing was 0.25% (2/812).

Out of the same 812 specimens tested with the GBS LB assay, 12 (1.48%) were initially reported as Indeterminate.; 6 from a run with an external control failure and 6 from an incomplete run. No result remained Indeterminate upon repeat testing.

Table 1. Overall performance characteristics (all sites combined) of the GBS LB assay in comparison to the Composite Reference Method.

Overall performance		Composite Reference Method		Total
GBS LB assay	Positive	Positive	Negative	
	Negative	163	27 ^B	190
	Total	7A	574	581
		170	601	771

Sensitivity: 95.9% (95%CI: 91.7 - 98.0 %)
Specificity: 95.5% (95%CI: 93.5 - 96.9 %)

^A 5 out of 7 false negative Revogene GBS LB results were tested on a FDA-cleared molecular device and yielded negative results

^B 10 out 27 false positive Revogene GBS LB results were tested on a FDA-cleared molecular device and yielded positive results.

Table 2. Summary of performance characteristics of the GBS LB assay per site

Site	Sensitivity	Specificity	Prevalence ¹
1	87.8% (36/41)	92.8% (142/153)	21.1% (41/194)
2	98.0% (48/49)	97.5% (194/199)	19.8% (49/248)
3	100% (43/43)	97.0% (164/169)	20.3% (43/212)
4	97.3% (36/37)	92.5% (74/80)	31.6% (37/117)
Total	95.9% (163/170)	95.5% (574/601)	22.0% (170/771)

¹Prevalence was calculated with samples compliant at culture reference method and Revogene GBS LB assay levels.

ANALYTICAL SENSITIVITY

The analytical sensitivity (Limit of Detection or LoD) of the GBS LB assay was determined using clinical LIM broth matrix previously tested negative for GBS and spiked with different concentrations of GBS bacterial suspensions. Two strains of GBS (ATCC 12403 and ATCC 13813) were tested in 24 replicates per concentration by 2 operators using 3 different lots of GBS LB kits. The LoD is defined as the lowest concentration at which 95% of all replicates tested positive. The LoD of the GBS LB assay with the two strains tested ranged from 200 to 375 CFU/mL of SB (Table 3).

Table 3. LoD of the GBS LB assay

GBS strain (ATCC number)	LoD (CFU/mL of SB)
Serotype III (ATCC 12403)	375
Non-hemolytic (ATCC 13813)	200

INCLUSIVITY

Inclusivity of the GBS LB assay was determined for 12 strains of GBS representing 11 known serotypes and 1 non-hemolytic strain. Each GBS strain was tested using a quantitated culture spiked in a GBS-negative clinical LIM broth matrix. Twenty-four replicates per concentration per strain were tested using 3 different lots of GBS LB kits. The lowest concentrations at which strains reached a positivity rate of 100% are summarized in Table 4.

Table 4. Organisms tested for inclusivity with the Revogene GBS LB assay.

GBS strain	Test concentration	Test concentration (CFU/mL of SB)	Positivity rate
Serotype Ia (ATCC 12400)	< 2	735	100%
Serotype Ib (ATCC 51487)	15	5,625	100%
Serotype Ic (ATCC 27591)	5	1,875	100%
Serotype II (ATCC 12973)	< 2	735	100%
Serotype III (ATCC 12403)	1	375	100%
Serotype IV (ATCC 49446)	7	2,625	100%
Serotype V (ATCC BAA-611)	5	1,875	100%
Serotype VI (ATCC BAA-2671)	3	1,125	100%
Serotype VII (ATCC BAA-2670)	7	2,625	100%
Serotype VIII (ATCC BAA-2669)	10	3,750	100%
Serotype IX (ATCC BAA-2668)	3	1,125	100%
Non-hemolytic (ATCC 13813)	1.33	500	100%

*LoD of strain ATCC 12403 determined to be 375 CFU/mL of SB.

In addition, an *in silico* analysis was performed to assess inclusivity of the GBS LB assay regarding 36 additional GBS strains listed in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database of October 20th, 2016. The alignment results showed no mismatch with the selected sequences. The analysis predicted the detection of all these GBS strains.

CROSS-REACTIVITY

A cross-reactivity study was performed to assess unintended reactivity of the GBS LB assay with high loads of organisms phylogenetically related to GBS or present in urogenital flora and intestinal tract and not targeted by the test. The study included 64 bacteria, 4 yeasts, 4 viruses, 2 parasites and human DNA (Table 5). Bacteria and yeasts were tested at a load of $\geq 10^6$ CFU/mL of SB. Nucleic acids from viruses, parasites and human DNA were tested at a load of $\geq 10^5$ DNA or RNA cp/mL of SB. Each organism was tested using a quantitated culture or nucleic acid solution spiked in a GBS-negative clinical LIM broth matrix. Three replicates per organism were tested using 3 different lots of GBS LB kits.

Under the conditions of the study, none of the organisms or nucleic acids tested were detected by the GBS LB assay.

Table 5. List of organisms tested *in vitro* for cross-reactivity with the GBS LB assay

Bacteria	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> (gDNA)
<i>Aerococcus viridans</i>	<i>Mycoplasma hominis</i> (gDNA)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Prevotella melaninogenica</i>
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
<i>Bifidobacterium breve</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Brevibacterium linens</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Dublin</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i> (gDNA)	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Minneapolis</i>
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>typhimurium</i>
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Newport</i>
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Corynebacterium genitalium</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (Cowan)
<i>Enterococcus avium</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Enterococcus dispar</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
<i>Enterococcus durans</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Streptococcus bovis</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>disgalactiae</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>equisimilis</i>
<i>Escherichia fergusonii</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>
<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>
<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Streptococcus uberis</i>
<i>Lactobacillus delbreuckii</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i> (gDNA)
<i>Lactobacillus jensenii</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
Yeasts	
<i>Candida albicans</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida tropicalis</i>
Viruses	
<i>HerpesSimplexVirus-1</i> (gDNA)	<i>Norovirus</i> GII (RNA)
<i>HerpesSimplexVirus-2</i> (gDNA)	Human Papillomavirus (HPV) (gDNA)
Parasites	
<i>Blastocystis hominis</i> (gDNA)	<i>Trichomonas vaginalis</i> (gDNA)
Human DNA	
Human DNA (gDNA)	

In addition, an *in silico* analysis was performed to assess the risk of cross-reactivity of the GBS LB assay towards 62 additional organisms potentially found in urogenital flora and intestinal tract (Table 6). None of the organisms are presumed to cross-react with the GBS LB assay based on the high degree of mismatches between the selected NCBI gene sequences and the test primers and probes.

Table 6. List of organisms tested *in silico* for cross-reactivity with the GBS LB assay

Bacteria	
<i>Abiotrophia defectiva</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Mobiluncus mulieris</i>
<i>Campylobacter fetus</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>
<i>Chromobacterium violaceum</i>	<i>Moraxella lacunata</i>
<i>Clostridium bifementans</i>	<i>Moraxella osloensis</i>
<i>Clostridium butyricum</i>	<i>Morganella morganii</i>
<i>Clostridium novyi</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
<i>Clostridium septicum</i>	<i>Neisseria flava</i>
<i>Clostridium sordelli</i>	<i>Neisseria flavescens</i>
<i>Clostridium sporogenes</i>	<i>Neisseria lactamica</i>
<i>Corynebacterium urealyticum</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>
<i>Corynebacterium xerosis</i>	<i>Neisseria perflava</i>
<i>Deinococcus radiodurans</i>	<i>Plesiomonas shigelloides</i>
<i>Derrxia gummosa</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>Eikenella corrodens</i>	<i>Providencia stuartii</i>
<i>Enterococcus gallinarum</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Gemella haemolysans</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>Haemophilus ducreyi</i>	<i>Rhodospirillum rubrum</i>
<i>Haemophilus influenza</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>
<i>Haemophilus influenza type B</i>	<i>Shigella boydii</i>
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Kingella denitrificans</i>	<i>Staphylococcus simulans</i>
<i>Kingella kingae</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Streptococcus gordonii</i>
<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Streptococcus mutans</i>	
Mold/Yeast	
<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Viruses	
<i>Adenovirus 40</i>	<i>Echovirus</i>
<i>Adenovirus 41</i>	<i>Epstein-Barr Virus</i>
<i>BK virus</i>	<i>Rotavirus</i>
<i>Coxsackievirus</i>	

INTERFERING ORGANISMS

A study was conducted to assess the potentially inhibitory effect of 29 organisms that may be present in urogenital flora and intestinal tract and which are not targeted by the test. Selection of organisms was based on their prevalence in the vaginal/rectal flora. The *Enterococcus* strains represent the highest interference risk due to their prevalence in the rectal flora as well as their capacity to grow in LIM broth. Other organisms present a low risk of being found at high loads in the specimen since selective LIM broth enrichment inhibits their growth and the loads of those organisms cannot increase much following sampling. Each organism or nucleic acid solution was diluted to reach a final concentration of 10⁶ CFU/mL or cp/mL of SB, except *Escherichia coli* ATCC 11775, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Trichomonas vaginalis* ATCC 30001 and *Mycoplasma genitalium* ATCC BAA-2641S, which were tested at 10⁵ CFU/mL or cp/mL of SB. Fifteen (15) µL of a GBS dilution prepared in a negative clinical LIM broth matrix to reach a final concentration of 735 CFU/mL of SB was added to the SBT. The 29 organisms included in the study are presented in Table 7.

Table 7. List of organisms tested for interference with the GBS LB assay

Organisms	
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Dublin</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Corynebacterium genitalium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i> (gDNA)	<i>Trichomonas vaginalis</i> (gDNA)
<i>Herpes Simplex Virus-1</i> (gDNA)	<i>Mycoplasma genitalium</i> (gDNA)
Human Papillomavirus (HPV) (gDNA)	

None of the 29 organisms present at ≥ 10⁵ CFU/mL or cp/mL of SB in the specimen interfered with detection of PrC. Among the 29 organisms tested, only 3 showed a potentially inhibitory effect on detection of GBS (Table 8). Inhibition from *E. faecalis*, *E. faecium* and *L. acidophilus* was observed at concentrations of > 10⁵, > 10⁴ and > 10⁴ CFU/mL of SB respectively.

Table 8. Organisms interfering with the GBS LB assay.

Organism (ATCC)	Concentration tested (CFU/mL of SB)	GBS positivity rate (positive / total)	
		Non-hemolytic	Serotype III
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 19433)	106	66.7% (2/3)	33.3% (1/3)
	105	100% (3/3)	100% (3/3)
	106	100% (3/3)	66.7% (2/3)
<i>Enterococcus faecium</i> (ATCC 19434)	105	N/D*	33.3% (1/3)
	104	N/D	100% (3/3)
	105	100% (3/3)	66.7% (2/3)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> (ATCC 4356)	104	N/D	100% (3/3)

*N/D: Not determined because there was no interference at the highest concentration.

INTERFERING SUBSTANCES

A study was conducted to assess the potentially inhibitory effect of 22 exogenous and 9 endogenous substances that may be present in urogenital flora and intestinal tract. GBS negative and GBS positive samples at 735 CFU/mL of SB were tested in presence of a negative clinical LIM broth matrix with the highest physiologically relevant concentration of substance. The 31 substances tested in 11 groups are presented in Table 9.

Results demonstrated no reportable interference on PrC. Only the combination of loperamide hydrochloride (e.g. Imodium®), bismuth subsalicylate (e.g. Pepto-Bismol™) and sennosides (e.g. Senokot®) at concentrations of 0.023 µg/mL, 0.675 µg/mL and 0.011 µg/mL SB respectively showed a potentially inhibitory effect on detection of GBS. When tested individually, these substances showed no reportable interference with the GBS LB assay.

Table 9. List of exogenous and endogenous substances tested with the GBS LB assay.

Exogenous substances			
Group	Substance (commercial name)	Concentration in SBT ¹	Results ²
A	Fungicide (Micatin [®])	0.023% W/V	NI
	Hemorrhoid cooling gel (Preparation H [®])	0.023% W/V	
	Lubricating gel (K-Y [®] Personal Lubricant)	0.023% W/V	
	Body powder (Vagisil [®] deodorant powder)	0.023% W/V	
	Moisturizing lotion (Aveeno [®] moisturizing lotion)	0.023% W/V	
	Body oil (Neutrogena [®] Body oil)	0.023% V/V	
B	Deodorant spray (Summer's Eve [®] Spray)	0.023% V/V	NI
	Enemas (Life BRAND [™] Heavy Mineral Oil USP)	0.023% V/V	
	Antimicrobials (Canesten [®])	0.023% W/V	
	Enemas (Pentasa)	0.495 µg/mL	
C	Radiology oral compounds (Barium sulfate)	0.113 µg/mL	NI
	Gastritis medications (Nexium)	0.011 µg/mL	
	Antimicrobials (Flagyl)	0.016 µg/mL	
D	Non-steroidal anti-inflammatory medications (Aleve [®])	0.071 µg/mL	NI
	Antimicrobials (DIFLUCAN [®] One)	0.020 µg/mL	
	Gastritis medications (Tums [®])	1.200 µg/mL	
E	Anti-diarrheal medication (Imodium [®])	0.023 µg/mL	I
	Anti-diarrheal medication (Pepto-Bismol [®])	0.675 µg/mL	
	Laxatives (Senokot [®])	0.011 µg/mL	
F	Spermicide (Trojan [®] with spermicidal lubricant)	0.023% V/V	NI
	Moist towelettes (Equate [™] flushable moist wipes)	0.023% V/V	
	Moist towelettes (Wet Ones [®])	0.023% V/V	
Endogenous substances			
Group	Substance	Concentration in SBT ¹	Results ²
G	Whole blood	0.023% V/V	NI
	Leukocytes	15,000 cells/mL	
H	Amniotic fluid	0.023% V/V	NI
	Mucous	0.023% V/V	
I	Seminal fluid	0.023% V/V	NI
	Urine	0.023% V/V	
J	Feces	0.023% V/V	NI
	Meconium	0.023% V/V	
K	Human DNA	4.65 ng/mL	NI

¹W/V: Weight/Volume; V/V: Volume/Volume

²I: interference with the GBS

LB assay;

NI: no interference with the GBS LB assay

PRECISION/REPRODUCIBILITY

A reproducibility study was conducted to evaluate the within- site (precision), between-site and between-day variance with multiple operators. The panel comprised three GBS strains (ATCC 13813 (non-hemolytic), ATCC 12400 (serotype Ia) and ATCC 12403 (serotype III)) tested at two concentrations and two true negative samples. Each sample was tested by two operators three times per day over five different days on three sites. A total of 90 replicates for each positive sample and of 180 replicates for negative samples were tested (8 panel members x 2 operators x 3 times per day x 5 days x 3 sites). The study was performed using three lots of GBS LB assay.

The panel consisted of three contrived samples categories as follow:

1. Low positive (LP): $1 < 2 \times \text{LoD}$
2. Moderate positive (MP): $> 2 - 3 \times \text{LoD}$
3. True negative (TN): samples without target

Precision study results within sites are shown in Table 10.

Table 10. Summary of the precision study within sites

Site 1				
Panel ID	Results/Total	% Agreement	Ct Mean	Ct %CV
LP	87/90	96.7%	37.3	5.4
MP	87/90	96.7%	36.6	5.0
TN	60/60	100%	32.1	3.7
Site 2				
Panel ID	Results/Total	% Agreement	Ct Mean	Ct %CV
LP	90/90	100%	36.3	4.2
MP	89/90	98.9%	35.7	3.8
TN	60/60	100%	32.7	3.2
Site 3				
Panel ID	Results/Total	% Agreement	Ct Mean	Ct %CV
LP	90/90	100%	35.5	4.1
MP	90/90	100%	34.9	4.3
TN	60/60	100%	30.8	2.4

Reproducibility study results between sites are shown in Table 11.

Table 11. Summary of the reproducibility study results between sites

All sites combined				
Panel ID	Results/Total	% Agreement	Ct Mean	Ct %CV
LP	267/270	98.9%	36.4	2.3
MP	266/270	98.5%	35.7	2.3
TN	180/180	100%	31.9	3.1

CARRY-OVER AND CROSS-CONTAMINATION

A study was conducted to investigate within run and across run carry-over and cross-contamination. Positive samples contained 15 µL of a GBS dilution prepared in a clinical negative LIM broth matrix to reach a final concentration of $> 10^6$ CFU/mL of SB. Negative samples contained 15 µL of clinical negative LIM broth matrix per SBT. For the within run study, 4 replicates of high positive samples and 4 replicates of negative samples were tested in each run by alternating positive and negative replicates. For the across run study, a run of 8 replicates of high positive samples followed by a run of 8 replicates of negative samples were repeated 5 times. Each operator performed 10 runs of 8 samples, for a total of 20 runs.

Overall, all high positive samples were accurately detected as positive while all of the true negative samples were accurately detected as negative. Absence of carry-over and cross-contamination was demonstrated when using the GBS LB assay.

E-LABELING

Documentation related to this product can be accessed online at www.meridianbioscience.com/pi. Additionally, paper copies are available upon request by contacting your local distributor or via the phone number listed on the kit box.

revogene®

GBS LB

Per l'uso con Revogene®

REF 410200

IVD Per l'uso diagnostico in vitro



Rx Only

FINALITÀ D'USO

Il test Revogene® GBS LB eseguito sullo strumento Revogene è un test diagnostico qualitativo *in vitro* elaborato per rilevare il DNA dello *Streptococcus* di gruppo B (GBS) da brodi di arricchimento LIM di 18-24 ore di tamponi di campioni vaginali/rettali ottenuti da donne in gravidanza. Il test Revogene GBS LB utilizza l'elaborazione automatizzata dei campioni e la reazione a catena della polimerasi (PCR) in tempo reale per rilevare una sequenza genica *cfb* specifica del genoma dello *Streptococcus agalactiae*.

Il test Revogene GBS LB è indicato per l'identificazione della colonizzazione da GBS antepartum e non fornisce risultati di sensibilità. Non è destinato alla diagnosi o al monitoraggio del trattamento dell'infezione da GBS. Per condurre un test di sensibilità, raccomandato per le donne allergiche alla penicillina, sono necessari degli isolati in coltura.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

Lo *Streptococcus* di gruppo B è un batterio gram-positivo che si trova comunemente nel tratto gastrointestinale, genitale e urinario degli adulti sani. Circa il 10-30% di tutte le donne incinte sono colonizzate da GBS nella vagina o nel retto¹

Le madri colonizzate da GBS in genere non mostrano sintomi o effetti sulla salute. Tuttavia, questo tipo di infezione batterica è associata a gravi malattie riscontrate in neonati di donne colonizzate dal microorganismo. Nei neonati, questo tipo di malattia causa frequentemente sepsi (infezione del sangue), polmonite (infezione dei polmoni) e talvolta meningite (infezione del liquido e del rivestimento intorno al cervello). Il tasso di mortalità per i bambini con insorgenza precoce (durante la prima settimana di vita) della malattia da streptococco di gruppo B è attualmente stimato dal 4% al 6%.¹ I bambini sopravvissuti possono soffrire di disabilità a lungo termine tra cui perdita dell'udito, perdita della vista o ritardo mentale.²

La trasmissione dello streptococco di gruppo B avviene principalmente dalla madre al neonato durante il travaglio e il parto (*intrapartum*).² Lo screening per la colonizzazione da GBS nelle donne antepartum tra 35 e 37 settimane di gestazione, seguito da un trattamento antibiotico di profilassi *intrapartum* per le donne con stato di colonizzazione positivo, si è dimostrato un meccanismo efficace per la prevenzione dell'infezione perinatale da streptococco di gruppo B. Poiché la colonizzazione potrebbe essere transitoria, intermittente o persistente durante la gravidanza, lo screening è più efficace quando i campioni vengono raccolti non più di cinque settimane (35-37 settimane di gestazione) prima del parto e dopo l'arricchimento con brodo di coltura selettivo.¹

La maggior parte dei test GBS viene eseguita per coltura e può richiedere fino a 48 ore per l'identificazione definitiva del GBS dopo le 18-24 ore iniziali di incubazione del tampone vaginale/rettale in un brodo selettivo.

Il test GBS LB può fornire risultati per un massimo di otto campioni in circa un'ora una volta disponibile il campione di coltura in brodo LIM. Il test riduce al minimo l'intervento dell'operatore dal momento in cui la cartuccia microfluidica monouso (PIE) contenente il campione viene inserita nel carosello di Revogene fino a quando i risultati non sono disponibili. Il test riduce al minimo l'intervento dell'operatore dal momento in cui la cartuccia microfluidica monouso (PIE) contenente il campione viene inserita nel carosello di Revogene fino a quando i risultati non sono disponibili.

PRINCIPI DELLA PROCEDURA

Revogene automatizza l'omogeneizzazione del campione, la diluizione del campione, la lisi cellulare, l'amplificazione del DNA e il rilevamento dei prodotti PCR amplificati. L'intervento dell'utente è richiesto solo per scaricare il campione del paziente nella SBT (Sample Buffer Tube), trasferire il campione nella PIE e caricare/scaricare le PIE nel carosello di Revogene.

La PIE è un dispositivo chiuso completamente integrato in cui erogare ed elaborare un campione attraverso diverse camere e canali microfluidici che ne consentono l'elaborazione (omogeneizzazione, diluizione del campione e lisi cellulare). Il liquido di un singolo campione viene trasferito mediante centrifugazione da una camera alla successiva in sequenza e tutti i reagenti specifici per la reazione PCR sono incorporati ed essiccati all'interno dei pozzetti PCR. In ogni PIE è incorporato inoltre un controllo di processo (PrC) per controllare le fasi di elaborazione e amplificazione del campione (Figura 1). Il PrC consente il monitoraggio delle sostanze potenzialmente inibitorie e degli errori relativi alla cartuccia microfluidica, strumentali o dei reagenti. Una volta caricata una PIE in Revogene, non è necessario alcun intervento da parte dell'operatore. I prodotti amplificati vengono rilevati in tempo reale utilizzando sonde a base chimica TaqMan® specifiche per bersaglio.

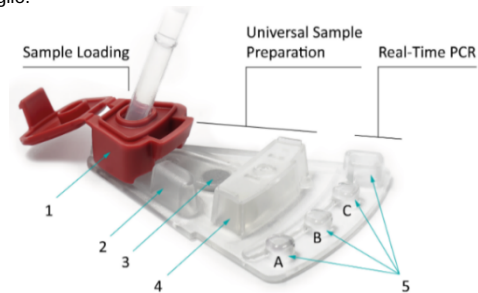


Figura 1 Vista dall'alto di una PIE

1: Camera di caricamento del campione, 2: Camera di troppo pieno,
3: Camera di omogeneizzazione contenente PrC, 4: Camera di diluizione/lisi,
5: Tre (3) pozzetti per PCR (da A a C da sinistra a destra) e una (1) camera di scarico (all'estremità destra).

Revogene è in grado di elaborare da uno a un massimo di otto campioni contemporaneamente nella stessa serie. Il carosello deve contenere otto PIE per mantenere l'equilibrio termodinamico all'interno della serie. Al termine di una serie, i risultati vengono interpolati dal sistema da segnali fluorescenti misurati e da algoritmi di calcolo integrati. I risultati visualizzati sul touchscreen possono essere stampati, trasferiti e/o archiviati dall'utente mediante la porta USB o l'opzione di connettività.

REAGENTI E MATERIALI

Il kit GBS LB contiene reagenti e materiali sufficienti per l'elaborazione di 24 campioni. Il kit contiene i seguenti materiali:

1. 24 **Sample Buffer Tube (SBT)**: provetta con codice a barre contenente soluzione tamponata TE 1X (Tris-HCl pH 8,0/EDTA.Na₂) come tampone di diluizione e conservazione per campioni.
2. 24 **Disposable Transfer Tool (DTT)**: il DTT è una pipetta di trasferimento monouso per il trasferimento del campione dalla SBT alla PIE.
3. 24 buste singole contenenti una (1) **PIE GBS LB**: dispositivo integrato che comprende i reagenti essiccati necessari per le fasi di elaborazione dei campioni e di PCR in tempo reale per l'amplificazione e il rilevamento del GBS. Ogni PIE contiene PrC, primer specifici per PrC e relativa sonda, primer specifici per gene *cfb* di GBS e relativa sonda, dNTP, soluzione tampone e DNA polimerasi.

MATERIALI/APPARECCHIATURE NECESSARI MA NON FORNITI

1. Revogene® (n. cat. 610210)
2. Guanti monouso senza polvere
3. Miscelatore vortex (n. cat. 131132 o apparecchio equivalente)
4. Rack per campioni (n. cat. 132539; opzionale)
5. Tampone compatibile con la raccolta di campioni vaginali/rettali e terreni di trasporto consigliati (ad es. Stuart liquido o Amies liquido)
6. Brodo LIM di arricchimento selettivo (brodo Todd Hewitt integrato con colistina (10 µg/mL) e acido nalidixico (15 µg/mL) (Alere n. cat. L57 o equivalente))
7. Micropipetta calibrata (P20 consigliata, VWR n. cat. 89079-964 o equivalente)
8. Puntali per micropipette di lunghezza estesa privi di DNasi/RNasi, resistenti agli aerosol (Sarstedt n. cat. 70.1189.215 o equivalente)
9. MOCK PIE (n. cat. 610208; opzionale)

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

1. Questo prodotto può essere utilizzato solo con Revogene.
2. Non utilizzare il kit se l'etichetta che sigilla la scatola esterna non è integra alla consegna.
3. Non utilizzare i reagenti del kit GBS LB se le buste protettive sono aperte o non sono integre alla consegna.
4. Non scambiare il DTT, la SBT e la PIE con i corrispondenti elementi di altri lotti di kit.
5. Ogni PIE e DTT del kit GBS LB possono essere utilizzati per l'elaborazione di un solo campione alla volta. Non riutilizzare la PIE e il DTT.
6. Trattare sempre i campioni come se fossero infettivi e secondo procedure di laboratorio sicure, come quelle descritte nel documento Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (Biosicurezza nei laboratori microbiologici e biomedici)⁴ e nel documento M29-A4 del CLSI.⁵
7. Indossare guanti monouso durante la manipolazione dei campioni paziente e subito dopo lavarsi accuratamente le mani.
8. La PIE del kit GBS LB contiene reagenti essiccati. La busta protettiva non deve essere aperta fino a quando non si è pronti eseguire il test.
9. Smaltire i reagenti non utilizzati e i rifiuti in conformità alle normative nazionali, federali, provinciali, statali e locali.
10. Non aprire o rompere la PIE dopo l'uso. Il tappo e le guarnizioni nella PIE prevengono la contaminazione con prodotti di amplificazione e/o particelle infettive.
11. Non utilizzare una PIE in caso di caduta o se è stata agitata o capovolta dopo aver caricato il campione, in quanto ciò potrebbe causare risultati non validi.
12. Il test GBS LB non fornisce risultati di sensibilità. È necessario ulteriore tempo per la coltura di isolati e per eseguire i test di sensibilità raccomandati per le donne allergiche alla penicillina.
13. Non utilizzare kit o componenti del kit che hanno superato la data di scadenza indicata.
14. Non refrigerare la PIE dopo averla caricata.

DICHIARAZIONI DI PERICOLO E PRUDENZA

Per le nostre attuali conoscenze, non ci sono rischi associate a questo prodotto.

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

1. I campioni di tampone vaginale/rettale devono essere conservati secondo le linee guida approvate¹
2. Il brodo LIM arricchito può essere conservato a 25 C per un massimo di 2 giorni o a 2-8 C per un massimo di 3 giorni.
3. Conservare il kit GBS LB a 2-25 C. La data di scadenza è indicata sull'etichetta della confezione del kit. Non aprire alcuna busta finché non si è pronti per eseguire i test. Utilizzare la PIE entro 1 ora dall'apertura della busta.
4. La SBT inocolata può essere conservata a 25 C per un massimo di 3 giorni o a 2-8 C per un massimo di 5 giorni.

ISTRUZIONI PER L'USO

RACCOLTA E TRASPORTO DEI CAMPIONI

Tipo di campione: tampone vaginale/rettale prelevato da donne antepartum a 35-37 settimane di gestazione.

La raccolta di campioni vaginali/rettali dalla stessa paziente deve essere eseguita in conformità alle linee guida pubblicate per la raccolta di campioni clinici per la coltura del GBS.¹

1. Prelevare il tampone vaginale/rettale secondo le raccomandazioni del CDC.¹ In breve:
 - a. Inserire il tampone nella vagina inferiore (introito vaginale), quindi nel retto (attraverso lo sfintere anale); è possibile utilizzare lo stesso tampone o due tamponi diversi. Fare attenzione a non mischiare feci, acqua, urina o sapone nel campione.
 - b. Subito dopo la raccolta del campione, collocare i tamponi in un terreno di trasporto non nutritivo (ad es. Stuart liquido o Amies liquido). Se i tamponi vaginali/rettali vengono prelevati separatamente dalla stessa paziente, entrambi i tamponi possono essere collocati nello stesso contenitore di trasporto.
2. Etichettare il dispositivo di trasporto con l'identificativo (ID) del campione o della paziente e trasportarlo in laboratorio per l'analisi (consultare la sezione "Conservazione e stabilità").

ARRICCHIMENTO DEL CAMPIONE

3. Rimuovere i tamponi vaginali/rettali dal terreno di trasporto e inoculare nel brodo LIM di arricchimento selettivo.
4. Incubare il brodo LIM inocolato a 35-37 C per 18-24 ore all'aria ambiente o al 5% di CO₂.
5. Il brodo LIM arricchito può essere conservato a 25 C per un massimo di 2 giorni o a 2-8 C per un massimo di 3 giorni.
6. Procedere alla preparazione dei campioni.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

NOTA 1: iniziare l'analisi entro 1 ora dall'apertura della busta contenente la PIE.

1. Per ogni campione da analizzare, prelevare una SBT dalla confezione del kit.
2. Etichettare la SBT con l'identificativo campione appropriato avendo cura di non coprire o scrivere sui codici a barre dell'etichetta.
3. Agitare su vortex il campione di brodo LIM arricchito ad alta velocità per 15 secondi.
4. Utilizzando una micropipetta calibrata e un puntale di lunghezza estesa resistente agli aerosol, aspirare 15 µL del campione di brodo LIM arricchito.
5. Rimuovere il tappo dalla SBT e dispensare l'aliquota del campione arricchito nella SBT, facendo attenzione a non aerosolizzare il campione. Pipettare il liquido su e giù per garantire il trasferimento completo dell'aliquota del campione.
6. Chiudere bene il tappo della SBT e collocare la SBT sul rack per campioni, se utilizzato. Aprire una sola SBT alla volta.
7. Preparare eventuali campioni aggiuntivi per il test ripetendo i passaggi da 1 a 6, quindi procedere al passaggio 8.
8. Agitare la SBT su un miscelatore vortex per 15 secondi alla massima velocità.
9. Aprire la busta della PIE ed estrarre la PIE.
10. Estrarre un DTT dalla confezione del kit e aspirare l'SB comprimendo l'intero bulbo. Il livello del liquido nel DTT deve trovarsi in un punto qualsiasi tra i due segni (Figura 2). Se il livello del liquido non è compreso tra i due segni, scaricare completamente l'SB nella SBT e ripetere il passaggio 10.
11. Scaricare completamente l'SB nella camera di iniezione del campione della PIE (Figura 1).
12. Chiudere bene il tappo della PIE, assicurandosi che la camera risulti completamente sigillata. Posizionare la PIE sul rack per campioni, se utilizzato. Non refrigerare la PIE dopo averla caricata.
13. Preparare tutti i campioni aggiuntivi per il test ripetendo i passaggi da 8 a 11, quindi procedere al passaggio 13, assicurandosi di aprire una sola PIE alla volta.
14. Conservare i campioni di brodo LIM arricchito e la SBT inocolata conformemente alle istruzioni riportate nella sezione "Conservazione e stabilità".

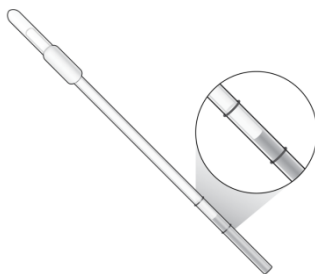


Figura 2.
Raffigurazione di un livello corretto di SB (Sample Buffer) utilizzando il DTT (Disposable Transfer Tool)

FUNZIONAMENTO DEL SISTEMA REVOGENE

NOTA 1: è possibile elaborare simultaneamente un massimo di otto campioni (inclusi i controlli esterni) in una sola serie.

NOTA 2: eseguire ogni serie con 8 PIE nello strumento Revogene. Se si elaborano meno di 8 campioni, riempire i posti vuoti con MOCK PIE*.

1. Accendere il sistema Revogene. Il software si avvierà automaticamente. Per ulteriori informazioni sulla configurazione e il funzionamento dello strumento, consultare il Manuale d'uso di Revogene.³
2. Immettere nome utente e password e premere **<Accedi>**.
3. Selezionare il menu **<Configura serie>**.
4. Immettere il numero di identificazione del campione utilizzando lo scanner di codici a barre o mediante inserimento manuale.
5. Inserire i codici a barre della SBT e della PIE manualmente o utilizzando lo scanner di codici a barre, posizionando la PIE quasi in verticale davanti allo scanner. Maneggiare la PIE con cura, senza scuoterla e facendo attenzione a non farla cadere.
6. (Facoltativo) Immettere il numero di identificazione paziente utilizzando lo scanner di codici a barre o mediante inserimento manuale.
7. (Facoltativo) Premere **<Aggiungi commenti>** e digitare un commento.
8. Inserire la PIE nello strumento, in qualsiasi posizione del carosello, e premere **<OK>**. Il software assocerà automaticamente il campione e la SBT alla PIE corretta.
9. Per aggiungere un altro campione, premere **<+Aggiungi>** e ripetere i passaggi da 4 a 8.
10. Una volta caricati tutti i campioni sul carosello, premere **<Avanti>**.
11. Scansionare l'anello di ritenzione e procedere alla sua installazione. Chiudere il coperchio dello strumento.
12. Avviare la serie di test premendo **<Avvia>**.

*Se le MOCK PIE non sono disponibili, utilizzare le PIE dopo averle riempite con l'SB o con i controlli esterni.

VISUALIZZAZIONE ED ESPORTAZIONE DEI RISULTATI

1. Una volta completata la serie, il coperchio si apre automaticamente.
2. Se Revogene si è disconnesso, immettere nuovamente nome utente e password e premere **<Accedi>**.
3. Selezionare il menu **<Risultati>** per accedere ai risultati del test.
4. Premere **<Ultima serie>** per visualizzare gli ultimi risultati dei test.
5. Da **<Ultima serie>**, selezionare i campioni per i quali esportare i rapporti sui risultati. È possibile selezionare tutti i campioni contemporaneamente facendo clic sulla prima casella in alto.
6. Premere **<Esporta>** e salvare nella posizione appropriata (ad esempio su una chiavetta USB).
7. Rimuovere l'anello di ritenzione e le PIE dallo strumento Revogene.

NOTA: quando si ottengono risultati indeterminati (IND) o non risolti (UNR) o quando si verifica un errore di controllo esterno, è necessario eseguire una ripetizione del test dalla SBT preparata entro il periodo di tempo specificato (fare riferimento alla sezione Procedura di ripetizione dell'analisi).

PROCEDURA DI RIPETIZIONE DELL'ANALISI

NOTA: è consentita una sola ripetizione dell'analisi dal corrispondente campione di brodo LIM arricchito originale o dalla corrispondente SBT inoculata.

- Se la ripetizione dell'analisi viene eseguita direttamente dal rimanente campione di brodo LIM arricchito conservato a 25 C per un massimo di 2 giorni, o a 2-8 C per un massimo di 3 giorni, fare riferimento ai passaggi da 1 a 11 della sezione Preparazione dei campioni. Seguire quindi le istruzioni riportate nella sezione Funzionamento del sistema Revogene.
- Se la ripetizione dell'analisi viene eseguita dalla SBT inoculata conservata a 25 C per un massimo di 3 giorni o a 2-8 C per un massimo di 5 giorni dopo la preparazione dei campioni, agitare il campione su un miscelatore vortex per 15 secondi alla massima velocità e seguire i passaggi 10 e 11 della sezione Preparazione dei campioni per ciascun campione. Seguire quindi le istruzioni riportate nella sezione Funzionamento del sistema Revogene.

CONTROLLO QUALITÀ

Le procedure di controllo qualità monitorano l'accuratezza e la precisione del processo analitico. Ciascun laboratorio deve stabilire il numero, il tipo e la frequenza dei materiali di controllo del test secondo le normative applicabili o le agenzie di accreditamento. La procedura descritta di seguito può essere utilizzata eventualmente sulla base di politiche e procedure locali.

- Ogni PIE contiene un controllo di processo (PrC) che monitora l'omogeneizzazione e la diluizione del campione, la lisi cellulare, l'inibizione dell'amplificazione del DNA e le anomalie dei reagenti di analisi.
- La buona pratica di laboratorio raccomanda l'uso di materiali di controllo. Gli utenti devono attenersi alle linee guida pertinenti riguardanti l'esecuzione dei controlli di qualità esterni. Si consiglia di eseguire un controllo esterno positivo e un controllo esterno negativo almeno su base giornaliera fino a quando non si ottiene un'adeguata convalida del processo su Revogene in ogni ambiente di laboratorio. I materiali di controllo esterno non sono forniti da Meridian Bioscience, Inc.
- Come controllo esterno positivo è possibile utilizzare i materiali di controllo esistenti in commercio (ad es. *Streptococcus agalactiae* ATCC® 13813). Si consiglia di preparare al momento i ceppi batterici nel brodo LIM. Trasferire un'aliquota da 15 µL di una coltura di 18-24 ore in brodo LIM in una SBT e procedere dal passaggio 6 della sezione Preparazione dei campioni.
- Come controllo esterno negativo si consiglia l'utilizzo del brodo LIM puro. Trasferire un'aliquota da 15 µL di brodo LIM in una SBT e procedere dal passaggio 6 della sezione Preparazione dei campioni.
- Per ogni reagente di controllo esterno è necessario utilizzare un DTT, una SBT e una PIE diversi.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

I risultati vengono calcolati da Revogene sulla base di segnali fluorescenti misurati e algoritmi di calcolo integrati e sono disponibili nella finestra Risultati di Revogene. I risultati possibili sono:

Campione	Simbolo visualizzato sullo schermo utente	Risultato complessivo riportato	Interpretazione
Campione paziente		Positivo	Il campione contiene DNA bersaglio di GBS.
		Negativo	Nessun DNA bersaglio di GBS rilevato oppure numero di organismi inferiore al limite di rilevamento del test.
		Indeterminato	Nessun risultato refertabile a causa di un possibile errore di rilevamento di Revogene durante il trattamento del test o l'analisi dei dati oppure in caso di interruzione della serie da parte dell'utente. La ripetizione del test deve essere eseguita utilizzando il corrispondente campione di brodo LIM arricchito originale o la corrispondente SBT inoculata entro il periodo di tempo definito sopra.
		Irrisolto	Errore di amplificazione/rilevamento per il controllo di processo e per il bersaglio GBS. Potrebbe essere causato da campioni inibitori o da errori relativi alla cartuccia microfluidica o ai reagenti. La ripetizione del test deve essere eseguita utilizzando il corrispondente campione di brodo LIM arricchito originale o la corrispondente SBT inoculata entro il periodo di tempo definito sopra.
Controllo esterno positivo		Positivo	Risultato di controllo esterno positivo valido.
		Negativo	Risultato di controllo esterno positivo errato. La serie non è valida. È necessario ripetere l'analisi per tutti i campioni della serie, utilizzando il corrispondente campione di brodo LIM arricchito originale o la corrispondente SBT inoculata con una nuova serie di controlli esterni entro il periodo di tempo definito sopra.
		Indeterminato	Risultato di controllo esterno positivo errato. Nessun risultato refertabile a causa di un possibile errore di rilevamento di Revogene durante il trattamento del test o l'analisi dei dati oppure in caso di interruzione della serie da parte dell'utente. La serie non è valida. È necessario ripetere l'analisi per tutti i campioni della serie, utilizzando i corrispondenti campioni di brodo LIM arricchito originali o le corrispondenti SBT inoculate con una nuova serie di controlli esterni entro il periodo di tempo definito sopra.
		Irrisolto	Risultato di controllo esterno positivo errato. Errore di amplificazione/rilevamento per il controllo di processo e per il bersaglio GBS. Potrebbe essere causato da campioni inibitori o da errori relativi alla cartuccia microfluidica o ai reagenti. La serie non è valida. È necessario ripetere l'analisi per tutti i campioni della serie, utilizzando i corrispondenti campioni di brodo LIM arricchito originali o le corrispondenti SBT inoculate con una nuova serie di controlli esterni entro il periodo di tempo definito sopra.
Controllo esterno negativo		Positivo	Risultato errato del controllo esterno negativo a causa della manipolazione del campione e/o di un problema di contaminazione. La serie non è valida. È necessario ripetere l'analisi per tutti i campioni della serie, utilizzando i corrispondenti campioni di brodo LIM arricchito originali o le corrispondenti SBT inoculate con una nuova serie di controlli esterni entro il periodo di tempo definito sopra.
		Negativo	Risultato di controllo esterno negativo valido.
		Indeterminato	Risultato di controllo esterno negativo errato. Nessun risultato refertabile a causa di un possibile errore di rilevamento di Revogene durante il trattamento del test o l'analisi dei dati oppure in caso di interruzione della serie da parte dell'utente. La serie non è valida. È necessario ripetere l'analisi per tutti i campioni della serie, utilizzando i corrispondenti campioni di brodo LIM arricchito originali o le corrispondenti SBT inoculate con una nuova serie di controlli esterni entro il periodo di tempo definito sopra.
		Irrisolto	Risultato di controllo esterno negativo errato. Errore di amplificazione/rilevamento per il controllo di processo. Potrebbe essere causato da campioni inibitori o da errori relativi alla cartuccia microfluidica o ai reagenti. La serie non è valida. È necessario ripetere l'analisi per tutti i campioni della serie, utilizzando i corrispondenti campioni di brodo LIM arricchito originali o le corrispondenti SBT inoculate con una nuova serie di controlli esterni entro il periodo di tempo definito sopra.

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

1. Il test GBS LB può essere utilizzato solo con Revogene da personale qualificato.
2. Un risultato positivo del test non indica necessariamente la presenza di organismi vitali. Tuttavia, è indicativo per la presenza di DNA di GBS.
3. Le prestazioni del test GBS LB sono state accertate con campioni di tamponi vaginali/rettali prelevati da donne antepartum, trasportati in terreno non nutritivo (ad es. Stuart liquido) e arricchiti in brodo LIM selettivo. L'uso del test GBS LB per tipi di campioni clinici diversi da quelli specificati non è stato valutato e le caratteristiche prestazionali non sono state accertate.
4. I campioni cervicali, perianali, perirettali o perineali non sono accettabili e per la raccolta di colture non deve essere utilizzato uno speculum.
5. Il test GBS LB non fornisce risultati di sensibilità. È necessario eseguire il test di sensibilità antimicrobica su isolati prenatali di GBS da donne allergiche alla penicillina ad alto rischio di anafilassi.
6. L'uso di brodi di arricchimento diversi dal brodo LIM non è stato valutato.
7. A seguito di errate procedure di raccolta, manipolazione o conservazione dei campioni, errori tecnici o commistione dei campioni possono verificarsi risultati errati del test. Per evitare risultati errati è necessario attenersi scrupolosamente alle istruzioni contenute nel presente inserto e alle linee guida approvate.
8. La chiusura non corretta del tappo di una PIE può generare risultati del test errati.
9. Sebbene non siano noti ceppi/isolati di GBS privi del gene *cfb*, la presenza di un tale ceppo porterebbe a un risultato errato (falso negativo) del test Revogene GBS LB.
10. *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus acidophilus* possono potenzialmente inibire il rilevamento del GBS se presenti individualmente a concentrazioni > 10⁴ CFU/mL di SB.
11. L'effetto potenzialmente inibitorio del grasso fecale non è stato valutato.
12. Una combinazione di loperamide cloridrato (ad esempio Imodium®), subsalicilato di bismuto (ad esempio Pepto-Bismol™) e sennosidi (ad esempio Senokot®), sebbene altamente improbabile, può potenzialmente inibire il rilevamento del GBS quando queste sostanze sono presenti in SBT a concentrazioni rispettivamente di 0,023 µg/mL, 0,675 µg/mL e 0,011 µg/mL.
13. Mutazioni o polimorfismi nelle regioni di legame con primer o sonda possono influire sul rilevamento delle varianti del gene *cfb* di GBS, determinando un risultato falso negativo con il test GBS LB.
14. I risultati del test GBS LB devono essere utilizzati come integrazione alle osservazioni cliniche e ad altre informazioni a disposizione del medico.
15. Un risultato negativo non esclude la possibilità di colonizzazione da GBS. Quando la concentrazione di GBS è inferiore al limite di rilevamento del test, possono verificarsi risultati falsi negativi.
16. Il test non ha lo scopo di differenziare i portatori di GBS da quelli con malattia da streptococco.
17. I risultati del test possono essere influenzati dalla terapia antimicrobica concomitante poiché il DNA di GBS potrebbe continuare a essere rilevato.

VALORI ATTESI

Nello studio sperimentale per il test Revogene GBS LB, sono stati ottenuti un totale di 771 risultati refertabili da campioni conformi ai livelli di coltura e PCR da 4 regioni geograficamente diverse. Nel complesso, il tasso di prevalenza di GBS è stato del 22,0% (170/771) con un IC al 95% del 19,3-25,1%.

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

PRESTAZIONI CLINICHE

Le prestazioni del test GBS LB sono state valutate durante uno studio di indagine prospettico che ha coinvolto due siti canadesi e due americani utilizzando lo strumento Revogene.

I campioni raccolti e analizzati in modo prospettico consistevano in campioni di brodo LIM arricchito deidentificati rimanenti in eccesso, prelevati per l'analisi standard di cura per GBS antepartum da donne a 35-37 settimane di gestazione. Il brodo LIM rimanente è stato utilizzato per il test GBS LB e per i test di coltura di riferimento eseguiti in ciascun sito.

Le prestazioni del test GBS LB sono state confrontate con un metodo di riferimento composito consistente nell'arricchimento in brodo LIM del tampone vaginale/rettale seguito da una sottocoltura su piastre di agar sangue di pecora e identificazione biochimica di GBS. Tutti i campioni con un risultato di coltura batterica negativo sono stati nuovamente analizzati presso un singolo laboratorio di base indipendente utilizzando le stesse procedure operative standard richieste per la coltura batterica.

Nello studio sono stati registrati 839 campioni. Di questi, 63 campioni sono stati considerati non conformi in base al metodo di riferimento e/o ai criteri del protocollo del test GBS LB, 1 campione è stato considerato non conforme in termini di condizioni di trasporto e conservazione e 4 campioni sono stati considerati non conformi a causa dei risultati del test mancanti. Due (2) campioni pienamente conformi hanno fornito risultati PCR finali non refertabili. Per determinare le prestazioni cliniche del test GBS LB rispetto al metodo di riferimento composito (Tabelle 1 e 2), sono stati utilizzati in totale 771 risultati di campioni.

Le caratteristiche prestazionali complessive del test GBS LB hanno dimostrato una sensibilità del 95,9% (163/170, IC 95% del 91,7-98,0%) e una specificità del 95,5% (574/601, IC 95% del 93,5-96,9%) rispetto al metodo di riferimento composito.

Degli 812 campioni analizzati con il test GBS LB e risultati conformi a livello di campione e PCR, 6 (0,74%) sono stati refertati come irrisolti dopo l'analisi iniziale. La percentuale di campioni irrisolti dopo la ripetizione dell'analisi era dello 0,25% (2/812).

Degli stessi 812 campioni analizzati con il test GBS LB, 12 (1,48%) sono stati inizialmente refertati come indeterminati: 6 da una serie con un errore di controllo esterno e 6 da una serie incompleta. Nessun risultato è rimasto indeterminato dopo la ripetizione dell'analisi.

Tabella 1. Caratteristiche prestazionali complessive (tutti i siti combinati) del test GBS LB rispetto al metodo di riferimento composito

Prestazioni complessive	Metodo di riferimento composito		
	Positivo	Negativo	Totale
Test GBS LB	163	27B	190
	7A	574	581
Totale	170	601	771

Sensibilità: 95,9% (IC 95%: 91,7-98,0%)
Specificità: 95,5% (IC 95%: 93,5-96,9%)

^A 5 risultati falsi negativi su 7 del test Revogene GBS LB sono stati analizzati su un dispositivo molecolare approvato dalla FDA e hanno prodotto risultati negativi.

^B 10 risultati falsi positivi su 27 del test Revogene GBS LB sono stati analizzati su un dispositivo molecolare approvato dalla FDA e hanno prodotto risultati positivi.

Tabella 2. Riepilogo delle caratteristiche prestazionali del test GBS LB per sito

Laboratorio	Sensibilità	Specificità	Prevalenza ¹
1	87,8% (36/41)	92,8% (142/153)	21,1% (41/194)
2	98,0% (48/49)	97,5% (194/199)	19,8% (49/248)
3	100% (43/43)	97,0% (164/169)	20,3% (43/212)
4	97,3% (36/37)	92,5% (74/80)	31,6% (37/117)
Totale	95,9% (163/170)	95,5% (574/601)	22,0% (170/771)

¹La prevalenza è stata calcolata con campioni conformi al metodo di riferimento della coltura e ai livelli del test Revogene GBS LB.

SENSIBILITÀ ANALITICA

La sensibilità analitica (limite di rilevamento o LoD) del test GBS LB è stata determinata utilizzando la matrice di brodo LIM precedentemente risultata negativa per GBS, arricchita con varie concentrazioni di sospensioni batteriche di GBS. Due ceppi di GBS (ATCC 12403 e ATCC 13813) sono stati analizzati in 24 replicati per concentrazione da 2 operatori utilizzando 3 diversi lotti di kit GBS LB. Il LoD è la concentrazione più bassa alla quale il 95% di tutti i replicati è risultato positivo. Il LoD del test GBS LB con i due ceppi testati variava da 200 a 375 CFU/mL di SB (Tabella 3).

Tabella 3. LoD del test GBS LB

Ceppo GBS (numero ATCC)	LoD (CFU/mL di SB)
Sierotipo III (ATCC 12403)	375
Non emolitico (ATCC 13813)	200

INCLUSIVITÀ

L'inclusività del test GBS LB è stata determinata per 12 ceppi di GBS che rappresentano 11 sierotipi noti e 1 ceppo non emolitico. Ciascun ceppo di GBS è stato analizzato utilizzando una coltura quantitativa addizionata in una matrice di brodo LIM clinica negativa per GBS. Sono stati analizzati ventiquattro replicati per concentrazione per ceppo utilizzando 3 diversi lotti di kit GBS LB. Le concentrazioni più basse alle quali i ceppi hanno raggiunto un tasso di positività del 100% sono riassunte nella Tabella 4.

Tabella 4. Organismi analizzati per l'inclusività con il test Revogene GBS LB

Ceppo GBS	Concentrazione del test	Concentrazione del test (CFU/mL di SB)	Tasso di positività
Sierotipo Ia (ATCC 12400)	< 2	735	100%
Sierotipo Ib (ATCC 51487)	15	5,625	100%
Sierotipo Ic (ATCC 27591)	5	1,875	100%
Sierotipo II (ATCC 12973)	< 2	735	100%
Sierotipo III (ATCC 12403)	1	375	100%
Sierotipo IV (ATCC 49446)	7	2,625	100%
Sierotipo V (ATCC BAA-611)	5	1,875	100%
Sierotipo VI (ATCC BAA-2671)	3	1,125	100%
Sierotipo VII (ATCC BAA-2670)	7	2,625	100%
Sierotipo VIII (ATCC BAA-2669)	10	3,750	100%
Sierotipo IX (ATCC BAA-2668)	3	1,125	100%
Non emolitico (ATCC 13813)	1,33	500	100%

*Il LoD del ceppo ATCC 12403 è risultato essere 375 CFU/mL di SB.

Inoltre, è stata eseguita un'analisi *in silico* per valutare l'inclusività del test GBS LB in relazione a 36 ulteriori ceppi di GBS elencati nel database del National Center for Biotechnology Information (NCBI) del 20 ottobre 2016. I risultati dell'allineamento non hanno mostrato alcuna discrepanza con le sequenze selezionate. L'analisi ha previsto il rilevamento di tutti questi ceppi di GBS.

REATTIVITÀ CROCIATA

È stato eseguito uno studio della reattività crociata per valutare la reattività non intenzionale del test GBS LB con cariche elevate di organismi filogeneticamente correlati al GBS o presenti nella flora urogenitale e nel tratto intestinale e non considerati come bersaglio dal test. Lo studio includeva 64 batteri, 4 lieviti, 4 virus, 2 parassiti e DNA umano (Tabella 5). Batteri e lieviti sono stati analizzati con una carica di $\geq 10^6$ CFU/mL di SB. Gli acidi nucleici di virus, parassiti e DNA umano sono stati analizzati con una carica di DNA o RNA $\geq 10^5$ cp/mL di SB. Ciascun organismo è stato analizzato utilizzando una coltura quantitativa o una soluzione di acido nucleico addizionata in una matrice di brodo LIM clinica negativa per GBS. Sono stati analizzati 3 replicati per organismo utilizzando 3 diversi lotti di kit GBS LB.

Nelle condizioni dello studio, nessuno degli organismi o acidi nucleici analizzati è stato rilevato dal test GBS LB.

Tabella 5. Elenco di organismi analizzati *in vitro* per reattività crociata con il test GBS LB

Batteri	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> (gDNA)
<i>Aerococcus viridans</i>	<i>Mycoplasma hominis</i> (gDNA)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Prevotella melaninogenica</i>
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
<i>Bifidobacterium breve</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Brevibacterium linens</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Dublin</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i> (gDNA)	<i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Minneapolis</i>
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar typhimurium</i>
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Newport</i>
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Corynebacterium genitalium</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (Cowan)
<i>Enterococcus avium</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Enterococcus dispar</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
<i>Enterococcus durans</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Streptococcus bovis</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Streptococcus dysgalactiae subsp. dysgalactiae</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Streptococcus dysgalactiae equisimilis</i>
<i>Escherichia fergusonii</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>
<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>
<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Streptococcus uberis</i>
<i>Lactobacillus delbreuckii</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i> (gDNA)
<i>Lactobacillus jensenii</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
Lieviti	
<i>Candida albicans</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida tropicalis</i>
Virus	
<i>HerpesSimplexVirus-1</i> (gDNA)	<i>Norovirus GII</i> (RNA)
<i>HerpesSimplexVirus-2</i> (gDNA)	Papillomavirus umano (HPV) (gDNA)
Parassiti	
<i>Blastocystis hominis</i> (gDNA)	<i>Trichomonas vaginalis</i> (gDNA)
DNA umano	
DNA umano (gDNA)	

Inoltre, è stata eseguita un'analisi *in silico* per valutare il rischio di reattività crociata del test GBS LB verso 62 ulteriori organismi potenzialmente presenti nella flora urogenitale e nel tratto intestinale (Tabella 6). Sulla base dell'alto grado di discrepanze tra le sequenze geniche NCBI selezionate e i primer e le sonde del test, si presume che nessuno degli organismi produca reattività crociata con il test GBS LB.

Tabella 6. Elenco di organismi analizzati *in silico* per la reattività crociata con il test GBS LB

Batteri	
<i>Abiotrophia defectiva</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Mobiluncus mulieris</i>
<i>Campylobacter fetus</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>
<i>Chromobacterium violaceum</i>	<i>Moraxella lacunata</i>
<i>Clostridium bifermentans</i>	<i>Moraxella osloensis</i>
<i>Clostridium butyricum</i>	<i>Morganella morganii</i>
<i>Clostridium novyi</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
<i>Clostridium septicum</i>	<i>Neisseria flava</i>
<i>Clostridium sordelli</i>	<i>Neisseria flavescens</i>
<i>Clostridium sporogenes</i>	<i>Neisseria lactamica</i>
<i>Corynebacterium unreaalyticum</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>
<i>Corynebacterium xerosis</i>	<i>Neisseria perflava</i>
<i>Deinococcus radiodurans</i>	<i>Plesiomonas shigelloides</i>
<i>Derxia gummosa</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>Eikenella corrodens</i>	<i>Providencia stuartii</i>
<i>Enterococcus gallinarum</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Gemella haemolysans</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>Haemophilus ducreyi</i>	<i>Rhodospirillum rubrum</i>
<i>Haemophilus influenza</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>
<i>Haemophilus influenza type B</i>	<i>Shigella boydii</i>
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Kingella denitrificans</i>	<i>Staphylococcus simulans</i>
<i>Kingella kingae</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Streptococcus gordonii</i>
<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Streptococcus mutans</i>	
Muffalievito	
<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Virus	
<i>Adenovirus 40</i>	<i>Echovirus</i>
<i>Adenovirus 41</i>	<i>Epstein-Barr Virus</i>
<i>BK virus</i>	<i>Rotavirus</i>
<i>Coxsackievirus</i>	

ORGANISMI DI INTERFERENZA

È stato condotto uno studio per valutare l'effetto potenzialmente inibitorio di 29 organismi che possono essere presenti nella flora urogenitale e nel tratto intestinale e che non vengono considerati come bersaglio dal test. La selezione degli organismi si basava sulla loro prevalenza nella flora vaginale/rettale. I ceppi di *Enterococcus* rappresentano il più alto rischio di interferenza a causa della loro prevalenza nella flora rettale e della loro capacità di crescere in brodo LIM. Altri organismi presentano un basso rischio di rilevamento nel campione a cariche elevate poiché l'arricchimento selettivo del brodo LIM ne inibisce la crescita e le cariche di questi organismi non possono aumentare di molto dopo il campionamento. Ogni organismo o soluzione di acido nucleico è stato diluito allo scopo di raggiungere una concentrazione finale di 10⁶ CFU/mL o cp/mL di SB, eccetto *Escherichia coli* ATCC 11775, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Trichomonas vaginalis* ATCC 30001 e *Mycoplasma genitalium* ATCC BAA-2641S, che sono stati analizzati a 10⁵ CFU/mL o cp/mL di SB. Nella SBT sono stati aggiunti quindici (15) µL di una diluizione GBS preparata in una matrice di brodo LIM clinica negativa allo scopo di raggiungere una concentrazione finale di 735 CFU/mL di SB. I 29 organismi inclusi nello studio sono riportati nella Tabella 7.

Tabella 7. Elenco di organismi analizzati per interferenze con il test GBS LB

Organismi	
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Dublin</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Corynebacterium genitalium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i> (gDNA)	<i>Trichomonas vaginalis</i> (gDNA)
<i>HerpesSimplexVirus-1</i> (gDNA)	<i>Mycoplasma genitalium</i> (gDNA)
<i>Papillomavirus umano</i> (HPV) (gDNA)	

Nessuno dei 29 organismi presenti a $\geq 10^5$ CFU/mL o cp/mL di SB nel campione ha generato interferenze con il rilevamento di PrC. Tra i 29 organismi analizzati, solo 3 hanno mostrato un effetto potenzialmente inibitorio sul rilevamento del GBS (Tabella 8). L'inibizione da *E. faecalis*, *E. faecium* e *L. acidophilus* è stata osservata a concentrazioni rispettivamente di $> 10^5$, $> 10^4$ e $> 10^4$ CFU/mL di SB.

Tabella 8. Organismi che interferiscono con il test GBS LB

Laboratorio	Sensibilità	Specificità	Prevalenza ¹
1	87,8% (36/41)	92,8% (142/153)	21,1% (41/194)
2	98,0% (48/49)	97,5% (194/199)	19,8% (49/248)
3	100% (43/43)	97,0% (164/169)	20,3% (43/212)
4	97,3% (36/37)	92,5% (74/80)	31,6% (37/117)
Totale	95,9% (163/170)	95,5% (574/601)	22,0% (170/771)

*N/D: non determinato perché non c'era interferenza alla massima concentrazione.

SOSTANZE INTERFERENTI

È stato condotto uno studio per valutare il potenziale effetto inibitorio di 22 sostanze esogene e 9 endogene che possono essere presenti nella flora urogenitale e nel tratto intestinale. Sono stati analizzati campioni GBS negativi e GBS positivi a 735 CFU/mL di SB in presenza di una matrice di brodo LIM clinica negativa con la più alta concentrazione di sostanza fisiologicamente rilevante. Le 31 sostanze analizzate in 11 gruppi sono riportate nella Tabella 9.

I risultati non hanno mostrato alcuna interferenza refertabile su PrC. Solo la combinazione di loperamide cloridrato (ad es. Imodium[®]), subsalicilato di bismuto (ad es. Pepto-BismolTM) e senosidi (ad es. Senokot[®]) a concentrazioni rispettivamente di 0,023 µg/mL, 0,675 µg/mL e 0,011 µg/mL di SB ha mostrato un potenziale effetto inibitorio sul rilevamento di GBS. Se analizzate individualmente, queste sostanze non hanno mostrato alcuna interferenza refertabile con il test GBS LB.

Tabella 9. Elenco delle sostanze esogene ed endogene analizzate con il test GBS LB

Sostanze esogene			
Gruppo	Sostanza (nome commerciale)	Concentrazione in SBT ¹	Risultati ²
A	Fungicida (Micatin [®])	0,023% p/v	NI
	Gel lenitivo per emorroidi (Preparazione H [®])	0,023% p/v	
	Gel lubrificante (K-Y [®] lubrificante personale)	0,023% p/v	
	Polvere per il corpo (Vagisil [®] polvere deodorante)	0,023% p/v	
	Lozione idratante (Aveeno [®] lozione idratante)	0,023% p/v	
B	Olio per il corpo (Neutrogena [®] olio corpo)	0,023% v/v	NI
	Deodorante spray (Summer's Eve [™] spray)	0,023% v/v	
	Clisteri (Life BRAND [™] olio minerale pesante USP)	0,023% v/v	
	Antimicrobici (Canesten [®])	0,023% p/v	
	Clisteri (Pentasa)	0,495 µg/mL	
C	Composti orali per radiologia (solfato di bario)	0,113 µg/mL	NI
	Farmaci per la gastrite (Nexium)	0,011 µg/mL	
	Antimicrobici (Flagyl)	0,016 µg/mL	
	Farmaci antinfiammatori non steroidei (Aleve [®])	0,071 µg/mL	
D	Antimicrobici (DIFLUCAN [®] One)	0,020 µg/mL	NI
	Farmaci per la gastrite (Tums [®])	1,200 µg/mL	
	Farmaco antidiarico (Imodium [®])	0,023 µg/mL	
E	Farmaco antidiarico (Pepto-Bismol [®])	0,675 µg/mL	I
	Lassativi (Senokot [®])	0,011 µg/mL	
F	Spermicida (Trojan [®] con lubrificante spermicida)	0,023% v/v	NI
	Salviette umidificate (Equate [™] salviette umidificate lavabili)	0,023% v/v	
	Salviette umidificate (Wet Ones [®])	0,023% v/v	
Sostanze endogene			
Gruppo	Sostanza	Concentrazione in SBT ¹	Risultati ²
G	Sangue intero	0,023% v/v	NI
	Leucociti	15.000 cellule/mL	
H	Liquido amniotico	0,023% v/v	NI
	Mucosa	0,023% v/v	
I	Fluido seminale	0,023% v/v	NI
	Urina	0,023% v/v	
J	Feci	0,023% v/v	NI
	Meconio	0,023% v/v	
K	DNA umano	4,65 ng/mL	NI

¹p/v: peso/volume; v/v: volume/volume

²I: interferenza con il test GBS

LB;

NI: nessuna interferenza con il test GBS LB

PRECISIONE/RIPRODUCIBILITÀ

È stato condotto uno studio di riproducibilità per valutare la varianza all'interno del sito (precisione), tra i siti e tra i giorni con più operatori. Il pannello comprendeva tre ceppi di GBS (ATCC 13813 (non emolitico), ATCC 12400 (sierotipo Ia) e ATCC 12403 (sierotipo III)) analizzati a due concentrazioni e due campioni negativi veri. Ogni campione è stato analizzato da due operatori tre volte al giorno per cinque giorni diversi in tre siti. Sono stati analizzati in totale 90 replicati per ogni campione positivo e 180 replicati per i campioni negativi (8 membri del pannello x 2 operatori x 3 volte al giorno x 5 giorni x 3 siti). Lo studio è stato eseguito utilizzando tre lotti di test GBS LB.

Il pannello era costituito da tre categorie di campioni artificiali come segue:

1. Basso positivo (LP): 1 - < 2 x LoD
2. Positivo moderato (MP): > 2 - 3 x LoD
3. Vero negativo (TN): campioni senza bersaglio

I risultati dello studio di precisione all'interno dei siti sono riportati nella Tabella 10.

Tabella 10. Riepilogo dello studio di precisione all'interno dei siti

Sito 1				
ID pannello	Risultati/Totale	% concordanza	Media Ct	%CV Ct
LP	87/90	96,7%	37,3	5,4
MP	87/90	96,7%	36,6	5,0
TN	60/60	100%	32,1	3,7
Sito 2				
ID pannello	Risultati/Totale	% concordanza	Media Ct	%CV Ct
LP	90/90	100%	36,3	4,2
MP	89/90	98,9%	35,7	3,8
TN	60/60	100%	32,7	3,2
Sito 3				
ID pannello	Risultati/Totale	% concordanza	Media Ct	%CV Ct
LP	90/90	100%	35,5	4,1
MP	90/90	100%	34,9	4,3
TN	60/60	100%	30,8	2,4

I risultati dello studio di riproducibilità tra i siti sono riportati nella Tabella 11.

Tabella 11. Riepilogo dei risultati dello studio di riproducibilità tra i siti

Risultati combinati di tutti i siti				
ID pannello	Risultati/Totale	% concordanza	Media Ct	%CV Ct
LP	267/270	98,9%	36,4	2,3
MP	266/270	98,5%	35,7	2,3
TN	180/180	100%	31,9	3,1

CARRY-OVER E CONTAMINAZIONE CROCIATA

È stato condotto uno studio per analizzare il carry-over e la contaminazione crociata all'interno della serie e tra le serie. I campioni positivi contenevano 15 µL di una diluizione GBS preparata in una matrice di brodo LIM clinica negativa allo scopo di raggiungere una concentrazione finale di > 10⁶ CFU/mL di SB. I campioni negativi contenevano 15 µL di matrice di brodo LIM clinica negativa per SBT. Per lo studio all'interno della serie, sono stati analizzati 4 replicati di campioni altamente positivi e 4 replicati di campioni negativi in ciascuna serie alternando replicati positivi e negativi. Per lo studio tra le serie, una serie di 8 replicati di campioni altamente positivi seguita da una serie di 8 replicati di campioni negativi sono state ripetute 5 volte. Ogni operatore ha eseguito 10 serie di 8 campioni, per un totale di 20 serie.

Nel complesso, tutti i campioni altamente positivi sono stati accuratamente rilevati come positivi mentre tutti i campioni negativi veri sono stati accuratamente rilevati come negativi. Durante l'utilizzo del test GBS LB è stata dimostrata l'assenza di carry-over e contaminazione crociata.

DOCUMENTAZIONE ONLINE

La documentazione relativa a questo prodotto è accessibile online all'indirizzo www.meridianbioscience.com/pi. Inoltre, sono disponibili su richiesta le copie cartacee, contattando il distributore locale o tramite il numero di telefono riportato sulla confezione del kit.

revogene®

GBS LB

Compatibilité avec le Revogene®

REF 410200

IVD Pour usage diagnostique *in vitro*



Rx Only

UTILISATION PRÉVUE

Le test Revogene® GBS LB réalisé sur l'instrument Revogene est un test diagnostique qualitatif *in vitro* conçu pour détecter l'ADN de streptocoques du groupe B (GBS) dans des bouillons d'enrichissement LIM d'échantillons d'écouvillonnage vaginal ou rectal prélevés de femmes enceintes. Le test Revogene GBS LB utilise le traitement automatisé des échantillons et la réaction en chaîne de la polymérase (PCR) en temps réel pour détecter une séquence du gène *cfb* spécifique du génome de *Streptococcus agalactiae*.

Ce test est indiqué pour le dépistage d'une colonisation antepartum par GBS, mais il ne produit pas de résultats de sensibilité. Il ne se veut pas un outil de diagnostic des infections à GBS, ni de suivi du traitement de ces infections. Des isolats de culture sont nécessaires pour réaliser les épreuves de sensibilité recommandées chez les femmes allergiques à la pénicilline.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION

Le streptocoque du groupe B est une bactérie Gram positif souvent présente dans le tractus gastro-intestinal, génital et urinaire des adultes en bonne santé. Quelque 10 à 30 % des femmes enceintes présentent une colonisation par des GBS dans le vagin ou le rectum¹.

Ces femmes ne présentent habituellement aucun symptôme ni problème de santé. Toutefois, ce type d'infection bactérienne est associé à des maladies graves chez les nouveau-nés de femmes dont l'organisme est colonisé par le microorganisme. Ce type de maladie chez les nouveau-nés cause souvent une septicémie (infection du sang), une pneumonie (infection des poumons) et, parfois, une méningite (infection du liquide et de la paroi entourant le cerveau). Selon les estimations actuelles, le taux de létalité chez les nourrissons atteints d'une infection à streptocoques du groupe B d'apparition précoce (durant la première semaine de vie) varie entre 4 % et 6 %¹. Les nourrissons qui survivent à ces infections peuvent présenter des invalidités de longue durée, notamment une perte auditive, une perte de vision ou une déficience intellectuelle².

La transmission du GBS s'effectue principalement de la mère au nouveau-né durant le travail et l'accouchement (*intrapartum*)². Le dépistage de la colonisation par des GBS chez des femmes antepartum entre 35 et 37 semaines de grossesse, suivie d'une antibioprophyxie *intrapartum* chez des femmes présentent une colonisation positive, s'est imposé comme un mécanisme efficace en matière de prévention d'une infection périnatale à streptocoques du groupe B. Étant donné que la colonisation peut être passagère, intermittente ou persistante tout au long de la grossesse, le dépistage est le plus efficace lorsque des spécimens sont collectés pendant cinq semaines au plus (35 à 37 semaines de grossesse) avant l'accouchement et qu'il est effectué après l'enrichissement dans un milieu de culture liquide sélectif.

PRINCIPES DE LA PROCÉDURE

L'instrument Revogene automatise l'homogénéisation et la dilution de l'échantillon, la lyse cellulaire ainsi que l'amplification de l'ADN de l'échantillon et la détection des copies issues de l'amplification par PCR. L'utilisateur n'a à intervenir que pour placer le spécimen du patient dans le tube échantillon (SBT), transférer l'échantillon dans la cartouche (PIE) et charger/décharger les PIEs dans le carrousel Revogene.

Chaque cartouche (PIE) est un dispositif fermé complètement intégré dans lequel un échantillon est distribué et traité via différentes chambres et différents canaux microfluidiques (homogénéisation, dilution d'échantillon et lyse cellulaire). Le liquide d'un échantillon est transféré par centrifugation d'une chambre à une autre, dans l'ordre, et l'ensemble des réactifs propres à la réaction PCR sont incorporés et séchés dans les puits de PCR. Un contrôle de procédé est également incorporé dans chaque PIE pour contrôler les étapes de traitement de l'échantillon et d'amplification (Figure 1). Ce procédé permet de contrôler les substances potentiellement inhibitrices ainsi que les défaillances du test au niveau microfluidique, de l'instrument ou des réactifs. Aucune intervention de l'opérateur n'est nécessaire une fois qu'un PIE est chargé dans l'instrument Revogene. Les produits de l'amplification sont détectés en temps réel à l'aide de sondes de base chimique TaqMan® spécifiques à la cible.

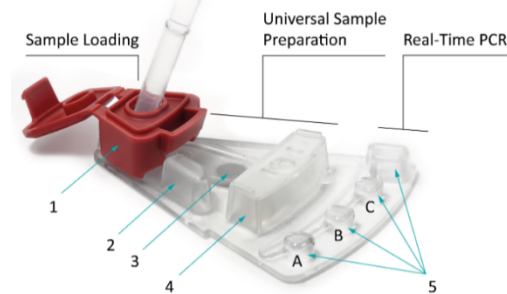


Figure 1. Vue du dessus d'un PIE.

1: Chambre de chargement de l'échantillon, 2: Chambre de trop plein, 3: Chambre d'homogénéisation contenant le PrC, 4: Chambre de dilution/lyse, 5: Trois (3) puits de PCR (A à C de gauche à droite) et une (1) chambre à déchets (à extrême droite).

L'instrument Revogene peut traiter simultanément entre un et huit échantillons dans une même série. Le carrousel doit toutefois contenir huit PIEs afin de maintenir l'équilibre thermodynamique de la série. À la fin de l'analyse, les résultats sont interpolés par le système à partir de signaux fluorescents mesurés et d'algorithmes de calcul intégrés. L'utilisateur peut imprimer, transférer et/ou enregistrer les résultats affichés sur l'écran tactile à l'aide du port USB ou de l'option de connectivité.

RÉACTIFS ET MATÉRIEL

Le kit GBS LB contient suffisamment de réactifs et de matériel pour traiter 24 échantillons. Le kit contient 24 sachets individuels, chaque sachet comprenant les matériaux suivants :

- 24 tubes de tampon d'échantillon (TTE): Tube avec étiquette à code-barres contenant une solution tamponnée TE 1X (Tris-HCl pH 8,0/EDTA.Na₂) comme tampon de dilution et de conservation pour l'échantillon.
- 24 outils de transfert jetable (PTJ) : L'PTJ est une pipette à usage unique servant au transfert de l'échantillon du tube échantillon au PIE.
- 24 pochettes individuelles contenant une (1) PIE GBS LB : Dispositif intégré qui comprend des réactifs séchés permettant de traiter les échantillons et d'effectuer les étapes de PCR en temps réel pour la détection et l'amplification des GBS. Chaque PIE comprend un contrôle de procédé, une sonde et des amorces spécifiques du contrôle de procédé, une sonde et des amorces spécifiques du gène *cfb*, des GBS, un tampon et de l'ADN polymérase.

MATÉRIEL/ÉQUIPEMENT REQUIS MAIS NON FOURNI

1. Revogene® (réf. cat. 610210)
2. Gants jetables, non poudrés
3. Agitateur-mélangeur Vortex
4. Poste d'échantillonnage en rack (réf. cat. 132539, facultatif)
5. Prélèvement d'échantillons d'écouvillonnage vaginal ou rectal et milieu de transport recommandé (par exemple Liquid Stuart ou Liquid Amies)
6. Bouillon d'enrichissement LIM sélectif [bouillon Todd Hewitt avec colistine (10 µg/mL) et acide nalidixique (15 µg/mL) (Aleré, réf. cat L57 ou équivalent)]
7. Micropipette étalonnée (P20 recommandée, VWR réf. cat. 89079-964 ou équivalent)
8. Cônes de micropipette de taille agrandie résistants aux aérosols et exempts de DNase et de RNase (Sarstedt, réf. cat. 70.1189.215 ou équivalent)
9. MOCK PIE (réf. cat. 610208, facultatif)

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

1. Ce produit ne doit être utilisé qu'avec l'instrument Revogene.
2. N'utilisez pas le kit si l'étiquette qui scelle l'emballage externe n'est pas intacte à l'arrivée.
3. N'utilisez pas les réactifs GBS LB si les sachets de protection sont ouverts ou endommagés à l'arrivée.
4. N'échangez pas les DTT, les SBT et les PIEs entre les lots de kits.
5. Les PIEs GBS LB et les DTT à usage unique servent à traiter un échantillon à la fois. Ne réutilisez pas les PIEs ni les DTT.
6. Veillez à toujours manipuler les échantillons comme s'ils étaient infectieux et conformément aux procédures de laboratoire sécuritaires telles que celles décrites dans le document Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories⁴ et le document CLSI M29-A45.
7. Portez des gants jetables lorsque vous manipulez les échantillons des patientes et lavez-vous bien les mains ensuite.
8. Le PIE GBS LB contient des réactifs séchés. Vous ne devez pas ouvrir le sachet de protection tant que vous n'êtes pas prêt à procéder au test.
9. Mettez au rebut les réactifs inutilisés et les déchets conformément à la réglementation de votre pays, de votre État, de votre province ou de votre municipalité.
10. N'ouvrez ou ne détruisez PAS le PIE après utilisation. Le bouchon et les joints d'étanchéité du PIE empêchent toute contamination par les produits de l'amplification et/ou les particules infectieuses.
11. N'utilisez pas un PIE ayant subi une chute ou ayant été secouée ou retournée une fois l'échantillon chargé sous peine de fausser les résultats.
12. Le test GBS LB ne produit pas de résultats de sensibilité. Du temps supplémentaire sera nécessaire pour la mise en culture des isolats et la réalisation des épreuves de sensibilité recommandées pour les femmes allergiques à la pénicilline.
13. Veillez à ne pas utiliser de kits ou de composants de kits ayant dépassé la date d'expiration indiquée.
14. Ne mettez pas le PIE chargée au réfrigérateur.

DANGER ET MISES EN GARDE

A notre connaissance, il n'y a pas de risque connu associé à ce produit.

CONSERVATION ET STABILITÉ

1. Les échantillons d'écouvillonnage vaginal ou rectal doivent être entreposés selon les lignes directrices établies¹.
2. Le bouillon d'enrichissement LIM peut être conservé à 25 C pendant deux jours au plus ou à une température comprise entre 2 et 8 C pendant trois jours au plus.
3. Conservez le kit GBS LB entre 2 et 25 C. La date d'expiration est indiquée sur l'étiquette de la boîte du kit N'ouvrez pas un sachet tant que vous n'êtes pas prêt à procéder aux tests. Utilisez le PIE dans les 60 minutes suivant l'ouverture du sachet.
4. Les SBT inoculés peuvent être conservés à 25 C pendant trois jours au plus ou à une température comprise entre 2 et 8 C pendant cinq jours au plus.

MODE D'EMPLOI

PRÉLÈVEMENT ET TRANSPORT D'ÉCHANTILLONS

Type d'échantillons : Écouvillon vaginal ou rectal prélevé chez des femmes antepartum entre 35 et 37 semaines de grossesse. Le prélèvement des échantillons vaginaux et rectaux d'une même patiente doit se faire conformément aux lignes directrices publiées pour le prélèvement des échantillons cliniques pour mise en culture aux fins du dépistage de GBS¹.

1. Prélevez les échantillons vaginaux ou rectaux conformément aux recommandations du CDC¹. Brièvement:
 - a. Écouvillonnez d'abord l'entrée du vagin (ostium vaginae), puis le rectum (c.-à-d. introduire l'écouvillon dans le sphincter anal) en utilisant le même écouvillon ou deux écouvillons différents. Prenez soin de ne pas mélanger l'échantillon avec des selles, de l'urine, de l'eau ou du savon.
 - b. Placez l'écouvillon ou les écouvillons dans un milieu de transport non nutritif (par exemple Liquid Stuart or Liquid Amies) immédiatement après le prélèvement de l'échantillon. Si les écouvillons vaginaux et rectaux sont prélevés séparément auprès du même patient, les deux écouvillons peuvent être placés dans le même flacon de transport.
2. Apposez sur le flacon de transport une étiquette identifiant l'échantillon ou le patient et envoyez-le au laboratoire pour le soumettre aux tests (voir la section «Conservation et stabilité»).

ENRICHISSEMENT DES ÉCHANTILLONS

3. Retirez les écouvillons vaginaux et rectaux du milieu de transport et incubez-les dans un bouillon d'enrichissement LIM sélectif.
4. Incubez le bouillon de LIM inoculé à une température de 35 à 37 C pendant 18 à 24 heures à température ambiante ou 5% de CO₂.
5. Le bouillon d'enrichissement LIM peut être conservé à 25 C pendant deux jours au plus ou à une température comprise entre 2 et 8 C pendant trois jours au plus.
6. Procédez à la préparation des échantillons.

PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

REMARQUE 1 : Commencez le test dans les 60 minutes suivant l'ouverture du sachet contenant le PIE.

1. Pour chaque échantillon à tester, prendre un TTE dans la boîte du kit.
2. Apposez sur le tube échantillon à code barres une étiquette portant l'identification appropriée sans masquer ni écrire sur les codes barres.
3. Mélangez le bouillon d'enrichissement LIM dans l'agitateur-mélangeur vortex à vitesse maximale pendant 15 secondes.
4. À l'aide d'une micropipette étalonnée et d'un cône de taille agrandie résistant aux aérosols, aspirez 15 µL de l'échantillon de bouillon d'enrichissement LIM.
5. Retirez le capuchon du TTE et distribuez l'aliquote d'échantillon enrichi dans le SBT, en prenant soin de ne pas nébuliser l'échantillon. Agitez le liquide dans la pipette du haut vers le bas afin de vous assurer du transfert de l'aliquote d'échantillon.
6. Fermez bien le bouchon du tube échantillon et placez ce dernier sur le poste d'échantillonnage en rack (si vous en utilisez un). Veillez à ce qu'un seul tube échantillon soit ouvert à la fois.
7. Préparez les échantillons supplémentaires à tester en répétant les étapes 1 à 6, puis passez à l'étape 8.
8. Dans l'agitateur-mélangeur vortex, mélangez le tampon d'échantillon pendant 15 secondes à vitesse maximale.
9. Ouvrir la pochette de la cartouche PIE et en extraire la cartouche PIE.
10. Prendre une PTJ dans la boîte du kit et aspirer le tampon pour échantillon (TE) inoculé en pressant l'ensemble de la poire, en plaçant le bout de la pipette dans le tampon pour échantillon et en relâchant lentement la pression sur la poire. Le liquide doit monter entre les deux (2) marques du PTJ. (Figure 2). Si le niveau de liquide ne se situe pas entre les deux (2) marques, déchargez complètement le tampon dans le SBT et répétez l'étape 10.
11. Placez tout le contenu du SB dans la chambre d'injection de l'échantillon de le PIE (Figure 1).
12. Fermez bien le bouchon du PIE en veillant à ce qu'il ferme la chambre complètement et de façon étanche. Placez le PIE sur le poste de travail d'échantillonnage en rack, le cas échéant. Ne mettez pas le PIE chargé au réfrigérateur.
13. Préparez les échantillons supplémentaires à tester en répétant les étapes 8 à 11, puis passez à l'étape 13 en vous assurant qu'un seul PIE est ouvert à la fois.
14. Conservez les échantillons de bouillon d'enrichissement LIM et le tube échantillon inoculé conformément à la section « Conservation et stabilité ».

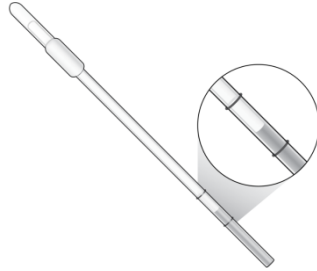


Figure 2. Représentation du niveau approprié du SB avec l'outil de transfert jetable (DTT).

FONCTIONNEMENT DU SYSTÈME REVOGENE

REMARQUE 1 : Il est possible de traiter au maximum huit échantillons à la fois dans le cadre d'une seule analyse (contrôles externes inclus).

REMARQUE 2 : Chaque analyse doit être effectuée avec huit PIEs dans le Revogene. En présence de moins de huit échantillons, remplissez les espaces vides avec des cartouches MOCK PIE*.

1. Vérifiez que l'instrument Revogene est sous tension. Le logiciel se lance automatiquement. Pour de plus amples renseignements sur la configuration et le fonctionnement de l'instrument, consultez le manuel d'utilisation³ du système Revogene.
2. Saisissez votre nom d'utilisateur et votre mot de passe et appuyez sur « **Connexion** ».
3. Appuyez sur le menu « **Configuration de l'analyse** ».
4. Indiquez le numéro d'identification de l'échantillon soit à l'aide du lecteur de codes barres, soit en le saisissant manuellement.
5. Saisissez les codes barres du tube échantillon et du PIE manuellement ou à l'aide du lecteur de codes barres en plaçant doucement le PIE pratiquement à la verticale devant le lecteur. Manipulez le PIE avec précaution sans la secouer, ni la faire tomber.
6. (Facultatif) Indiquez le numéro d'identification du patient soit à l'aide du lecteur de codes barres, soit en le saisissant manuellement.
7. (Facultatif) Appuyez sur « **Ajouter des commentaires** » et saisissez un commentaire.
8. Insérez le PIE dans l'instrument, dans n'importe quelle position du carrousel, et appuyez sur « **OK** ». Le logiciel associera automatiquement l'échantillon et le tube échantillon au bon PIE.
9. Pour ajouter un autre échantillon, appuyez sur « **Ajouter** » et répétez les étapes 4 à 8.
10. Lorsque tous les échantillons sont placés dans le carrousel, appuyez sur « **Suivant** ».
11. Balayez l'anneau de rétention et procédez à son installation. Fermez le couvercle de l'instrument.
12. Exécutez le test en appuyant sur « **Démarrer** ».

* En l'absence de cartouches MOCK PIE, utiliser des cartouches d'essai remplies par le SB ou des contrôles externes.

RÉSULTATS DE VISUALISATION ET D'EXPORTATION

1. Une fois l'analyse effectuée, le couvercle se déverrouille automatiquement.
2. Si la session Revogene s'est fermée, saisissez à nouveau votre nom d'utilisateur et votre mot de passe, et appuyez sur « **Connexion** ».
3. Appuyez sur le menu « **Résultats** » pour accéder aux résultats du test.
4. Appuyez sur « **Dernière analyse** » pour afficher les résultats des derniers tests.
5. Dans le menu « **Dernière analyse** », sélectionnez les échantillons dont les rapports de résultats doivent être exportés. Vous pouvez sélectionner tous les échantillons à la fois en cliquant sur la première case au-dessus.
6. Appuyez sur « **Exporter** » et enregistrez-les à l'endroit approprié (par exemple sur une clé USB).
7. Retirez l'anneau de rétention et les PIEs de l'instrument Revogene.

REMARQUE : Lorsque les résultats Indeterminate (IND) [Indéterminé] ou Unresolved (UNR) [Non résolu] sont obtenus, ou en cas de défaillance du contrôle externe, répétez le test à partir du SBT préparé dans les délais indiqués (reportez-vous à la section « Répéter le test »).

RÉPÉTER LE TEST

REMARQUE : Le test ne peut être répété qu'une fois à l'aide de l'échantillon de bouillon d'enrichissement LIM ou le TTE inoculé.

1. Si le nouveau test est effectué directement à partir de l'échantillon d'enrichissement LIM restant conservé à 25 C pendant deux jour maximum ou à 2 à 8 C pendant trois jour maximum, reportez-vous aux étapes 1 à 11 de la section « Préparation de l'échantillon ». Suivez ensuite les instructions de la section « Fonctionnement du système Revogene ».
2. Si un nouveau test est effectué à partir du tube échantillon inoculé conservé à 25 C pendant trois jour maximum ou à 2 à 8 C pendant cinq jour maximum après la préparation de l'échantillon, mélangez l'échantillon dans l'agitateur- mélangeur vortex pendant 15 secondes à vitesse maximale et suivez les étapes 10 et 11 de la section « Préparation de l'échantillon » pour chaque échantillon. Suivez ensuite les instructions de la section « Fonctionnement du système Revogene ».

CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

Les procédures de contrôle de la qualité contrôlent l'exactitude et la précision du processus analytique. Chaque laboratoire doit établir le nombre, le type et la fréquence relatifs au matériel de contrôle des tests conformément aux réglementations applicables ou aux organismes d'accréditation compétents. La procédure ci-dessous peut être employée, si nécessaire, en fonction des procédures et des politiques locales.

1. Chaque PIE contient un contrôle de procédé qui vérifie l'homogénéisation et la dilution de l'échantillon, la lyse cellulaire, l'inhibition de l'amplification de l'ADN et la défaillance de l'analyse au niveau des réactifs.
2. Les bonnes pratiques de laboratoire recommandent l'utilisation de matériel de contrôle. Les utilisateurs doivent suivre les directives appropriées concernant l'exécution de contrôles de qualité externes. D'après les recommandations, il convient d'exécuter un contrôle externe positif et un contrôle externe négatif au moins une fois par jour jusqu'à ce qu'une validation de processus adéquate soit obtenue sur l'instrument Revogene dans chaque environnement de laboratoire. Le matériel de contrôle externe n'est pas fourni par Meridian Bioscience, Inc.
3. Le matériel de contrôle commercial (par exemple *Streptococcus agalactiae* ATCC® 13813) peut être utilisé à titre de contrôle externe positif. Il est recommandé que les souches bactériennes soient fraîchement préparées dans le bouillon de LIM. Transférez une aliquote de 15 µL d'une culture de 18 à 24 heures du bouillon de LIM dans un SBT et procédez à l'étape 6 de la section « Préparation de l'échantillon ».
4. Un bouillon de LIM pure est recommandé aux fins d'utilisation en tant que contrôle externe négatif. Transférez une aliquote de 15 µL du bouillon de LIM dans un SBT et procédez à l'étape 6 de la section « Préparation de l'échantillon ».
5. Il convient d'utiliser des OTJ, des tubes échantillon et des PIEs distincts pour chaque réactif de contrôle externe.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les résultats sont calculés par le Revogene à partir des signaux fluorescents mesurés et des algorithmes de calcul intégrés et ils s'affichent dans la fenêtre « Résultat » du Revogene. Voici les résultats possibles :

Échantillon	Symbole affiché à l'écran utilisateur	Résultat global signalé	Interprétation
Échantillon patient		Positif	L'échantillon comporte l'ADN cible de GBS.
		Négatif	Aucun ADN cible de GBS détecté ou nombre d'organismes pourrait être inférieur à la limite de détection de l'essai.
		Indéterminé	Aucun résultat à signaler en raison d'éventuelles erreurs de détection de l'instrument Revogene durant le traitement de l'essai ou l'analyse des données, ou à cause de l'interruption de l'analyse par l'utilisateur. Il convient de répéter les tests à l'aide de l'échantillon de bouillon d'enrichissement LIM correspondant ou du TTE inoculé correspondant dans les délais définis ci-dessus.
		Non résolu	Erreur d'amplification/de détection pour le contrôle de procédé ainsi que pour la cible de GBS. Peut être causée par des échantillons inhibiteurs, ou une défaillance au niveau microfluidique ou des réactifs. Il convient de répéter les tests à l'aide de l'échantillon de bouillon d'enrichissement LIM correspondant ou du TTE inoculé correspondant dans les délais définis ci-dessus.
Contrôle externe positif		Positif	Résultat du contrôle externe positif valide.
		Négatif	Résultat du contrôle externe positif incorrect. L'analyse n'est pas valide. Il convient de répéter les tests pour tous les échantillons de l'analyse, à l'aide de l'échantillon de bouillon d'enrichissement LIM correspondant ou du TTE inoculé correspondant avec un nouvel ensemble de contrôles externes dans les délais définis ci-dessus.
		Indéterminé	Résultat du contrôle externe positif incorrect. Aucun résultat à signaler en raison d'éventuelles erreurs de détection de l'instrument Revogene durant le traitement de l'essai ou l'analyse des données, ou à cause de l'interruption de l'analyse par l'utilisateur. L'analyse n'est pas valide. Il convient de répéter les tests pour tous les échantillons de l'analyse, à l'aide de l'échantillon de bouillon d'enrichissement LIM correspondant ou du SBT inoculé correspondant avec un nouvel ensemble de contrôles externes dans les délais définis ci-dessus.
		Non résolu	Résultat du contrôle externe positif incorrect. Erreur d'amplification/de détection pour le contrôle de procédé ainsi que pour la cible de GBS. Peut être causée par des échantillons inhibiteurs, ou une défaillance au niveau microfluidique ou des réactifs. L'analyse n'est pas valide. Il convient de répéter les tests pour tous les échantillons de l'analyse, à l'aide de l'échantillon de bouillon d'enrichissement LIM correspondant ou du SBT inoculé correspondant avec un nouvel ensemble de contrôles externes dans les délais définis ci-dessus.
Contrôle externe négatif		Positif	Contrôle externe positif incorrect causé par un problème de prélèvement des échantillons et/ou de contamination. L'analyse n'est pas valide. Il convient de répéter les tests pour tous les échantillons de l'analyse, à l'aide de l'échantillon de bouillon d'enrichissement LIM correspondant ou du SBT inoculé correspondant avec un nouvel ensemble de contrôles externes dans les délais définis ci-dessus.
		Négatif	Résultat du contrôle externe négatif valide.
		Indéterminé	Résultat du contrôle externe négatif incorrect. Aucun résultat à signaler en raison d'éventuelles erreurs de détection de l'instrument Revogene durant le traitement de l'essai ou l'analyse des données, ou à cause de l'interruption de l'analyse par l'utilisateur. L'analyse n'est pas valide. Il convient de répéter les tests pour tous les échantillons de l'analyse, à l'aide de l'échantillon de bouillon d'enrichissement LIM correspondant ou du SBT inoculé correspondant avec un nouvel ensemble de contrôles externes dans les délais définis ci-dessus.
		Non résolu	Résultat du contrôle externe négatif incorrect. Erreur d'amplification/de détection pour le contrôle de procédé. Peut être causée par des échantillons inhibiteurs, ou une défaillance au niveau microfluidique ou des réactifs. L'analyse n'est pas valide. Il convient de répéter les tests pour tous les échantillons de l'analyse, à l'aide de l'échantillon de bouillon d'enrichissement LIM correspondant ou du SBT inoculé correspondant avec un nouvel ensemble de contrôles externes dans les délais définis ci-dessus.

LIMITES DE LA PROCÉDURE

- Le test GBS LB ne peut être utilisé sur l'instrument Revogene que par du personnel qualifié.
- Un résultat positif au test ne révèle pas nécessairement la présence d'organismes viables. Il indique en revanche la présence d'ADN de GBS.
- La performance du test GBS LB a été établie à l'aide d'échantillons d'écouvillonnage vaginal ou rectal prélevés chez des femmes antepartum, transportés dans un milieu non nutritif (par exemple Liquid Stuart) et enrichis dans un bouillon d'enrichissement LIM sélectif. L'utilisation du test GBS LB pour d'autres types d'échantillons cliniques que ceux indiqués n'a pas été évaluée et les caractéristiques de performance n'ont pas été établies.
- Les échantillons prélevés dans le col de l'utérus ou dans la région périanaire, périrectale ou périnéale ne sont pas acceptables, et aucun spéculum ne doit être utilisé pour le prélèvement.
- Le test GBS LB ne produit pas de résultats de sensibilité. L'épreuve de sensibilité antimicrobienne doit être effectuée sur des isolats de GBS prénataux auprès de femmes allergiques à la pénicilline qui présentent un haut risque d'anaphylaxie.
- L'utilisation de bouillon d'enrichissement différent du bouillon de LIM n'a pas été évaluée.
- Les résultats des tests peuvent être faussés par une manipulation, une conservation ou un prélèvement inadéquat des échantillons, une erreur technique ou le mélange de l'échantillon. Pour éviter ces erreurs, il est indispensable de respecter scrupuleusement les instructions du présent document ou les directives établies.
- Des résultats de test erronés peuvent survenir si un bouchon de PIE est mal fermé.
- Bien qu'on ne connaisse aucune souche ni aucun isolat de GBS dépourvu du gène *cfb*, la présence d'une telle souche produirait un résultat erroné (faux négatif) avec le test GBS LB.
- Les bactéries *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* et *Lactobacillus acidophilus* peuvent inhiber la détection de GBS si elles sont présentes individuellement à une charge de > 104 UFC/mL de SB.
- L'effet potentiellement inhibiteur du gras fécal n'a pas été évalué.
- Une combinaison de chlorhydrate de l'opéramide (par exemple Imodium®), de sous-salicylate de bismuth (par exemple Pepto-Bismol™) et de sennosides (par exemple Senokot®), bien que très peu probable, peut inhiber la détection de GBS lorsque ces substances sont présentes dans le SBT à des concentrations de 0,023 µg/mL, de 0,675 µg/mL et de 0,011 µg/mL, respectivement.
- Les mutations ou polymorphismes des sites de liaison des amorces (ou sondes) peuvent influencer sur la détection des variantes du gène *cfb* de GBS, donnant lieu à un faux négatif lors de l'utilisation du test GBS LB.
- Les résultats du test GBS LB doivent être utilisés comme un complément des observations cliniques et des autres renseignements à la disposition du médecin.
- Un résultat négatif n'exclut pas l'éventualité d'une colonisation par des GBS. Des faux négatifs peuvent être obtenus lorsque la concentration de GBS est inférieure à la limite de détection de l'analyse.
- Ce test ne doit pas servir à établir une distinction entre les porteurs de GBS et les personnes atteintes d'une maladie à streptocoques.
- Les résultats du test pourraient être altérés par un traitement antimicrobien concomitant, car le test pourrait toujours détecter l'ADN de GBS.

VALEURS ATTENDUES

Durant l'évaluation clinique du test Revogene GBS LB, 771 résultats à déclarer, obtenus d'échantillons conformes à la méthode de culture et aux tests PCR, ont été obtenus dans quatre régions géographiquement diverses. Dans l'ensemble, le taux de prévalence de GBS a été de 22,0 % (170/771) avec un IC à 95 % de 19,3 % à 25,1 %.

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

ET PERFORMANCE CLINIQUE

La performance du test GBS LB a été établie au cours d'une étude expérimentale prospective impliquant deux centres canadiens et deux centres américains à l'aide de l'instrument Revogene.

Des échantillons prélevés et testés de façon prospective comprenaient des échantillons de bouillon d'enrichissement LIM excédentaires dépersonnalisés prélevés pour un test de GBS antepartum auprès de femmes se trouvant à 35 à 37 semaines de grossesse. Le bouillon de LIM restant a été utilisé pour le test GBS LB et pour le test de la culture de référence effectué à chaque cent tre.

La performance du test GBS LB a été comparée à la méthode de référence composite comprenant un bouillon d'enrichissement LIM des échantillons d'écouvillonnage vaginal ou rectal, suivie d'une sous-culture sur des boîtes de gélose au sang de mouton et de l'identification biochimique du GBS. Tous les échantillons comportant une culture bactérienne négative ont été réévalués à un laboratoire central indépendant à l'aide des mêmes procédures opérationnelles standard requises pour la culture bactérienne.

Au total, 839 échantillons ont été inclus dans l'étude. Parmi ces derniers, 63 ont été jugés non conformes à la méthode de référence et/ou aux critères du protocole de test GBS LB, 1 échantillon a été jugé non conforme aux modalités de transport et d'entreposage, et 4 échantillons ont été jugés non conformes en raison de résultats de test manquants. Deux (2) échantillons totalement conformes ont donné des résultats finaux de test PCR non mesurables. Au total, 771 résultats d'échantillons ont été utilisés pour déterminer la performance clinique du test GBS LB comparativement à la méthode de référence composite (tableaux 1 et 2).

Les caractéristiques de performance globales du test GBS LB ont démontré une sensibilité de 95,9 % (163/170, IC à 95 % de 91,7 % à 98,0 %) et une spécificité de 95,5 % (574/601), IC à 95 % de 93,5 % à 96,9 %) comparativement à la méthode de référence composite.

Parmi les 812 échantillons analysés par le test GBS LB qui étaient conformes au niveau de l'échantillon et du test PCR, six (0,74 %) ont été déclarés non résolus après l'analyse initiale. Le taux d'échantillons non résolus après la répétition du test était de 0,25 % (2/812).

Parmi les 812 échantillons testés avec le test GBS LB, 12 (1,48 %) ont initialement été désignés comme étant indéterminés, dont 6 d'un essai avec défaillance du contrôle externe, et 6 d'un essai incomplet. Aucun résultat n'est demeuré indéterminé après la répétition du test.

Tableau 1. Caractéristiques de performance globales (tous centres combinés) du test GBS LB comparativement à la méthode de référence composite.

Performance globale		Méthode de référence composite		Total
		Positif	Négatif	
Test GBS LB	Positif	163	27 ^b	190
	Négatif	7 ^a	574	581
	Total	170	601	771

Sensibilité : 95,9 % (IC à 95 % : 91,7 % - 98,0 %)
 Spécificité : 95,5 % (IC à 95 % : 93,5 % - 96,9 %)

^a Cinq des sept résultats faux négatifs au test Revogene GBS LB ont été évalués sur un appareil moléculaire approuvé par la FDA et ont donné des résultats négatifs.

^b 10 des 27 résultats faux positifs au test Revogene GBS LB ont été évalués sur un appareil moléculaire approuvé par la FDA et ont donné des résultats positifs.

Tableau 2. Résumé des caractéristiques de performance du test GBS LB par centre

Centre	Sensibilité	Spécificité	Prévalence ¹
1	87,8 % (36/41)	92,8 % (142/153)	21,1 % (41/194)
2	98,0 % (48/49)	97,5 % (194/199)	19,8 % (49/248)
3	100 % (43/43)	97,0 % (164/169)	20,3 % (43/212)
4	97,3 % (36/37)	92,5 % (74/80)	31,6 % (37/117)
Total	95,9 % (163/170)	95,5 % (574/601)	22,0 % (170/771)

1 La prévalence a été calculée avec des échantillons conformes à la méthode de culture de référence et au test Revogene GBS LB.

SENSIBILITÉ ANALYTIQUE

La sensibilité analytique (limite de détection ou LdD) du test GBS LB a été déterminée à l'aide d'une matrice clinique constituée de bouillon de LIM négatif pour le GBS et enrichie avec différentes concentrations de suspensions bactériennes de GBS. Deux souches de GBS (ATCC 12403 et ATCC 13813) ont été testées dans 24 réplicats par concentration, par deux opérateurs utilisant trois lots différents de kits GBS LB. La LdD est définie comme la concentration minimale à laquelle 95 % de tous les réplicats testés ont été positifs. La LdD du test GBS LB avec les deux souches était comprise entre 200 et 375 UFC/mL de SB (tableau 3).

Tableau 3. LdD du test GBS LB

Souche GBS (numéro ATCC®)	LdD (UFC/mL de SB)
Sérotype III (ATCC 12403)	375
Non hémolytique (ATCC 13813)	200

INCLUSIVITÉ

L'inclusivité du test GBS LB a été déterminée pour 12 souches de GBS représentant 11 sérotypes connus et 1 souche non hémolytique. Chaque souche a été testée à l'aide d'une culture cellulaire quantifiée dans une matrice de bouillon de LIM enrichie négative pour le GBS sur le plan clinique. Vingt-quatre (24) réplicats par concentration par souche ont été testés à l'aide de trois différents lots de kits GBS LB. Les plus faibles concentrations auxquelles les souches ont atteint un taux positif de 100 % sont résumées au tableau 4.

Tableau 4. Organismes testés pour l'inclusivité avec le test Revogene GBS LB.

Souche GBS (numéro ATCC®)	Concentration d'essai (x LdD)*	Concentration d'essai (UFC/mL de SB)	Taux de résultats positifs
Sérotype Ia (ATCC 12400)	< 2	735	100 %
Sérotype Ib (ATCC 51487)	15	5 625	100 %
Sérotype Ic (ATCC 27591)	5	1 875	100 %
Sérotype II (ATCC 12973)	< 2	735	100 %
Sérotype III (ATCC 12403)	1	375	100 %
Sérotype IV (ATCC 49446)	7	2 625	100 %
Sérotype V (ATCC BAA-611)	5	1 875	100 %
Sérotype VI (ATCC BAA-2671)	3	1 125	100 %
Sérotype VII (ATCC BAA-2670)	7	2 625	100 %
Sérotype VIII (ATCC BAA-2669)	10	3 750	100 %
Sérotype IX (ATCC BAA-2668)	3	1 125	100 %
Non hémolytique (ATCC 13813)	1,33	500	100 %

* La LdD de la souche ATCC 12403 a été déterminée à 375 UPC/mL de SB.

En outre, une analyse *in silico* a été effectuée pour évaluer l'inclusivité du test GBS LB pour 36 souches de GBS supplémentaires apparaissant dans la base de données du National Center for Biotechnology Information (NCBI) du 20 octobre 2016. Les résultats de l'alignement n'ont révélé aucune incohérence avec les séquences sélectionnées. L'analyse a prédit la détection de chacune de ces souches de GBS.

RÉACTIVITÉ CROISÉE

Une étude de la réactivité croisée a été effectuée pour évaluer la réactivité imprévue du test GBS LB avec de fortes charges d'organismes liés phylogénétiquement au GBS ou présentes dans la flore urinogénitale et le tube digestif et non visées par le test. L'étude a porté sur 64 bactéries, 4 levures, 4 virus, 2 parasites et de l'ADN humain (tableau 5). Les bactéries et les levures ont été testées à une charge d'au moins 106 UFC/mL de SB. Les acides nucléiques des virus, des parasites et de l'ADN humain ont été testés à une charge d'au moins 105 copies/mL d'ADN ou d'ARN de SB. Ces organismes ont été testés au moyen de cultures cellulaires quantifiées ou de solutions d'acide nucléique enrichies dans une matrice de bouillon d'enrichissement négative pour le GBS sur le plan clinique. Trois réplicats par organisme ont été testés à l'aide de trois lots différents de kits GBS LB.

Dans les conditions de l'étude, aucun des organismes ou acides nucléiques testés n'a été détecté par le test GBS LB.

Tableau 5. Liste des organismes dont la réactivité croisée avec le test GBS LB a été évaluée *in vitro*

Bactéries	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> (ADNg)
<i>Aerococcus viridans</i>	<i>Mycoplasma hominis</i> (ADNg)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Prevotella melaninogenica</i>
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
<i>Bifidobacterium breve</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Brevibacterium linens</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Dublin</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i> (ADNg)	<i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Minneapolis</i>
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Salmonella enterica subsp. Enterica serovar Typhimurium</i>
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Newport</i>
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Corynebacterium genitalium</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (Cowan)
<i>Enterococcus avium</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Enterococcus dispar</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
<i>Enterococcus durans</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Streptococcus bovis</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Streptococcus dysgalactiae subsp. dysgalactiae</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Streptococcus dysgalactiae equisimilis</i>
<i>Escherichia fergusonii</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>
<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>
<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Streptococcus uberis</i>
<i>Lactobacillus delbreuckii</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i> (ADNg)
<i>Lactobacillus jensenii</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
Levures	
<i>Candida albicans</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida tropicalis</i>
Virus	
<i>Herpès simplex virus type 1</i> (ADNg)	<i>Norovirus GII</i> (ARN)
<i>Herpès simplex virus type 2</i> (ADNg)	<i>Virus du papillome humain</i> (VPH) (ADNg)
Parasites	
<i>Blastocystis hominis</i> (ADNg)	<i>Trichomonas vaginalis</i> (ADNg)
ADN humain	
ADN humain (ADNg)	-

En outre, une analyse *in silico* a été réalisée pour évaluer le risque de réactivité croisée du test GBS LB et de 62 organismes supplémentaires que l'on peut trouver dans la flore urinogénitale et le tube digestif (tableau 6). On a supposé qu'aucun des organismes ne présentait une réactivité croisée avec le test GBS LB sur la base du haut degré d'incohérences entre les séquences génétiques sélectionnées du NCBI et les sondes et amorces de test.

Tableau 6. Liste des organismes dont la réactivité croisée avec le test GBS LB a été évaluée *in silico*

Bactéries	
<i>Abiotrophia defectiva</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Mobiluncus mulieris</i>
<i>Campylobacter fetus</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>
<i>Chromobacterium violaceum</i>	<i>Moraxella lacunata</i>
<i>Clostridium bifermentans</i>	<i>Moraxella osloensis</i>
<i>Clostridium butyricum</i>	<i>Morganella morganii</i>
<i>Clostridium novyi</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
<i>Clostridium septicum</i>	<i>Neisseria flava</i>
<i>Clostridium sordelli</i>	<i>Neisseria flavescens</i>
<i>Clostridium sporogenes</i>	<i>Neisseria lactamica</i>
<i>Corynebacterium urealyticum</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>
<i>Corynebacterium xerosis</i>	<i>Neisseria perflava</i>
<i>Deinococcus radiodurans</i>	<i>Plesiomonas shigelloides</i>
<i>Dexia gummosa</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>Eikenella corrodens</i>	<i>Providencia stuartii</i>
<i>Enterococcus gallinarum</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Gemella haemolysans</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>Haemophilus ducreyi</i>	<i>Rhodospirillum rubrum</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>
<i>Haemophilus influenzae type B</i>	<i>Shigella boydii</i>
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Kingella denitrificans</i>	<i>Staphylococcus simulans</i>
<i>Kingella kingae</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Streptococcus gordonii</i>
<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Streptococcus mutans</i>	-
Moisissures/levures	
<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Virus	
<i>Adénovirus 40</i>	<i>Échovirus</i>
<i>Adénovirus 41</i>	<i>Virus d'Epstein-Barr</i>
<i>Virus BK</i>	<i>Rotavirus</i>
<i>Virus Coxsackie</i>	-

ORGANISMES CAUSANT UNE INTERFÉRENCE

Une étude a été menée pour évaluer l'effet potentiellement inhibiteur de 29 organismes qui peuvent être présents dans la flore urogénitale et le tube digestif et qui ne sont pas ciblés par le test. La sélection des organismes a été basée sur leur prévalence dans la flore vaginale/rectale. Les souches *Enterococcus* représentent le plus haut risque d'interférence dû à leur prévalence dans la flore rectale ainsi qu'à leur capacité de croissance dans le bouillon de LIM. D'autres organismes présentent un faible risque de présence à de fortes charges dans l'échantillon étant donné que le bouillon d'enrichissement LIM inhibe leur croissance et que les charges de ces organismes ne peuvent augmenter considérablement après l'échantillonnage. Chaque organisme ou solution d'acide nucléique a été dilué afin d'atteindre une concentration finale de 106 UFC/mL ou cp/mL de SB, sauf les souches *Escherichia coli* (ATCC 11775), *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 4356), *Trichomonas vaginalis* (ATCC 30001) et *Mycoplasma genitalium* (ATCC BAA-2641S), qui ont été testées à 105 UFC/mL ou cp/mL de SB. Une solution de GBS diluée de 15 µL préparée dans une matrice de bouillon de LIM négative sur le plan clinique afin d'atteindre une concentration finale de 735 UFC/mL de SB a été ajoutée au SBT. Les 29 organismes inclus dans l'étude sont présentés au tableau 7.

Tableau 7. Liste des organismes dont l'interférence a été testée avec le test GBS LB

Organismes	
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Dublin</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Corynebacterium genitalium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i> (ADNg)	<i>Trichomonas vaginalis</i> (ADNg)
<i>Herpès simplex virus type 1</i> (ADNg)	<i>Mycoplasma genitalium</i> (ADNg)
<i>Virus du papillome humain</i> (VPH) (ADNg)	-

Aucun des 29 organismes présents à une concentration supérieure ou égale à 105 UFC/mL ou cp/mL de SB dans l'échantillon n'a interféré avec la détection du contrôle du procédé. Parmi les 29 organismes testés, seuls trois ont montré un effet potentiellement inhibiteur sur la détection du GBS (tableau 8). Une inhibition découlant des souches *E. faecalis*, *E. faecium* et *L. acidophilus* a été observée à des concentrations de > 105, > 104 et > 104 UFC/mL de SB, respectivement.

Tableau 8. Organismes interférant avec le test GBS LB

Organisme (numéro ATCC)	Concentration d'essai (UFC/mL de SB)	Taux de résultats positifs (positif/total)	
		GBS non hémolytique (ATCC 13813)	GBS de sérotype (ATCC 12403)
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 19433)	106	66,7 % (2/3)	33,3 % (1/3)
	105	100 % (3/3)	100 % (3/3)
<i>Enterococcus faecium</i> (ATCC 19434)	106	100 % (3/3)	66,7 % (2/3)
	105	ND*	33,3 % (1/3)
	104	ND	100 % (3/3)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> (ATCC 4356)	105	100 % (3/3)	66,7 % (2/3)
	104	ND	100 % (3/3)

* ND : Non déterminé en raison de l'absence d'interférence à la plus forte concentration.

SUBSTANCES CAUSANT UNE INTERFÉRENCE

Une étude a été menée pour évaluer l'effet potentiellement inhibiteur de 22 substances exogènes et de 9 substances endogènes qui peuvent être présentes dans la flore urinogénitale et le tube digestif. Des échantillons de GBS négatifs et positifs à 735 UFC/mL de SB ont été testés en présence d'une matrice de bouillon de LIM négative sur le plan clinique avec la plus forte concentration de la substance sur le plan physiologique. Les 31 substances testées dans 11 groupes sont présentées au tableau 9.

Les résultats n'ont démontré aucune interférence mesurable sur le contrôle de procédé. Seule la combinaison de chlorhydrate de lopéramide (par exemple Imodium®), de sous-salicylate de bismuth (par exemple Pepto-Bismol™) et de sennosides (par exemple Senokot®) à des concentrations de 0,023 µg/mL, de 0,675 µg/mL et de 0,011 µg/mL de SB, respectivement, ont montré un effet potentiellement inhibiteur sur la détection du GBS. Lors de leur test individuel, ces substances n'ont montré aucune interférence mesurable avec le test GBS LB.

Tableau 9. Liste des substances exogènes et endogènes testées avec le test GBS LB.

Substances exogènes			
Groupe	Substance (nom commercial)	Concentration dans le SBT ¹	Résultats ²
A	Fongicide (Micatin®)	0,023 % P/V	AI
	Gel rafraîchissant pour les hémorroïdes (Préparation H®)	0,023 % P/V	
	Gel lubrifiant (lubrifiant gel personnel de K-Y®)	0,023 % P/V	
	Poudre corporelle (déodorant en poudre Vagisil®)	0,023 % P/V	
B	Lotion hydratante (lotion hydratante Aveeno®)	0,023 % P/V	AI
	Huile corporelle (huile corporelle Neutrogena®)	0,023 % V/V	
	Désodorisant aérosol (vaporisateur Summer's Eve™)	0,023 % V/V	
	Lavements (huile minérale USP liquide Life BRAND™)	0,023 % V/V	
C	Antimicrobiens (Canesten®)	0,023 % P/V	AI
	Lavements (Pentasa)	0,495 µg/mL	
	Composés oraux radiologiques (sulfate de baryum)	0,113 µg/mL	
	Médicaments gastriques (Nexium)	0,011 µg/mL	
D	Antimicrobiens (Flagyl)	0,016 µg/mL	AI
	Anti-inflammatoires non stéroïdiens (Aleve®)	0,071 µg/mL	
	Antimicrobiens (DIFLUCAN® One)	0,020 µg/mL	
	Médicaments gastriques (Tums®)	1,200 µg/mL	
E	Anti-diarrhée (Imodium®)	0,023 µg/mL	I
	Anti-diarrhée (Pepto Bismol™)	0,675 µg/mL	
	Laxatifs (Senokot®)	0,011 µg/mL	
F	Spermicide (Trojan® avec lubrifiant spermicide)	0,023 % V/V	AI
	Lingettes humides (lingettes humides jetables à la toilette Equate™)	0,023 % V/V	
	Lingettes humides (Wet Ones®)	0,023 % V/V	
Substances endogènes			
Groupe	Substance	Concentration dans le SBT ¹	Résultats ²
G	Sang complet	0,023 % V/V	AI
	Leucocytes	15 000 cellules/mL	
H	Liquide amniotique	0,023 % V/V	AI
	Muqueux	0,023 % V/V	
I	Liquide séminal	0,023 % V/V	AI
	Urine	0,023 % V/V	
J	Selles	0,023 % V/V	AI
	Méconium	0,023 % V/V	
K	ADN humain	4,65 ng/mL	AI

1 P/V : Poids/Volume; V/V : Volume/Volume

2 I : interférence avec le test GBS LB;

AI : Aucune interférence avec le test GBS LB

PRÉCISION/REPRODUCTIBILITÉ

Une étude de reproductibilité a été menée afin d'évaluer l'écart dans un même centre (précision), entre centres et d'un jour à l'autre avec plusieurs opérateurs. Le panel comprenait trois souches de GBS [ATCC 13813 (non hémolytique), ATCC 12400 (sérotypé Ia) et ATCC 12403 (sérotypé III)] testées à deux concentrations ainsi que deux échantillons vrais négatifs. Chaque échantillon a été testé par deux opérateurs trois fois par jour pendant cinq jours, dans trois centres. Au total, 90 répliqués pour chaque échantillon positif et 180 répliqués pour les échantillons négatifs ont été testés (huit membres du panel x 2 opérateurs x 3 fois par jour x 5 jours x 3 centres). L'étude a été menée à l'aide de trois lots de test GBS LB.

Le panel comprenait trois catégories d'échantillons combinés, comme suit:

1. Faible positif (FP): 1 - < 2 x LdD
2. Modéré positif (MP): > 2 - 3 x LdD
3. Vrai négatif (VN): échantillons sans cible

Les résultats de l'étude de précision dans des centres sont présentés au tableau 10.

Tableau 10. Résumé de l'étude de précision dans des centres

Centre 1				
Catégorie	Résultats/total	% concordance	Moyenne Ct	% CV (Ct)
FP	87/90	96,7 %	37,3	5,4
MP	87/90	96,7 %	36,6	5,0
VN	60/60	100 %	32,1	3,7
Centre 2				
Catégorie	Résultats/total	% concordance	Moyenne Ct	% CV (Ct)
FP	90/90	100 %	36,3	4,2
MP	89/90	98,9 %	35,7	3,8
VN	60/60	100 %	32,7	3,2
Centre 3				
Catégorie	Résultats/total	% concordance	Moyenne Ct	% CV (Ct)
FP	90/90	100 %	35,5	4,1
MP	90/90	100 %	34,9	4,3
VN	60/60	100 %	30,8	2,4

Les résultats de l'étude de reproductibilité entre les centres sont présentés au tableau 11.

Tableau 11. Résumé des résultats de l'étude de reproductibilité entre les centres

Tous sites combinés				
Catégorie	Résultats/total	% concordance	Moyenne Ct	% CV (Ct)
FP	267/270	98,9 %	36,4	2,3
MP	266/270	98,5 %	35,7	2,3
VN	180/180	100 %	31,9	3,1

CONTAMINATION PAR RECIRCULATION ET CONTAMINATION CROISÉE

Une étude a été menée afin d'analyser la contamination par recirculation et la contamination croisée au cours des séries et entre les séries. Des échantillons positifs contenaient 15 µL d'une solution de GBS diluée préparée dans une matrice de bouillon de LIM négative sur le plan clinique afin d'atteindre une concentration finale de $> 10^6$ UFC/mL de SB. Des échantillons négatifs contenaient 15 µL d'une matrice de bouillon de LIM négative sur le plan clinique par SBT. Pour l'étude sur la contamination au cours des séries, quatre réplicats d'échantillons fortement positifs et quatre réplicats d'échantillons négatifs ont été testés dans chacune des séries par des réplicats positifs et négatifs alternatifs. Pour l'étude sur la contamination entre les séries, une série de 8 réplicats d'échantillons fortement positifs, suivie d'une série de 8 réplicats d'échantillons négatifs ont été répétées cinq fois. Chaque opérateur a exécuté dix séries de huit échantillons pour un total de 20 séries.

Dans l'ensemble, tous les échantillons fortement positifs ont été détectés avec précision comme étant positifs, tandis que les échantillons vrais négatifs ont été détectés comme étant négatifs. Le test GBS LB a démontré l'absence de contamination par recirculation et de contamination croisée.

ÉTIQUETAGE ÉLECTRONIQUE

Les documents liés à ce produit sont accessibles en ligne à l'adresse suivante : www.meridianbioscience.com/pi. De plus, vous pouvez obtenir des exemplaires papier de ces documents en communiquant avec votre distributeur local ou en composant le numéro de téléphone inscrit sur la boîte du kit.

revogene®

GBS LB

Para uso con el analizador Revogene®

REF 410200

IVD Para diagnóstico *in vitro*



Rx Only

USO INDICADO

El ensayo Revogene® GBS LB, que se realiza en el analizador Revogene, es una prueba cualitativa de diagnóstico *in vitro* diseñada para detectar ADN de *Streptococcus* del grupo B (EGB) a partir de hisopados vaginales/rectales obtenidos de mujeres embarazadas y mantenidos durante 18-24 horas en medio de cultivo de enriquecimiento LIM. El ensayo Revogene GBS LB utiliza el procesamiento de muestras automatizado y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real para detectar una secuencia del gen *cbf* específica del genoma de *Streptococcus agalactiae*.

El ensayo Revogene GBS LB se emplea para identificar la colonización prenatal de EGB, pero no proporciona resultados de sensibilidad. No está pensado para diagnosticar ni supervisar el tratamiento de la infección por EGB. Para realizar antibiogramas, como se recomienda en el caso de las mujeres alérgicas a la penicilina, hacen falta cepas aisladas en cultivo.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

El *Streptococcus* del grupo B es una bacteria Gram-positiva que se encuentra normalmente en el tubo gastrointestinal, el aparato genital y las vías urinarias de los adultos sanos. Aproximadamente un 10-30 % de todas las mujeres embarazadas presentan colonización por EGB en la vagina o el recto¹.

La colonización de las madres por EGB no suele provocar ningún síntoma ni tener efecto alguno sobre la salud. Sin embargo, este tipo de infección bacteriana se asocia con enfermedades graves en los recién nacidos de mujeres colonizadas por el microorganismo. En los recién nacidos, este tipo de enfermedad suele causar sepsis (infección de la sangre), neumonía (infección de los pulmones) y, a veces, meningitis (infección del líquido y del endotelio que rodea el cerebro). La tasa de mortalidad de los lactantes con infección por estreptococo del grupo B de aparición temprana (durante la primera semana de vida) se estima actualmente que está entre el 4 y el 6 %¹. Los bebés que sobreviven pueden tener discapacidades permanentes, como pérdida de audición o de visión o retraso mental².

La transmisión del EGB de la madre al recién nacido se produce principalmente durante el trabajo de parto y el nacimiento (*intraparto*)². El cribado prenatal para detectar la colonización por EGB en mujeres embarazadas a las 35 y 37 semanas de gestación, seguido de un tratamiento antibiótico profiláctico *intraparto* en las mujeres que den positivo, ha demostrado ser un método eficaz para prevenir la infección perinatal por estreptococos del grupo B. Como la colonización puede ser transitoria, intermitente o persistente a lo largo del embarazo, el cribado es más eficaz si las muestras se obtienen en las cinco semanas previas al parto (a las 35-37 semanas de gestación) y después se enriquecen con un medio de cultivo selectivo¹.

La mayoría de las pruebas de EGB se realizan mediante cultivo, y se pueden tardar hasta 48 horas en identificar definitivamente el EGB tras una incubación inicial de 18-24 horas de un hisopado vaginal/rectal en un medio de cultivo selectivo.

El ensayo GBS LB permite obtener los resultados de hasta ocho muestras en aproximadamente una hora a partir del momento en que esté disponible la muestra del medio de cultivo LIM. El ensayo reduce al máximo la intervención del técnico desde el momento en que se coloca el cartucho microfluídico desechable de un solo uso (PIE) con la muestra en el carrusel del Revogene hasta que se dispone de los resultados. El ensayo reduce al máximo la intervención del técnico desde el momento en que se coloca el cartucho microfluídico desechable de un solo uso (PIE) con la muestra en el carrusel del Revogene hasta que se dispone de los resultados.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

El analizador Revogene automatiza la homogeneización y la dilución de las muestras, la lisis celular, la amplificación del ADN y la detección de los productos de la amplificación de la PCR. El usuario solo tiene que intervenir para descargar la muestra de la paciente en el tubo de tampón de muestra (TTM), transferir la muestra al PIE y cargar/descargar los PIE en el carrusel del Revogene.

Cada PIE es un dispositivo cerrado totalmente integrado en el que se dispensa una muestra y –a través de diferentes cámaras y canales de microfluidos– se produce el procesamiento de la muestra (es decir, la homogeneización y dilución de la muestra, y la lisis celular). El líquido de una muestra individual se transfiere por centrifugación de una cámara a la siguiente de forma secuencial, y todos los reactivos específicos de la PCR se incorporan y se secan dentro de los pocillos de PCR. En cada PIE también se incorpora un Control del proceso (CdP) para controlar el procesamiento de las muestras y los pasos de amplificación (figura 1). El CdP permite verificar la posible presencia de sustancias inhibitoras, así como fallos de los microfluidos, el instrumento o los reactivos. Una vez cargado un PIE en el Revogene ya no es necesaria la intervención del técnico. Los productos amplificados se detectan en tiempo real mediante sondas químicas TaqMan® específicas de la diana.

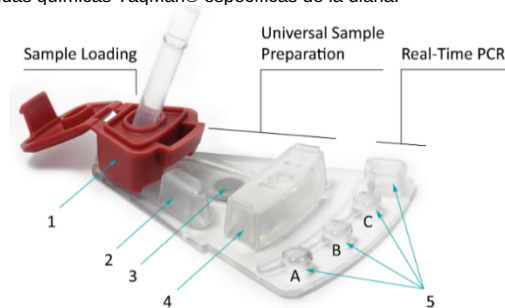


Figura 1. Vista superior de un PIE

- 1: Cámara de carga de la muestra, 2: Cámara de desbordamiento,
3: Cámara de homogeneización, con CP en su interior, 4: Cámara de dilución/lisis,
5: Tres (3) pocillos de PCR (A a C de izquierda a derecha) y una (1) Cámara de residuos (en el lado derecho).

El analizador Revogene puede procesar entre una y un máximo de ocho muestras simultáneamente en una misma serie analítica. El carrusel debe contener ocho PIE para mantener el equilibrio termodinámico de la serie. Al final del análisis, el sistema interpola los resultados a partir de las señales fluorescentes medidas y de los algoritmos de cálculo que incorpora. El usuario puede imprimir, transferir y almacenar los resultados que se indican en la pantalla táctil utilizando el puerto USB o la opción de conectividad.

REACTIVOS Y MATERIALES

El kit GBS LB contiene suficientes reactivos y materiales para procesar 24 muestras. El kit contiene los siguientes materiales:

1. 24 **tubos de tampón de muestra (TTM)**: tubo con etiqueta de código de barras con una solución tamponada TE 1X (Tris-HCl pH 8,0/EDTA.Na₂) que actúa de tampón de dilución y conservación de la muestra.
2. 24 **dispositivos de transferencia desechables (DTD)**: el DTD consiste en una pipeta de transferencia de un solo uso para transferir la muestra del TTM al PIE.
3. 24 bolsas individuales, cada una de ellas con un (1) **PIE GBS LB**: un dispositivo integrado que incluye reactivos secos para procesar la muestra y efectuar los pasos de la PCR en tiempo real para la amplificación y detección del EGB. Cada PIE contiene CdP, cebadores y una sonda específicos para el CdP, cebadores y una sonda específicos para el gen *cfb* del EGB, dNTP, tampón y ADN polimerasa.

MATERIALES/EQUIPOS NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

1. Analizador Revogene® (n.º ref. 610210)
2. Guantes desechables, sin talco
3. Agitador vórtex (n.º ref. 131132 u otro equivalente)
4. Gradilla de muestras (n.º ref. 132539; opcional)
5. Hisopo adecuado para la recogida de muestras vaginales/rectales y medio de transporte recomendado (p. ej., medio líquido de Stuart o de Amies)
6. Medio de cultivo LIM de enriquecimiento selectivo (medio Todd Hewitt complementado con colistina (10 µg/mL) y ácido nalidíxico (15 µg/mL) (Alere, n.º ref. L57 o equivalente))
7. Micropipeta calibrada (se recomienda una P20, VWR, n.º ref. 89079-964 o equivalente)
8. Puntas de micropipeta extendidas sin ADNasa/ARNasa resistentes a los aerosoles (Sarstedt, n.º ref. 70.1189.215 o equivalente)
9. PIE SIMULADO (n.º ref. 610208, opcional)

ADVERTENCIA Y PRECAUCIONES

1. Este producto solo se puede utilizar con el analizador Revogene.
2. No utilice el kit si al recibirlo observa que la etiqueta que precinta la caja exterior está rota.
3. No utilice los reactivos GBS LB si las bolsas de protección llegan abiertas o rotas.
4. No intercambie DTD, TTM y PIE entre distintos lotes del kit.
5. Cada DTD y PIE GBS LB de un solo uso se utiliza para procesar una sola muestra. No reutilice el PIE ni el DTD.
6. Maneje siempre las muestras como si fueran infecciosas y siguiendo unas prácticas de laboratorio seguras como las que se describen en Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories⁴ y en el documento M29-A44 del CLSI⁵.
7. Utilice guantes desechables para manipular las muestras de las pacientes y lávese después muy bien las manos.
8. El PIE GBS LB contiene reactivos secos. No debe abrir la bolsa de protección hasta que esté listo para hacer el análisis.
9. Deseche los residuos y los reactivos que no se hayan utilizado con arreglo a la normativa nacional, federal, provincial, estatal y local.
10. No abra ni desmonte el PIE después de usarlo. La tapa y los precintos del PIE evitan que se contamine con productos de la amplificación y/o partículas infecciosas.
11. No utilice un PIE si se ha caído, agitado o invertido cuando ya se ha cargado la muestra, los resultados podrían no ser válidos.
12. El ensayo GBS LB no proporciona resultados de sensibilidad. Para cultivar cepas aisladas y realizar antibiogramas, como se recomienda hacer en el caso de las mujeres alérgicas a la penicilina, hace falta más tiempo.
13. No utilice kits ni componentes de kits si ya ha pasado su fecha de caducidad.
14. No refrigere el PIE cargado.

DECLARACIONES DE RIESGO Y PRECAUCIÓN

No se conoce ningún riesgo asociado con este producto.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

1. Los hisopados vaginales/rectales deben almacenarse de acuerdo con las directrices establecidas¹.
2. El medio de cultivo de enriquecimiento LIM se puede conservar a 25 C durante un máximo de 2 días, o a 2-8 C durante un máximo de 3 días.
3. Almacene el kit GBS LB a una temperatura de 2-25 C. La fecha de caducidad se indica en la etiqueta de la caja del kit. No abra una bolsa hasta que esté listo para hacer el análisis. Después de abrir la bolsa, use el PIE antes de 1 hora.
4. El TTM inoculado se puede conservar a 25 C durante un máximo de 3 días, o a 2-8 C durante un máximo de 5 días.

INSTRUCCIONES DE USO

RECOLECCIÓN Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS

Tipo de muestra: Hisopados vaginales/rectales obtenidos de mujeres antes del parto, a las 35-37 semanas de gestación.

Las muestras vaginales/rectales de una misma paciente deben obtenerse siguiendo las directrices publicadas para la recolección de muestras clínicas para el cultivo de EGB¹.

1. Obtenga el hisopado vaginal/rectal siguiendo las recomendaciones de los CDC¹. Brevemente:
 - a. Tome una muestra de la parte inferior de la vagina (orificio vaginal), seguida de una del recto (es decir, introduzca el hisopo a través del esfínter anal) utilizando el mismo hisopo o dos hisopos diferentes. Procure no mezclar la muestra con heces, agua, orina o jabón.
 - b. Inmediatamente después de obtener la muestra, coloque el hisopo o hisopos en un medio de transporte no nutritivo (p. ej., medio líquido de Stuart o de Amies). Si se recogen por separado hisopados vaginales y rectales de una misma paciente, ambos hisopos pueden ponerse en el mismo recipiente de transporte.
2. Etiquete el recipiente de transporte con el ID de la muestra o de la paciente y llévela a analizar al laboratorio (consulte el apartado «Almacenamiento y estabilidad»).

ENRIQUECIMIENTO DE LAS MUESTRAS

3. Saque el hisopo o hisopos vaginales/rectales del medio de transporte e inocule con ellos el medio de cultivo LIM de enriquecimiento selectivo.
4. Incube el medio de cultivo LIM inoculado a 35-37 °C durante 18-24 horas en aire ambiente o con un 5 % de CO₂.
5. El medio de cultivo de enriquecimiento LIM se puede conservar a 25 C durante un máximo de 2 días, o a 2-8 C durante un máximo de 3 días.
6. Proceda a preparar las muestras.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

NOTA 1: Comience el análisis antes de que haya pasado 1 hora desde el momento de abrir la bolsa que contiene el PIE.

1. Saque un TTM de la caja del kit por cada muestra que se vaya a analizar.
2. Etiquete el TTM con el identificador de la muestra, sin tapar ni escribir encima del código de barras.
3. Agite con un vórtex la muestra enriquecida con medio de cultivo LIM a alta velocidad durante 15 segundos.
4. Usando una micropipeta calibrada y una punta extendida resistente a los aerosoles, aspire 15 µL de la muestra enriquecida con medio de cultivo LIM.
5. Quite la tapa del TTM y dispense la alícuota de la muestra enriquecida en el TTM, procurando que no se formen aerosoles. Suelte y recoja varias veces el líquido con la pipeta para asegurarse de que se transfiere toda la muestra.
6. Cierre bien el TTM con la tapa y coloque el tubo en la gradilla de muestras, si la utiliza. Abra solamente un TTM a la vez.
7. Prepare las demás muestras que se vayan a analizar repitiendo los pasos 1 a 6 y vaya luego al paso 8.
8. Mezcle el TTM en un agitador vórtex durante 15 segundos a la velocidad máxima.
9. Abra el precinto de la bolsa del PIE y saque el PIE.
10. Saque un DTD de la caja del kit y aspire el tampón de muestra (TM) inoculado; para ello, apriete del todo el bulbo. El nivel del líquido del DTD debe estar situado en un punto cualquiera entre las dos marcas (figura 2). Si el nivel de líquido no está entre las dos marcas, descargue completamente el TM en el TTM y repita el paso 10.
11. Descargue todo el TM en la cámara de inyección de la muestra del PIE (figura 1).
12. Cierre bien la tapa del PIE de modo que la cámara quede completamente sellada. Coloque el PIE en la gradilla de muestras, si se utiliza. No refrigere el PIE cargado.
13. Prepare el resto de las muestras del ensayo repitiendo los pasos 8 a 11, y vaya después al paso 13, procurando que solo haya un PIE abierto en cada momento.
14. Conserve las muestras enriquecidas con medio de cultivo LIM y el TTM inoculado de acuerdo con las instrucciones del apartado «Almacenamiento y estabilidad».

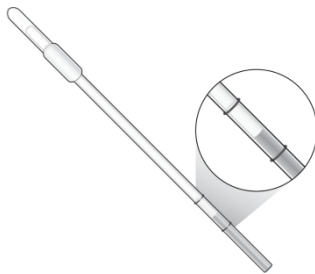


Figura 2.

Ejemplo de un nivel adecuado de tampón de muestra (TM) utilizando el dispositivo de transferencia desechable (DTD)

FUNCIONAMIENTO DEL SISTEMA REVOGENE

NOTA 1: En una misma serie se pueden procesar al mismo tiempo como máximo ocho muestras (incluidos los controles externos).

NOTA 2: Todos los análisis deben efectuarse con ocho PIE colocados en el analizador Revogene. Si se van a procesar menos de ocho muestras, llene los espacios vacíos con PIE SIMULADOS*.

1. Encienda el analizador Revogene. El software se inicia automáticamente. Consulte el manual de funcionamiento del analizador Revogene³ para obtener más información sobre la configuración y el funcionamiento del mismo.
2. Introduzca el Nombre de usuario y la Contraseña y pulse <Iniciar sesión>.
3. Pulse en el menú **Configurar análisis**.
4. Introduzca el número de identificación de la muestra utilizando el lector de códigos de barras o manualmente.
5. Introduzca los códigos de barras del TTM y del PIE manualmente, o bien con el escáner de códigos de barras situando cuidadosamente el PIE casi en vertical delante del escáner. Maneje el PIE con cuidado, procurando no sacudirlo y que no se caiga.
6. (Opcional) Introduzca el número de identificación de la paciente utilizando el lector de códigos de barras o manualmente.
7. (Opcional) Pulse <Añadir comentarios> y escriba un comentario.
8. Inserte el PIE en el analizador, en cualquier posición del carrusel, y pulse <Aceptar>. El software asocia automáticamente la muestra y el TTM con el PIE correcto.
9. Para añadir otra muestra, pulse <+Añadir> y repita los pasos 4 a 8.
10. Cuando haya colocado todas las muestras en el carrusel, pulse <Siguiente>.
11. Escanee el anillo de retención y proceda a instalarlo. Cierre la tapa del analizador.
12. Inicie el análisis pulsando <Iniciar>.

*Si no hay PIE SIMULADOS disponibles, utilice PIE del ensayo cargados con TM o con controles externos.

VER Y EXPORTAR RESULTADOS

1. Una vez finalizado el análisis, la tapa se desbloquea automáticamente.
2. Si se ha cerrado la sesión del Revogene, vuelva a introducir el Nombre de usuario y la Contraseña y pulse <Iniciar sesión>.
3. Pulse en el menú <Resultados> para ver los resultados del ensayo.
4. Pulse <Última serie> para ver los resultados del último análisis.
5. En el menú <Última serie>, seleccione las muestras para las que se tienen que exportar informes de resultados. Se pueden seleccionar todas las muestras de una sola vez haciendo clic en la primera casilla de la parte superior.
6. Pulse <Exportar> y guarde los informes donde corresponda (p. ej., la memoria USB).
7. Retire el anillo de retención y los PIE del Revogene.

NOTA: Cuando se obtiene un resultado indeterminado (IND) o inconcluso (RIC), o falla un control externo, debe volver a analizarse el TTM ya preparado dentro de los plazos especificados (véase el apartado Repetición del procedimiento de la prueba).

REPETICIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

NOTA: Solo se permite volver a analizar una vez la muestra enriquecida con medio de cultivo LIM o el TTM inoculado original correspondiente.

1. Si el análisis se repite usando directamente el resto de la muestra enriquecida con medio de cultivo LIM almacenada a 25 °C durante un máximo de 2 días, o a 2-8 °C hasta 3 días, consulte los pasos 1 a 11 del apartado Preparación de las muestras. A continuación, siga las instrucciones del apartado Funcionamiento del sistema Revogene.
2. Si el análisis se repite usando el TTM inoculado conservado a 25 °C durante un máximo de 3 días, o a 2-8 °C hasta 5 días después de la preparación de la muestra, agite la muestra con un vórtex durante 15 segundos a la velocidad máxima, y siga los pasos 10 y 11 del apartado Preparación de las muestras con cada una de las muestras. A continuación, siga las instrucciones del apartado Funcionamiento del sistema Revogene.

CONTROL DE CALIDAD

Los procedimientos de control de calidad permiten comprobar la exactitud y la precisión del procedimiento analítico. Cada laboratorio debe establecer el número, tipo y frecuencia de los materiales de control del análisis conforme a la reglamentación aplicable o a las agencias de acreditación. Si es apropiado con arreglo a las políticas y procedimientos locales, se puede emplear el procedimiento que se describe a continuación.

1. Cada PIE contiene un control del proceso (CdP) para verificar la homogeneización y la dilución de la muestra, la lisis celular, la inhibición de la amplificación del ADN y un posible fallo de los reactivos del ensayo.
2. Las buenas prácticas de laboratorio recomiendan usar materiales de control. Los usuarios deben seguir las correspondientes directrices relativas al análisis de controles de calidad externos. Se recomienda analizar un control externo positivo y un control externo negativo al menos una vez al día hasta que se consiga validar adecuadamente el procedimiento en el analizador Revogene en cada laboratorio. Los materiales de control externo no los proporciona Meridian Bioscience, Inc.
3. Para el control externo positivo se puede usar material de control comercial (p. ej., *Streptococcus agalactiae* ATCC® 13813). Es conveniente preparar las cepas bacterianas en medio de cultivo LIM en el mismo momento. Transfiera a un TTM una alícuota de 15 µL de la muestra incubada durante 18-24 horas en medio de cultivo LIM y continúe a partir del paso 6 del apartado Preparación de las muestras.
4. Como control externo negativo se recomienda usar medio de cultivo LIM puro. Transfiera a un TTM una alícuota de 15 µL de medio de cultivo LIM y continúe a partir del paso 6 del apartado Preparación de las muestras.
5. Para preparar cada reactivo de control externo deben utilizarse DTD, TTM y PIE distintos.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

El analizador Revogene calcula los resultados a partir de las señales fluorescentes medidas y de los algoritmos de cálculo que incorpora, y los presenta en la ventana Resultados. Los posibles resultados son:

Muestra	Símbolo representado en la pantalla del usuario	Resultado general comunicado	Interpretación
Muestra de la paciente		Positivo	La muestra contiene el ADN diana del EGB.
		Negativo	No se ha detectado ADN diana del EGB o el número de organismos puede estar por debajo del límite de detección del ensayo.
		Indeterminado	No hay resultados que notificar por un posible error de detección del Revogene durante el procesamiento del ensayo, el análisis de los datos o si el usuario interrumpe el análisis. Debe repetirse el análisis utilizando la correspondiente muestra enriquecida con medio de cultivo LIM o el TTM inoculado original en los plazos anteriormente indicados.
		Inconcluso	Fallo de amplificación/detección del Control del proceso así como de la diana del EGB. Puede deberse a la presencia de muestras inhibitorias o a un fallo de los microfluidos o de los reactivos. Debe repetirse el análisis utilizando la correspondiente muestra enriquecida con medio de cultivo LIM o el TTM inoculado original en los plazos anteriormente indicados.
Control externo positivo		Positivo	Resultado del control externo positivo válido.
		Negativo	Resultado del control externo positivo incorrecto. La serie analítica no es válida. Debe repetirse el análisis de todas las muestras de la serie utilizando la correspondiente muestra enriquecida con medio de cultivo LIM o el TTM inoculado original y una nueva serie de controles externos en los plazos anteriormente indicados.
		Indeterminado	Resultado del control externo positivo incorrecto. No hay resultados que notificar por un posible error de detección del Revogene durante el procesamiento del ensayo, el análisis de los datos o si el usuario interrumpe el análisis. La serie analítica no es válida. Debe repetirse el análisis de todas las muestras de la serie utilizando las correspondientes muestras enriquecidas con medio de cultivo LIM o los TTM inoculados originales y una nueva serie de controles externos en los plazos anteriormente indicados.
		Inconcluso	Resultado del control externo positivo incorrecto. Fallo de amplificación/detección del Control del proceso así como de la diana del EGB. Puede deberse a la presencia de muestras inhibitorias o a un fallo de los microfluidos o de los reactivos. La serie analítica no es válida. Debe repetirse el análisis de todas las muestras de la serie utilizando las correspondientes muestras enriquecidas con medio de cultivo LIM o los TTM inoculados originales y una nueva serie de controles externos en los plazos anteriormente indicados.
Control externo negativo		Positivo	Resultado del control externo negativo incorrecto debido a un problema de manipulación de la muestra o de contaminación. La serie analítica no es válida. Debe repetirse el análisis de todas las muestras de la serie utilizando las muestras enriquecidas con medio de cultivo LIM originales correspondientes o los TTM inoculados correspondientes con una nueva serie de controles externos en los plazos anteriormente indicados.
		Negativo	Resultado del control externo negativo válido.
		Indeterminado	Resultado del control externo negativo incorrecto. No hay resultados que notificar por un posible error de detección del Revogene durante el procesamiento del ensayo, el análisis de los datos o si el usuario interrumpe el análisis. La serie analítica no es válida. Debe repetirse el análisis de todas las muestras de la serie utilizando las correspondientes muestras enriquecidas con medio de cultivo LIM o los TTM inoculados originales y una nueva serie de controles externos en los plazos anteriormente indicados.
		Inconcluso	Resultado del control externo negativo incorrecto. Fallo de amplificación/detección del Control del proceso. Puede deberse a la presencia de muestras inhibitorias o a un fallo de los microfluidos o de los reactivos. La serie analítica no es válida. Debe repetirse el análisis de todas las muestras de la serie utilizando las correspondientes muestras enriquecidas con medio de cultivo LIM o los TTM inoculados originales y una nueva serie de controles externos en los plazos anteriormente indicados.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. El ensayo GBS LB solo lo puede llevar a cabo personal debidamente formado en el uso del analizador Revogene.
2. Un resultado analítico positivo no indica necesariamente la presencia de organismos viables. Sin embargo, sí es indicativo de la presencia de ADN de EGB.
3. Para establecer las características de funcionamiento del ensayo GBS LB se usaron hisopados vaginales/rectales obtenidos de mujeres antes del parto, transportados en un medio no nutritivo (p. ej., medio líquido de Stuart) y enriquecidos con medio de cultivo selectivo LIM. No se ha evaluado el uso del ensayo GBS LB ni se han establecido sus características de funcionamiento para otros tipos de muestras clínicas distintos de los especificados.
4. Las muestras cervicouterinas, perianales, perirectales o perineales no son aceptables, y no se debe utilizar un espéculo para obtener el cultivo.
5. El ensayo GBS LB no proporciona resultados de sensibilidad. En las mujeres alérgicas a la penicilina con un riesgo elevado de anafilaxia conviene hacer antibiogramas de cepas aisladas de EGB antenatales.
6. No se ha evaluado el uso de otros medios distintos del medio de enriquecimiento LIM.
7. Los resultados analíticos erróneos pueden deberse a una recolección, manipulación o almacenamiento inadecuados de las muestras, a un error técnico o a una confusión de las muestras. Para evitar resultados erróneos, es necesario cumplir escrupulosamente las instrucciones de este prospecto y las directrices establecidas.
8. No cerrar bien la tapa de un PIE puede dar lugar a un resultado analítico erróneo.
9. Aunque no se conocen cepas/aislados de EGB que carezcan del gen *cfb*, la aparición de una cepa de ese tipo daría lugar a un resultado erróneo (negativo falso) en el ensayo GBS LB.
10. *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* y *Lactobacillus acidophilus* pueden inhibir la detección de EGB si se encuentran a concentraciones individuales > 10⁴ UFC/mL de TM.
11. No se ha evaluado el posible efecto inhibidor de la grasa fecal.
12. Aunque es muy poco probable, una combinación de clorhidrato de loperamida (p. ej., Imodium®), subsalicilato de bismuto (p. ej., Pepto-Bismol™) y senósidos (p. ej., Senokot®) podría inhibir la detección de EGB si estas sustancias están presentes en el TTM a concentraciones de 0,023 µg/mL, 0,675 µg/mL y 0,011 µg/mL respectivamente.
13. Las mutaciones o polimorfismos de las regiones de unión al cebador o a la sonda podrían afectar a la detección de las variantes del gen *cfb* del EGB, y dar lugar a un resultado negativo falso en el ensayo GBS LB.
14. Los resultados del ensayo GBS LB deben utilizarse como complemento de las observaciones clínicas y otra información a disposición del médico.
15. Un resultado negativo no descarta la posibilidad de una colonización por EGB. Pueden obtenerse resultados negativos falsos si la concentración de EGB es inferior al límite de detección del ensayo.
16. El objetivo del análisis no es diferenciar a las portadoras del EGB de quienes padecen la enfermedad estreptocócica.
17. Los resultados del ensayo pueden verse afectados por un tratamiento antimicrobiano simultáneo, ya que puede que se siga detectando el ADN del EGB.

VALORES ESPERADOS

En el estudio de investigación del ensayo Revogene GBS LB, se obtuvieron un total de 771 resultados notificables de muestras que cumplían los criterios del cultivo y de la PCR de 4 regiones geográficas diferentes. La tasa global de prevalencia del EGB fue del 22,0 % (170/771) con un IC del 95 % del 19,3-25,1 %.

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

FUNCIONAMIENTO CLÍNICO

Para establecer el funcionamiento del ensayo GBS LB se realizó un estudio de investigación prospectivo en el que participaron dos laboratorios canadienses y dos estadounidenses que utilizaron el analizador Revogene.

Las muestras recolectadas y ensayadas de forma prospectiva eran muestras desidentificadas enriquecidas con medio de cultivo LIM que habían sobrado de pruebas de diagnóstico del EGB que se practican habitualmente a mujeres prenatales a las 35-37 semanas de gestación. El medio de cultivo LIM sobrante se usó para el ensayo GBS LB y para las pruebas del cultivo de referencia realizadas en cada laboratorio.

El funcionamiento del ensayo GBS LB se comparó con un método de referencia compuesto que consistía en un enriquecimiento del hisopado vaginal/rectal con medio de cultivo LIM, seguido de un subcultivo en placas de agar con sangre de oveja y la identificación del EGB por métodos bioquímicos. Todas las muestras con un resultado negativo en el cultivo bacteriano se volvieron a analizar en un único laboratorio central independiente utilizando los mismos procedimientos normalizados de trabajo requeridos para el cultivo bacteriano.

En el estudio se incluyeron un total de 839 muestras. De estas muestras, 63 incumplían los criterios con arreglo al método de referencia o al protocolo del ensayo GBS LB, 1 muestra incumplía los relativos a las condiciones de transporte y almacenamiento y en otras 4 muestras faltaban los resultados analíticos. En dos (2) muestras que cumplían todos los criterios, no se obtuvieron resultados finales que notificar en la PCR. Para determinar el funcionamiento clínico del ensayo GBS LB en comparación con el método de referencia compuesto se utilizaron los resultados de un total de 771 muestras (tablas 1 y 2).

Las características generales de funcionamiento del ensayo GBS LB pusieron de manifiesto una sensibilidad del 95,9 % (163/170, IC del 95 % del 91,7-98,0 %) y una especificidad del 95,5 % (574/601), IC del 95 % del 93,5-96,9 %) en comparación con el método de referencia compuesto. En 6 (0,74 %) de las 812 muestras analizadas con el ensayo GBS LB que cumplían los criterios de la muestra y de la PCR se obtuvo un resultado inconcluso en el análisis inicial. La tasa de resultados inconclusos después de la repetición del análisis fue del 0,25 % (2/812).

Al analizar esas mismas 812 muestras con el ensayo GBS LB, 12 (1,48 %) dieron inicialmente un resultado indeterminado: 6 de una serie con un fallo del control externo y 6 debido a un análisis incompleto. Al repetirse el análisis no hubo ningún resultado indeterminado.

Tabla 1. Características generales de funcionamiento (todos los laboratorios combinados) del ensayo GBS LB en comparación con el método de referencia compuesto.

Funcionamiento general	Método de referencia compuesto		
	Positivo	Negativo	Total
Ensayo GBS LB	163	27B	190
	7A	574	581
	170	601	771

Sensibilidad: 95,9 % (IC del 95 %: 91,7-98,0 %)

Especificidad: 95,5 % (IC del 95 %: 93,5-96,9 %)

^a 5 de 7 resultados negativos falsos en el ensayo Revogene GBS LB se analizaron con un producto de biología molecular aprobado por la FDA, y también se obtuvieron resultados negativos.

^b 10 de 27 resultados positivos falsos en el ensayo Revogene GBS LB se analizaron con un producto de biología molecular aprobado por la FDA, y también se obtuvieron resultados positivos.

Tabla 2. Resumen de las características de funcionamiento del ensayo GBS LB por laboratorio

Laboratorio	Sensibilidad	Especificidad	Prevalencia ¹
1	87,8 % (36/41)	92,8 % (142/153)	21,1 % (41/194)
2	98,0 % (48/49)	97,5 % (194/199)	19,8 % (49/248)
3	100 % (43/43)	97,0 % (164/169)	20,3 % (43/212)
4	97,3 % (36/37)	92,5 % (74/80)	31,6 % (37/117)
Total	95,9 % (163/170)	95,5 % (574/601)	22,0 % (170/771)

¹La prevalencia se calculó con muestras que cumplían los criterios del método de referencia de cultivo y del ensayo Revogene GBS LB.

SENSIBILIDAD ANALÍTICA

La sensibilidad analítica (límite de detección o LD) del ensayo GBS LB se determinó utilizando una matriz de medio de cultivo LIM con un resultado negativo previo para EGB y enriquecida con diferentes concentraciones de suspensiones bacterianas de EGB. Dos técnicos diferentes analizaron 24 réplicas por concentración de dos cepas de EGB (ATCC 12403 y ATCC 13813) usando 3 lotes diferentes de kits GBS LB. El LD se define como la concentración más baja a la que el 95 % de todas las réplicas dieron un resultado positivo. El LD del ensayo GBS LB con las dos cepas analizadas oscilaba entre 200 y 375 UFC/mL de TM (tabla 3).

Tabla 3. LD del ensayo GBS LB

Cepa de EGB (número ATCC)	LD (UFC/mL de TM)
Serotipo III (ATCC 12403)	375
No hemolítica (ATCC 13813)	200

INCLUSIVIDAD

Para determinar la inclusividad del ensayo GBS LB se utilizaron 12 cepas de EGB que representaban 11 serotipos conocidos y 1 cepa no hemolítica. Cada cepa de EGB se analizó usando un cultivo cuantitativo añadido a una matriz clínica de medio de cultivo LIM negativa para EGB. Se analizaron 24 réplicas por concentración y por cepa usando 3 lotes diferentes de kits GBS LB. En la tabla 4 se resumen las concentraciones mínimas a las que se alcanzó una tasa de positividad del 100 % con cada cepa.

Tabla 4. Organismos ensayados para determinar la inclusividad del ensayo Revogene GBS LB.

Cepa de EGB	Concentración del ensayo	Concentración del ensayo (UFC/mL de TM)	Tasa de positividad
Serotipo Ia (ATCC 12400)	< 2	735	100 %
Serotipo Ib (ATCC 51487)	15	5,625	100 %
Serotipo Ic (ATCC 27591)	5	1,875	100 %
Serotipo II (ATCC 12973)	< 2	735	100 %
Serotipo III (ATCC 12403)	1	375	100 %
Serotipo IV (ATCC 49446)	7	2,625	100 %
Serotipo V (ATCC BAA-611)	5	1,875	100 %
Serotipo VI (ATCC BAA-2671)	3	1,125	100 %
Serotipo VII (ATCC BAA-2670)	7	2,625	100 %
Serotipo VIII (ATCC BAA-2669)	10	3,750	100 %
Serotipo IX (ATCC BAA-2668)	3	1,125	100 %
No hemolítica (ATCC 13813)	1,33	500	100 %

*El LD determinado para la cepa ATCC 12403 fue de 375 UFC/mL de TM

Además, se realizó un análisis informático para evaluar la inclusividad del ensayo GBS LB con respecto a 36 cepas adicionales de EGB que figuraban en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) a fecha del 20 de octubre de 2016. Los resultados de la alineación no pusieron de manifiesto ninguna discrepancia con las secuencias seleccionadas. El análisis predijo la detección de todas estas cepas de EGB.

REACTIVIDAD CRUZADA

Para evaluar la reactividad no deliberada del ensayo GBS LB se realizó un estudio de reactividad cruzada con cargas elevadas de organismos filogenéticamente relacionados con el EGB o presentes en la flora genitourinaria y en el tubo intestinal que no eran la diana de la prueba. El estudio incluía 64 bacterias, 4 levaduras, 4 virus, 2 parásitos y ADN humano (tabla 5). Las bacterias y las levaduras se analizaron con una carga $\geq 10^6$ UFC/mL de TM. Los ácidos nucleicos de los virus, los parásitos y el ADN humano se analizaron con una carga $\geq 10^5$ copias de ADN o ARN/mL de TM. Cada organismo se analizó usando un cultivo cuantitativo o una solución de ácido nucleico que se añadieron a una matriz clínica de medio de cultivo LIM negativa para EGB. Se analizaron 3 réplicas por organismo usando 3 lotes diferentes de kits GBS LB.

En las condiciones del estudio, no se detectó ninguno de los organismos o ácidos nucleicos analizados con el ensayo GBS LB.

Tabla 5. Lista de organismos ensayados *in vitro* para determinar la reactividad cruzada con el ensayo GBS LB

Bacterias	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> (qDNA)
<i>Aerococcus viridans</i>	<i>Mycoplasma hominis</i> (qDNA)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Prevotella melaninogenica</i>
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
<i>Bifidobacterium breve</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Brevibacterium linens</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Dublin</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i> (qDNA)	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Minneapolis</i>
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>typhimurium</i>
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Newport</i>
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Corynebacterium genitalium</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (Cowan)
<i>Enterococcus avium</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Enterococcus dispar</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
<i>Enterococcus durans</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Streptococcus bovis</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>disgalactiae</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>equisimilis</i>
<i>Escherichia fergusonii</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>
<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>
<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Streptococcus uberis</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i> (qDNA)
<i>Lactobacillus jensenii</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
Levaduras	
<i>Candida albicans</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida tropicalis</i>
Virus	
<i>HerpesSimplexVirus-1</i> (qDNA)	<i>Norovirus</i> GII (RNA)
<i>HerpesSimplexVirus-2</i> (qDNA)	Papilomavirus humano (PVH, ADN genómico)
Parásitos	
<i>Blastocystis hominis</i> (qDNA)	<i>Trichomonas vaginalis</i> (qDNA)
ADN humano	
ADN humano (ADN genómico)	

Además, se realizó un análisis informático para evaluar el riesgo de reactividad cruzada del ensayo GBS LB con otros 62 organismos que podrían encontrarse en la flora genitourinaria y en el tubo intestinal (tabla 6). Se supone que ninguno de estos organismos presenta reactividad cruzada con el ensayo GBS LB por el bajo grado de homología que existe entre las secuencias genéticas seleccionadas del NCBI y los cebadores y las sondas de prueba.

Tabla 6. Lista de organismos ensayados por medios informáticos para determinar la reactividad cruzada con el ensayo GBS LB

Bacterias	
<i>Abiotrophia defectiva</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Achromobacter xylooxidans</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Mobiluncus mulieris</i>
<i>Campylobacter fetus</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>
<i>Chromobacterium violaceum</i>	<i>Moraxella lacunata</i>
<i>Clostridium bifementans</i>	<i>Moraxella osloensis</i>
<i>Clostridium butyricum</i>	<i>Morganella morganii</i>
<i>Clostridium novyi</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
<i>Clostridium septicum</i>	<i>Neisseria flava</i>
<i>Clostridium sordelli</i>	<i>Neisseria flavescens</i>
<i>Clostridium sporogenes</i>	<i>Neisseria lactamica</i>
<i>Corynebacterium unreahticum</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>
<i>Corynebacterium xerosis</i>	<i>Neisseria perflava</i>
<i>Deinococcus radiodurans</i>	<i>Plesiomonas shigelloides</i>
<i>Derrxia gummosa</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>Eikenella corrodens</i>	<i>Providencia stuartii</i>
<i>Enterococcus gallinarum</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Gemella haemolysans</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>Haemophilus ducreyi</i>	<i>Rhodospirillum rubrum</i>
<i>Haemophilus influenza</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>
<i>Haemophilus influenza type B</i>	<i>Shigella boydii</i>
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Kingella denitrificans</i>	<i>Staphylococcus simulans</i>
<i>Kingella kingae</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Streptococcus gordonii</i>
<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Streptococcus mutans</i>	
Moho/levadura	
<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Virus	
<i>Adenovirus 40</i>	<i>Echovirus</i>
<i>Adenovirus 41</i>	<i>Epstein-Barr Virus</i>
<i>BK virus</i>	<i>Rotavirus</i>
<i>Coxsackievirus</i>	

ORGANISMOS INTERFERENTES

Se llevó a cabo un estudio para evaluar el efecto potencialmente inhibitorio de 29 organismos que pueden estar presentes en la flora genitourinaria y el tubo intestinal que no son la diana del ensayo. Los organismos se seleccionaron en función de su prevalencia en la flora vaginal/rectal. Las cepas de *Enterococcus* representan el mayor riesgo de interferencia por su prevalencia en la flora rectal, así como por su capacidad de crecer en el medio de cultivo LIM. El riesgo de encontrar una carga elevada de otros organismos en la muestra es bajo, ya que el enriquecimiento selectivo con medio de cultivo LIM inhibe su crecimiento y su carga no puede aumentar mucho después del muestreo. Cada organismo o solución de ácido nucleico se diluyó hasta una concentración final de 10⁶ UFC/mL o copias/mL de TM, con la excepción de *Escherichia coli* ATCC 11775, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Trichomonas vaginalis* ATCC 30001 y *Mycoplasma genitalium* ATCC BAA-2641S, que se ensayaron a una concentración de 105 UFC/mL o copias/mL de TM. Se añadieron al TTM quince (15) µL de una dilución de EGB preparada en una matriz clínica negativa de medio de cultivo LIM para obtener una concentración final de 735 UFC/mL de TM. Los 29 organismos incluidos en el estudio se indican en la tabla 7.

Tabla 7. Lista de organismos ensayados para determinar la interferencia con el ensayo GBS LB.

Organismos	
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Dublin</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Corynebacterium genitalium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i> (gDNA)	<i>Trichomonas vaginalis</i> (gDNA)
<i>HerpesSimplexVirus-1</i> (gDNA)	<i>Mycoplasma genitalium</i> (gDNA)
Papilomavirus humano (PVH, ADN genómico)	

Ninguno de los 29 organismos presentes en la muestra a una concentración ≥ 105 UFC/mL o copias/mL interfirió con la detección del CdP. De los 29 organismos ensayados, solo 3 de ellos tuvieron un efecto potencialmente inhibitorio de la detección de EGB (tabla 8). La inhibición por parte de *E. faecalis*, *E. faecium* y *L. acidophilus* se produjo a concentraciones de > 105, > 104 y > 104 UFC/mL de TM respectivamente.

Tabla 8. Organismos que interfieren con el ensayo GBS LB.

Organismo (número)	Concentración ensayada (UFC/mL de TM)	Tasa de positividad de EGB (positivo/total)	
		No hemolítica	Serotipo III
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 19433)	106	66,7 % (2/3)	33,3 % (1/3)
	105	100 % (3/3)	100 % (3/3)
<i>Enterococcus faecium</i> (ATCC 19434)	106	100 % (3/3)	66,7 % (2/3)
	105	N/D*	33,3 % (1/3)
	104	N/D	100 % (3/3)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> (ATCC 4356)	105	100 % (3/3)	66,7 % (2/3)
	104	N/D	100 % (3/3)

*N/D: No se determinó porque no hubo ninguna interferencia a la concentración más alta.

SUSTANCIAS INTERFERENTES

Se llevó a cabo un estudio para evaluar el posible efecto inhibitorio de 22 sustancias exógenas y 9 endógenas que pueden estar presentes en la flora genitourinaria y en el tubo intestinal. Se ensayaron muestras negativas y positivas a EGB a una concentración de 735 UFC/mL de TM en presencia de una matriz clínica negativa de medio de cultivo LIM con la mayor concentración fisiológicamente relevante de la sustancia. Las 31 sustancias analizadas en 11 grupos se indican en la tabla 9.

Los resultados no pusieron de manifiesto ninguna interferencia notificable con el CdP. La combinación de clorhidrato de loperamida (p. ej., Imodium®), subsalicilato de bismuto (p. ej., Pepto-Bismol™) y senósidos (p. ej., Senokot®), a concentraciones de 0,023 µg/mL, 0,675 µg/mL y 0,011 µg/mL de TM respectivamente, era la única que presentaba un efecto potencialmente inhibitorio de la detección de EGB. Ensayadas de forma individual, ninguna de estas sustancias produjo una interferencia notificable con el ensayo GBS LB.

Tabla 9. Lista de sustancias exógenas y endógenas analizadas con el ensayo GBS LB.

Sustancias exógenas			
Grupo	Sustancia (nombre comercial)	Concentración en el TTM1	Resultados2
A	Fungicida (Micatin®)	0,023 % P/V	NI
	Gel refrescante para las hemorroides (Preparation H®)	0,023 % P/V	
	Gel lubricante (Lubricante íntimo K-Y®)	0,023 % P/V	
	Polvos para el cuerpo (desodorante en polvo Vagisil®)	0,023 % P/V	
	Loción hidratante (loción hidratante Aveeno®)	0,023 % P/V	
B	Aceite corporal (aceite corporal Neutrogena®)	0,023 % V/V	NI
	Desodorante en spray (spray Summer's Eve™)	0,023 % V/V	
	Enemas (aceite mineral pesado Life BRAND™ USP)	0,023 % V/V	
	Antimicrobianos (Canesten®)	0,023 % P/V	
C	Enemas (Pentasa)	0,495 µg/mL	NI
	Compuestos orales para radiología (sulfato de bario)	0,113 µg/mL	
	Medicamentos para la gastritis (Nexium)	0,011 µg/mL	
	Antimicrobianos (Flagyl)	0,016 µg/mL	
D	Antiinflamatorios no esteroideos (Aleve®)	0,071 µg/mL	NI
	Antimicrobianos (DIFLUCAN® One)	0,020 µg/mL	
	Medicamentos para la gastritis (Tums®)	1,200 µg/mL	
E	Antidiarreicos (Imodium®)	0,023 µg/mL	I
	Antidiarreicos (Pepto-Bismol®)	0,675 µg/mL	
	Laxantes (Senokot®)	0,011 µg/mL	
F	Espérmica (Trojan® con lubricante espérmica)	0,023 % V/V	NI
	Toallitas húmedas (toallitas húmedas desechables Equate™)	0,023 % V/V	
	Toallitas húmedas (Wet Ones®)	0,023 % V/V	
Sustancias endógenas			
Grupo	Sustancia	Concentración en el TTM1	Resultados2
G	Sangre completa	0,023 % V/V	NI
	Leucocitos	15.000 células/mL	
H	Líquido amniótico	0,023 % V/V	NI
	Mucosa	0,023 % V/V	
I	Líquido seminal	0,023 % V/V	NI
	Orina	0,023 % V/V	
J	Heces	0,023 % V/V	NI
	Meconio	0,023 % V/V	
K	ADN humano	4,65 ng/mL	NI

¹P/V: Peso/Volumen; V/V: Volumen/Volumen

²I: interfiere con el ensayo

GBS LB;

NI: no interfiere con el ensayo GBS LB

PRECISIÓN/REPRODUCIBILIDAD

Para evaluar la variación dentro de un mismo laboratorio (precisión), y la variabilidad entre laboratorios e interdiaria con múltiples técnicos, se llevó a cabo un estudio de reproducibilidad. El panel estaba compuesto por tres cepas de EGB (ATCC 13813 (no hemolítica), ATCC 12400 (serotipo Ia) y ATCC 12403 (serotipo III)), ensayadas a dos concentraciones, y dos muestras negativas verdaderas. Cada muestra fue analizada por dos técnicos tres veces al día durante cinco días diferentes en tres laboratorios. Se ensayaron un total de 90 réplicas para cada muestra positiva y 180 réplicas para las muestras negativas (8 miembros del panel x 2 técnicos x 3 veces al día x 5 días x 3 laboratorios). El estudio se realizó usando tres lotes del ensayo GBS LB.

El panel incluía tres categorías de muestras artificiales, como se indica a continuación:

1. Positiva baja (PB): 1-<2 x LD
2. Positivo moderada (PM): >2-3 x LD
3. Negativa verdadera (NV): muestras sin diana

Los resultados del estudio de precisión en cada laboratorio se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Resumen del estudio de precisión en cada laboratorio

Laboratorio 1				
ID del panel	Resultados/Total	% concordancia	Ct medio	% CV de Ct
PB	87/90	96,7 %	37,3	5,4
PM	87/90	96,7 %	36,6	5,0
NV	60/60	100 %	32,1	3,7
Laboratorio 2				
ID del panel	Resultados/Total	% concordancia	Ct medio	% CV de Ct
PB	90/90	100 %	36,3	4,2
PM	89/90	98,9 %	35,7	3,8
NV	60/60	100 %	32,7	3,2
Laboratorio 3				
ID del panel	Resultados/Total	% concordancia	Ct medio	% CV de Ct
PB	90/90	100 %	35,5	4,1
PM	90/90	100 %	34,9	4,3
NV	60/60	100 %	30,8	2,4

Los resultados del estudio de reproducibilidad entre laboratorios se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Resumen de los resultados del estudio de reproducibilidad entre laboratorios

Todos los laboratorios combinados				
ID del panel	Resultados/Total	% concordancia	Ct medio	% CV de Ct
PB	267/270	98,9 %	36,4	2,3
PM	266/270	98,5 %	35,7	2,3
NV	180/180	100 %	31,9	3,1

ARRASTRE Y CONTAMINACIÓN CRUZADA

Se llevó a cabo un estudio para investigar el arrastre y la contaminación cruzada intraserial e interserial. Las muestras positivas contenían 15 µL de una dilución de EGB preparada en una matriz clínica negativa de medio de cultivo LIM para obtener una concentración final > 106 UFC/mL de TM. Las muestras negativas contenían 15 µL de matriz clínica negativa de medio de cultivo por TTM. Para el estudio intraserial, se analizaron en cada serie 4 réplicas de muestras positivas altas y 4 réplicas de muestras negativas, alternando réplicas positivas y negativas. Para el estudio interserial, se analizó una serie de 8 réplicas de muestras positivas altas seguida de una serie de 8 réplicas de muestras negativas 5 veces consecutivas. Cada técnico analizó 10 series de 8 muestras, es decir, un total de 20 series.

En general, todas las muestras positivas altas se detectaron correctamente como positivas, mientras que todas las muestras negativas verdaderas se detectaron correctamente como negativas. Con ello se demostró la ausencia de arrastre y contaminación cruzada al usar el ensayo GBS LB.

ETIQUETADO ELECTRÓNICO

Se puede acceder a la documentación en línea relacionada con este producto a través de www.meridianbioscience.com/pi. Además, puede obtener copias en papel poniéndose en contacto con el distribuidor de su localidad o a través del número de teléfono que figura en la caja del kit.

revogene®

GBS LB

Zur Verwendung mit Revogene®

REF 410200

IVD Für *In-vitro*-Diagnostik



Rx Only

VERWENDUNGSZWECK

Der Revogene® GBS LB-Assay wird auf dem Revogene-Analysegerät ausgeführt und ist ein qualitativer *In-vitro*-Diagnosteset zum Nachweis der DNA von Bakterien der Gattung *Streptococcus* der Gruppe B (GBS) nach einer 18–24-stündigen Anreicherung in LIM-Bouillon aus vaginalen/rektalen Abstrichen von schwangeren Frauen. Der Revogene GBS LB-Assay verwendet eine automatische Probenverarbeitung und Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) für den Nachweis einer *cfb*-Gensequenz, die spezifisch für das *Streptococcus agalactiae*-Genom ist.

Der Revogene GBS LB-Assay ist für die Identifizierung einer antepartalen GBS-Besiedlung vorgesehen und liefert keine Ergebnisse bezüglich der Empfindlichkeit. Er dient nicht zur Diagnose oder Überwachung der Behandlung einer GBS-Infektion. Kulturisolate werden für die Durchführung eines Empfindlichkeitstests benötigt, wie es für Frauen mit Penicillinallergie empfohlen wird.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG

Beim *Streptococcus* der Gruppe B handelt es sich um ein grampositives Bakterium, das bei gesunden Erwachsenen häufig im Gastrointestinal-, Genital- und Harntrakt zu finden ist. Bei ca. 10–30 % aller schwangeren Frauen liegt eine GBS-Besiedlung der Vagina oder des Rektums vor¹

Bei Müttern mit einer GBS-Besiedlung zeigen sich für gewöhnlich keine Symptome oder gesundheitlichen Auswirkungen. Eine Infektion mit diesen Bakterien kann jedoch schwere Erkrankungen bei Neugeborenen von Müttern verursachen, die mit diesem Mikroorganismus besiedelt sind. Diese Erkrankung führt bei Neugeborenen häufig zu Sepsis (Infektion des Bluts), Pneumonie (Infektion der Lunge) und in einigen Fällen zu Meningitis (Infektion der Gehirnflüssigkeit und -haut). Die Sterblichkeitsrate bei Säuglingen mit einem frühen Auftreten einer Gruppe-B-Streptokokkenerkrankung (während der ersten Lebenswoche) liegt momentan bei 4 % bis 6 %.¹ Bei überlebenden Säuglingen treten möglicherweise dauerhafte Behinderungen, einschließlich Hörverlust, Sehverlust oder geistiger Retardierung, auf.²

Die Übertragung von GBS von der Mutter auf das Neugeborene erfolgt primär während der Wehen und Geburt (*intrapartal*).² Ein Screening auf eine GBS-Besiedlung bei antepartalen Frauen in der 35.–37. Schwangerschaftswoche, gefolgt von einer *intrapartalen* prophylaktischen Antibiose bei Frauen mit positivem Besiedlungsstatus hat sich als wirksam bei der Prävention der perinatalen Gruppe-B-Streptokokkenerkrankung erwiesen. Da die Besiedlung während der Schwangerschaft transient, intermittierend oder persistent sein kann, ist ein Screening am wirksamsten, wenn Proben nicht früher als 5 Wochen vor der Entbindung (35.–37. Schwangerschaftswoche) entnommen und nach einer Anreicherung mit einer selektiven Bouillon getestet werden.¹

Die meisten GBS-Tests werden anhand einer Kultur durchgeführt und es kann bis zu 48 Stunden dauern, bis GBS nach einer ersten, 18 bis 24 Stunden dauernden Inkubation des vaginalen/rektalen Abstrichs in einer Selektivbouillon eindeutig identifiziert werden kann.

Der GBS LB-Assay kann Ergebnisse für bis zu acht Proben in ca. einer Stunde liefern, sobald die LIM-Bouillon-Kultur der Proben vorliegt. Der Assay erfordert bis zum Vorliegen der Ergebnisse nur ein minimales Eingreifen des Bedieners, sobald die mikrofluidische Kartusche für den Einmalgebrauch (PIE), die die Probe enthält, in die Revogene-Zentrifuge eingesetzt wird. Der Assay erfordert bis zum Vorliegen der Ergebnisse nur ein minimales Eingreifen des Bedieners, sobald die mikrofluidische Kartusche für den Einmalgebrauch (PIE), die die Probe enthält, in die Revogene-Zentrifuge eingesetzt wird.

PRINZIPIEN DES VERFAHRENS

Das Revogene automatisiert die Probenhomogenisierung und -verdünnung, Zellyse, DNA-Amplifikation und den Nachweis der amplifizierten PCR-Produkte. Der Bediener muss lediglich die Patientenprobe in das Probenpufferröhrchen (SBT, Sample Buffer Tube) laden, die Probe vom SBT in die PIE übertragen und die PIEs in die Revogene-Zentrifuge laden und sie wieder herausnehmen.

Jede PIE ist eine vollständig integrierte und geschlossene Kartusche. Eine Probe wird darin über verschiedene Mikrofluidkammern und Kanäle verteilt und verarbeitet, wodurch eine vollständige Probenaufbereitung (d. h. Homogenisierung, Verdünnung und Zellyse) möglich ist. Die Flüssigkeit einer Probe wird durch Zentrifugation aus einer Kammer der Reihe nach in die nächste Kammer übertragen und alle für die PCR-Reaktion spezifischen Reagenzien sind in die PCR-Vertiefung integriert und liegen dort getrocknet vor. In jede PIE ist eine Prozesskontrolle (PrC) integriert, um die Probenaufbereitungs- und Amplifikationsschritte zu kontrollieren (Abbildung 1). Die PrC ermöglicht eine Überwachung auf potenzielle Hemmstoffe sowie Fehler der Mikrofluidik, des Geräts oder der Reagenzien. Sobald die PIE in das Revogene geladen ist, ist kein Bedieneringriff mehr erforderlich. Die amplifizierten Produkte werden mithilfe von zielspezifischen TaqMan® chemiebasierten Sonden in Echtzeit nachgewiesen.

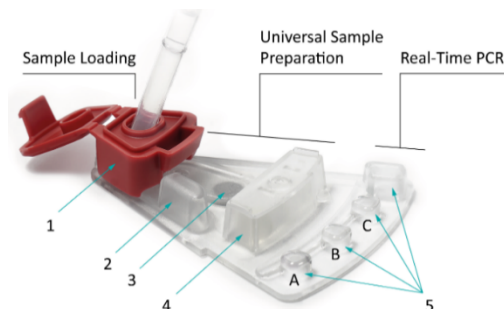


Abbildung 1. Draufsicht auf eine PIE
1: Kammer zur Probenladung, 2: Überlaufkammer,
3: Homogenisierungskammer mit PrC, 4: Verdünnungs-/Lysekammer,
5: Drei (3) PCR-Vertiefungen (A bis C von links nach rechts) und eine (1) Abfallkammer (am rechten Ende).

Das Revogene kann in einem Lauf eine bis zu acht Proben gleichzeitig verarbeiten. Die Zentrifuge muss acht PIEs enthalten, um das thermodynamische Gleichgewicht während des Laufs aufrechtzuerhalten. Nach Abschluss des Laufs werden die Ergebnisse vom System anhand der gemessenen Fluoreszenzsignale und integrierten Berechnungsalgorithmen interpoliert. Die auf dem Touchscreen angezeigten Ergebnisse können vom Anwender über den USB-Port oder die Verbindungsoption gedruckt, übertragen und/oder gespeichert werden.

REAGENZIE UND MATERIALIEN

Das GBS LB-Kit enthält ausreichend Reagenzien und Materialien für die Aufbereitung von 24 Proben. Das Kit enthält die folgenden Materialien:

1. 24 **Probenpufferröhrchen (SBT, Sample Buffer Tube)**: Röhrchen mit Barcode-Etikett, das gepufferte TE 1X-Lösung (Tris-HCl pH 8,0/EDTA.Na₂) als Verdünnung und Konservierungspuffer für die Probe enthält.
2. 24 **Einweg-Übertragungswerkzeuge (DTT, Disposable Transfer Tool)**: Ein DTT besteht aus einer Einweg-Transferpipette für die Übertragung der Probe aus dem SBT in die PIE.
3. 24 Beutel mit jeweils einem (1) **GBS LB PIE**: Eine Integrierte Kartusche mit getrockneten Reagenzien, die eine Probenaufbereitung und Echtzeit-PCR für die Amplifikation und den Nachweis von GBS ermöglicht. Jede PIE enthält PrC, PrC-spezifische Primer und Sonde, GBS-*cfb*-genspezifische Primer und Sonde, dNTPs, Puffer und DNA-Polymerase.

BENÖTIGTE, ABER NICHT ENTHALTENE MATERIALIEN UND AUSRÜSTUNG

1. Revogene® (Bestellnr. 610210)
2. Einweghandschuhe, puderfrei
3. Vortexmischer (Bestellnr. 131132 oder gleichwertig)
4. Probenständer (Bestellnr. 132539; optional)
5. Für die vaginale/rektale Probennahme geeigneter Abstrichtupfer und empfohlenes Transportmedium (z. B. Liquid Stuart oder Liquid Amies)
6. Selektive LIM-Bouillon für die Anreicherung (Todd-Hewitt-Bouillon, supplementiert mit Colistin (10 µg/mL) und Nalidixinsäure (15 µg/mL) (Alere-Bestellnr. L57 oder gleichwertig))
7. Kalibrierte Mikropipette (empfohlen wird P20, VWR-Bestellnr. 89079-964 oder gleichwertig)
8. DNase-/RNase-freie, aerosolbeständige, verlängerte Mikropipettenspitzen (Sarstedt-Bestellnr. 70.1189.215 oder gleichwertig)
9. MOCK PIE (Dummy-PIE; Bestellnr. 610208; optional)

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Dieses Produkt kann nur mit dem Revogene verwendet werden.
2. Das Kit nicht verwenden, wenn das Etikett, das die Außenverpackung versiegelt, bei der Lieferung beschädigt ist.
3. Die GBS LB-Reagenzien nicht verwenden, wenn die Schutzbeutel bei der Lieferung offen oder beschädigt sind.
4. DTT, SBT und PIE zwischen Kit-Chargen nicht vertauschen.
5. Jede GBS LB-PIE und jedes DTT zum Einmalgebrauch dient der Aufbereitung von nur jeweils einer Probe. PIE und DTT nicht wiederverwenden.
6. Proben stets wie infektiöses Material und in Übereinstimmung mit den Grundsätzen der sicheren Laborpraxis, wie in „Biosafety in Microbiology and Biomedical Laboratories“⁴⁴ und in der CLSI-Dokumentation M29-A4⁵ beschrieben, handhaben.
7. Bei der Handhabung der Patientenproben sind Einweghandschuhe zu tragen. Nach der Arbeit sind die Hände gründlich zu waschen.
8. Die GBS LB-PIE enthält getrocknete Reagenzien. Die Schutzbeutel dürfen erst dann geöffnet werden, wenn der Test durchgeführt wird.
9. Die nicht verwendeten Reagenzien und Abfallstoffe in Übereinstimmung mit den gesetzlichen Bestimmungen auf Bundes-, Landes- oder kommunaler Ebene entsorgen.
10. Die PIE nach der Verwendung nicht öffnen oder aufbrechen. Die Kappe und die Dichtungen in der PIE verhindern eine Kontamination mit Amplifikationsprodukten und/oder infektiösen Partikeln.
11. Eine PIE, die nach dem Laden der Probe fallen gelassen, geschüttelt oder umgedreht wurde, nicht verwenden, da dies zu ungültigen Ergebnissen führen kann.
12. Der GBS LB-Assay liefert keine Ergebnisse bezüglich der Empfindlichkeit. Es ist zusätzliche Zeit erforderlich, um Isolate zu kultivieren und Empfindlichkeitstests durchzuführen, wie sie für Frauen mit Penicillinallergie empfohlen werden.
13. Keine Kits oder Kitkomponenten verwenden, deren angegebenes Verfallsdatum überschritten ist.
14. Die geladene PIE nicht kühlen.

GEFAHREN- UND SICHERHEITSHINWEISE

Es gibt keine bekannten Gefahren, die mit diesem Produkt verbunden sind.

AUFBEWAHRUNG UND STABILITÄT

1. Vaginale/rektale Abstrichproben sind entsprechend den gängigen Richtlinien zu lagern.¹
2. Eine angereicherte LIM-Bouillon kann bei 25 C bis zu 2 Tage lang oder bei 2–8 C bis zu 3 Tage lang aufbewahrt werden.
3. Das GBS LB-Kit bei 2–25 C lagern. Das Verfallsdatum ist auf dem Etikett der Kit-Verpackung angegeben. Den Beutel erst unmittelbar vor Durchführung des Tests öffnen. Die PIE innerhalb 1 Stunde nach Öffnen des Beutels verwenden.
4. Ein inokuliertes SBT kann bei 25 C bis zu 3 Tage lang oder bei 2–8 C bis zu 5 Tage lang aufbewahrt werden.

GEBRAUCHSANWEISUNG

PROBENNAHME UND -TRANSPORT

Probentyp: Vaginaler/rektaler Abstrich einer antepartalen Frau in der 35.–37. Schwangerschaftswoche.

Die Durchführung eines vaginalen/rektalen Abstrichs von der gleichen Patientin sollte gemäß den veröffentlichten Leitlinien für die Entnahme von klinischen Proben zum Ansetzen einer GBS-Kultur durchgeführt werden.¹

1. Führen Sie den vaginalen/rektalen Abstrich gemäß den CDC-Empfehlungen durch.¹ Kurzanweisung:
 - a. Entnehmen Sie eine Abstrichprobe aus dem unteren Bereich der Vagina (Scheideneingang) und dann aus dem Rektum (d. h. Sie führen den Abstrichtupfer durch den Schließmuskel des Anus ein); Sie können den gleichen Abstrichtupfer oder zwei verschiedene Abstrichtupfer verwenden. Vermischen Sie nicht Stuhl, Wasser, Urin oder Seife in der Probe.
 - b. Geben Sie den/die Abstrichtupfer gleich nach der Probennahme in ein nicht-nutritives Transportmedium (z. B. Liquid Stuart oder Liquid Amies). Werden von der Patientin separat ein vaginaler und ein rektaler Abstrich entnommen, können beide Abstrichtupfer in den gleichen Transportbehälter gegeben werden.
2. Kennzeichnen Sie den Transportbehälter mit der Proben- oder Patienten-ID und transportieren Sie ihn zum Testen zum Labor (siehe Abschnitt „Aufbewahrung und Stabilität“).

PROBENANREICHERUNG

3. Entnehmen Sie den/die vaginalen/rektalen Abstrich(e) aus dem Transportmedium und inokulieren Sie ihn/sie in eine selektive LIM-Anreicherungsbouillon.
4. Inkubieren Sie die inokulierte LIM-Bouillon für 18–24 Stunden bei 35–37 °C bei Umgebungsluft oder 5 % CO₂.
5. Eine angereicherte LIM-Bouillon kann bei 25 C bis zu 2 Tage lang oder bei 2–8 C bis zu 3 Tage lang aufbewahrt werden.
6. Mit der Probenaufbereitung fortfahren.

PROBENAUFBEREITUNG

HINWEIS 1: Den Test innerhalb 1 Stunde nach Öffnen des Beutels mit der PIE beginnen.

1. Entnehmen Sie aus der Kit-Verpackung ein SBT für jede zu testende Probe.
2. Kennzeichnen Sie das SBT mit der entsprechenden Probenidentifikation, ohne dabei die Barcodeetiketten unleserlich zu machen oder sie zu überschreiben.
3. Mischen Sie die in LIM-Bouillon angereicherte Probe mit hoher Geschwindigkeit 15 Sekunden lang mit dem Vortexmischer.
4. Aspirieren Sie mit einer kalibrierten Mikropipette mit einer aerosolbeständigen, verlängerten Spitze 15 µL der in LIM-Bouillon angereicherten Probe.
5. Entfernen Sie die Kappe vom SBT und geben Sie das Aliquot der angereicherten Probe in das SBT. Achten Sie darauf, die Probe nicht zu aerosolisieren. Pipettieren Sie die Flüssigkeit auf und ab, um sicherzustellen, dass das gesamte Aliquot der Probe übertragen wird.
6. Schließen Sie die SBT-Kappe fest und stellen Sie es in den Probenständer (sofern verwendet). Achten Sie darauf, dass immer nur ein SBT gleichzeitig offen ist.
7. Bereiten Sie weitere Proben für den Test auf, indem Sie die Schritte 1 bis 6 wiederholen und dann mit Schritt 8 fortfahren.
8. Mischen Sie mithilfe eines Vortexmischers das SBT 15 Sekunden lang bei maximaler Geschwindigkeit.
9. Öffnen Sie den Beutel, der die PIE enthält und entnehmen Sie sie.
10. Nehmen Sie ein DTT aus der Verpackung des Kits und aspirieren Sie den SB durch Zusammendrücken des gesamten Ballons. Der Füllstand im DTT muss zwischen den zwei Markierungen liegen (Abbildung 2). Wenn der Füllstand außerhalb der zwei Markierungen liegt, geben Sie den SB komplett in das SBT und wiederholen Sie Schritt 10.
11. Geben Sie den SB vollständig in die Probeninjektionskammer der PIE (Abbildung 1).
12. Schließen Sie die Kappe der PIE fest, achten Sie darauf, dass die Kammer vollständig versiegelt ist. Stellen Sie die PIE in den Probenständer, sofern verwendet. Die geladene PIE nicht kühlen.
13. Bereiten Sie alle weiteren Proben für den Test auf, indem Sie die Schritte 8 bis 11 wiederholen und dann mit Schritt 13 fortfahren. Stellen Sie sicher, dass immer nur eine PIE gleichzeitig geöffnet ist.
14. Lagern Sie die in LIM-Bouillon angereicherte Probe und das inokulierte SBT entsprechend den Angaben im Abschnitt „Aufbewahrung und Stabilität“.

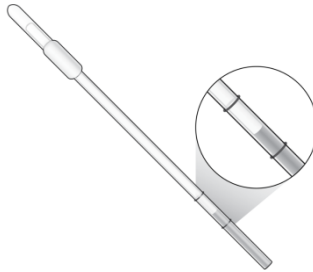


Abbildung 2.
Darstellung eines ordnungsgemäßen Probenpuffer(SB)-Füllstands bei Verwendung des Einweg-Übertragungswerkzeugs (DTT).

BEDIENUNG DES REVOGENE-SYSTEMS

HINWEIS 1: In einem Lauf können maximal 8 Proben gleichzeitig verarbeitet werden (einschließlich externer Kontrollen).

HINWEIS 2: Jeder Lauf muss mit acht PIEs im Revogene durchgeführt werden. Sollten weniger als acht Proben verarbeitet werden, stellen Sie MOCK PIEs* in die leeren Plätze.

1. Stellen Sie sicher, dass das Revogene eingeschaltet ist. Die Software startet automatisch. Weitere Informationen zur Einrichtung und zum Betrieb des Geräts finden Sie im Revogene-Bedienungshandbuch.3
2. Geben Sie Benutzername und Kennwort ein und tippen Sie auf **<Anmelden>**.
3. Tippen Sie auf das Menü **<Lauf einrichten>**.
4. Geben Sie die Probenidentifikationsnummer entweder mithilfe des Barcode-Scanners oder manuell ein.
5. Geben Sie mithilfe des Barcode-Scanners oder manuell die SBT- und PIE-Barcodes ein, indem Sie die PIE nahezu senkrecht vor den Scanner halten. Handhaben Sie die PIE vorsichtig, ohne sie zu schütteln oder fallen zu lassen.
6. (Optional) Geben Sie die Patientenidentifikationsnummer entweder mithilfe des Barcode-Scanners oder manuell ein.
7. (Optional) Tippen Sie auf **<Kommentare hinzufügen>** und geben Sie einen Kommentar ein.
8. Setzen Sie die PIE an eine beliebige Stelle in der Zentrifuge in das Revogene und tippen Sie auf **<OK>**. Die Software ordnet die Probe und das SBT automatisch der richtigen PIE zu.
9. Tippen Sie auf **<+Hinzufügen>**, um eine weitere Probe hinzuzufügen, und wiederholen Sie die Schritte 4 bis 8.
10. Wenn sich alle Proben im Karussell befinden, tippen Sie auf **<Weiter>**.
11. Scannen Sie den Haltering und bringen Sie ihn an. Schließen Sie den Deckel des Geräts.
12. Starten Sie den Test, indem Sie auf **<Start>** tippen.

* Wenn keine MOCK PIEs verfügbar sind, verwenden Sie Assay-PIEs mit SB oder mit externen Kontrollen.

ANZEIGEN UND EXPORTIEREN DER ERGEBNISSE

1. Sobald der Lauf beendet ist, entriegelt sich der Deckel automatisch.
2. Wenn das Revogene Sie abgemeldet hat, geben Sie erneut Benutzername und Kennwort ein und tippen Sie auf **<Anmelden>**.
3. Tippen Sie auf das Menü **<Ergebnisse>**, um auf die Testergebnisse zuzugreifen.
4. Tippen Sie auf **<Letzter Lauf>**, um die aktuellsten Testergebnisse einzusehen.
5. Wählen Sie aus dem Menü **<Letzter Lauf>** die Proben aus, für die Ergebnisberichte exportiert werden müssen. Alle Proben können auf einmal ausgewählt werden, indem Sie das Kästchen über der Spalte aktivieren.
6. Tippen Sie auf **<Export>** und speichern Sie sie auf einem geeigneten Medium (z. B. auf einem USB-Stick).
7. Entfernen Sie den Haltering und die PIEs vom Revogene.

HINWEIS: Liegen die Ergebnisse „Unbestimmt“ (IND, Indeterminate) oder „Unklar“ (UNR, Unresolved) vor oder kommt es zu einem Fehler der externen Kontrolle, muss ein Wiederholungstest für das vorbereitete SBT innerhalb des angegebenen Zeitfensters durchgeführt werden (siehe Abschnitt „Verfahren für Wiederholungstests“).

VERFAHREN FÜR WIEDERHOLUNGSTESTS

HINWEIS: Es ist lediglich ein einzelner Wiederholungstest aus der ursprünglichen in LIM-Bouillon angereicherten Probe oder dem entsprechenden inokulierten SBT zulässig.

1. Wird der Wiederholungstest direkt aus der verbleibenden in LIM-Bouillon angereicherten Probe durchgeführt, die bis zu 2 Tage lang bei 25 C oder bis zu 3 Tage lang bei 2–8 C gelagert worden war, befolgen Sie Schritte 1 bis 11 des Abschnitts „Probenaufbereitung“. Befolgen Sie anschließend die Anweisungen in Abschnitt „Bedienung des Revogene-Systems“.
2. Wird der Wiederholungstest aus dem inokulierten SBT durchgeführt, das nach der Probenaufbereitung bis zu 3 Tage lang bei 25 C oder bis zu 5 Tage lang bei 2–8 C gelagert worden war, mischen Sie die Proben 15 Sekunden lang bei maximaler Geschwindigkeit mit einem Vortexmischer und befolgen Sie Schritte 10 und 11 des Abschnitts „Probenvorbereitung“ für jede einzelne Probe. Befolgen Sie anschließend die Anweisungen in Abschnitt „Bedienung des Revogene-Systems“.













QUALITÄTSKONTROLLE

Mithilfe von Qualitätskontrollverfahren werden Genauigkeit und Präzision des analytischen Prozesses überwacht. Jedes Labor muss die Anzahl, Art und Häufigkeit der Testkontrollmaterialien gemäß den geltenden Vorschriften oder zulassungsbehördlichen Auflagen festlegen. Das unten beschriebene Verfahren kann, falls zutreffend, auf Grundlage von örtlichen Richtlinien und Verfahren eingesetzt werden.

1. Jede PIE enthält eine Prozesskontrolle (PrC), die die Homogenisierung und Verdünnung der Probe, Zellyse, Inhibition der DNA-Amplifikation und einen möglichen Ausfall der Assay-Reagenzien überwacht.
2. Gemäß guter Laborpraxis ist die Anwendung von Kontrollmaterialien empfohlen. Anwender sollten die entsprechenden Leitlinien zur Durchführung von externen Qualitätskontrollen beachten. Es wird empfohlen, mindestens einmal täglich eine externe Positivkontrolle und eine externe Negativkontrolle laufen zu lassen, bis eine angemessene Prozessvalidierung auf dem Revogene im jeweiligen Labor erreicht wurde. Externe Kontrollmaterialien werden nicht von Meridian Bioscience Inc. bereitgestellt.
3. Als externe Positivkontrolle kann handelsübliches Kontrollmaterial (z. B. *Streptococcus agalactiae* ATCC® 13813) verwendet werden. Es wird empfohlen, dass Bakterienstämme frisch in LIM-Bouillon vorbereitet werden. Übertragen Sie ein Aliquot von 15 µL einer 18–24 Stunden lang in LIM-Bouillon inkubierten Kultur in ein SBT und befolgen Sie den Abschnitt „Probenaufbereitung“ ab Schritt 6.
4. Reine LIM-Bouillon wird als externe Negativkontrolle empfohlen. Übertragen Sie ein Aliquot von 15 µL einer LIM-Bouillon in ein SBT und befolgen Sie den Abschnitt „Probenaufbereitung“ ab Schritt 6.
5. Für jedes externe Kontrollreagenz müssen ein separates DTT, SBT und eine separate PIE verwendet werden.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Die Ergebnisse werden vom Revogene anhand der Fluoreszenzsignale und integrierten Berechnungsalgorithmen berechnet und sind auf dem Revogene unter dem Fenster „Ergebnisse“ verfügbar. Die folgenden Ergebnisse sind möglich:

Probe	Auf dem Bildschirm angezeigtes Symbol	Ausgewiesenes Gesamtergebnis	Auswertung
Patientenprobe		Positiv	Probe enthält GBS-Ziel-DNA.
		Negativ	Keine GBS-Ziel-DNA erkannt oder Anzahl der Organismen kann unterhalb der Nachweisgrenze des Assays sein.
		Unbestimmt	Kein meldefähiges Ergebnis aufgrund eines möglichen Revogene-Nachweisfehlers während der Assay-Verarbeitung, der Datenanalyse oder aufgrund des Abbruchs des Laufs durch den Anwender. Es muss ein Wiederholungstest mit der ursprünglichen in LIM-Bouillon angereicherten Probe oder dem entsprechenden inokulierten SBT innerhalb des oben definierten Zeitraums durchgeführt werden.
		Unklar	Amplifikations-/Nachweisfehler für die Prozesskontrolle sowie für die GBS-Ziel-DNA. Könnte durch hemmende Proben, einen Mikrofluidik- oder einen Reagenzienfehler verursacht worden sein. Es muss ein Wiederholungstest mit der ursprünglichen in LIM-Bouillon angereicherten Probe oder dem entsprechenden inokulierten SBT innerhalb des oben definierten Zeitraums durchgeführt werden.
Externe Positivkontrolle		Positiv	Gültiges Ergebnis der externen Positivkontrolle.
		Negativ	Falsches Ergebnis der externen Positivkontrolle. Der Lauf ist ungültig. Es muss ein Wiederholungstest mit allen Proben des Laufs mit den ursprünglichen in LIM-Bouillon angereicherten Proben oder den entsprechenden inokulierten SBT mit neuen externen Kontrollen innerhalb des oben definierten Zeitraums durchgeführt werden.
		Unbestimmt	Falsches Ergebnis der externen Positivkontrolle. Kein meldefähiges Ergebnis aufgrund eines möglichen Revogene-Nachweisfehlers während der Assay-Verarbeitung, der Datenanalyse oder aufgrund des Abbruchs des Laufs durch den Anwender. Der Lauf ist ungültig. Es muss ein Wiederholungstest mit allen Proben des Laufs mit den ursprünglichen in LIM-Bouillon angereicherten Proben oder den entsprechenden inokulierten SBT mit neuen externen Kontrollen innerhalb des oben definierten Zeitraums durchgeführt werden.
		Unklar	Falsches Ergebnis der externen Positivkontrolle. Amplifikations-/Nachweisfehler für die Prozesskontrolle sowie für die GBS-Ziel-DNA. Könnte durch hemmende Proben, einen Mikrofluidik- oder einen Reagenzienfehler verursacht worden sein. Der Lauf ist ungültig. Es muss ein Wiederholungstest mit allen Proben des Laufs mit den ursprünglichen in LIM-Bouillon angereicherten Proben oder den entsprechenden inokulierten SBT mit neuen externen Kontrollen innerhalb des oben definierten Zeitraums durchgeführt werden.
Externe Negativkontrolle		Positiv	Falsches Ergebnis der externen Negativkontrolle aufgrund von Handhabung einer Probe und/oder einem Kontaminationsproblem. Der Lauf ist ungültig. Es muss ein Wiederholungstest mit allen Proben des Laufs mit den ursprünglichen in LIM-Bouillon angereicherten Proben oder den entsprechenden inokulierten SBT mit neuen externen Kontrollen innerhalb des oben definierten Zeitraums durchgeführt werden.
		Negativ	Gültiges Ergebnis der externen Negativkontrolle.
		Unbestimmt	Falsches Ergebnis der externen Negativkontrolle. Kein meldefähiges Ergebnis aufgrund eines möglichen Revogene-Nachweisfehlers während der Assay-Verarbeitung, der Datenanalyse oder aufgrund des Abbruchs des Laufs durch den Anwender. Der Lauf ist ungültig. Es muss ein Wiederholungstest mit allen Proben des Laufs mit den ursprünglichen in LIM-Bouillon angereicherten Proben oder den entsprechenden inokulierten SBT mit neuen externen Kontrollen innerhalb des oben definierten Zeitraums durchgeführt werden.
		Unklar	Falsches Ergebnis der externen Negativkontrolle. Amplifikations-/Nachweisfehler für die Prozesskontrolle. Könnte durch hemmende Proben, einen Mikrofluidik- oder einen Reagenzienfehler verursacht worden sein. Der Lauf ist ungültig. Es muss ein Wiederholungstest mit allen Proben des Laufs mit den ursprünglichen in LIM-Bouillon angereicherten Proben oder den entsprechenden inokulierten SBT mit neuen externen Kontrollen innerhalb des oben definierten Zeitraums durchgeführt werden.

EINSCHRÄNKUNGEN

- Der GBS LB-Assay darf nur mit dem Revogene und von geschultem Personal verwendet werden.
- Ein positives Testergebnis weist nicht notwendigerweise auf das Vorliegen von lebensfähigen Organismen hin. Es ist jedoch ein Hinweis auf GBS-DNA.
- Die Leistung des GBS LB-Assays wurde anhand von vaginalen/rektalen Abstrichen von antepartalen Frauen, die in einem nicht-nutritiven Medium transportiert (z. B. Liquid Stuart) und in selektiver LIM-Bouillon angereichert wurden, ermittelt. Die Verwendung des GBS LB-Assays für klinische Probenarten, die nicht den angegebenen entsprechen, wurde nicht evaluiert und die Leistungsmerkmale wurden nicht ermittelt.
- Zervix-, Perianal-, Perirektal- oder Perinealproben sind nicht zulässig und es sollte kein Spekulum zur Entnahme von Kulturen verwendet werden.
- Der GBS LB-Assay liefert keine Ergebnisse bezüglich der Empfindlichkeit. Eine antimikrobielle Empfindlichkeitstestung sollte bei Frauen mit Penicillinallergie und einem hohen Anaphylaxierisiko anhand von antenatalen GBS-Isolaten durchgeführt werden.
- Die Verwendung von anderen Anreicherungsbouillons als LIM-Bouillon wurde nicht beurteilt.
- Eine nicht ordnungsgemäße Probenahme, -handhabung oder -lagerung, technische Fehler oder das Vermischen von Proben kann zu fehlerhaften Testergebnissen führen. Die Anweisungen dieser Beilage und die gängigen Richtlinien müssen sorgfältig eingehalten werden, um fehlerhafte Ergebnisse zu vermeiden.
- Es kann zu falschen Assay-Ergebnissen kommen, wenn eine PIE-Kappe nicht ordnungsgemäß verschlossen wird.
- Auch wenn es keine bekannten GBS-Stämme/-Isolate ohne das *cfb*-Gen gibt, würde das Vorliegen eines solchen Stammes zu einem fehlerhaften Ergebnis (falsch negativ) mit dem GBS LB-Assay führen.
- Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* und *Lactobacillus acidophilus* können den Nachweis von GBS hemmen, falls sie jeweils mit mehr als > 104 KBE/mL SB vorliegen.
- Die potenziell hemmende Wirkung von Stuhlfez wurde nicht beurteilt.
- Eine Kombination von Loperamidhydrochlorid (z. B. Imodium®), Bismutsubsalicylat (z. B. Pepto-Bismol™) und Sennosiden (z. B. Senokot®) kann möglicherweise den Nachweis von GBS hemmen, wenn diese Substanzen im SBT mit Konzentrationen von 0,023 µg/mL, 0,675 µg/mL bzw. 0,011 µg/mL vorliegen. Dies ist jedoch sehr unwahrscheinlich.
- Mutationen oder Polymorphismen in primer- oder sondenbindenden Regionen können den Nachweis von GBS-*cfb*-Genvarianten beeinträchtigen und mit dem GBS LB-Assay zu einem falsch negativen Ergebnis führen.
- Die Ergebnisse des GBS LB-Assays sollten als Ergänzung klinischer Beobachtungen und anderen dem Arzt zur Verfügung stehenden Informationen verwendet werden.
- Ein negatives Ergebnis schließt die Möglichkeit einer GBS-Besiedlung nicht aus. Falsch negative Ergebnisse können auftreten, wenn die GBS-Konzentration unter der Nachweisgrenze des Assays liegt.
- Der Test ist nicht dafür bestimmt, GBS-Träger von Patienten mit einer Streptokokkenkrankung zu unterscheiden.
- Die Testergebnisse können durch eine gleichzeitig durchgeführte Antibiotikatherapie beeinträchtigt werden, da die GBS-DNA möglicherweise weiterhin nachgewiesen wird.

ERWARTETE WERTE

In der Forschungsstudie für den Revogene GBS DS-Assay wurden insgesamt 771 meldefähige Ergebnisse für auf Kultur- und PCR-Ebene konforme Proben aus 4 verschiedenen geographischen Regionen gesammelt. Insgesamt lag die GBS-Prävalenzrate bei 22,0 % (170/771) mit einem 95 %-KI von 19,3–25,1 %.

LEISTUNGSMERKMALE

KLINISCHE LEISTUNG

Die Leistung des GBS LB-Assays mit einem Revogene wurde im Rahmen einer prospektiven Forschungsstudie an jeweils zwei Standorten in Kanada und den USA ermittelt.

Bei den prospektiv entnommenen und getesteten Proben handelte es sich um übriggebliebene Restmengen von in LIM-Bouillon angereicherten Proben, die für die standardmäßige antepartale Testung von Frauen in der 35.–37. Schwangerschaftswoche entnommen worden waren. Die übriggebliebene LIM-Bouillon wurde für den GBS LB-Assay und für die Referenzkulturtestung am jeweiligen Standort verwendet.

Die Leistung des GBS LB-Assays wurde mit einer Komposit-Referenzmethode verglichen, die aus einer Anreicherung des vaginalen/rektalen Abstrichs, gefolgt von einer Subkultur auf Schafblutagarplatten und biochemischen Identifikation von GBS bestand. Alle Proben mit einem negativen Bakterienkultur-Ergebnis wurden von einem einzelnen, unabhängigen Zentrallabor anhand der gleichen standardmäßigen Betriebsverfahren für Bakterienkulturen erneut getestet.

Insgesamt 839 Proben wurden in die Studie aufgenommen. Davon wurden 63 Proben anhand der Referenzmethode und/oder den Protokollkriterien des GBS LB-Assays als nicht konform eingestuft, 1 Probe wurde hinsichtlich Transport- und Lagerbedingungen als nicht konform eingestuft und 4 Proben wurden aufgrund von fehlenden Testergebnissen als nicht konform eingestuft. Zwei (2) vollständig konforme Proben ergaben letztlich nicht meldefähige PCR-Ergebnisse. Zum Ermitteln der klinischen Leistung des GBS LB-Assays im Vergleich zur Komposit-Referenzmethode wurden insgesamt 771 Probenergebnisse verwendet (Tabellen 1 und 2).

Die Leistungsmerkmale des GBS LB-Assay zeigten im Vergleich zur Komposit-Referenzmethode eine Sensitivität von 95,9 % (163/170, 95 %-KI 91,7%–98,0%) und eine Spezifität von 95,5 % (574/601), 95 %-KI 93,5%–96,9 %). Von den 812 mit dem GBS LB-Assay getesteten Proben, die auf Proben- und PCR-Ebene konform waren, wurden 6 (0,74 %) beim ersten Test als „Unklar“ gemeldet. Die Rate der unklaren Ergebnisse nach dem Wiederholungstest lag bei 0,25 % (2/812).

Von den gleichen 812 mit dem GBS DS-Assay getesteten Proben wurden 12 (1,48 %) anfänglich als „Unbestimmt“ gemeldet; bei 6 lag ein Fehler der externen Kontrolle, bei 6 ein unvollständiger Durchlauf vor. Nach dem Wiederholungstest lagen keine unbestimmten Ergebnisse mehr vor.

Tabelle 1. Allgemeine Leistungsmerkmale (alle Standorte gemeinsam) des GBS LB-Assays im Vergleich mit der Komposit-Referenzmethode.

Gesamtleistung	Komposit-Referenzmethode		
	Positiv	Negativ	Gesamt
GBS LB-Assay	163	278	190
	7A	574	581
	170	601	771

Sensitivität: 95,9 % (95 %-KI: 91,7–98,0 %)

Spezifität: 95,5 % (95 %-KI: 93,5–96,9 %)

[^] 5 von 7 falsch negative Revogene GBS LB-Ergebnisse wurden auf einem von der FDA zugelassenen molekularen Analyseinstrument getestet und lieferten negative Ergebnisse.

[®] 10 von 27 falsch positiven Revogene GBS LB-Ergebnissen wurden auf einem von der FDA zugelassenen molekularen Analyseinstrument getestet und lieferten positive Ergebnisse.

Tabelle 2. Zusammenfassung der Leistungsmerkmale des GBS LB-Assays nach Standort

Standort	Sensitivität	Spezifität	Prävalenz ¹
1	87,8 % (36/41)	92,8 % (142/153)	21,1 % (41/194)
2	98,0 % (48/49)	97,5 % (194/199)	19,8 % (49/248)
3	100 % (43/43)	97,0 % (164/169)	20,3 % (43/212)
4	97,3 % (36/37)	92,5 % (74/80)	31,6 % (37/117)
Gesamt	95,9 % (163/170)	95,5 % (574/601)	22,0 % (170/771)

¹ Die Prävalenz wurde anhand von Proben berechnet, die auf Kulturreferenzmethoden- und Revogene GBS LB-Assay-Ebene konform waren.

ANALYTISCHE SENSITIVITÄT

Die analytische Sensitivität (Nachweisgrenze oder LoD (Limit of Detection)) des GBS DS-Assays wurde mithilfe einer klinischen LIM-Bouillon-Matrix bestimmt, die zuvor negativ auf GBS getestet und mit verschiedenen Konzentrationen einer GBS-Bakteriensuspension versetzt wurde. Zwei GBS-Stämme (ATCC 12403 und ATCC 13813) wurden in 24 Replikaten pro Konzentration durch 2 Bediener, die 3 verschiedene Chargen von GBS LB-Kits verwendeten, getestet. Die LoD ist definiert als die niedrigste Konzentration, die in 95 % der Replikate positive Ergebnisse lieferte. Die LoD des GBS LB-Assays rangierte bei den zwei getesteten Stämmen von 200 bis 375 KBE/mL SB (Tabelle 3).

Tabelle 3. LoD des GBS LB-Assays

GBS-Stamm (ATCC-Nummer)	LoD (KBE/mL SB)
Serotyp III (ATCC 12403)	375
Nicht hämolytisch (ATCC 13813)	200

INKLUSIVITÄT

Die Inklusivität des GBS LB-Assays wurde für 12 GBS-Stämme bestimmt, wobei 11 bekannte Serotypen und 1 nicht hämolytischer Stamm vertreten waren. Jeder GBS-Stamm wurde anhand einer GBS-negativen klinischen LIM-Bouillon-Matrix, versetzt mit einer quantifizierten Kultur, getestet. 24 Replikate pro Konzentration wurden anhand von GBS LB-Kits aus 3 verschiedenen Chargen getestet. Die niedrigsten Konzentrationen, bei denen die Stämme noch eine Positivitätsrate von 100 % erreichten, sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4. Mit dem Revogene GBS LB-Assay auf Inklusivität getestete Organismen.

GBS-Stamm	Testkonzentration	Testkonzentration (KBE/mL SB)	Positivitätsrate
Serotyp Ia (ATCC 12400)	< 2	735	100 %
Serotyp Ib (ATCC 51487)	15	5,625	100 %
Serotyp Ic (ATCC 27591)	5	1,875	100 %
Serotyp II (ATCC 12973)	< 2	735	100 %
Serotyp III (ATCC 12403)	1	375	100 %
Serotyp IV (ATCC 49446)	7	2,625	100 %
Serotyp V (ATCC BAA-611)	5	1,875	100 %
Serotyp VI (ATCC BAA-2671)	3	1,125	100 %
Serotyp VII (ATCC BAA-2670)	7	2,625	100 %
Serotyp VIII (ATCC BAA-2669)	10	3,750	100 %
Serotyp IX (ATCC BAA-2668)	3	1,125	100 %
Nicht hämolytisch (ATCC 13813)	1,33	500	100 %

* Die LoD des Stamms ATCC 12403 wurde bestimmt als 375 KBE/mL SB.

Es wurde zusätzlich eine *in silico*-Analyse durchgeführt, um die Inklusivität des GBS LB-Assays bezüglich 36 zusätzlicher GBS-Stämme zu bewerten, die in der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) vom 20. Oktober 2016 aufgeführt sind. Die Ergebnisse des Abgleichs zeigten keinen Unterschied zwischen den ausgewählten Sequenzen. Die Analyse sagte einen Nachweis aller dieser GBS-Stämme vorher.

KREUZREAKTIVITÄT

Es wurde eine Kreuzreaktivitätsstudie durchgeführt, um eine ungewollte Reaktivität des GBS LB-Assays bei hohen Belastungen mit Organismen, die phylogenetisch mit GBS verwandt sind oder in der normalen urogenitalen Flora und im Darmtrakt vorliegen, zu prüfen. Die Studie umfasste 64 Bakterien, 4 Hefen, 4 Viren, 2 Parasiten und menschliche DNA (Tabelle 5). Die Bakterien und Hefen wurden bei einer Belastung von ≥ 106 KBE/mL SB getestet. Die Nukleinsäuren von Viren, Parasiten und menschlicher DNA wurden bei einer Belastung von ≥ 105 DNA- oder RNA-cp/mL SB getestet. Jeder Organismus wurde anhand einer GBS-negativen klinischen LIM-Bouillon-Matrix, versetzt mit einer quantifizierten Kultur oder Nukleinsäurelösung, getestet. Drei Replikate pro Organismus wurden anhand von GBS LB-Kits aus 3 verschiedenen Chargen getestet.

Unter den Bedingungen der Studie wurde keiner der getesteten Organismen oder Nukleinsäuren vom GBS LB-Assay nachgewiesen.

Tabelle 5. Liste der Organismen, die mit dem GBS LB-Assay *in vitro* auf Kreuzreaktivität getestet wurden.

Bakterien	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i> (gDNA)
<i>Aerococcus viridans</i>	<i>Mycoplasma hominis</i> (gDNA)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Prevotella melaninogenica</i>
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
<i>Bifidobacterium breve</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Brevibacterium linens</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Dublin</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i> (gDNA)	<i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Minneapolis</i>
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar typhimurium</i>
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Newport</i>
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Corynebacterium genitalium</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (Cowan)
<i>Enterococcus avium</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Enterococcus dispar</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
<i>Enterococcus durans</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Streptococcus bovis</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Streptococcus dysgalactiae subsp. dysgalactiae</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Streptococcus dysgalactiae equisimilis</i>
<i>Escherichia fergusonii</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>
<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>
<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Streptococcus uberis</i>
<i>Lactobacillus delbreuckii</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i> (gDNA)
<i>Lactobacillus jensenii</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
Hefen	
<i>Candida albicans</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida tropicalis</i>
Viren	
<i>HerpesSimplexVirus-1</i> (gDNA)	<i>Norovirus GI</i> (RNA)
<i>HerpesSimplexVirus-2</i> (gDNA)	Humanes Papillomvirus (HPV) (gDNA)
Parasiten	
<i>Blastocystis hominis</i> (gDNA)	<i>Trichomonas vaginalis</i> (gDNA)
Menschliche DNA	
Menschliche DNA (gDNA)	

Es wurde zusätzlich eine *In-silico*-Analyse durchgeführt, um das Risiko für eine Kreuzreaktivität des GBS LB-Assays auf 62 weitere Organismen zu bewerten, die sich potenziell in der Flora des Urogenital- und Darmtrakts befinden (Tabelle 6). Aufgrund von starken Unterschieden zwischen den ausgewählten NCBI-Gensequenzen und den Testprimern und -sonden wird bei keinem der Organismen von einer Kreuzreaktivität mit dem GBS LB-Assay ausgegangen.

Tabelle 6. Liste der Organismen, die mit dem GBS LB-Assay *in silico* auf Kreuzreaktivität getestet wurden.

Bakterien	
<i>Abiotrophia defectiva</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Mobiluncus mulieris</i>
<i>Campylobacter fetus</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>
<i>Chromobacterium violaceum</i>	<i>Moraxella lacunata</i>
<i>Clostridium bifermentans</i>	<i>Moraxella osloensis</i>
<i>Clostridium butyricum</i>	<i>Morganella morganii</i>
<i>Clostridium novyi</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
<i>Clostridium septicum</i>	<i>Neisseria flava</i>
<i>Clostridium sordelli</i>	<i>Neisseria flavescens</i>
<i>Clostridium sporogenes</i>	<i>Neisseria lactamica</i>
<i>Corynebacterium urealyticum</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>
<i>Corynebacterium xerosis</i>	<i>Neisseria perflava</i>
<i>Deinococcus radiodurans</i>	<i>Plesiomonas shigelloides</i>
<i>Derxia gummosa</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>Eikenella corrodens</i>	<i>Providencia stuartii</i>
<i>Enterococcus gallinarum</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Gemella haemolysans</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>Haemophilus ducreyi</i>	<i>Rhodospirillum rubrum</i>
<i>Haemophilus influenza</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>
<i>Haemophilus influenza type B</i>	<i>Shigella boydii</i>
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Kingella denitrificans</i>	<i>Staphylococcus simulans</i>
<i>Kingella kingae</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Streptococcus gordonii</i>
<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Streptococcus mutans</i>	
Schimmel/Hefe	
<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Viren	
<i>Adenovirus 40</i>	<i>Echovirus</i>
<i>Adenovirus 41</i>	<i>Epstein-Barr Virus</i>
<i>BK virus</i>	<i>Rotavirus</i>
<i>Coxsackievirus</i>	

STÖRENDE ORGANISMEN

Es wurde eine Studie durchgeführt, um die potenzielle Hemmwirkung von 29 Organismen, die sich möglicherweise in der urogenitalen Flora und im Darmtrakt befinden und die keine Testziele darstellen, zu bewerten. Die Auswahl der Organismen basierte auf deren Prävalenz in der vaginalen/rektalen Flora. Die *Enterococcus*-Stämme stellen das größte Risiko für eine Störung dar, da sie sowohl in der rektalen Flora vorhanden sind als auch in LIM-Bouillon wachsen können. Andere Organismen sind nur mit geringer Wahrscheinlichkeit in großer Menge in den Proben zu finden, da die Anreicherung in selektiver LIM-Bouillon ihr Wachstum hemmt und die Belastung durch diese Organismen nach der Probenahme kaum steigen kann. Jeder Organismus bzw. jede Nukleinsäurelösung wurde auf eine Endkonzentration von 10⁸ KBE/mL oder cp/mL SB verdünnt, außer *Escherichia coli* ATCC 11775, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Trichomonas vaginalis* ATCC 30001 und *Mycoplasma genitalium* ATCC BAA-2641S, die bei 105 KBE/mL oder cp/mL SB getestet wurden. Fünfzehn (15) µL einer GBS-Lösung, die auf eine Endkonzentration von 735 KBE/mL SB in einer negativen klinischen LIM-Bouillon-Matrix vorbereitet wurde, wurden dem SBT hinzugefügt. Die 29 im Rahmen der Studie untersuchten Organismen sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7. Liste der mit dem GBS LB-Assay auf Störung getesteten Organismen.

Organismen	
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Dublin</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Corynebacterium genitalium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i> (gDNA)	<i>Trichomonas vaginalis</i> (gDNA)
<i>HerpesSimplexVirus-1</i> (gDNA)	<i>Mycoplasma genitalium</i> (gDNA)
<i>Humanes Papillomvirus</i> (HPV) (gDNA)	

Keiner der 29 Organismen störte bei einer Konzentration von ≥ 105 KBE/mL oder cp/mL SB in der Probe den PrC-Nachweis. Von den 29 getesteten Organismen zeigten nur 3 eine potenziell hemmende Wirkung auf den Nachweis von GBS (Tabelle 8). Eine Hemmung durch *E. faecalis*, *E. faecium* und *L. acidophilus* wurde beobachtet bei Konzentrationen von > 10⁵, > 10⁴ bzw. > 10⁴ KBE/mL SB.

Tabelle 8. Organismen, die den GBS LB-Assay stören.

Organismus (ATCC-Nummer)	Getestete Konzentration (KBE/mL SB)	GBS-Positivitätsrate (positiv/gesamt)	
		Nicht hämolytisch	Serotyp III
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 19433)	106	66,7 % (2/3)	33,3 % (1/3)
	105	100 % (3/3)	100 % (3/3)
<i>Enterococcus faecium</i> (ATCC 19434)	106	100 % (3/3)	66,7 % (2/3)
	105	n. b.*	33,3 % (1/3)
	104	n. b.	100 % (3/3)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> (ATCC 4356)	105	100 % (3/3)	66,7 % (2/3)
	104	n. b.	100 % (3/3)

* n. b.: Nicht bestimmt, da auch bei der höchsten Konzentration keine Störung vorlag.

STÖRSUBSTANZEN

Es wurde eine Studie durchgeführt, um die potenzielle Hemmwirkung von 22 exogenen und 9 endogenen Substanzen, die sich in der urogenitalen Flora und im Darmtrakt befinden können, zu prüfen. Es wurden GBS-negative und GBS-positive Proben bei 735 KBE/mL SB in Anwesenheit einer negativen klinischen LIM-Bouillon-Matrix mit der höchsten physiologisch relevanten Konzentration der Substanz getestet. Die 31 Substanzen, die in 11 Gruppen zusammengefasst getestet wurden, sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Die Ergebnisse zeigten keine meldefähige Störung der PrC. Ausschließlich die Kombination von Loperamidhydrochlorid (z. B. Imodium®), Bismutsubsalicylat (z. B. Pepto-Bismol™) und Sennosiden (z. B. Senokot®) bei Konzentrationen von 0,023 µg/mL, 0,675 µg/mL bzw. 0,011 µg/mL zeigte eine mögliche Hemmwirkung auf den Nachweis von GBS. Einzeln getestet zeigten diese Substanzen keine meldefähige Störung des GBS LB-Assays.

Tabelle 9. Liste der mit dem GBS LB-Assay getesteten exogenen und endogenen Substanzen.

Exogene Substanzen			
Gruppe	Substanz (Handelsbezeichnung)	Konzentration im SBT1	Ergebnisse2
A	Fungizid (Micatin®)	0,023 % w/v	KI
	Kühlgel zur Hämorrhoidenbehandlung (Preparation H®)	0,023 % w/v	
	Gleitmittel (K-Y® Gleitmittel)	0,023 % w/v	
	Körperpuder (Vagisil® Deodorantpuder)	0,023 % w/v	
	Feuchtigkeitsspendende Lotion (Aveeno® feuchtigkeitsspendende Lotion)	0,023 % w/v	
B	Körperöl (Neutrogena® Körperöl)	0,023 % v/v	KI
	Deospray (Summer's Eve™ Spray)	0,023 % v/v	
	Einläufe (Life BRAND™ Schwerminealöl USP)	0,023 % v/v	
	Antimikrobiotika (Canesten®)	0,023 % w/v	
C	Einläufe (Pentasa)	0,495 µg/mL	KI
	Orale Radiologiepräparate (Bariumsulfat)	0,113 µg/mL	
	Medikamente gegen Gastritis (Nexium)	0,011 µg/mL	
	Antimikrobiotika (Flagyl)	0,016 µg/mL	
D	Nichtsteroidale Entzündungshemmer (Aleve®)	0,071 µg/mL	KI
	Antimikrobiotika (DIFLUCAN® One)	0,020 µg/mL	
	Medikamente gegen Gastritis (Tums®)	1,200 µg/mL	
E	Medikamente gegen Diarrhoe (Imodium®)	0,023 µg/mL	I
	Medikamente gegen Diarrhoe (Pepto-Bismol®)	0,675 µg/mL	
	Laxative (Senokot®)	0,011 µg/mL	
F	Spermizide (Trojan® mit spermizidem Gleitmittel)	0,023 % v/v	KI
	Feuchte Toilettücher (Equate™ Spülbare Feuchttücher)	0,023 % v/v	
	Feuchte Toilettücher (Wet Ones®)	0,023 % v/v	
Endogene Substanzen			
Gruppe	Substanz	Konzentration im SBT1	Ergebnisse2
G	Vollblut	0,023 % v/v	KI
	Leukozyten	15.000 Zellen/mL	
H	Fruchtwasser	0,023 % v/v	KI
	Schleim	0,023 % v/v	
I	Samenflüssigkeit	0,023 % v/v	KI
	Urin	0,023 % v/v	
J	Fäkalien	0,023 % v/v	KI
	Mekonium	0,023 % v/v	
K	Menschliche DNA	4,65 ng/mL	KI

1 w/v: Gewicht/Volumen; v/v: Volumen/Volumen

2 I: Interferenz mit dem

GBS LB-Assay;

KI: Keine Interferenz mit dem

GBS LB-Assay

PRÄZISION/REPRODUZIERBARKEIT

Eine Reproduzierbarkeitsstudie wurde durchgeführt, um Varianz innerhalb eines Standorts (Präzision), zwischen Standorten und zwischen verschiedenen Tagen bei mehreren Bedienern zu bewerten. Das Panel bestand aus drei GBS-Stämmen (ATCC 13813 (nicht hämolytisch), ATCC 12400 (Serotyp Ia) und ATCC 12403 (Serotyp III)), die bei zwei Konzentrationen getestet wurden, und zwei richtig negativen Proben. Jede Probe wurde von zwei Bedienern drei Mal täglich an fünf verschiedenen Tagen an drei Standorten getestet. Insgesamt wurden 90 Replikate für jede positive Probe und 180 Replikate für die negativen Proben getestet (8 Panel-Analyte x 2 Bediener x 3 Mal täglich x 5 Tage x 3 Standorte). Die Studie wurde mit drei Chargen des GBS LB-Assays durchgeführt.

Das Panel bestand aus den drei folgenden künstlichen Probenkategorien:

1. Schwach positiv (LP, Low Positive): 1–< 2 x LoD
2. Mäßig positiv (MP): > 2–3 x LoD
3. Richtig negativ (TN, True Negative): Proben ohne Ziel

Die Ergebnisse der Präzisionsstudie nach Standorten sind in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10. Zusammenfassung der Präzisionsstudie nach Standorten

Standort 1				
Panel-ID	Ergebnisse/Gesamt	% Übereinstimmung	Ct-Mittelwert	Ct % VK
LP	87/90	96,7 %	37,3	5,4
MP	87/90	96,7 %	36,6	5,0
TN	60/60	100 %	32,1	3,7
Standort 2				
Panel-ID	Ergebnisse/Gesamt	% Übereinstimmung	Ct-Mittelwert	Ct % VK
LP	90/90	100 %	36,3	4,2
MP	89/90	98,9 %	35,7	3,8
TN	60/60	100 %	32,7	3,2
Standort 3				
Panel-ID	Ergebnisse/Gesamt	% Übereinstimmung	Ct-Mittelwert	Ct % VK
LP	90/90	100 %	35,5	4,1
MP	90/90	100 %	34,9	4,3
TN	60/60	100 %	30,8	2,4

Die Ergebnisse der Reproduzierbarkeitsstudie zwischen Standorten sind in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11. Zusammenfassung der Ergebnisse der Reproduzierbarkeitsstudie zwischen Standorten.

Alle Standorte kombiniert				
Panel-ID	Ergebnisse/Gesamt	% Übereinstimmung	Ct-Mittelwert	Ct % VK
LP	267/270	98,9 %	36,4	2,3
MP	266/270	98,5 %	35,7	2,3
TN	180/180	100 %	31,9	3,1

ÜBERTRAGUNG UND KREUZKONTAMINATION

Es wurde eine Studie durchgeführt, um die Übertragung und Kreuzkontamination innerhalb von und zwischen Läufen zu untersuchen. Die positiven Proben enthielten 15 µL einer GBS-Lösung, die auf eine Endkonzentration von > 10⁶ KBE/mL SB in einer negativen klinischen LIM-Bouillon-Matrix vorbereitet wurde. Die negativen Proben enthielten 15 µL einer negativen klinischen LIM-Bouillon-Matrix pro SBT. Für die Untersuchung innerhalb der Läufe wurden 4 Replikate mit stark positiven Proben und 4 Replikate mit negativen Proben in jedem Durchlauf getestet, die positiven und negativen Replikate wurden abwechselnd im Revogene platziert. Für die Untersuchung zwischen den Läufen wurde ein Lauf mit 8 Replikaten mit stark positiven Proben, gefolgt von einem Lauf mit 8 Replikaten mit negativen Proben durchgeführt. Dies wurde 5 Mal wiederholt. Jeder Bediener führte 10 Läufe mit 8 Proben durch, insgesamt 20 Läufe.

Insgesamt wurden die stark positiven Proben korrekt als positiv erkannt, wohingegen alle richtig negativen Proben korrekt als negativ erkannt wurden. Es konnte gezeigt werden, dass es bei der Verwendung des GBS LB-Assays nicht zu Übertragung und Kreuzkontamination kommt.

ELEKTRONISCHE KENNZEICHNUNG

Auf die Dokumentation zu diesem Produkt kann online unter www.meridianbioscience.com/pi zugegriffen werden. Zusätzlich sind Kopien in Papierform auf Nachfrage erhältlich. Wenden Sie sich an Ihren Händler vor Ort oder rufen Sie unter der auf der Kitpackung angegebenen Telefonnummer an.

REFERENCES

1. MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report, Recommendations and Reports, Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease; Revised Guidelines from CDC, 2010 Nov 19; 59(RR-10):1-36
2. A population-based comparison of strategies to prevent early-onset Group B Streptococcal disease in neonates. N Engl J Med 2002; 347:233-239
3. SN134822 Revogene® Operator's Manual
4. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, 5th ed. U.S Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, National Institute of Health, HHS Publication No. (CDC) 21-1112, Revised 2009 Dec
5. M29-A4 Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections; Approved Guideline 4th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2014 May.

SN134763

























REV. 04/26

 <p>Manufactured By</p>	<p>Meridian Bioscience, Inc. 3471 River Hills Drive Cincinnati, OHIO - 45244 USA www.meridianbioscience.com</p> <p><u>Contacts:</u> Main Telephone (+1) 513.271.3700 Customer Service/Orders 800.543.1980 Technical Support Center 800.343.3858 Information Fax: 513.272.5432 Ordering Fax: 513.271.0124 E-mail: info@meridianbioscience.com</p>
--	--

INTERNATIONAL SYMBOLS USAGE

You may see one or more of these symbols on the labeling/packaging of this product:

Key guide to symbols (Guida ai simboli, Guide des symboles, Guia de símbolos, Zeichenerklärung)

	Use-by date / Data di scadenza / Date de péremption / Fecha de caducidad / Verwendbar bis
	Batch code / Codice di lotto / Code de lot / Código de lote / Chargennummer
	In vitro diagnostic medical device / Dispositivo medico diagnostico <i>in vitro</i> / Instrument de test diagnostique <i>in vitro</i> / Producto sanitario para diagnóstico <i>In vitro</i> / <i>In-vitro</i> -Diagnostikum
	CE Mark / Marcatura CE / Symbole CE / Marcado CE / CE-Kennzeichen
	Catalog number / Numero di catalogo / Référence catalogue / Referencia / Bestellnummer
	Consult instructions for use / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulter le mode d'emploi / Consultar las instrucciones de uso / Gebrauchsanweisung beachten
	Manufacturer / Produttore / Fabricant / Fabricante / Hersteller
	Contains sufficient for <n> tests / Contiene una quantità sufficiente per <n> test / Contient le matériel suffisant pour <n> tests / Contiene la cantidad suficiente para <n> ensayos / Inhalt ausreichend für <n> Tests
	Temperature limit / Limite di temperatura / Limite de température / Limite de temperatura / Temperaturgrenze
	Authorized representative in the European Community / Rappresentante autorizzato nella Comunità Europea / Représentant agréé dans la Communauté européenne / Representante autorizado en la Comunidad Europea / Bevollmächtigter EU-Repräsentant
	Do not reuse / Non riutilizzare / Ne pas réutiliser / No reutilizar / Nicht wiederverwenden
	Keep dry / Conservare all'asciutto / Conserver au sec / Mantener seco / Vor Feuchtigkeit schützen
	Contains # pouches: 1 Disposable Transfer Tool (DTT), 1 Sample Buffer Tube (SBT), 1 PIE / Contiene # buste: 1 PIE, 1 Sample Buffer Tube (SBT), 1 Disposable Transfer Tool (DTT) / Contient # sachets: Une cartouche PIE, Un tube échantillon, Un outil de transfert jetable (OTJ) / Incluye # bolsitas: 1 PIE, 1 Sample Buffer Tube (SBT), 1 Disposable Transfer Tool (DTT) / Enthält # Beutel: 1 PIE, 1 Sample Buffer Tube (SBT), 1 Disposable Transfer Tool (DTT)
	Humidity Limitation / Limitazione dell'umidità / Limite d'humidité / Limitación de humedad / Feuchtigkeitsbegrenzung
	Prescription Use Only / Per l'uso su prescrizione medica / Uniquement sur prescription / Solo Para Uso Por Receta / verschreibungspflichtig
	Do not use if package is damaged / Non utilizzare se la confezione è danneggiata / Ne pas utiliser si l'emballage est endommagé / No utilizar si el envase está dañado / Nicht verwenden, wenn die Verpackung beschädigt ist
	Keep away from sunlight / Tenere lontano dalla luce del sole / Tenir à l'écart de la lumière du soleil / Mantener alejado de la luz solar / Vor Sonnenlicht schützen
	Contains 24 Disposable Transfer Loops (DTL) / Contiene 24 loop di trasferimento monouso (DTL) / Contient 24 boucles de transfert jetables (DTL) / Contiene 24 bucles de transferencia desechables (DTL) / Enthält 24 Einwegübertragungsschleifen (DTL)
	Disposable Transfer Tool (DTT) / Dispositivo Transfer Tool 9DTT / Un outil de transfert jetable (OTJ) / Disposable Transfer Tool (DTT) / Disposable Transfer Tool (DTT)
	Revogene Test Device / Dispositivo Test Revogene / Dispositif de test Revogene / Dispositivo para la Prueba Revogene / Revogene-Analysegefäß
	For Emergency Use Authorization only / Solo per l'autorizzazione per l'uso di emergenza / pour autorisation d'utilisation d'urgence uniquement / para autorización de uso de emergencia solamente / nur für Notfallverwendungsautorisierung
	Disposable Transfer Loop / Loop di trasferimento monouso / Boucles de transfert jetables / Bucles de transferencia desechables / Einwegübertragungsschleifen
	Sample Buffer Tube / Sample Buffer Tube / Un tube échantillon / Sample Buffer Tube / Sample Buffer Tube
	Revogene Test Device / Dispositivo Test Revogene / Dispositif de test Revogene / Dispositivo para la Prueba Revogene / Revogene-Analysegefäß

For technical assistance, call Technical Support Services at 800-343-3858 between the hours of 8AM and 6PM, USA Eastern Standard Time. To place an order call Customer Service Department at 800-543-1980.

TaqMan is a registered trademark of Roche Molecular Systems, Inc.
ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.
Revogene and associated logos are registered trademarks of Meridian Bioscience, Inc.
© 2020-12 Meridian Bioscience, Inc.

TaqMan è un marchio registrato di Roche Molecular Systems, Inc. ATCC
è un marchio di American Type Culture Collection.
Revogene e i relativi loghi sono marchi registrati di Meridian Bioscience, Inc.
© 2020-12 Meridian Bioscience, Inc.

TaqMan est une marque commerciale déposée de Roche Molecular Systems, Inc.
ATCC est une marque de commerce déposée de l'American Type Culture
Collection.
Revogene et les logos connexes sont des marques déposées de Meridian Bioscience, Inc.
© 2020-12 Meridian Bioscience, Inc.

TaqMan es una marca registrada de Roche Molecular Systems, Inc.
ATCC es una marca registrada de la American Type Culture Collection.
Revogene y los logotipos asociados son marcas registradas de Meridian Bioscience, Inc.
© 2020-12 Meridian Bioscience, Inc.

TaqMan ist eine eingetragene Marke von Roche Molecular Systems, Inc.
ATCC ist eine Marke der American Type Culture Collection.
BBL ist eine Marke von Becton, Dickinson and Company.
Revogene und die damit verbundenen Logos sind Marken von Meridian Bioscience, Inc.
© 2020-12 Meridian Bioscience, Inc.