Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD
Kit PCR en tiempo real para estreptococo del grupo B, IVD

REF MD04941, 96 reacciones

Solo para uso diagnóstico* in vitro *profesional

CE IVD

ES

Instrucciones de Uso

MD0494_IM_es

VERSION 2401, Enero 2024

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

Contenido

1. Introducción ... 3
2. Uso previsto ... 3
3. Principios de la prueba ... 3
4. Composición del kit ... 3
5. Condiciones de almacenamiento, estabilidad y manipulación ... 4
6. Materiales e instrumentación necesarios, pero no proporcionados ... 4
7. Recolección y preparación de muestras ... 4
8. Precauciones y Advertencias ... 4
   8.1. Información de seguridad ... 4
   8.2. Requisitos de manipulación y procedimiento ... 4
9. Procedimiento de prueba ... 5
   9.1. Configuración de la reacción ... 5
   9.2. Programación del instrumento de PCR en tiempo real ... 5
10. Análisis de los datos ... 6
   10.1. Ejecutar criterios de validación ... 6
   10.2. Interpretación de los resultados de la prueba ... 6
11. Evaluación del desempeño ... 7
   11.1. Resultados previstos ... 7
   11.2. Límite de detección (LoD) - Sensibilidad analítica ... 7
   11.3. Especificidad Analítica ... 8
   11.3.1. Reactividad Cruzada (Exclusividad) y Especificidad ... 8
   11.3.2. Estudios de interferencia microbiana ... 8
   11.3.3. Sustancias que interfieren ... 8
   11.4. Precisión ... 9
   11.4.1. Repetibilidad ... 10
   11.4.2. Reproducibilidad diaria ... 10
   11.4.3. Reproducibilidad lote a lote ... 10
   11.4.4. Reproducibilidad entre operadores ... 10
   11.4.5. Reproducibilidad entre instrumentos ... 10
   11.5. Evaluación clínica ... 10
12. Control de calidad ... 11
13. Apoyo técnico ... 11
14. Marcas registradas y descargos de responsabilidad ... 11
15. Explicación de los símbolos ... 11
16. Declaración de conformidad ... 12
17. Referencias ... 13

1. Introducción

Streptococcus agalactiae, también conocido como *Streptococcus* del grupo B (GBS), es el patógeno causante de las infecciones bacterianas más graves en los recién nacidos. Esta bacteria forma colonias en el tracto gastrointestinal y el tracto genital inferior de entre el 10 y el 40% de las embarazadas, y existe el riesgo de que el bebé se infecte durante el parto. La infección por GBS en recién nacidos puede provocar sepsis, neumonía y meningitis. Para prevenir la infección por GBS en los recién nacidos, al final del embarazo (entre las semanas 35 y 37 de gestación), las mujeres embarazadas se someten rutinariamente a pruebas de detección del GBS. Un resultado positivo en la prueba del GBS requerirá la administración de antibióticos durante el parto para reducir el riesgo de infección del bebé. Sin embargo, las mujeres que dan a luz a niños prematuros no suelen tener la oportunidad de someterse a pruebas de detección del GBS, por lo que la presencia de esta bacteria en el parto no está controlada. Por lo tanto, en estos casos, existe un mayor riesgo de infecciones graves en los recién nacidos, lo que lleva a la administración de antibióticos durante el parto, que se ha asociado a la aparición de cepas bacterianas resistentes. Estudios recientes revelaron que hasta dos tercios de los recién nacidos que desarrollaron septicemia precoz por GBS nacieron de madres cuyo examen prenatal realizado mediante métodos rutinarios de cultivo microbiológico indicó que eran GBS negativos. Por lo tanto, aunque el cultivo microbiológico se considera el método estándar para detectar el GBS, tiene limitaciones relacionadas con su menor sensibilidad y el periodo de tiempo hasta el resultado que tarda hasta 72 horas. La prueba PCR en tiempo real representa un método rápido, potente y robusto que puede utilizarse para identificar la presencia de *Streptococcus* del grupo B.

2. Uso previsto

El Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, de NZYtech, es una prueba molecular basada en la tecnología de PCR en tiempo real, destinada a la detección rápida y el diagnóstico cualitativo de ácidos nucleicos específicos de GBS, a partir de frotis vaginales y/o perianales recogidos en un kit de transporte que contiene Amies líquido. Esta prueba está destinada a identificar la formación de colonias por GBS en mujeres antes del parto. No existen contraindicaciones para el uso del Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, de NZYtech. Las pruebas las deben realizar técnicos de laboratorio especializados y calificados, especialmente en técnica de PCR en tiempo real y diagnóstico molecular *in vitro*. El kit solo debe usarse como se indica en este manual de usuario.

3. Principios de la prueba

El Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, de NZYtech, proporciona el conjunto de reactivos, enzimas y oligonucleótidos (cebadores y sondas) para la detección cualitativa del genoma del GBS, mediante PCR en tiempo real (véanse los requisitos de especificación del equipo en la **Sección 6**). La secuencia objetivo del kit fue identificada previamente como un buen marcador genético del GBS. El Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, de NZYtech, se diseñó para tener un amplio perfil de detección sin dejar de ser específico para la detección del GBS. Además, el conjunto de oligonucleótidos fue diseñado específicamente para la detección de este organismo y no muestra una homología significativa con otros genomas, lo que refleja la alta especificidad y sensibilidad de detección de la prueba. Como tal, el kit fue diseñado para ser específico para el GBS y para evitar la detección de otros organismos que causan infecciones semejantes. El control interno, incluido en el kit, valida la eficacia del proceso de extracción así como la ausencia de inhibidores de PCR potencialmente presentes en las muestras biológicas humanas. Periódicamente, NZYtech revisa la secuencia del gen objetivo del GBS y, si es necesario, puede proporcionar una nueva versión de este kit. Además, el kit incluye dos controles externos (un control positivo y un control negativo) como se describe a continuación. El control positivo consiste en un fragmento de ácido nucleico que contiene la secuencia diana detectada por el kit.

En este kit, la determinación cualitativa de ADN se basa en la tecnología PCR en tiempo real, que es una metodología de referencia en el diagnóstico de laboratorio. Es una metodología de alta sensibilidad y especificidad para detectar con precisión la presencia de este organismo. El principio del Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, de NZYtech, consiste en el uso de ADN aislado y purificado mediante un sistema de extracción para buscar la presencia de ADN bacteriano. El ADN extraído se somete a una amplificación por PCR, en una sola reacción, utilizando un conjunto de cebador/sonda altamente específicos aprovechando el principio TaqMan®. En la presencia del ADN de GBS, la sonda TaqMan® se une específicamente a las regiones conservadas del gen GBS que está flanqueado por un par de cebadores específicos. Un segundo conjunto de cebadores/sonda actúa como control interno, detectando el gen β-actina humano (ACTB). La detección del control interno valida la eficacia del proceso de extracción, y también permite confirmar si la reacción de PCR se vio comprometida por la presencia/ausencia de inhibidores en las muestras clínicas. Para permitir la identificación de la amplificación de los dos objetivos específicos en una sola reacción, las sondas específicas para GBS y para β-actina humano se marcan de forma diferente con colorantes indicadores FAM™ y HEX™, respectivamente. Por lo tanto, este kit consta de una prueba dúplex en el que el objetivo específico de GBS se detecta en el canal óptico FAM y el gen objetivo humano se detecta en el canal óptico VIC (véase la **Sección 9.2**). Estos oligonucleótidos/conjuntos de sondas se proporcionan en concentraciones optimizadas para garantizar que el ADN humano, incluso cuando está presente en concentraciones extremadamente altas, no limite la eficacia de los conjuntos de cebadores/sonda de GBS.

4. Composición del kit

El Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD de NZYtech, proporciona un conjunto completo de reactivos suficientes para realizar 96 reacciones de Real-time PCR en un solo paso.

COMPONENTE DEL KIT		**VOLUMEN** (POR VIAL)	**NÚMERO DE TUBOS**	**COLOR DE LA TAPA**
GBS MMix	Sonda qPCR NZYSupreme Master Mix (2x)	1050 µL	1	Neutral
GBS PPMix	Mezcla de cebadores y sondas de GBS/ACTB (10x)	205 µL	1	Marrón
GBS POS	GBS/Control positivo ACTB	105 µL	1	Rojo
NTC	Control sin plantilla	105 µL	1	Neutral

5. Condiciones de almacenamiento, estabilidad y manipulación

El Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, de NZYtech, se envía refrigerado. Al recibir el kit, todos los componentes deben almacenarse inmediatamente entre -85 °C y -15 °C. Cuando esté en uso, los componentes del kit deben colocarse rápidamente en el congelador después de su uso para minimizar el tiempo de exposición a temperatura ambiente. Además:

- Minimice el número de ciclos de congelado- descongelado almacenando alícuotas de trabajo. Si corresponde, los componentes del kit se pueden dividir en alícuotas en volúmenes más pequeños después de descongelarlos. El kit es estable durante un mínimo de 6 ciclos de congelado-descongelado.
- El componente GBS PPMix debe almacenarse protegido de la luz. En particular, no exponga GBS MMix a la luz solar directa después de combinarlo con GBS PPMix.
- Si el paquete que protege el kit llega dañado, comuníquese con NZYtech.
- Cuidado con la fecha de caducidad indicada en el envase. NZYtech no recomienda usar el kit después de la fecha de vencimiento. En esta fecha, el kit debe desecharse siguiendo las instrucciones de eliminación de la **Sección 8.2.**

6. Materiales e instrumentación necesarios, pero no proporcionados

- Instrumento de PCR en tiempo real que detecta FAM™ y VIC™ (a longitudes de onda de emisión de 520 y 556 nm, respectivamente). Véase en la **Sección 11** los modelos de equipos para los que se validó el kit.
- Equipos y consumibles para el aislamiento de ADN de muestras biológicas/clínicas.
- Material de plástico de Real-time PCR libre de ARNasa/ADNasa: Tubos de PCR, tiras, tapas, placas de 96 pocillos, películas adhesivas.
- Pipetas y puntas con filtro (sin RNasa/DNasa).
- Bloque de enfriamiento
- Guantes desechables.
- Vortex y centrífuga.

7. Recolección y preparación de muestras

El kit está diseñado para detectar ADN extraído de hisopos vaginales y/o perianales. Diferentes factores, como el procedimiento de recolección de muestras biológicas, el transporte, el almacenamiento y el tiempo de procesamiento de las muestras, son fundamentales para garantizar la integridad de las muestras y lograr resultados óptimos. Las muestras vaginales y/o perianales se deben recoger utilizando un hisopo único (ESwab®, Copan). Las muestras deben sellarse herméticamente en tubos o envases adecuados, etiquetarse correctamente y luego transportarse rápidamente al laboratorio. Las muestras recolectadas deben analizarse lo antes posible. La recolección, la manipulación y/o el transporte inadecuado de las muestras pueden causar un resultado falso. Los ácidos nucleicos extraídos constituyen el material de partida para la prueba con el Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, de NZYtech. NZYtech recomienda el uso de uno de los siguientes kits de purificación de ácidos nucleicos basados en tecnología de perlas magnéticas: NZY Mag Viral RNA/DNA Isolation Kit, IVD (MD0488, NZYtech) o chemagic Pathogenic NA gDNA Kit H96 (PerkinElmer). Además, la extracción de ácidos nucleicos se puede realizar utilizando columnas de sílice basadas en centrifugación, especialmente el kit de aislamiento de ADN gDNA de tejido NZY (MB135, NZYtech). Estos tres kits han sido validados para la extracción de muestras clínicas de GBS y la posterior detección mediante el Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD. Los métodos de extracción de ADN basados en sílice pueden ser más propensos a la contaminación que los sistemas de extracción automatizados debido al manejo manual de las muestras. Por favor, asegúrese de que no se produzcan contaminaciones cruzadas y de que las muestras de ADN sean adecuadas en términos de pureza, concentración e integridad de ácidos nucleicos. Dado que el etanol es un fuerte inhibidor de la PCR en tiempo real, es necesario eliminar este componente antes de la elución de los ácidos nucleicos durante el proceso de extracción. El kit de NZYtech contiene un control interno que apunta al ADN humano copurificado con el ADN del GBS bacteriano. El ADN humano se amplifica con el conjunto de oligonucleótidos (cebadores y sonda) del gen de la β-actina humana. La introducción del control interno es útil para evaluar la eficacia de la extracción y el aislamiento del ADN y/o para detectar la presencia de posibles inhibidores durante el procesamiento de la muestra.

8. Precauciones y Advertencias

Siga cuidadosamente los procedimientos y las guías que se proporcionan en este manual para asegurarse de que la prueba se realice correctamente. Antes de usar la prueba, verifique la integridad del producto, es decir, la cantidad y el tipo de componentes del kit y su correcto etiquetado. Como en cualquier procedimiento de prueba analítica, las buenas prácticas de laboratorio son esenciales. Cualquier desviación de ellas puede resultar en una falla de la prueba o causar resultados erróneos. Debido a la alta sensibilidad del kit, se debe tener especial cuidado para mantener los reactivos y las mezclas de amplificación de PCR libres de contaminación.

8.1. Información de seguridad

Antes de usar el kit, consulte la Ficha de Datos de Seguridad (FDS) que está disponible en el sitio web de NZYtech (www.nzytech.com). La detección de este kit la debe llevar a cabo únicamente el personal capacitado en los procedimientos técnicos y de seguridad pertinentes en laboratorios debidamente equipados. Se deben seguir las guías internacionales y nacionales sobre bioseguridad en el laboratorio en todas las circunstancias.

8.2. Requisitos de manipulación y procedimiento

- Solo para uso diagnóstico *in vitro* profesional
- No use este kit después de la fecha de caducidad.
- No utilice los componentes de prueba si el sellado del kit está dañado.
- No intercambie reactivos de diferentes lotes de producción.
- No se deben utilizar reactivos de otros fabricantes junto con los reactivos de este kit de prueba.
- En todos los procedimientos se deben utilizar pipetas y recipientes de plástico desechables libres de ADNasa/RNasa.

- La preparación de muestras, la configuración de la reacción y la amplificación deben realizarse en diferentes áreas de trabajo. El orden de las tareas en el laboratorio debe ser unidireccional. Siempre use guantes desechables en cada área y cámbielos antes de ingresar a un área diferente. Si es posible, cámbiate de abrigo.
- Seleccione materiales y equipos específicos para cada área de trabajo individual y no los transfiera de un área a otra.
- La extracción de ácidos nucleicos utilizando columnas de sílice puede ser más propensa a la contaminación cruzada que la extracción realizada con sistemas de extracción automatizados.
- Utilice siempre el NTC (Control sin plantilla) proporcionado en el kit.
- Las muestras biológicas deben manipularse como si fueran infecciosas siguiendo las precauciones de bioseguridad adecuadas.
- El control positivo contiene plantillas con un alto número de copias; debe abrirse y procesarse lejos de las muestras de prueba y los componentes del kit para evitar la contaminación cruzada.
- Manipule las placas postamplificación con cuidado y elimínelas inmediatamente después del final de la prueba; las placas siempre deben desecharse en un contenedor de riesgo biológico adecuado después de su uso. No abra los tubos/placas de reacción posteriores a la amplificación para evitar la contaminación por ampliación.
- Al final de cada prueba, limpie las superficies de trabajo y el equipo con un removedor de ADN/ARN.
- Los residuos de productos químicos y preparados se consideran generalmente como residuos peligrosos. La eliminación de este tipo de residuos está regulada por leyes y reglamentos nacionales y regionales.
- Todos los resultados deben ser interpretados por un profesional de la salud en el contexto del historial médico y los síntomas clínicos del paciente.
- Esta prueba no puede excluir enfermedades causadas por otros patógenos.
- Un resultado negativo para cualquier prueba de PCR no descarta de manera concluyente la posibilidad de infección.
- Siga las buenas prácticas de laboratorio, use ropa de protección, use permanentemente guantes desechables sin talco, use gafas de protección y mascarilla. No coma, beba ni fume en el área de trabajo.

9. Procedimiento de prueba

Lea atentamente las instrucciones de uso antes de realizar la prueba. Tenga en cuenta que todos los pasos de pipeteo y configuración de la placa se deben realizar siguiendo las buenas prácticas de Real-time PCR. Después del vertido en la placa, inicie inmediatamente el protocolo de PCR en tiempo real. La incubación prolongada de mezclas de reacción a temperatura ambiente puede provocar artefactos de PCR que reducen la sensibilidad de detección. Antes del experimento, comience mezclando suavemente los tubos de reacción proporcionados con el dedo y centrifugue durante cinco segundos para recolectar el contenido en el fondo del tubo. Coloque los tubos en hielo. **Recomendamos encarecidamente pipetear el GBS POS en último lugar para evitar contaminaciones cruzadas.**

9.1. Configuración de la reacción

1. Prepare una mezcla de Real-time PCR suficiente para el número de pruebas que se van a realizar con un volumen adicional del 5% para las pérdidas por pipeteo. Proceda de acuerdo con la tabla a continuación que especifica los volúmenes para 1 y n pruebas (donde n corresponde al número total de reacciones):

COMPONENTE	1 VOLUMEN DE PRUEBA (µL)	*n* PRUEBAS * VOLUMEN + 5% (µL)
GBS MMIX **	10	*n* x 10,5
GBS PPMIX	2	*n* x 2,1
VOLUMEN FINAL	**12**	***n* x 12,6**

** Para calcular el número total de reacciones necesarias para cada ensayo, cuente el número de muestras y agregue dos más, para incluir los controles Negativo y Positivo, respectivamente.*
*** Tenga en cuenta que se puede observar un precipitado en el fondo del tubo de la mezcla maestra, en particular después de varios ciclos de congelación/descongelación. Para garantizar un rendimiento óptimo, asegúrese de que todos los componentes estén descongelados y resuspendidos antes de su uso. En este caso, no haga girar la mezcla maestra antes de pipetear.*

2. Pipetee 12 µL de la mezcla de Real-time PCR en pocillos individuales de acuerdo con la configuración de su placa experimental de PCR en tiempo real.
3. Para el control negativo, agregue 8 µL de NTC en lugar de la plantilla de ADN en el pocillo de control negativo. El volumen final debe ser de 20 µL.
4. Para las muestras biológicas, agregue 8 µL de cada muestra de ADN en los pocillos de muestra, de acuerdo con la configuración de su placa experimental. El volumen final en cada pocillo debe ser de 20 µL.
5. Para el control positivo, agregue 8 µL de GBS POS en lugar de la plantilla de ADN en el pocillo de control positivo. El volumen final debe ser de 20 µL.
6. Cubra y selle la placa con una película o tapas adhesivas ópticas idóneas antes de continuar con los pasos de Real-time PCR y detección.
7. Coloque la placa de reacción en el instrumento de PCR en tiempo real y ejecute el protocolo de PCR en tiempo real de acuerdo con la sección siguiente.

9.2. Programación del instrumento de PCR en tiempo real

La siguiente tabla muestra un protocolo estándar optimizado en algunas plataformas. Sin embargo, estas condiciones pueden adaptarse y validarse para ajustarse a diferentes protocolos específicos de la máquina.

CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO	PASO
1	95 °C	3 min	Activación de la polimerasa
45	95 °C	5 s	Desnaturalización
	60 °C	30 s	Recocido/Extensión*

** En función del instrumento de Real-time PCR, seleccione los canales de detección adecuados. Los datos fluorogénicos deben recopilarse durante este paso a través de los canales FAM y HEX.*

Los colorantes fluorescentes utilizados en este kit y sus correspondientes canales de detección son los siguientes:

Colorantes fluorescentes y canales de detección

DIANAS	COLORANTE FLUORESCENTE	CANALES DE DETECCIÓN
Gen específico GBS	FAM™	FAM
Gen de la β-actina humana (ACTB)	HEX™	HEX/VIC/JOE
GBS POS	FAM™ y HEX™	FAM & HEX/VIC/JOE

El Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, de NZYtech, fue validado para los siguientes sistemas de PCR en tiempo real: Applied Biosystems™ QuantStudio 5, Applied Biosystems™ 7500 FAST, Applied Biosystems™ StepOne Plus, Roche Lightcycler® 96 Instrument, Bio-Rad® CFX Opus Real-Time PCR and Bio-Rad® CFX96 Touch Real-Time PCR. Si se utiliza otro equipo, el kit debe ser validado por el usuario utilizando muestras previamente caracterizadas (tanto positivas como negativas).

10. Análisis de los datos

10.1. Ejecutar criterios de validación

Antes de analizar los resultados, recomendamos consultar el manual de usuario del respectivo dispositivo de PCR en tiempo real. Luego verifique si la prueba de PCR en tiempo real es válida. Por lo tanto, para cada placa, confirme si los resultados de los controles Positivo y Negativo se realizaron como se esperaba, de acuerdo con los siguientes criterios:

Control negativo (sin reacción de plantilla): no se detecta amplificación. Puede haber ocurrido contaminación de la muestra si el control negativo tiene curvas de amplificación (FAM y HEX) con forma sigmoidal. Repita la prueba siguiendo buenas prácticas de Real-time PCR.

Control positivo: las curvas de amplificación de FAM (GBS) y las curvas HEX (ACTB) son positivas. Se espera que el control positivo amplifique a Ct <32, en ambos canales FAM y HEX. El incumplimiento de este criterio de control de calidad es una fuerte indicación de que el experimento se ha visto comprometido.

Si los controles están de acuerdo con lo esperado, la prueba es **válida**. Continúe con la interpretación de los resultados de las muestras analizadas.

Si alguno de los controles no muestra el rendimiento esperado, la prueba se vio comprometida o se ejecutó incorrectamente y debe considerarse **inválida**.
Por favor, repita la prueba. Si el problema persiste, póngase en contacto con el fabricante.

10.2. Interpretación de los resultados de la prueba

El Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, de NZYtech, utiliza los siguientes valores de corte Ct para la interpretación de los resultados:

VALOR CT	INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS
Ct ≤38	Detectado (+) → **POSITIVO**
Ct >38	No Detectado (-) → **NEGATIVO**

GBS se detecta si la curva de amplificación de FAM muestra una forma sigmoidal con un Ct≤38, independientemente del resultado que se obtenga para la prueba ACTB (HEX). La presencia o ausencia de una señal en el canal HEX no es significante para la validez de la prueba.

GBS no se detecta si la curva FAM no se amplifica (Ct>38), mientras que la prueba ACTB (HEX) muestra una curva sigmoidea positiva con Ct≤45.

La **prueba no es válida** si las pruebas GBS y ACTB son negativos. La prueba debe repetirse con ácido nucleico repurificado de la muestra.

La siguiente tabla resume la interpretación de los principales resultados (evaluar la forma general de las curvas de amplificación; **solo las curvas de amplificación sigmoidales son indicativas de una amplificación real**; **+**: curva de amplificación detectada; **-**: sin curva de amplificación).

GBS (FAM)	ACTB (HEX)	CONTROL NEGATIVO	CONTROL POSITIVO	INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS
+	+	-	+	**GBS → POSITIVO**
+	- [1]	-	+	**GBS → POSITIVO**
-	+	-	+	**GBS → NEGATIVO**
-	-	-	+	**PRUEBA INVÁLIDA** [2]

[1] *Una alta concentración/carga de ADN de GBS detectable en la muestra puede conducir a una señal de control interno reducida o ausente en el canal HEX.*
[2] *Repita la extracción de ADN y vuelva a ejecutar la prueba Real-time PCR.*

Nota: *La interpretación de los resultados debe tener en cuenta la posibilidad de resultados falsos negativos y falsos positivos.*

- Los resultados falsos negativos pueden deberse a:
  - Recolección, manipulación y/o almacenamiento inadecuado de las muestras.
  - Degradación de la muestra.
  - Presencia de inhibidores de Real-time PCR.
  - Mutaciones en el genoma del organismo patógeno.
  - Incumplimiento de los procedimientos de este manual.
  - Uso de kit de extracción o plataforma de PCR en tiempo real no autorizados.
- Los resultados falsos positivos pueden deberse a:
  - Contaminación cruzada con el control positivo debido a su manipulación inadecuada.
  - Manipulación inadecuada de muestras que contienen alta concentración de ADN de GBS. Debido a la alta susceptibilidad del método Real-time PCR a las contaminaciones cruzadas, se debe tener especial cuidado durante el aislamiento del ADN.
  - Manipulación inadecuada del producto amplificado (placa de postamplificación).

Los resultados negativos no excluyen la infección por GBS y el resultado de la prueba no debe utilizarse como la única base para el tratamiento u otras decisiones de manejo del paciente. Además, esta prueba no puede descartar enfermedades causadas por otros patógenos bacterianos.

11. Evaluación del desempeño

El desempeño de este kit fue validado para los equipos especificados en la **Sección 9.2** (véase anteriormente). Si se utiliza otro equipo, el kit debe ser validado por el usuario utilizando muestras previamente caracterizadas (tanto positivas como negativas).

11.1. Resultados previstos

Un gráfico de amplificación típico observado para una muestra clínica positiva de GBS está presente en la Figura 1. En situaciones donde la muestra contiene altas cantidades de ADN de GBS, la curva del canal VIC, correspondiente al objetivo β-actina humana, puede estar ausente o presentar una forma atípica.

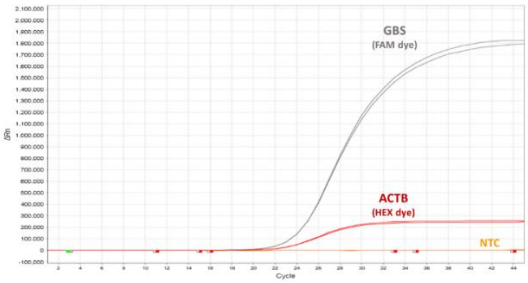

Figura 1. Detección de objetivos GBS y β-actina humana (ACTB) en una muestra clínica positiva. Curva gris: detección de la secuencia objetivo de GBS a través del canal FAM. Curva roja: detección del objetivo β-actina humana (ACTB) a través del canal VIC. Curva naranja: Control sin plantilla (NTC).

11.2. Límite de detección (LoD) - Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica se definió como la concentración más baja del analito que podía detectarse de forma fiable con un 95% de confianza. Esto se evaluó mediante pruebas de ácidos nucleicos de GBS en diferentes números de copias, agregados al ADN extraído de muestras vaginales/perianales negativas, utilizando tres lotes de kits diferentes siguiendo las condiciones de reacción de prueba típicas. Las pruebas se repitieron dos veces al día durante dos días, produciendo 48 réplicas para cada concentración probada. Juntos, los datos revelaron que el Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, de NZYtech, detecta 5 copias/reacción o 0,250 copias/µL de ADN de GBS con una confianza ≥95%. Por lo tanto, se determinó que el Límite de Detección (LoD) tentativo es de 250 copias/mL para GBS. Todos los ensayos se realizaron con el instrumento de PCR en tiempo real Applied Biosystems™ QuantStudio 5 y el análisis se realizó con el software del instrumento.

El kit de límite de detección (LoD) fue reevaluado por dos operadores diferentes, utilizando tres lotes de kit y tres métodos alternativos de aislamiento de ácidos nucleicos, a saber, NZY Mag Viral RNA/DNA Isolation Kit, IVD (MD0488, NZYtech), NZY Tissue gDNA Isolation kit (MB135, NZYtech) y chemagic Pathogenic NA gDNA Kit H96 (PerkinElmer), en tres experimentos con un total de 48 pruebas para cada kit de aislamiento. Los datos muestran que cuando se extraen ácidos nucleicos utilizando NZY Mag Viral RNA/DNA Isolation Kit, IVD (MD0488, NZYtech) o NZY Tissue gDNA Isolation kit (MB135, NZYtech), el LoD es de 250 copias/mL y que cuando se realiza la extracción de ácidos nucleicos utilizando chemagic Pathogenic NA gDNA Kit H96 (PerkinElmer), el LoD es de 500 copias/mL.

La capacidad del Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, para detectar el patógeno a diferentes concentraciones (de 5 x 10^5 a 5 copias por reacción) se presenta en la Figura 2.

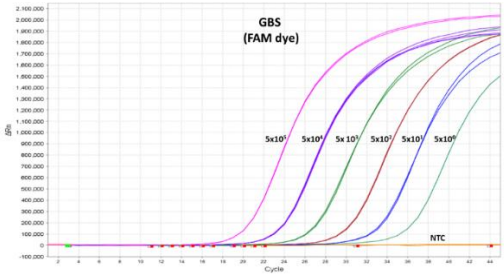

Figura 2. Sensibilidad del Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, de NZYtech. Gráfica de amplificación (número de ciclos frente a fluorescencia - ΔRn) de diluciones en serie 1:10 del ADN de GBS, de 5 x 10^5 copias a 5 copias por reacción a través del canal FAM. NTC, Control Sin Plantilla (control negativo).

11.3. Especificidad Analítica

11.3.1. Reactividad Cruzada (Exclusividad) y Especificidad

La inclusividad y la reactividad cruzada se evaluaron *in silico* analizando todas las sondas de oligonucleótidos y cebadores incluidos en el kit frente a patógenos relacionados con el GBS y patógenos normales que causan infecciones con síntomas similares, respectivamente. Los cebadores y las sondas de prueba se examinaron frente a las secuencias genómicas publicadas. Mediante los análisis *in silico* se encontró que el diseño de la prueba para detectar específicamente GBS y no mostró reactividad con especies no relacionadas.

Se realizaron ensayos de reactividad cruzada *in vitro* (exclusividad) para confirmar que el Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, no reacciona con otros microorganismos colonizadores y patógenos que se encuentran comúnmente en muestras vaginales/perianales humanas. Este estudio se realizó utilizando un panel comercial de patógenos vaginales (NATtrol™ Vaginal Panel®, ZeptoMetrix®) y ADN genómico (DSMZ) de los microorganismos seleccionados. Los ensayos se realizaron utilizando ADN genómico de los 29 microorganismos siguientes: *Atopobium vaginae Z242, Bacillus cereus ATCC 14579, Bifidobacterium breve ATCC 15700, BVAB2 recombinant, Candida albicans Z006, Candida glabrata 14/73657, Candida krusei Z009, Candida tropicalis ATCC 13803, Chlamydia trachomatis ATCC VR-902B, Clostridium perfringens VPI No.5, Enterobacter cloacae ATCC 13047, Enterococcus avium R 6566, Enterococcus faecium E980, Escherichia coli K-12, Fusobacterium nucleatum ATCC 25586, Gardnerella vaginalis CCUG 792, Klebsiella oxytoca 1028, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus crispatus Z246, Mesomycoplasma lagogenitalium ATCC 700289, Mycoplasma hominis ZK-CU2, Neisseria gonorrhoeae ATCC 19424, Proteus mirabilis ATCC 12453, Pseudomonas aeruginosa BWKH 8, Staphylococcus aureus BWKH 152, Staphylococcus epidermidis K2-4, Streptococcus pneumoniae ATCC 33400, Streptococcus pyogenes ATCC 12344* and *Trichomonas vaginalis cepa Z070.* Todas las pruebas se realizaron por triplicado utilizando tres lotes de kits. Ninguno de los patógenos analizados arrojó una señal de Real-time PCR falso positiva. También se analizó la cepa Z019 de *Streptococcus agalactiae*, y como era de esperar dio una señal Real-time PCR realmente positiva.

11.3.2. Estudios de interferencia microbiana

Se realizaron estudios de interferencia microbiana para determinar si el Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, de NZYtech reacciona con otros patógenos y/o microorganismos que probablemente se encuentren en las muestras clínicas, generando un resultado falso negativo de la prueba. Las muestras vaginales/perianales negativas se enriquecieron con ácidos nucleicos de GBS a 3x LoD, y con una alta concentración de ADN genómico de cada organismo potencialmente inhibidor. El ensayo se realizó utilizando tres lotes del kit y siguiendo las condiciones típicas de reacción de ensayo. Los resultados mostraron que no se observaron interferencias con los 24 microorganismos siguientes: *Bacillus cereus ATCC 14579, Bifidobacterium breve ATCC 15700, Candida albicans Z006, Candida glabrata 14/73657, Candida tropicalis ATCC 13803, Chlamydia trachomatis ATCC VR-902B, Clostridium perfringens VPI No.5, Enterobacter cloacae ATCC 13047, Enterococcus avium R 6566 Enterococcus faecium E980, Escherichia coli K-12, Fusobacterium nucleatum ATCC 25586, Gardnerella vaginalis CCUG 792, Klebsiella oxytoca 1028, Lactobacillus acidophilus, Mesomycoplasma lagogenitalium ATCC 700289, Mycoplasma hominis ZK-CU2, Neisseria gonorrhoeae ATCC 19424, Proteus mirabilis ATCC 12453, Pseudomonas aeruginosa BWKH 8, Staphylococcus aureus BWKH 152, Staphylococcus epidermidis K2-4, Streptococcus pneumoniae ATCC 33400* y *Streptococcus pyogenes ATCC 12344.*

11.3.3. Sustancias que interfieren

El rendimiento del Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, de NZYtech, se evaluó con 25 sustancias potencialmente interferentes que pueden estar presentes en las muestras vaginales/perianales. Los ensayos se realizaron utilizando muestras vaginales/perianales negativas enriquecidas con muestras GBS positivas a 3x LoD y 30x LoD. Las sustancias potencialmente interferentes se probaron en concentraciones que representan los niveles más altos esperados en muestras vaginales/perianales artificiales según la revisión bibliográfica. Todas las pruebas se realizaron por triplicado usando tres lotes de kit y se compararon con los datos obtenidos con una prueba de control que no contenía interferencias. La siguiente tabla resume los datos recopilados en estos experimentos. Los datos revelaron que ninguna de las sustancias analizadas interfirió con la sensibilidad de detección de GBS por el Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD.

POTENCIAL INTERFERENTE	INGREDIENTES ACTIVOS	CONCENTRACIÓN FINAL EN LA MUESTRA	INTERFERENCIA SÍ (S) O NO (N)
Antiácidos (Gaviscon®)	Alginato de sodio (250 m) + Bicarbonato de sodio (133,5 mg) + Carbonato de calcio (80 mg)	5 mg/mL	N
Medicación antidiarreica (Imodium®)	Hidrocloruro de loperamida (2 mg)	10 mg/mL	N
Laxantes (Bekunis®)	Senna (105 mg) + bisacodyl (5 mg)	10 mg/mL	N
Cremas/ungüentos antihemorroidales (Scheriproct®)	Prednisolona (1,9 mg/g) + Cincocaína (5 mg/g)	10% w/v	N
Antiácidos (Kompensan® Trieffect)	Carbonato sódico de dihidróxido de aluminio (340 mg) y dimeticona (30 mg)	5 mg/mL	N
Antimicrobianos (Gino-Canesten®)	Clotrimazol (10 mg/g)	10% w/v	N
Medicación antidiarreica (UL-250®)	Saccharomyces boulardii (250 mg)	10 mg/mL	N
Laxantes (Microlax®)	citrato sódico dihidratado (450 mg) + lauril sulfoacetato sódico (45 mg)	5% v/v	N
Antimicrobianos (Lomexin®)	Nitrato de fenticonazol	10% w/v	N
Medicina (Progeffik®)	Progesterona	5 mg/mL	N
Antifúngico	Flucitosina	5 mg/mL	N
Antifúngico	Anfotericina B (20 µg/mL)	10% v/v	N
Fluido seminal	-	5% v/v	N*
Sangre pura	Glucosa, Hormonas, Enzimas, Iones, Hierro etc.	10% v/v	N
Orina	-	10% v/v	N
Heces	-	1% w/v	N*
Productos de lavado	Grasa saponificada + silicatos	10 mg/mL	N
Productos tópicos (Lauroderme®)	Óxido de zinc (23 mg/g) + Ácido salicílico (2 mg/g)	10 mg/mL	N
Productos tópicos (Bepanthene® Pomada)	Dexpantenol (50 mg/g)	10% w/v	N
Productos tópicos (Halibut®)	Óxido de zinc (150 mg/g)	10% w/v	N
Productos tópicos (ClimaCare® Gel Vaginal)	Ácido hialurónico + Ácido láctico	10% v/v	N
Productos tópicos (WOMAN ISDIN® Hidratante Vaginal)	Glicerina (11%), Poliacrilato de glicerilo, Ácido poliacrílico	10% v/v	N
Productos de lavado (BETADINE® Vaginal)	Povidona yodada	10% v/v	N*
Productos de lavado	Ácido láctico	10% v/v	N
Etanol absoluto	Alcohol	5% v/v	N

* Concentraciones más elevadas de este interferente pueden reducir la sensibilidad del kit o dar lugar a resultados falsos negativos.

11.4. Precisión

La precisión de la prueba para el Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, de NZYtech, fue determinada por la prueba repetida de muestras positivas que representan dos niveles de carga bacteriana, 3x LoD y 30x LoD copias por reacción, enriquecido con ADN extraído de muestras vaginales/perianales negativas, utilizando 3 lotes diferentes del kit y siguiendo las condiciones de reacción típicas de las pruebas. La precisión se evaluó midiendo el promedio de Cq, el coeficiente de variación de Cq y el % de detección de réplicas, como se describe a continuación para cada caso. Los datos se resumen en las tablas que se muestran a continuación.

Precisión del Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, de NZYtech

VARIABLE		GBS (COPIAS/REACCIÓN)	
		3x LDD	30x LDD
REPETIBILIDAD	n	12	12
	Promedio de Cq	35,23	31,26
	Coeficiente de variación (%)	2,01	0,95
	% de detección de réplicas	100	100
REPRODUCIBILIDAD DIARIA	n	48	48
	Promedio de Cq	34,85	31,25
	Coeficiente de variación (%)	2,40	1,10
	% de detección de réplicas	100	100
REPRODUCIBILIDAD LOTE A LOTE	n	72	72
	Promedio de Cq	35,03	31,45
	Coeficiente de variación (%)	2,42	1,34
	% de detección de réplicas	100	100
REPRODUCIBILIDAD ENTRE OPERADORES	n	36	36
	Promedio de Cq	35,35	31,64
	Coeficiente de variación (%)	2,09	1,25
	% de detección de réplicas	100	100
REPRODUCIBILIDAD ENTRE INSTRUMENTOS	n	60	60
	Promedio de Cq	35,20	31,69
	Coeficiente de variación (%)	2,18	1,02
	% de detección de réplicas	100	100

11.4.1. Repetibilidad

La repetibilidad fue evaluada por un operador mediante el análisis de 12 réplicas de cada muestra (3x LdD y 30x LdD copias por reacción), lo que representa un número final de 24 pruebas realizadas por diana.

11.4.2. Reproducibilidad diaria

Un operador evaluó la reproducibilidad diaria analizando 48 réplicas de cada muestra (3x LoD y 30x LoD copias por reacción), durante 4 días, con 12 réplicas de cada concentración por día (se realizaron un total de 96 ensayos).

11.4.3. Reproducibilidad lote a lote

Un operador evaluó la reproducibilidad entre lotes mediante el análisis de 72 réplicas de cada muestra (3x LdD y 30x LdD copias por reacción) utilizando 3 lotes de kits diferentes con 24 réplicas por lote.

11.4.4. Reproducibilidad entre operadores

La reproducibilidad entre operadores se evaluó mediante la prueba de 36 réplicas de cada muestra (3x LdD y 30x LdD copias por reacción), por tres operadores diferentes con 12 repeticiones por operador.

11.4.5. Reproducibilidad entre instrumentos

Un operador midió la reproducibilidad entre instrumentos mediante la prueba de 12 réplicas de cada muestra (3x LdD y 30x LdD copias por reacción), en seis instrumentos de Real-time PCR diferentes:

FABRICANTE DEL EQUIPO PCR EN TIEMPO REAL	MODELO DE PLATAFORMA PCR EN TIEMPO REAL
Applied Biosystems®	7500 Fast
	StepOne Plus
	QuantStudio™ 5
Roche®	Instrumento LightCycler 96™
Bio-Rad®	CFX Opus 96 Real-Time PCR
	CFX96 Touch Real-Time PCR

11.5. Evaluación clínica

El rendimiento clínico del Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD de NZYtech, se evaluó utilizando 186 muestras de frotis vaginales y/o perianales obtenidas de mujeres embarazadas y caracterizadas previamente mediante cultivo microbiológico rutinario. Los ácidos nucleicos fueron extraídos utilizando el kit de aislamiento NZY Mag Viral RNA/DNA Isolation Kit, IVD (MD0488, NZYtech) y luego amplificados utilizando el Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD. Los datos revelaron que se lograron concordancias del 93,1% de sensibilidad clínica (PPA) y del 97,0% de especificidad clínica (NPA) para todas las muestras positivas y negativas analizadas, respectivamente.

		ENSAYO DE COMPARACIÓN - CULTIVO MICROBIOLÓGICO		
		GBS Positivo	GBS Negativo	Total
GROUP B STREPTOCOCCUS REAL-TIME PCR KIT, IVD	GBS Positivo	81	3*	84
	GBS Negativo	6	96	102
	Total	87	99	186

PPA (concordancia de porcentual positiva): 93,1% *Streptococcus* del Grupo B
NPA (concordancia de porcentual negativa): 97,0% *Streptococcus* del Grupo B

* Una posible explicación para esas muestras de cultivo negativas es la pérdida de viabilidad bacteriana durante la recolección y/o el transporte de muestras donde el ADN bacteriano no viable permaneció disponible para la amplificación. Además, esta diferencia puede justificarse por el hecho de que la técnica Real-time PCR es más sensible que los métodos de cultivo.

Además, también se realizó una comparación del rendimiento clínico del Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD de NZYtech y una prueba de PCR en tiempo real de comparación. Los datos revelaron que se lograron concordancias del 98,8% de sensibilidad clínica (PPA) y del 98,1% de especificidad clínica (NPA) para todas las muestras positivas y negativas analizadas, respectivamente.

		ENSAYO DE COMPARACIÓN - KIT DE PCR EN TIEMPO REAL		
		GBS Positivo	GBS Negativo	Total
GROUP B STREPTOCOCCUS REAL-TIME PCR KIT, IVD	GBS Positivo	82	2	84
	GBS Negativo	1	101	102
	Total	83	103	186

PPA (concordancia de porcentual positiva): 98,8% *Streptococcus* del Grupo B
NPA (concordancia de porcentual negativa): 98,1% *Streptococcus* del Grupo B

Además, se evaluó el rendimiento clínico del kit al utilizar dos métodos alternativos de extracción de ácidos nucleicos, a saber, NZY Tissue gDNA Isolation kit (MB135, NZYtech) y chemagic Pathogenic NA gDNA Kit H96 (PerkinElmer). Para el kit NZY Tissue gDNA Isolation kit (MB135, NZYtech),

los datos revelaron un PPA del 100% y un NPA del 100% en comparación con la detección de ácidos nucleicos extraídos utilizando el kit de aislamiento de ácidos nucleicos NZY Mag Viral RNA/DNA Isolation Kit, IVD (MD0488, NZYtech). Para el kit chemagic Pathogenic NA gDNA Kit H96 (PerkinElmer), los datos revelaron un PPA del 95,8% y un NPA del 100%. En general, los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar GBS utilizando el Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, de NZYtech.

12. Control de calidad

Todos los componentes del Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, de NZYtech, se prueban siguiendo los protocolos descritos anteriormente. El sistema de Real-time PCR dúplex permite la detección de objetivos descritos para la identificación de ADN de GBS, así como el ADN humano ACTB. Se observan amplificaciones positivas para los genes objetivo y los controles positivos e internos mediante FAM y HEX, según los respectivos colorantes informadores del conjunto de cebadores/sondas.

13. Apoyo técnico

Para soporte técnico, comuníquese con nuestro equipo de soporte técnico dedicado por teléfono: +351 (0) 21 364 35 14 o correo electrónico: info@nzytech.com.

14. Marcas registradas y descargos de responsabilidad

Todas las marcas registradas que aparecen en este manual son propiedad de sus respectivos dueños.

15. Explicación de los símbolos

IVD	Dispositivo médico de diagnóstico *in vitro*		Consultar instrucciones de uso
REF	Número de catálogo		Fabricante
LOT	Código de lote		Usar por
	Limitación de temperatura		Suficiente para
CONTROL +	Control positivo		Mantener alejado de la luz solar (mezcla de cebador/sonda)
CONTROL -	Control negativo		

16. Declaración de conformidad

Nombre del producto: Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD

Número de catálogo: MD04941

Uso previsto: Detección cualitativa de *Streptococcus agalactiae*

Clasificación: Otros (no incluidos en el anexo II o no destinado a autodiagnóstico) según la Directiva 98/79/CE

Fabricante: NZYtech - Genes & Enzymes,

Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar

Edifício E, R/C,

1649-038, Lisboa

Portugal

Nosotros, NZYtech, Lda – Genes & Enzymes, declaramos por la presente que este producto, al que hace referencia esta declaración de conformidad, cumple con los siguientes estándares y demás documentos normativos ISO 9001:2015 e ISO 13485:2016, de acuerdo con las disposiciones de la Directiva 98/79/CE y Regulación (EU) 2017/746 sobre productos sanitarios para diagnóstico *in vitro*, incorporada a la legislación nacional de los Estados Miembros de la Unión Europea.

El archivo técnico del producto se conserva en NZYtech, Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar - Edifício E, R/C, 1649-038 Lisboa, Portugal.

Dra. Joana Brás

Directora técnica

17. Referencias

Florindo C, Ferreira R, Borges V, Spellerberg B, Gomes JP, Borrego MJ. Selection of reference genes for real-time expression studies in Streptococcus agalactiae. J Microbiol Methods. 2012 Sep;90(3):220-7. doi: 10.1016/j.mimet.2012.05.011. Epub 2012 Mayo 23. PMID: 22634000.

CDC. +() Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease, Revised Guidelines. Morbidity and Mortality Weekly Report, Vol.59.

ACOG, A.C. (2011). Prevention of Early-Onset Group B Streptococcal Disease in Newborns. Committee Opinion, 1

Paolucci M, Landini MP, Sambri V. How can the microbiologist help in diagnosing neonatal sepsis?. Int J Pediatr. 2012;2012:120139. doi:10.1155/2012/120139

Alfa MJ, Sepehri S, De Gagne P, Helawa M, Sandhu G, Harding GK. Real-time PCR assay provides reliable assessment of intrapartum carriage of group B Streptococcus. J Clin Microbiol. 2010;48(9):3095-3099. doi:10.1128/JCM.00594-10

Steer PJ, Russell AB, Kochhar S, Cox P, Plumb J, Gopal Rao G. Group B streptococcal disease in the mother and newborn-A review. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2020 Sep;252:526-533. doi: 10.1016/j.ejogrb.2020.06.024. Epub 2020 Jun 15. PMID: 32586597; PMCID: PMC7295463