Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD
Kit de PCR em tempo real para Streptococcus do grupo B, IVD

REF MD04941, 96 reações

***Dispositivo médico para diagnóstico* in vitro**

CE IVD

PT

Instruções de utilização

MD0494_IM_pt

VERSÃO 2401, janeiro 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

Índice

1. Introdução ... 3
2. Utilização prevista ... 3
3. Princípio do ensaio ... 3
4. Descrição do produto ... 3
5. Armazenamento, conservação e manuseamento ... 4
6. Materiais e instrumentos necessários, mas não fornecidos ... 4
7. Colheita e preparação da amostra ... 4
8. Advertências e precauções ... 4
   8.1. Informação de segurança ... 4
   8.2. Manuseamento e Procedimentos adequados ... 4
9. Procedimentos de testagem ... 5
   9.1. Preparação das reações de qPCR ... 5
   9.2. Programação do equipamento de PCR em tempo real ... 6
10. Análise de dados ... 6
   10.1. Critérios de validação da corrida ... 6
   10.2. Interpretação dos resultados ... 6
11. Avaliação de desempenho do teste ... 7
   11.1. Resultados esperados ... 7
   11.2. Sensibilidade Analítica – Limite de Deteção (LoD) ... 7
   11.3. Especificidade Analítica ... 8
   11.3.1. Reatividade cruzada (exclusividade) e especificidade ... 8
   11.3.2. Estudos de Interferência Microbiana ... 8
   11.3.3. Substâncias Interferentes ... 8
   11.4. Precisão ... 9
   11.4.1. Repetibilidade ... 10
   11.4.2. Repetibilidade diária ... 10
   11.4.3. Reprodutibilidade entre lotes ... 10
   11.4.4. Reprodutibilidade entre operadores ... 10
   11.4.5. Reprodutibilidade entre equipamentos ... 10
   11.5. Avaliação Clínica ... 10
12. Controlo de Qualidade ... 11
13. Apoio Técnico ... 11
14. Marcas registadas e direitos de propriedade ... 11
15. Tabela de símbolos ... 11
16. Declaração de Conformidade ... 12
17. Referências ... 13

1. Introdução

Streptococcus agalactiae, também conhecido por *Streptococcus* do grupo B (GBS), é a principal causa de infeções bacterianas graves em recém-nascidos, podendo resultar em septicemia e meningite. Esta bactéria coloniza o trato gastrointestinal e o trato genital inferior, em 10 a 40% das gestantes e, existe o risco de o bebé ficar infetado durante o parto. A infeção por GBS em recém-nascidos pode levar a sépsis, pneumonia e meningite. Para prevenir a infeção por GBS em recém-nascidos, no final da gravidez (entre 35 e 37 semanas de gestação), as mulheres grávidas são rotineiramente rastreadas para GBS. Um teste positivo para GBS exigirá a administração de antibióticos durante o trabalho de parto para reduzir o risco de infeção do bebé. No entanto, as mulheres que dão à luz prematuros geralmente não têm a oportunidade de serem rastreadas para GBS pelo que, a presença desta bactéria no trabalho de parto é desconhecida. Por um lado, este desconhecimento leva a um aumento do risco de infeções graves nos recém-nascidos e por outro lado, potencia a administração inadequada de antibióticos durante o parto, que tem sido associada ao aparecimento de estirpes de bactérias resistentes. Adicionalmente, estudos indicam que até dois terços dos recém-nascidos que desenvolveram septicemia precoce causada por GBS nasceram de mães cuja triagem pré-natal efetuada por métodos microbiológicos indicava que eram negativas para GBS. Embora a cultura microbiológica seja considerada o método padrão para deteção de GBS apresenta algumas limitações tais como a sua menor sensibilidade e o elevado tempo de obtenção do resultado, que pode chegar a 72 horas. O ensaio por PCR em tempo real representa um método rápido, poderoso e robusto que pode ser usado para identificar a presença de *Streptococcus* do Grupo B.

2. Utilização prevista

O kit Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, é um teste molecular baseado na tecnologia de PCR em tempo real, destinado à rápida deteção e diagnóstico qualitativo dos ácidos nucleicos específicos de GBS, a partir de zaragatoas vaginais e/ou recolhidas com um kit de transporte em meio líquido Amies. Este teste destina-se a identificar a colonização por GBS em mulheres no pré-parto. Não há contraindicações para o uso do kit de Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD. A testagem deve ser realizada por técnicos de laboratório especializados e qualificados, sobretudo na técnica de PCR em tempo real e em diagnóstico molecular. O kit deverá ser usado apenas conforme indicado neste manual do utilizador.

3. Princípio do ensaio

O kit Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, da NZYtech, fornece o conjunto de reagentes, enzimas e oligonucleótidos (*primers* e sondas) para a deteção qualitativa do genoma de GBS através da técnica de PCR em tempo real (ver requisitos das especificações do equipamento na **Secção 6).** A sequência-alvo do kit foi previamente identificada como um bom marcador genético para GBS. O kit Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, da NZYtech foi projetado para ter um perfil de deteção amplo, permanecendo específico exclusivamente para o genoma de GBS. Além disso, o conjunto de oligonucleótidos foi desenhado especificamente para a deteção desse organismo e não apresenta homologia significativa com outros genomas, o que reflete a alta especificidade e sensibilidade de deteção do teste. Como tal, o kit foi concebido para ser específico para GBS e evitar a deteção de outros organismos tipicamente encontrados no trato genital. O controlo interno, incluído no kit, permite confirmar a eficácia do processo de extração dos ácidos nucleicos, bem como a ausência de inibidores de PCR potencialmente presentes nas amostras biológicas humanas. Periodicamente, a NZYtech revisita a sequência do gene alvo de GBS e, se necessário, pode disponibilizar uma nova versão deste kit. Adicionalmente, o kit inclui dois controlos externos (um controlo positivo e um controlo negativo), tal como descrito adiante. O controlo positivo consiste num fragmento de ácidos nucleicos que contém a sequência alvo detetada pelo kit.

Neste kit, a determinação qualitativa de ADN é baseada na técnica de PCR em tempo real, metodologia de referência no diagnóstico laboratorial. É uma metodologia de elevada sensibilidade e especificidade para detetar com precisão a presença deste organismo. O princípio do kit Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, da NZYtech, consiste na utilização do ADN isolado e purificado através de um sistema de extração. O ADN extraído é submetido a amplificado por PCR, numa única reação, usando um conjunto de *primers/*sonda altamente específicos para o GBS, baseando-se no princípio TaqMan®. Na presença de ADN de GBS, a sonda TaqMan® liga-se especificamente a regiões conservadas do gene específico de GBS que é flanqueado por um par de *primers* igualmente específicos. Um segundo conjunto de oligonucleótidos (*primers* e sonda) funciona como controlo interno, detetando o gene humano β-actina (ACTB). A deteção do controlo interno valida a eficácia do processo de extração e também permite confirmar se a reação de PCR foi comprometida pela presença/ausência de inibidores em amostras clínicas. Para permitir a identificação da amplificação dos dois alvos específicos numa única reação, as sondas específicas para GBS e para β-actina humana são marcadas com fluoróforos emissores diferentes, FAM™ e HEX™, respetivamente. Assim, este kit consiste num ensaio duplex no qual o alvo específico para GBS é detetado no canal ótico FAM e o gene alvo humano é detetado no canal ótico VIC (ver **Secção 9.2**). Estes conjuntos de *primers*/sondas são fornecidos em concentrações otimizadas para garantir que o ADN humano, mesmo quando presente em concentrações extremamente altas, não limita a eficiência dos *primers*/sonda específicos para o ADN de GBS.

4. Descrição do produto

O kit Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD da NZYtech fornece um conjunto de reagentes e controlos suficientes para realizar 96 reações de Real-time PCR num único passo.

COMPOSIÇÃO DO KIT		**VOLUME** (POR TUBO)	**NÚMERO DE TUBOS**	**COR DA TAMPA**
GBS MMix	Mistura enzimática NZYSupreme qPCR Probe Master Mix (2x)	1050 µL	1	Neutro
GBS PPMix	Mistura primers/sonda GBS/ACTB	205 µL	1	Castanho
GBS POS	Controlo positivo GBS/ACTB	105 µL	1	Vermelho
NTC	Controlo negativo	105 µL	1	Neutro

5. Armazenamento, conservação e manuseamento

O kit Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD é enviado refrigerado. Ao receber o kit, todos os componentes devem ser imediatamente armazenados entre -85 °C e -15 °C. Q De forma a minimizar o tempo de exposição à temperatura ambiente, que pode degradar os componentes do kit, estes deverão ser colocados imediatamente no congelador após a sua utilização. Adicionalmente:

- É aconselhável reduzir o número dos ciclos de congelação/descongelação através do armazenamento de alíquotas de trabalho. Assim, os componentes do kit podem ser aliquotados em volumes menores após descongelação. O kit é estável por um mínimo de 6 ciclos de congelamento e descongelamento.
- O componente GBS PPMix deve ser armazenado num local protegido da luz. Em particular, não expor o componente GBS MMix diretamente à luz do sol depois de adicionar o componente GBS PPMix.
- Se ao receber o kit, a embalagem estiver danificada, contactar imediatamente a NZYtech.
- Tenha em atenção a data de validade indicada na embalagem. A NZYtech não recomenda a utilização do kit após a data de validade. Nessa altura, o kit deve ser descartado seguindo as instruções descritas na **Secção 8.2.**

6. Materiais e instrumentos necessários, mas não fornecidos

- Equipamento de PCR em tempo real que deteta FAM™ e VIC™ (canais de comprimento de onda de 520 e 556 nm, respetivamente). Ver na **Secção 11** os modelos dos equipamentos para os quais o kit foi validado.
- Equipamento e consumíveis para extração de ADN de amostras biológicas/clínicas.
- Consumíveis de plástico para Real-time PCR, isentos de nucleases: tubos de PCR e tampas, placas de 96 poços, peliculas adesivas apropriadas.
- Pipetas e respetivas pontas com filtro hidrófobos, estéreis e livres de nucleases.
- Bloco frio.
- Luvas descartáveis.
- Agitador de vórtex e centrífuga de bancada.

7. Colheita e preparação da amostra

O kit foi projetado para detetar ADN extraído a partir de zaragatoas vaginais e/ou perianais. Diferentes fatores, tais como, o procedimento de colheita de amostras biológicas, o transporte, o armazenamento e a duração do tempo de processamento da amostra, são críticos para garantir a integridade da amostra e alcançar os melhores resultados. Amostras vaginais e/ou perianais devem ser recolhidas com a mesma zaragatoa (ESwab®, Copan). As amostras devem ser hermeticamente fechadas em tubos e recipientes apropriados, rotuladas corretamente e transportadas imediatamente para o laboratório. As amostras recolhidas devem ser testadas o mais rapidamente possível. A colheita inadequada, o manuseamento e/ou o transporte inadequados das amostras poderão originar um resultado falso. Os ácidos nucleicos totais, constituem o material inicial para o ensaio usando o teste Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD. A NZYtech recomenda a utilização de um dos seguintes kits de purificação de ácidos nucleicos baseados na tecnologia de esferas magnéticas: NZY Mag Viral RNA/DNA Isolation Kit, IVD (MD0488, NZYtech) ou chemagic Pathogenic NA gDNA Kit H96 (PerkinElmer). Alternativamente, a extração dos ácidos nucleicos pode ser efetuada utilizando usando um método de extração de ADN baseado em sílica, em particular o kit NZY Tissue gDNA Isolation (MB135, NZYtech). Os três kits referidos acima foram validados para a extração de amostras clínicas de GBS e sua posterior deteção utilizando o teste Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD. Os métodos de extração de ADN baseados em sílica podem ser mais propensos à contaminação do que sistemas de extração automatizados, devido ao manuseio manual das amostras. Por favor, assegure-se de que não ocorreram contaminações cruzadas e que as amostras de ADN são adequadas em termos de pureza, concentração e integridade dos ácidos nucleicos. Sendo o etanol um forte inibidor do PCR em tempo real, é necessário eliminar completamente este componente antes da eluição dos ácidos nucleicos aquando de processo de extração. O kit da NZYtech contém um controlo interno que tem como alvo o ADN humano co-purificado com o ADN bacteriano de GBS. O ADN humano é amplificado com o conjunto de oligonucleotídeos (*primers* e sonda) do gene da β-actina humana. A introdução do controlo interno é útil na avaliação da eficiência da extração e isolamento do ADN e/ou na deteção da presença de potenciais inibidores da reação de PCR.

8. Advertências e precauções

Siga cuidadosamente os procedimentos e indicações fornecidas neste manual de forma a assegurar que o teste é realizado corretamente. Antes da primeira utilização verifique o produto e os seus componentes relativamente à sua integridade nomeadamente, totalidade e tipo de componentes do kit, etiquetagem correta e se congelado aquando entrega. Como em qualquer procedimento de testagem, as boas práticas de laboratório são essenciais. Qualquer alteração dos mesmos pode resultar na falha do ensaio ou causar resultados erróneos. Devido à elevada sensibilidade do kit, deve ser dada especial atenção aos reagentes e às misturas de amplificação da reação, de forma a mantê-los livres de contaminações.

8.1. Informação de segurança

Antes de utilizar o kit, por favor consulte a ficha de dados de segurança (SDS) que está disponível no website da NZYtech (www.nzytech.com). A deteção de GBS deve ser realizada somente por profissionais especializados com formação nos procedimentos técnicos e nas normas de segurança, em laboratórios devidamente equipados. Os regulamentos internacionais e nacionais de biossegurança de laboratórios devem ser seguidos em todas as circunstâncias.

8.2. Manuseamento e Procedimentos adequados

- Apenas para uso profissional de diagnóstico *in vitro*.
- Não utilizar este kit após a data de validade.
- Não utilizar os componentes do kit se a embalagem estiver danificada.
- Não misturar reagentes/componentes de diferentes lotes de produção.
- Não utilizar reagentes/componentes de outros fabricantes juntamente com os reagentes/componentes deste kit.

- Devem ser usados consumíveis de plástico e pipetas livres de nucleases (sem DNase/RNase) em todos os procedimentos.
- Utilize áreas de trabalho separadas/diferentes e isoladas para a preparação da amostra, a preparação da reação e as atividades de amplificação/deteção. A ordem das tarefas no laboratório deve ser unidirecional. Utilize sempre luvas descartáveis em cada área e troque-as antes de entrar numa área diferente. Se possível mude de bata.
- Selecione materiais e equipamentos específicos para cada área de trabalho individual e não os transfira de uma área para outra.
- A extração de ácidos nucleicos usando colunas de sílica pode ser mais propensa a contaminações cruzadas do que a extração realizada com sistemas de extração automatizados.
- Utilizar sempre o NTC (controlo negativo) fornecido no kit.
- As amostras biológicas devem ser manuseadas como sendo infeciosas e seguindo as devidas precauções de biossegurança.
- O controlo positivo contém um elevado número de cópias. Assim, deve ser guardado e manuseado longe das amostras e dos todos os outros componentes do kit de forma a evitar contaminação cruzada.
- Manusear as placas após amplificação com cuidado e descartá-las imediatamente no final da testagem; as placas devem ser sempre descartadas no contentor de riscos biológicos. Não abra os tubos/placas de reação pós-amplificação para evitar a contaminação do amplicão.
- No final de cada testagem, limpar/desinfetar as superfícies das zonas de trabalho e equipamentos com solução desinfetante apropriada para remoção de quaisquer vestígios de ácidos nucleicos.
- Deitar fora os resíduos de amostras e ensaios respeitando as normas regulamentares de segurança em vigor. Resíduos de compostos químicos e outras preparações são geralmente considerados resíduos perigosos. A rejeição deste tipo de resíduos está regulada por leis nacionais e regionais.
- Todos os resultados devem ser interpretados por um profissional de saúde no contexto do historial médico e sintomas do paciente.
- Este teste não pode excluir doenças causadas por outros patógenos.
- Um resultado negativo para qualquer teste de PCR não exclui a possibilidade de infeção.
- Seguir boas práticas de laboratório, vestir roupa de proteção, usar luvas permanentemente, óculos de proteção e máscara. Não comer, beber ou fumar na zona de trabalho.

9. Procedimentos de testagem

Por favor, leia cuidadosamente as instruções antes de realizar o ensaio. Tenha em atenção que todos os passos de pipetagem e preparação da placa devem ser executados de acordo com as boas práticas de Real-time PCR. Depois da placa estar selada, deve-se iniciar imediatamente o protocolo de PCR em tempo real. As exposições prolongadas das misturas da reação à temperatura ambiente podem originar artefactos PCR que reduzem a sensibilidade da deteção. Antes do ensaio, deve misturar gentilmente os tubos de reação fornecidos e centrifugue por cinco segundos para recolher o conteúdo no fundo do tubo. Colocar os tubos no gelo. **Recomendamos vivamente pipetar o GBS POS por último, de forma a evitar eventuais contaminações cruzadas.**

9.1. Preparação das reações de qPCR

1. Preparar uma mistura de reação Real.time PCR com o volume suficiente para o número de testes a realizar; com 5% de volume extra para perdas durante a pipetagem. Proceda de acordo com a tabela seguinte, onde estão especificados os volumes para 1 ou n testes (em que n corresponde ao número total de reações):

COMPONENTE	**VOLUME 1 TESTE (µL)**	**VOLUME *n* TESTES * + 5% (µL)**
GBS MMIX **	10	*n* x 10,5
GBS PPMIX	2	*n* x 2,10
VOLUME FINAL	**12**	***n* x 12,6**

** Para calcular o número total de reações necessárias para cada ensaio, contabilize o número de amostras e mais duas para os controlos negativo e positivo, respetivamente.*
*** Um ligeiro precipitado pode surgir no tubo, em particular após vários ciclos de congelação/ descongelação. Para garantir o desempenho ideal, proceda a uma agitação vigorosa da mistura de enzimas antes de usar. Neste caso, não centrifugue a mistura de enzimas antes de pipetar.*

2. Pipete 12 µL da mistura reação Real-time PCR para cada poço de acordo com a configuração de testagem da placa de qPCR.
3. Para o controlo negativo, adicione 8 µL de NTC no poço relativo ao controlo negativo, em substituição do ADN da amostra. O volume final deve ser de 20 µL.
4. Para as amostras biológicas, adicione 8 µL de cada amostra de ADN nos poços relativos ao ensaio, de acordo com a configuração de testagem da placa. O volume final deve ser de 20 µL.
5. Para o controlo positivo, adicionar 8 µL de GBS POS em substituição do ADN da amostra. O volume final deve ser de 20 µL.
6. Selar a placa contendo todas a reações com um revestimento adesivo apropriado antes de iniciar as etapas de Real-time PCR em tempo real para deteção das sequências.
7. Colocar a placa no equipamento de PCR em tempo real e iniciar o protocolo de qPCR de acordo com a secção seguinte.

9.2. Programação do equipamento de PCR em tempo real

A tabela seguinte exemplifica o protocolo padronizado e otimizado num determinado número de plataformas de PCR em tempo real. No entanto, estas condições podem ser adaptadas e validadas de forma a satisfazer protocolos específicos em alguns equipamentos.

CICLOS	TEMPERATURA	TEMPO	FASE
1	95 °C	3 min	Ativação da polimerase
45	95 °C	5 s	Desnaturação
	60 °C	30 s	Emparelhamento/Extensão*

**Dependendo do instrumento de Real-time PCR selecionar os canais de deteção adequados. Colheita de sinal de fluorescência nos canais FAM e HEX.*

Os corantes fluorescentes usados neste kit e respetivos canais de deteção são:

Fluoróforos/Marcações

GENES ALVO /DETETOR	CORANTE *REPORTER* (SONDAS)	CANAL DE DETEÇÃO
Gene específico de GBS	FAM™	FAM
Gene humano β-actina (ACTB)	HEX™	HEX/VIC/JOE
GBS POS	FAM™ & HEX™	FAM & HEX/VIC/JOE

O kit Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD da NZYtech foi validado nos seguintes equipamentos de PCR em Tempo Real: Applied Biosystems™ QuantStudio 5, Applied Biosystems™ 7500 FAST, Applied Biosystems™ StepOne Plus, Roche Lightcycler® 96 Instrument, Bio-Rad® CFX Opus Real-Time PCR e Bio-Rad® CFX96 Touch Real-Time PCR. Caso seja utilizado outro equipamento, o usuário deverá validar o kit utilizando amostras previamente caracterizadas (positivas quanto negativas).

10. Análise de dados

10.1. Critérios de validação da corrida

Previamente à análise dos resultados, recomendamos que consulte o manual do utilizador do respetivo aparelho. De seguida verifique se o teste de PCR em tempo real é válido. Assim, para cada placa, confirme se os resultados obtidos para os controlos positivo e negativo estão de acordo com os seguintes critérios:

Controlo negativo (reação sem ADN): nenhum sinal de amplificação é detetado. Se o controlo negativo origina algumas das curvas de amplificação (FAM e HEX) com forma sigmoide, poderá ter ocorrido contaminação. Repita o teste seguindo boas práticas de PCR em tempo real.

Controlo positivo: as curvas de amplificação para FAM (GBS) e HEX (ACTB) são positivas. É expectável que o controlo positivo origine curvas de amplificação com Ct < 32, para qualquer um dos canais FAM e HEX. O não cumprimento deste critério de controlo de qualidade é uma forte indicação de que o ensaio foi comprometido.

Se os controlos estão de acordo com o esperado, o teste é considerado **válido**.
Por favor, prossiga com a interpretação dos resultados das amostras testadas.

Se em algum dos controlos não foi obtido o resultado esperado, significa que o ensaio foi comprometido ou executado incorretamente e deve ser considerado **inválido**.
Por favor, repita o teste. Se o problema persistir, contacte o fabricante.

10.2. Interpretação dos resultados

O kit Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD da NZYtech usa os seguintes valores de Ct *cut-off* para a interpretação de resultados:

VALOR DE CT	INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS
Ct ≤38	Detetado (+) → **POSITIVO**
Ct >38	Não Detetado (-) → **NEGATIVO**

GBS é detetado se a curva de amplificação do FAM exibir uma forma sigmoide com Ct≤38, independentemente do resultado obtido para o gene ACTB (HEX) (a presença ou ausência de um sinal no canal HEX não é significativa para validade da análise processada).

GBS não é detetado se a curva do canal FAM não amplifica (Ct>38), enquanto o gene ACTB (HEX) apresenta uma curva positiva sigmoide com Ct ≤45.

O **teste é inválido** se as curvas de amplificação de GBS e ACTB forem negativas. O teste deve ser repetido, procedendo-se a nova extração de ácidos nucleicos a partir da amostra.

A tabela a seguir resume a interpretação dos resultados principais (deve avaliar a forma das curvas de amplificação; **apenas curvas de amplificação sigmoide são indicativas de uma amplificação real**).

GBS (FAM)	ACTB (HEX)	CONTROLO NEGATIVO	CONTROLO POSITIVO	INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS
+	+	-	+	**GBS → POSITIVO**
+	- [1]	-	+	**GBS → POSITIVO**
-	+	-	+	**GBS → NEGATIVO**
-	-	-	+	**TESTE INVÁLIDO** [2]

[1] Na presença de quantidades elevadas de ADN alvo na amostra a deteção do Controlo interno no canal de deteção HEX pode ser inibida, originando uma redução ou ausência do sinal (+: curva de amplificação detectada; -: inexistência de curva de amplificação).
[2] Repita a extração de ADN e realize uma nova corrida de Real-time PCR.

Nota: *A interpretação dos resultados deve ter em conta a possibilidade de resultados falsos negativos e falsos positivos.*

- Resultados falsos negativos podem ser causados por:
  - Recolha, manuseamento e/ou armazenamento incorretos das amostras.
  - Degradação da amostra.
  - Presença de inibidores de Real-time PCR.
  - Mutações no genoma do patogénico.
  - Falha no seguimento dos procedimentos deste manual.
  - Utilização de kits de extração ou plataformas de PCR em tempo real não validadas.
- Resultados falsos positivos, podem ser causados por:
  - Contaminação cruzada com o controlo positivo devido ao seu manuseamento incorreto.
  - Manuseamento inadequado de amostras contendo elevadas concentrações de ADN de GBS. Devido à alta suscetibilidade do método Real-time PCR para contaminações cruzadas, cuidados especiais devem ser tomados durante o isolamento do ADN.
  - Manuseamento incorreto do produto amplificado (placa pós amplificação).

Um resultado negativo não impede a infeção por GBS e não deve ser usado como único indicador para o tratamento médico ou outras decisões relativas ao paciente. Além disso, este teste não pode descartar doenças causadas por outros patógenos.

11. Avaliação de desempenho do teste

O desempenho do kit Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, da NZYtech foi validado nos equipamentos de PCR em tempo real especificados na **Secção 9.2**. Se outro equipamento for usado, o kit deverá ser validado pelo utilizador utilizando amostras positivas e negativas previamente caracterizadas.

11.1. Resultados esperados

Um gráfico típico de amplificação referente a uma amostra clínica positiva para GBS encontra-se apresentado na Figura 1. Em situações em que a amostra contém quantidades elevadas de ADN de GBS a curva do canal VIC, correspondente à amplificação do gene humano da β-actina, pode estar ausente ou exibir uma forma atípica.

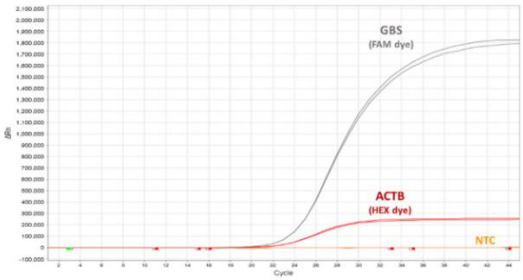

Figura 1. Deteção simultânea das sequências dos genes-alvo de GBS e da β-actina humana (ACTB) numa amostra clínica positiva. Curva cinzenta: deteção da sequência alvo de GBS através do canal FAM. Curva vermelha: deteção da sequência da β-actina humana (ACTB) através do canal VIC. Curva laranja: controlo negativo (NTC).

11.2. Sensibilidade Analítica – Limite de Deteção (LoD)

A sensibilidade analítica foi definida como a menor concentração de analito que pode ser detetado com 95% de confiança. Este parâmetro foi avaliado através de ensaios com diferentes números de cópias (todas diluições limitantes) dos ácidos nucleicos da GBS, misturadas com ADN extraído de amostras negativas vaginais/perianais, usando três lotes de kit diferentes e seguindo as condições de reação recomendadas. Os testes foram repetidos duas vezes ao dia durante 2 dias, produzindo 48 réplicas para cada concentração testada. A análise conjunta dos dados revelou que o kit deteta 5 copias/reação ou 0,250 copias/µL de GBS com uma confiança ≥95%. Assim, a sensibilidade analítica do kit, expressa como o Limite de Deteção (LoD), é de 250 cópias/mL para GBS. Todos os ensaios foram realizados usando o instrumento Applied Biosystems™ QuantStudio 5 Real-Time PCR e a análise foi realizada usando o software do instrumento.

O LoD do kit foi confirmado por dois operadores diferentes, utilizando três lotes do kit e os três métodos alternativos de isolamento de ácidos nucleicos, nomeadamente NZY Mag Viral RNA/DNA Isolation Kit, IVD (MD0488, NZYtech), NZY Tissue gDNA Isolation kit (MB135, NZYtech) e chemagic Pathogenic NA gDNA Kit H96 (PerkinElmer), em três ensaios independentes com um total de 48 réplicas para cada kit de extração. Os dados mostram que quando os ácidos nucleicos são extraídos usando o NZY Mag Viral RNA/DNA Isolation Kit, IVD (MD0488, NZYtech) ou o NZY Tissue gDNA Isolation kit (MB135, NZYtech), o LoD é de 250 cópias/mL, e que quando a extração de ácidos nucleicos é realizada usando o chemagic Pathogenic NA gDNA Kit H96 (PerkinElmer), o LoD é de 500 cópias/mL.

A capacidade do kit Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, para detetar o agente patogénico em diferentes concentrações (de 5 x 10^5 a 5 cópias por reação) é apresentado na Figura 2.

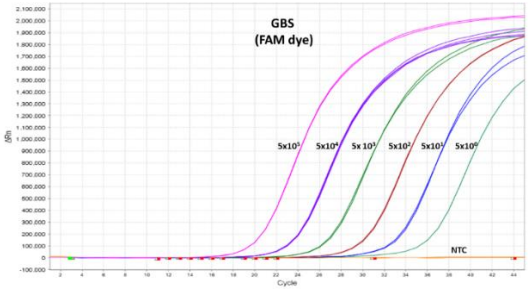

Figura 2. Sensibilidade do kit Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD. Gráfico de amplificação (número de ciclos versus fluorescência - ΔRn) de diluições seriadas 1:10, de 5 x 10^5 cópias a 5 cópias por reação, do ADN de GBS através do canal FAM. NTC, controlo negativo.

11.3. Especificidade Analítica

11.3.1. Reatividade cruzada (exclusividade) e especificidade

A inclusividade e a reatividade cruzada foram avaliadas por análise *in silico,* analisando todos as sondas e *primers* incluídos no kit contra agentes patógenos filogeneticamente relacionados com GBS e contra agentes patógenos que causam infeções com sintomas semelhantes, respetivamente. Os *primers* e as sondas do ensaio foram rastreados contra sequências genómicas publicadas. Após análise *in silico*, verificou-se que o kit deteta especificamente GBS e que não existe reatividade com espécies não relacionadas.

Os ensaios *in vitro* para reatividade cruzada (exclusividade) foram realizados para confirmar que o teste Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD não reage com outros microrganismos colonizadores e patogénicos comumente encontrados em amostras vaginais/perianais. Este estudo foi realizado usando um painel comercial de patógenos vaginais (*NATtrol™* Vaginal Panel®, ZeptoMetrix®) e ADN genómico (DSMZ) dos microrganismos selecionados. Os ensaios foram realizados usando ADN genómico dos 29 microrganismos seguintes: *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* e *Trichomonas vaginalis strain Z070.* Todos os testes foram realizados em triplicado usando três lotes de kits. Nenhum dos patógenos testados produziu um sinal falso-positivo de Real-time PCR. *Streptococcus agalactiae* Z019 também foi testado e tal como esperado, originou uma amplificação de Real-time PCR positiva.

11.3.2. Estudos de Interferência Microbiana

Foram realizados estudos de interferência microbiana para determinar se a deteção de GBS usando o teste Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, fica comprometida na presença de outros patógenos e/ou microrganismos que se encontram habitualmente nas amostras clínicas, gerando um resultado falso negativo. O ensaio foi realizado adicionando ácidos nucleicos de GBS numa concentração de 3x LoD a amostras vaginais/perianais contendo uma concentração elevada de ADN genómico de cada um dos microrganismos potencialmente inibidores. Todos os testes foram realizados utilizando três lotes de kit e seguindo condições típicas de reação. Os dados revelaram que nenhum dos 24 microrganismos testados interferiu com a sensibilidade de deteção de GBS pelo teste Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD: *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* e *Streptococcus pyogenes ATCC 12344.*

11.3.3. Substâncias Interferentes

O desempenho do teste Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, foi avaliado num ensaio usando 25 substâncias interferentes que podem ser ocasionalmente encontradas em amostras vaginais/perianais. Os ensaios foram realizados usando espécimes vaginais/perianais negativas misturadas com espécimes positivos para GBS em 3x LoD e 30x LoD. As substâncias potencialmente interferentes foram adicionadas às amostras em concentrações que representam os níveis mais altos esperados em amostras vaginais/perianais com base na revisão da literatura. Todos os testes foram realizados em triplicado, usando os três lotes do kit e, comparados com o teste controlo sem interferentes. A tabela abaixo resume os dados obtidos. Os dados revelaram que nenhuma das substâncias testadas interferiu com a sensibilidade de deteção de GBS pelo Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD.

POTENCIAL INTERFERENTE	INGREDIENTES ATIVOS	CONCENTRAÇÃO FINAL NA AMOSTRA	INTERFERÊNCIA SIM (S) OU NÃO (N)
Antiácidos (Gaviscon®)	Alginato de sódio (250 mg) + bicarbonato de sódio (133,5 mg) + carbonato de cálcio (80 mg)	5 mg/mL	N
Medicação antidiarreica (Imodium®)	Cloridrato de loperamida (2 mg)	10 mg/mL	N
Laxantes (Bekunis®)	Sene (105 mg) + bisacodilo (5 mg)	10 mg/mL	N
Anti-hemorroidais/Pomadas (Scheriproct®)	Prednisolona (1,9 mg/g) + Cinchocaína (5 mg/g)	10% w/v	N
Antiácidos (Kompensan® Trieffect)	Carbonato de di-hidróxido de alumínio e sódio (340 mg) e dimeticone (30 mg)	5 mg/mL	N
Antimicrobianos (Gino-Canesten®)	Clotrimazol (10 mg/g)	10% w/v	N
Medicação antidiarreica (UL-250®)	Saccharomyces boulardii (250 mg)	10 mg/mL	N
Laxantes (Microlax®)	Citrato de sódio (450 mg) + laurilsulfoacetato de sódio (45 mg)	5% v/v	N
Antimicrobianos (Lomexin®)	Nitrato de fenticonazol	10% w/v	N
Medicamento (Progeffik®)	Progesterona micronizada	5 mg/mL	N
Antifúngico	Flucitosina	5 mg/mL	N
Antifúngico	Anfotericina B (20 µg/mL)	10% v/v	N
Fluidos seminais	-	5% v/v	N*
Sangue	Glucose, Hormonas, Enzimas, Iões, Ferro, etc	10% v/v	N
Urina	-	10% v/v	N
Fezes	-	1% w/v	N*
Produtos de lavagem	Gordura saponificada + silicatos	10 mg/mL	N
Produtos tópicos (Lauroderme®)	Óxido de zinco (23 mg/g) + Ácido salicílico (2 mg/g)	10 mg/mL	N
Produtos tópicos (Bepanthene® Pomada)	Dexpantenol (50 mg/g)	10% w/v	N
Produtos tópicos (Halibut®)	Óxido de zinco (150 mg/g)	10% w/v	N
Produtos tópicos (ClimaCare® Gel Vaginal)	Ácido hialurônico + ácido lático	10% v/v	N
Produtos tópicos (WOMAN ISDIN® Hidratante Vaginal)	Glicerina (11%) + poliacrilato de glicerilo + ácido poliacrílico	10% v/v	N
Produtos de lavagem (BETADINE® Vaginal)	Iodopovidona	10% v/v	N*
Saugella Homme	Ácido láctico	10% v/v	N
Etanol	Álcool	5% v/v	N

* Concentrações mais elevadas deste interferente podem reduzir a sensibilidade do kit ou levar a resultados falsos negativos.

11.4. Precisão

A precisão do ensaio do kit Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD da NZYtech foi determinada pelo teste repetido de amostras positivas representando dois níveis de carga bacteriana, 3x LoD e 30x cópias de LoD por reação, combinadas com ADN extraído de amostras vaginais/perianais negativas, utilizando-se 3 lotes de kit e seguindo as condições de reação específicas. A precisão foi expressa através da média de Cq, do coeficiente de variação Cq e da percentagem (%) de deteção dos replicados, conforme descrito de seguida para cada caso. Os dados encontram-se resumidos na tabela apresentada abaixo.

Precisão do kit NZYtech's Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD

VARIÁVEL TESTADA		GBS (CÓPIAS/REAÇÃO)	
		3X LOD	30X LOD
REPETIBILIDADE	n	12	12
	Média Cq	35,23	31,26
	Coeficiente de Variação (%)	2,01	0,95
	% Réplicas detetadas	100	100
REPRODUTIBILIDADE DIÁRIA	n	48	48
	Média Cq	34,85	31,25
	Coeficiente de Variação (%)	2,40	1,10
	% Réplicas detetadas	100	100
REPRODUTIBILIDADE ENTRE LOTES	n	72	72
	Média Cq	35,03	31,45
	Coeficiente de Variação (%)	2,42	1,34
	% Réplicas detetadas	100	100
REPRODUTIBILIDADE ENTRE OPERADORES	n	36	36
	Média Cq	35,35	31,64
	Coeficiente de Variação (%)	2,09	1,25
	% Réplicas detetadas	100	100
REPRODUTIBILIDADE ENTRE EQUIPAMENTOS	n	60	60
	Média Cq	35,20	31,69
	Coeficiente de Variação (%)	2,18	1,02
	% Réplicas detetadas	100	100

11.4.1. Repetibilidade

A repetibilidade foi avaliada por um operador através da análise de 12 réplicas para cada amostra (3xLoD e 30xLoD por reação), contabilizando um total de 24 testes executados.

11.4.2. Repetibilidade diária

A repetibilidade diária foi avaliada por um operador através da análise de 48 réplicas para cada amostra (3xLoD e 30xLoD por reação), durante 4 dias, com 12 réplicas por cada concentração por dia (contabilizando um total de 96 reações).

11.4.3. Reprodutibilidade entre lotes

A reprodutibilidade entre lotes foi avaliada por um operador através da análise de 72 réplicas para cada amostra (3x LoD e 30x LoD por reação), usando 3 lotes diferentes do kit com 24 réplicas por cada lote.

11.4.4. Reprodutibilidade entre operadores

A reprodutibilidade entre operadores foi avaliada pela testagem de 36 réplicas de cada amostra (3x LoD e 30x LoD por reação), por três operadores, num total de 12 testes por operador.

11.4.5. Reprodutibilidade entre equipamentos

A reprodutibilidade entre equipamentos foi avaliada por um operador através da testagem de 12 réplicas por cada amostra (3xLoD e 30xLoD por reação), em seis equipamentos de Real-time PCR:

FABRICANTE DE EQUIPAMENTOS DE PCR EM TEMPO REAL	MODELO DE PLATAFORMA DE PCR EM TEMPO REAL
Applied Biosystem®	7500 Fast
	StepOne Plus
	QuantStudio™ 5
Roche®	LightCycler 96™ instrument
Bio-Rad®	CFX Opus 96 Real-Time PCR
	CFX96 Touch Real-Time PCR

11.5. Avaliação Clínica

A avaliação clínica do Kit Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, da NZYtech, foi avaliada usando 186 amostras de zaragatoas vaginais e/ou perianais recolhidas em mulheres grávidas e que foram previamente caracterizadas usando um método de cultura microbiológica de rotina. Os ácidos nucleicos foram extraídos utilizando o kit NZY Mag Viral RNA/DNA Isolation Kit, IVD (MD0488, NZYtech) e de seguida amplificados usando o teste Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD. Os dados revelaram que 93,1% de sensibilidade clínica (PPA) e 97,0% de especificidade clínica (NPA) foram alcançados para todas as amostras positivas e negativas testadas, respetivamente.

		ENSAIO COMPARATIVO - CULTURA MICROBIOLÓGICA		
		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 (Sensibilidade clínica): 93,1% para GBS
NPA (Especificidade clínica): 97,0% para GBS

* Uma possível explicação para a obtenção de resultado positivo em amostras de cultura negativas é a perda de viabilidade bacteriana durante a colheita e/ou transporte da amostra, onde o ADN bacteriano não viável só permaneceu disponível para amplificação por PCR. Além disso, esta diferença pode ser justificada pelo fato da técnica Real-time PCR ser mais sensível que os métodos de cultura.

Além disso, também foi realizada a comparação do desempenho clínico do kit Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, da NZYtech, com um teste de real-time PCR. Os dados revelaram que 98,8% de sensibilidade clínica (PPA) e 98,1% de especificidade clínica (NPA) foram alcançados para todas as amostras positivas e negativas testadas, respetivamente.

		ENSAIO COMPARATIVO – KIT DE PCR EM TEMPO 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 (Sensibilidade clínica): 98,8% para GBS
NPA (Especificidade clínica): 98,1% para GBS

Adicionalmente, o desempenho clínico do kit foi avaliado ao usar dois métodos alternativos de extração de ácidos nucleicos, nomeadamente, o NZY Tissue gDNA Isolation kit (MB135, NZYtech) e o chemagic Pathogenic NA gDNA Kit H96 (PerkinElmer). Para o NZY Tissue gDNA Isolation kit (MB135, NZYtech), os dados revelaram uma PPA de 100% e uma NPA de 100% quando comparado com a deteção de ácidos nucleicos extraídos com o kit NZY Mag Viral RNA/DNA Isolation Kit, IVD (MD0488, NZYtech). Para o chemagic Pathogenic NA gDNA Kit H96 (PerkinElmer), os dados revelaram uma PPA de 95,8% e uma NPA de 100% com o ensaio de referência (extração com o kit MD0488). No geral, os resultados demonstram a elevada sensibilidade e especificidade do teste Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD, da NZYtech.

12. Controlo de Qualidade

Todos os componentes do kit Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD da NZYtech foram testados seguindo os protocolos descritos anteriormente. O sistema duplex de Real-time PCR permite detetar as sequências alvo descritas para a identificação do ADN de GBS e do ADN humano (gene β-actina, ACTB). Amplificações positivas foram observadas para o gene alvo, controlo positivo e controlo interno através dos canais FAM e HEX, de acordo com os respetivos conjuntos de *primers* e sonda.

13. Apoio Técnico

Para apoio técnico, por favor contactar por telefone a nossa equipa dedicada de apoio técnico: +351 213643514 ou através do correio eletrónico: info@nzytech.com.

14. Marcas registadas e direitos de propriedade

Todas as marcas registadas que surgem neste manual são propriedade dos seus respetivos representantes.

15. Tabela de símbolos

IVD	Dispositivo de diagnóstico médico *in vitro*		Consultar instruções para utilização
REF	Número de catálogo		Fabricante
LOT	Código do lote		Usado por
	Limite de temperatura		Suficiente para
CONTROL +	Controlo positivo		Manter fora do alcance da luz solar (primer/probe mix)
CONTROL -	Controlo negativo		

16. Declaração de Conformidade

Nome do produto: Group B Streptococcus Real-time PCR Kit, IVD

Número de catálogo: MD04941

Utilização: Deteção qualitativa de *Streptococcus agalactiae*

Classificação: Outros (não abrangidos pelo Anexo II ou não destinados ao auto-diagnóstico) segundo a Diretiva 98/79/CE

Fabricante: NZYtech - Genes & Enzymes,
Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar
Edifício E, R/C,
1649-038, Lisboa
Portugal

Nós, NZYtech, Lda – Genes & Enzymes, declaramos que este produto, a que esta declaração de conformidade diz respeito, está em conformidade com as normas padrão ISO 9001:2015 e ISO 13485:2016, seguindo as disposições da diretiva 98/79/EC e do regulamento (EU) 2017/746 aplicado aos dispositivos médicos para diagnóstico *in vitro*, transposta para as leis nacionais dos Estados Membros da União Europeia.

A ficha técnica do produto é mantida na NZYtech, Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar - Edifício E, R/C, 1649-038 Lisboa, Portugal.

Joana Brás, PhD
Diretora Técnica

17. Referências

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

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

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

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

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

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