

DNA Amplification Assay for the Detection of Group B *Streptococcus* in Vaginal/Rectal Antepartum Specimens

REF 280350

IVD In vitro diagnostic medical device

INTENDED USE

The *illumigene* Group B *Streptococcus* (GBS) assay, performed on the *illumipro-10*, is a qualitative in vitro diagnostic for the detection of *Streptococcus agalactiae* in enriched cultures obtained from vaginal/rectal swab specimens from antepartum women. Enriched cultures are obtained by 18-24 hour incubation of vaginal/rectal swab specimens in selective broth medium, either Lim Broth or TransVag Broth.

The *illumigene* GBS assay utilizes loop-mediated isothermal DNA amplification (LAMP),^{1, 2} technology to detect *Streptococcus agalactiae* by targeting a segment of the *Streptococcus agalactiae* genome. Results from the *illumigene* GBS assay can be used as an aid in establishing the GBS colonization status of antepartum women. This assay does not diagnose or monitor treatment for GBS infections.

The *illumigene* GBS assay does not provide susceptibility results. Culture isolates are needed for performing susceptibility testing as recommended for penicillin-allergic women.

illumigene Group B *Streptococcus* is intended for use in hospital, reference or state laboratory settings. The device is not intended for point-of-care use.

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

The *illumigene* Group B *Streptococcus* (GBS) molecular assay is based on loop-mediated amplification technology, which uses specifically designed primers to *Streptococcus agalactiae* to provide for specific and continuous isothermal DNA amplification. A by-product of this amplification is magnesium pyrophosphate, which forms a white precipitate leading to a turbid reaction solution. The absorbance characteristics of the sample mixture are monitored by the Meridian *illumipro-10* Incubator/Reader. Change in sample absorbance created by precipitation of magnesium pyrophosphate indicates the presence of Group B *Streptococcus* and is reported by the *illumipro-10* as 'Positive'. The absence of target DNA results in no detectable change in sample absorbance and is reported by the *illumipro-10* as 'Negative'.

The *illumigene* GBS assay specifically targets a highly conserved 213 base pair (bp) sequence of the *Streptococcus agalactiae* genome. The target DNA sequence is found in all eight GBS strains for which the *Streptococcus agalactiae* genome sequence information is available and is present in all eleven GBS Serotypes.

The *illumigene* GBS kit includes Control Reagent and Test Devices. The Control Reagent is a buffer solution containing *Staphylococcus aureus* DNA. The *illumigene* GBS Test Device contains one dry reagent lysosphere in each of two chambers: a TEST chamber with GBS-specific primers and a CONTROL chamber with *S. aureus*-specific primers. Together, the *S. aureus* DNA from the Control Reagent and the *S. aureus*-specific primers in the CONTROL chamber lysosphere function as the Internal Control for the assay. Each patient specimen is diluted with the Control Reagent during specimen preparation and prior to amplification. Addition of *S. aureus* DNA to the patient sample allows for parallel processing of target DNA and Control DNA through amplification and detection. The Internal Control monitors amplification inhibition, assay reagent performance and sample processing effectiveness. The Control *S. aureus* target must be amplified and detected in the final reaction or the test is considered invalid and patient results are not reported.

BIOLOGICAL PRINCIPLES

Invasive Group B Streptococcal Disease emerged in the 1970s as the leading cause of infectious disease in infants.³ Infants with early on-set infection (< 7 days of age) may show symptoms of respiratory distress, apnea or sepsis. Early on-set is most commonly associated with sepsis and pneumonia, however may lead to meningitis. The fatality rate for infants with early on-set Group B Streptococcal Disease is currently estimated at 4-6%.⁴ Surviving infants may experience long-term disabilities including hearing loss, vision loss or mental retardation.⁵ The primary risk factor for early-onset Group B Streptococcal Disease is maternal colonization in the genitourinary or gastrointestinal tracts.

Group B *Streptococcus* (*Streptococcus agalactiae* or GBS) is a gram positive bacteria 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. While Group B *Streptococcus* colonized mothers typically show no symptoms or health effects, the bacteria can be passed to their child during labor and delivery.

Group B *Streptococcus* infection of neonates occurs most commonly when *Streptococcus agalactiae* ascends the vagina to amniotic fluid after membrane rupture. Transmission can also occur through intact membranes, by aspiration or by mucous membrane exposure during passage through the birth canal. Intrapartum transmission of Group B *Streptococcus* or early-onset infection can be prevented by administration of antibiotic prophylaxis prior to delivery.⁴

Screening for GBS colonization in antepartum women between 35 and 37 weeks' gestation, followed by intrapartum 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 performed when specimens are collected no more than five weeks (35 – 37 weeks gestation) prior to delivery and after enrichment with selective broth medium.

REAGENTS/MATERIALS PROVIDED

The maximum number of tests obtained from this test kit is listed on the outer box.

- illumigene* Control Reagent:** Tris-buffered solution containing non-infectious Plasmid DNA (*S. aureus* insert) with sodium azide (0.09%) as a preservative.
- illumigene* Reaction Buffer:** Tris-buffered solution containing sodium azide (0.09%) as a preservative.
- illumigene* GBS Test Device:** Two separate chambers containing dry reagent lysospheres comprised of DNA polymerase, Deoxyribonucleoside Triphosphate Solution (dNTPs), and either GBS-specific primers (TEST Chamber) or *S. aureus* primers (CONTROL Chamber).
- illumigene* Heat Treatment Tubes**

MATERIALS PROVIDED SEPARATELY

illumigene GBS External Control Kit, Catalog Number: 279900

MATERIALS NOT PROVIDED

- Disposable latex gloves, powder free
- DNase/RNase-free, aerosol resistant pipette tips
- Vaginal/Rectal Swabs: Rayon, Cotton, Dacron/polyester, Flocked nylon, Foam, Liquid Amies Swab, Modified Stuarts Swab. *Use of alternate swab material has not been validated with the illumigene GBS Assay.*
- Enrichment broth:
 - Lim Broth [Todd Hewitt Broth supplemented with colistin (10 µg/mL) and nalidixic acid (15 µg/mL)] OR
 - TransVag Broth [Todd Hewitt Broth supplemented with gentamicin (8 µg/mL) and nalidixic acid (15 µg/mL)]

EQUIPMENT NOT PROVIDED

- Dry-bath with 12 mm heat block capable of 95 C
- Digital thermometer with Max/Min Temperature Memory (eg, Traceable® Lollipop™ Waterproof/Shockproof Thermometer)
- Vortex mixer
- Interval timer
- Micropipette capable of dispensing 50 µL
- Micropipette capable of dispensing 200 µL
- illumipro-10*™, Meridian Bioscience, Inc. Catalog Number: 610172

PRECAUTIONS

- All reagents are for in vitro diagnostic use only.
- Do not interchange Control Reagents or Test Devices between lots. Reaction Buffer and Heat Treatment Tubes are interchangeable provided they are within assigned expiration dates when used.
- Follow Biosafety Level 2 and Good Laboratory practices during testing.⁶ Treat all specimens and used Test Devices as capable of transmitting infectious agents. Do not eat, drink or smoke in areas where specimens or kit reagents are handled.
- Wear disposable gloves while handling specimens and thoroughly wash hands afterwards.
- Quality Control Programs for Molecular Testing Laboratories should be employed.⁷
- The *illumigene* GBS Test Device contains lyophilized reagents. The protective pouch should not be opened until ready to perform the assay.
- The *illumigene* GBS Test Device includes a latch feature that is designed to prevent contamination of the test area with amplification product. Do NOT use Test Devices with broken latches.
- Dispose of used *illumigene* Test Devices immediately after processing, leaving the device latch securely in place. Do NOT open the Test Device after processing. Opening the device after amplification may result in contamination of the test area with amplification product.

SHELF LIFE AND STORAGE

The expiration date is indicated on the kit label. Store the kit at 2-27 C.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Sample type: Vaginal/rectal swabs taken from antepartum women.

Sample Collection: Vaginal and rectal sample collection should be performed in accordance with published guidelines for collection of clinical specimens for culture of Group B *Streptococcus*.⁴ Vaginal and rectal specimens may be collected using the same swab or two different swabs. *Cervical, perianal, perirectal or perineal specimens are not acceptable sample types. A speculum should not be used for sample collection.*

Place swab(s) in a non-nutritive transport medium (eg, Stuart's or Amies without charcoal) and transported to the laboratory. In the event that two different swabs are used for sample collection, a single transport device may be used.

Sample Enrichment: Remove vaginal/rectal swab(s) from transport device and place in culture enrichment broth (Lim Broth or TransVag Broth). Incubate sample(s) in culture enrichment broth at 37 ± 2 C for 18-24 hours.

Enriched samples should be tested as soon as possible. Enriched samples may be held at room temperature for up to six hours prior to testing. When testing will not be initiated within this time, the enriched sample may be stored at 2-8 C for up to seven days. Long-term storage of enriched samples may yield invalid results.

REAGENT PREPARATION

Ensure kit reagents are at room temperature (21-27 C) before use. Incorrect results may be obtained if reagents are not brought to room temperature prior to use.

SPECIMEN PREPARATION

NOTE: Ensure that the *illumipro-10* is powered on and required performance verifications have been completed prior to initiation of SPECIMEN PREPARATION. Refer to the *illumipro-10* Operator's Manual for further information regarding instrument set-up and operation.

- Label 1 Heat Treatment Tube for each sample to be tested.
- Add 200 µL of the *illumigene* Control Reagent to each heat treatment tube.
- Mix each enriched broth culture thoroughly.
- Add 50 µL of the mixed, enriched broth liquid to the *illumigene* Control Reagent. Specimens diluted in *illumigene* Control Reagent may be held at room temperature (21-27 C) for up to 15 minutes prior to proceeding. Incorrect results may be obtained if diluted specimens are held longer than 15 minutes before heat treatment.
- Vortex each Sample/Control mixture for a minimum of 10 seconds.
- Heat each Sample/Control mixture in a dry-bath/heat block at 95 ± 5 C for 10 ± 2 minutes. Monitor heat-treatment step with digital thermometer and interval timer.
- Remove each Heat Treatment Tube from the dry-bath/heat block and vortex for approximately 10 seconds. Heat-treated samples may be held at 19-29 C for up to 45 minutes prior to addition to Reaction Buffer. Heat-treated samples may not be frozen.

TEST PROCEDURE

NOTE: A maximum of 10 samples can be processed in a single *illumipro-10* run.

- Transfer 50 µL of heat-treated sample to an appropriately labeled *illumigene* Reaction Buffer tube.
- Vortex the Reaction Buffer tube containing heat-treated sample for approximately 10 seconds.
- Repeat steps 1 and 2 for all the samples to be analyzed before proceeding.
- Remove 1 *illumigene* GBS Test Device from its protective pouch per sample. Carefully open the device, holding the chambers such that the lyophilized reagent will not fall out upon opening. Place device on a flat surface or in a rack that can accommodate the device.
- Using a new pipette tip, transfer 50 µL from the Reaction Buffer tube containing heat-treated sample to the TEST chamber (White Bead) of the *illumigene* Test Device. Do not introduce air bubbles. Using a new pipette tip, transfer 50 µL from the Reaction Buffer tube containing heat-treated sample to the CONTROL chamber (Yellow Bead) of the *illumigene* Test Device. Do not introduce air bubbles. Close the *illumigene* Test Device and fasten the latch securely.
- Tap device on the bench top or mix to remove air bubbles. Carefully examine the test device to ensure that there are no air bubbles left in the tube and no liquid remaining in the top of the device.
- Insert the *illumigene* Test Device into the *illumipro-10* and initiate amplification reaction and detection. Results will be displayed at the conclusion of the run.

INTERPRETATION OF RESULTS

Sample ID	Reported Result	Interpretation
Patient Specimen	POSITIVE	Sample contains <i>Streptococcus agalactiae</i> target DNA.
	NEGATIVE	No <i>Streptococcus agalactiae</i> DNA detected.
	INVALID	No reportable result. Repeat the test using the original enriched broth sample. Inhibitory patient specimen, improper sample preparation, reagent failure, instrument failure or internal control failure.
Positive Control	POSITIVE	Valid positive control result. Reagents active at time of use. <i>illumipro-10</i> performing correctly.
	NEGATIVE	Incorrect control result. Repeat control testing as the first step in determining the root cause of the failure. If control failures are repeated please contact Meridian's Technical Services at 1-800-343-3858 (US) or your local distributor.
	INVALID	No reportable result. Repeat entire assay run using original samples. Improper sample preparation, reagent failure, instrument failure or internal control failure.
Negative Control	POSITIVE	Incorrect control result. Repeat control testing as the first step in determining the root cause of the failure. If control failures are repeated please contact Meridian's Technical Services at 1-800-343-3858 (US) or your local distributor.
	NEGATIVE	Valid negative control result. Reagents active at time of use. <i>illumipro-10</i> performing correctly.
	INVALID	No reportable result. Repeat entire assay run using original samples. Improper sample preparation, reagent failure, instrument failure or internal control failure.
EMPTY WELL	NONE	No <i>illumigene</i> Test Device in the <i>illumipro-10</i> Well. OR The <i>illumigene</i> Test Device present is compromised due to sample preparation failure, dirty device or improperly seated device. Repeat the test using original sample.

QUALITY CONTROL

This test should be performed per applicable local, state, or federal regulations or accrediting agencies.

- Each device contains an internal control chamber that controls for amplification inhibition, assay reagents and sample processing effectiveness.

- The heat-treatment step is monitored with an external thermometer and interval timer. Use the max/min temperature memory of the thermometer to ensure that a temperature of 95 ± 5 C is maintained. Use the interval timer to ensure that heat-treatment duration is 10 ± 2 minutes.
- Good laboratory practice recommends the use of control materials. Users should follow the appropriate federal, state and local guidelines concerning the running of external quality controls.
- illumigene* GBS External Control Reagents are supplied separately (Catalog 279900). It is recommended that the reactivity of each new lot and each new shipment of *illumigene* GBS be verified on receipt and before use. External control tests should be performed thereafter in accordance with appropriate federal, state and local guidelines. The *illumigene* GBS test kit should not be used in patient testing if the external controls do not produce the correct results.
- A separate device must be used for each external control reagent.
- Heat-treatment of GBS External Positive or Negative Control samples is not required.

EXPECTED VALUES

Approximately 10-30% of antepartum women are colonized with Group B *Streptococcus* in the vagina or rectum.⁴ The overall incidence of GBS colonization in antepartum women tested during this study was 24.3% (201 of 826). Incidence of GBS colonization for enrichment performed using Lim Broth was found to be 25.1% (101 of 403); while incidence for specimens enriched by TransVag Broth was found to be 23.6% (100 of 423).

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- The *illumigene* GBS assay does not distinguish between viable and non-viable organisms.
- The *illumigene* GBS assay is for use with vaginal/rectal swab specimens collected in accordance with established guidelines for collection of Group B *Streptococcus* culture specimens. Cervical, perianal, perirectal or perineal specimens are not acceptable sample types. A speculum should not be used for sample collection.
- The *illumigene* GBS assay does not provide susceptibility results. Culture isolates are needed for performing susceptibility testing as recommended for penicillin-allergic women.
- GBS colonization during pregnancy can be intermittent, persistent or transient. The clinical utility of GBS screening decreases when testing is performed more than five weeks prior to delivery.
- Evaluation of non-hemolytic colonies was not performed as part of Clinical Site testing.
- Crossreactivity with *Enterococcus dispar* was observed during performance characteristic testing. Negative Lim Broth specimens inoculated with *Enterococcus dispar* at a final concentration of 1.2 x 10⁸ CFU/mL produced positive results for one of seven replicates tested.

SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

illumigene GBS was evaluated in 2011 by four independent clinical test sites located in the Midwestern and Southern regions of the United States. Overall performance information is shown in Table 1.

Table 1. Overall performance data

Group B <i>Streptococcus</i> Culture	<i>illumigene</i> Group B <i>Streptococcus</i> (GBS)		
	Positive	Negative	Total
Positive	150	4	154
Negative	51	610	661
Total	201	614	815
			95% CI
Sensitivity	150/154	97.4%	91.9 – 99.0%
Specificity	610/661	92.3%	90.0 – 94.1%
Correlation	760/815	93.3%	91.3 – 94.8%

Forty-eight of the 51 false positive results were positive by another molecular method. Invalid results were obtained for 11/826 samples tested or 1.3%. Two of the 11 samples remained invalid after repeat testing of the original sample.

A total of 826 qualified patient samples were evaluated. Samples were obtained according to established guidelines for collection of clinical specimens for culture of Group B *Streptococcus* and enriched for 18-24 hours in either Lim Broth or TransVag Broth. A total 403 (48.8%) Lim Broth enriched specimens were tested by Clinical Site 2 (210) and Clinical Site 4 (193). A total of 423 (51.2%) TransVag Broth enriched specimens were tested by Clinical Site 1 (234) and Clinical Site 3 (189). The age groups of patients tested ranged from 15 years of age to 44 years of age, with age unknown for 3 (0.4%) of the patient population. No differences in test performance were observed based on enrichment medium or patient age. Table 2 shows assay performance by enrichment medium; Table 3 summarizes assay performance by Clinical Site.

Table 2. Performance characteristics by enrichment method

	Positive Samples			Negative Samples		
	<i>illumigene</i> / GBS Culture	Sensitivity %	95% CI	<i>illumigene</i> / GBS Culture	Specificity %	95% CI
Total	150/154	97.4%	91.9 – 99.0%	610/661	92.3%	90.0 – 94.1%
Lim Broth	82/84	97.6%	91.7 – 99.3%	296/315	94.0%	90.8 – 96.1%
TransVag Broth	68/70	97.1%	90.2 – 99.2%	314/346	90.8%	87.2 – 93.4%

Table 3. Performance characteristics by clinical site

Site	Positive Samples			Negative Samples		
	<i>illumigene</i> / GBS Culture	Sensitivity %	95% CI	<i>illumigene</i> / GBS Culture	Specificity %	95% CI
Total	150/154	97.4%	91.9 – 99.0%	610/661	92.3%	90.0 – 94.1%
Site 1	32/33	97.0%	84.7 – 99.5%	197/199	99.0%	96.4 – 99.7%
Site 2	38/39	97.4%	86.8 – 99.5%	162/168	96.4%	92.4 – 98.4%
Site 3	36/37	97.3%	86.2 – 99.5%	117/147	79.6%	72.4 – 85.3%
Site 4	44/45	97.8%	88.4 – 99.6%	134/147	97.8%	85.5 – 94.8%

ANALYTICAL SENSITIVITY

The analytical sensitivity or Limit of Detect for the *illumigene* Group B *Streptococcus* (GBS) assay was determined for all common *S. agalactiae* strains and serotypes.

Limit of Detect was determined following Lim Broth enrichment, using a minimum of 20 replicates for each measurand and a stated probability (eg. 95% where 19/20 replicates are positive) of obtaining positive responses. Analytical sensitivity testing is summarized below:

Serotype	<i>Streptococcus agalactiae</i> Strain Description	CFU/Test
Ia	NCTC 11248	60
Ib	ATCC 12401	80
Ic	NCTC 11253	640
II	II/2	320
III	ATCC 12403	160
V	ATCC BAA-611	1280

ASSAY REACTIVITY

The following *S. agalactiae* strains were tested and produced positive reactions at 1280 CFU/test with *illumigene* GBS: NCTC 11930 (Serotype IV), NCTC 08188 (Serotype VIa), VII/2 (Serotype VII), VIII/2 (Serotype VIII), NCTC 11249 (Serotype X); ATCC 13813 and ATCC 12386.

REPRODUCIBILITY

Blind coded panels of 10 samples were supplied to three independent laboratories for reproducibility studies. Samples were randomly sorted within each panel to mask sample identities. The panels included contrived samples manufactured as low positive samples (ie. near the assay limit of detection, n = 3) and high negative samples, (n = 3). The panels also included contrived positive (n = 3) samples and natural negative samples (n = 1). Testing was performed by different operators at each site on the same day (intra-assay variability) for five days (inter-assay variability). Three lots of *illumigene* GBS and five *illumipro-10* instruments were used in this study. Positive and Negative Controls were tested each day of testing. The results are given in the table below:

Sample Type	Clinical Site 1		Clinical Site 2		Clinical Site 4		Total	
	Percent agreement	Percent agreement	Percent agreement	Percent agreement	Percent agreement	Percent agreement	Percent agreement	Percent agreement
Negative	10/10	100%	10/10	100%	10/10	100%	10/10	100%
High Negative	30/30	100%	30/30	100%	30/30	100%	30/30	100%
Low Positive	30/30	100%	30/30	100%	30/30	100%	30/30	100%
Positive	30/30	100%	30/30	100%	30/30	100%	30/30	100%
Negative Control	10/10	100%	10/10	100%	10/10	100%	10/10	100%
Positive Control	10/10	100%	10/10	100%	10/10	100%	10/10	100%

CROSSREACTIVITY STUDIES

Crossreactivity studies were performed with positive and negative Lim Broth specimens inoculated with bacterial or fungal organisms to a final concentration of 1.2×10^8 CFU/mL or virus at a minimum of 1×10^5 TCID₅₀/mL. Crossreactivity with *Enterococcus dispar* was observed in one of seven replicates tested. None of the following organisms reacted with *illumigene* GBS:

Aeromonas hydrophila, *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacteroides fragilis*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter jejuni*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium bifementans*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium histolyticum*, *Clostridium novyi*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium septicum*, *Clostridium sordellii*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium genitalium*, *Corynebacterium urealyticum*, *Corynebacterium xerosis*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus avium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii*, *Gardnerella vaginalis*, *Haemophilus ducreyi*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii subspecies lactis*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactococcus lactis*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Moraxella osloensis*, *Morganella morganii*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Plesiomonas shigelloides*, *Porphyromonas asaccharolytica*, *Prevotella melaninogenica*, *Propionibacterium acnes*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella* Group B, *Salmonella* Group C, *Salmonella* Group D, *Salmonella* Group E, *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens*, *Shigella boydii*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* (Cowan), *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus dysgalactiae equisimilis*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguinis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, Adenovirus 40, Adenovirus 41, BK virus, Coxsackievirus, Echovirus, Epstein Barr virus, Herpes simplex virus-1, Herpes simplex virus-2, Rotavirus.

Mycoplasma genitalium, *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* were tested at final concentrations ranging between 1.6×10^5 and 9.9×10^6 CFU/mL with no reaction with the *illumigene* GBS assay.

TESTS FOR INTERFERING SUBSTANCES

The following substances, at the specified saturated solvent/diluent concentrations, do not interfere with test results: Amniotic fluid (10% v/v), Human DNA (100 ng/Test), Urine (30% v/v), Whole Blood (2.5% v/v). Whole Blood at concentrations greater than 2.5% v/v interferes with the *illumigene* GBS assay.

Additional testing was performed by coating cotton swabs with potentially interfering substances. Coated swabs were combined with Lim Broth sample and processed through the *illumigene* GBS assay. The following substances do not interfere with test results: Meconium, Stool, Hemorrhoidal cream (30.65 mg/100 mg), Miconazole (fungicide), Mucin (0.5-1.5%), Spermicidal gel (nonoxynol 9) (4 mg/100 mg). Lubricating gel produced False Negative Results in one of 11 replicates tested. Body Powder produced False Negative Results in one of 10 replicates tested.

ITALIANO



Test di amplificazione di DNA per il rilevamento dello *Streptococcus* Gruppo B nei campioni antepartum vaginali/rettali

REF 280350

IVD Dispositivo medico-diagnostico in vitro

FINALITÀ D'USO

Il test *illumigene Streptococcus* Gruppo B (GBS), eseguita sull'*illumipro-10*, è un'analisi in vitro qualitativa per il rilevamento di *Streptococcus agalactiae* in colture arricchite ottenute da campioni di tamponi vaginali/rettali di donne antepartum. Le colture arricchite sono ottenute mediante incubazione di 18-24 ore dei tamponi vaginali/rettali in un brodo di coltura selettivo, Lim oppure TransVag.

Il test *illumigene* GBS utilizza la tecnica LAMP (loop-mediated isothermal DNA amplification, amplificazione isoterma del DNA loop-mediata),^{1,2} una tecnologia in grado di rilevare lo *Streptococcus agalactiae* identificando un segmento del genoma dello *Streptococcus agalactiae*. I risultati dell'analisi *illumigene* GBS possono essere utilizzati come ausilio per stabilire lo stato di colonizzazione del GBS nelle donne antepartum. Questa analisi non diagnostica né monitora il trattamento per le infezioni da GBS.

L'analisi *illumigene* GBS non fornisce risultati sulla suscettibilità agli antibiotici. Isolati culturali sono necessari per eseguire l'analisi di suscettibilità, come raccomandato per le donne allergiche alla penicillina.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

Il test per l'analisi molecolare *illumigene Streptococcus* Gruppo B (GBS) è basato sulla tecnica di amplificazione loop-mediata, che utilizza primer specificamente ideati per lo *Streptococcus agalactiae* allo scopo di ottenere un'amplificazione isoterma specifica e continua del DNA. Un sottoprodotto di questa amplificazione è il magnesio pirofosfato, che forma un precipitato bianco rendendo torbida la soluzione di reazione. Le caratteristiche di assorbanza della miscela campione vengono monitorate dall'incubatore/lettore *illumipro-10* Meridian. Una variazione nell'assorbanza del campione crea dalla precipitazione del magnesio pirofosfato indica la presenza dello *Streptococcus* Gruppo B ed è riportata dall'*illumipro-10* come 'Positiva'. L'assenza del DNA target determina una variazione non rilevabile nell'assorbanza del campione ed è riportata dall'*illumipro-10* come 'Negativa'.

L'analisi *illumigene* GBS ha come target specifico una sequenza di 213 paia di basi (bp) altamente conservata del genoma *Streptococcus agalactiae*. La sequenza di DNA target si trova in tutti gli otto ceppi GBS per i quali sono disponibili le informazioni sulla sequenza del genoma di *Streptococcus agalactiae* ed è presente in tutti gli undici sierotipi GBS.

Il kit *illumigene* GBS include il reagente di controllo e i dispositivi di analisi. Il reagente di controllo è una soluzione tampone contenente DNA di *Staphylococcus aureus*. Il dispositivo di analisi *illumigene* GBS contiene un granulo liofilizzato in ciascuna delle due provette: una provetta TEST con primer specifici per GBS e una provetta CONTROLLO con primer specifici per *S. aureus*. Insieme, il DNA di *S. aureus* dal reagente di controllo ed i primer specifici di *S. aureus* nel granulo liofilizzato della provetta controllo funzionano come controllo interno per l'analisi. Ogni campione del paziente viene diluito con il reagente di controllo durante la preparazione del campione e prima dell'amplificazione. L'aggiunta di DNA di *S. aureus* al campione del paziente consente l'esame in parallelo del DNA target e del DNA di controllo mediante amplificazione e rilevamento. Il Controllo interno monitora l'inibizione dell'amplificazione, la prestazione del reagente analitico e l'efficacia di elaborazione del campione. Il target di controllo *S. aureus* deve essere amplificato e rilevato nella reazione finale, altrimenti il test è considerato non valido e i risultati del paziente non vengono riferiti.

PRINCIPI BIOLOGICI

La malattia invasiva streptococcica Gruppo B emerse negli anni '70 come causa principale di malattie infettive nei neonati.³ I neonati con infezione precoce (< 7 giorni di età) mostrano sintomi di insufficienza respiratoria, apnea o sepsi. Un'insorgenza precoce della malattia è comunemente associata a sepsi e polmonite, ma potrebbe portare a meningite. Il tasso di mortalità per i neonati con malattia streptococcica Gruppo B precoce è attualmente stimato al 4-6%.⁴ I neonati che sopravvivono possono soffrire di disabilità a lungo termine quali perdita dell'udito, perdita della vista o ritardo mentale.⁵ Il fattore di rischio primario per la malattia streptococcica Gruppo B precoce è la colonizzazione materna nei tratti genitourinario o gastrointestinale.

Lo *Streptococcus* Gruppo B (*Streptococcus agalactiae* o GBS) 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 con il GBS nella vagina o nel retto. Mentre lo *Streptococcus* Gruppo B ha colonizzato madri che tipicamente non mostrano sintomi o effetti sulla salute, i batteri possono essere trasmessi ai loro figli durante il travaglio e il parto.

L'infezione da *Streptococcus* Gruppo B dei neonati avviene con maggiore frequenza quando lo *Streptococcus agalactiae* ascende la vagina fino al liquido amniotico, dopo la rottura della membrana. La trasmissione può anche avvenire attraverso membrane intatte, per aspirazione o per esposizione della mucosa della membrana durante il passaggio attraverso il canale uterino e vaginale. La trasmissione intrapartum dello *Streptococcus* Gruppo B o l'infezione precoce possono essere prevenute con la somministrazione di una profilassi antibiotica prima del parto.⁴

Lo screening per la colonizzazione GBS nelle donne antepartum tra 35 e 37 settimane di gestazione, seguito dal trattamento antibiotico intrapartum per le donne con stato di colonizzazione positivo, si è dimostrato un meccanismo efficace per la prevenzione della malattia streptococcica del Gruppo B perinatale. Dal momento che la colonizzazione potrebbe essere transitoria, intermittente o persistente durante tutta 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 un brodo di coltura selettivo.

REAGENTI/MATERIALI FORNITI

Il numero massimo di analisi eseguibili con questo kit è indicato sulla confezione esterna.

1. **Reagente di controllo *illumigene*:** soluzione tampone tris contenente DNA plasmidico non infetto (inserto di *S. aureus*) con sodio azide (0,09%) come conservante.
2. **Tampone di reazione *illumigene*:** soluzione tampone tris contenente sodio azide (0,09%) come conservante.
3. **Dispositivo di analisi *illumigene* GBS:** due provette separate contenenti granuli liofilizzati di reagente composto da DNA polimerasi, deossiribonucleoside trifosfato (dNTPs) e primer specifici per GBS (provetta TEST) o primer per *S. aureus* (provetta CONTROLLO).
4. **Provette *illumigene* per il trattamento termico**

MATERIALI FORNITI SEPARATAMENTE

Kit controlli esterni *illumigene* GBS, numero di catalogo: 279900

MATERIALI NON FORNITI

1. Guanti in lattice monouso, senza talco
2. Puntali per pipette privi di DNase/RNase e resistenti alla contaminazione da aerosol,

3. Tamponi vaginali/rettali: rayon, cotone, dacron/poliestere, flocculati di nylon, gommapiuma, tamponi nel terreno liquido Amies, tamponi in terreno Stuart modificato. *L'uso di materiali alternativi per i tamponi non è stato convalidato con il test illumigene GBS.*
4. Brodo di arricchimento:
 - Brodo Lim [brodo Todd Hewitt arricchito con colistin (10 µg/mL) e acido nalidixico (15 µg/mL)] OPPURE
 - Brodo TransVag [brodo Todd Hewitt arricchito con gentamicin (8 µg/mL) e acido nalidixico (15 µg/mL)]

STRUMENTI NON FORNITI

1. Blocco termostatico a secco con pozzetti da 12 mm in grado di raggiungere 95 C
2. Termometro digitale con registrazione della temperatura max/min (es., termometro impermeabile/a prova d'urto Traceable® Lollipop™)
3. Vortex
4. Timer
5. Micropipetta in grado di dispensare 50 µL
6. Micropipetta in grado di dispensare 200 µL
7. *illumipro-10*™, Meridian Bioscience, Inc. Numero di catalogo: 610172

PRECAUZIONI

1. Tutti i reagenti sono esclusivo esclusivamente per uso diagnostico in vitro.
2. Non scambiare i reagenti di controllo o i dispositivi di analisi tra lotti diversi. Il tampone di reazione e le provette per il trattamento termico sono intercambiabili, a patto che non siano ancora scaduti quando vengono utilizzati.
3. Seguire le buone pratiche di laboratorio e il livello 2 di biosicurezza durante l'analisi.⁶ Trattare tutti i campioni e i dispositivi di analisi usati come in grado di trasmettere agenti infettivi. Non mangiare, bere o fumare nelle aree in cui vengono maneggiati i campioni o i reagenti del kit.
4. Indossare guanti monouso quando si maneggiano i campioni e in seguito lavarsi con cura le mani.
5. Applicare i requisiti indicati nei programmi di controllo della qualità per laboratori di analisi molecolari.⁷
6. Il dispositivo di analisi *illumigene* GBS contiene reagenti liofilizzati. Non aprire la busta protettiva fin quando non si è pronti a eseguire l'analisi.
7. Il dispositivo di analisi *illumigene* GBS comprende un sistema di chiusura progettato per prevenire la contaminazione dell'area di analisi con il prodotto di amplificazione. NON utilizzare dispositivi di analisi con sistemi di chiusura danneggiati.
8. Smaltire i dispositivi di analisi *illumigene* subito dopo l'uso, chiusura lasciando chiuse le linguette del dispositivo. NON aprire il dispositivo di analisi dopo l'uso. L'apertura del dispositivo dopo l'amplificazione potrebbe comportare la contaminazione dell'area di analisi con il prodotto di amplificazione.

STABILITÀ E CONSERVAZIONE

La data di scadenza è riportata sull'etichetta del kit. Conservare il kit a 2-27 C.

RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Tipo di campione: campioni da tamponi vaginali/rettali ottenuti da donne antepartum.

Raccolta del campione: la raccolta campione vaginale e rettale va eseguita secondo le linee guida pubblicate per la raccolta di campioni clinici per la coltura dello *Streptococcus* Gruppo B.⁴ I campioni da tamponi vaginali e rettali possono essere raccolti utilizzando lo stesso tampone o due tamponi differenti. *I campioni cervicali, perianali, perirettali o perineali non sono tipi di campioni accettabili. Per la raccolta dei campioni non si deve utilizzare uno speculum.*

Collocare il(i) tampone(i) in un terreno di trasporto non nutritivo (es., Stuart o Amies senza carbone) e trasportarlo al laboratorio. In caso vengano utilizzati due tamponi diversi per la raccolta dei campioni, è possibile utilizzare un singolo dispositivo di trasporto.

Arricchimento dei campioni: rimuovere il(i) tampone(i) vaginale/rettale dal dispositivo di trasporto e collocarlo(i) in un brodo di coltura di arricchimento (brodo Lim o TransVag). Incubare il(i) campione(i) nel brodo di coltura di arricchimento a 37 ± 2 C per 18-24 ore.

I campioni arricchiti vanno testati il prima possibile. I campioni arricchiti possono essere conservati a temperatura ambiente fino a un massimo di sei ore prima dell'analisi. Se l'analisi non viene iniziata entro tale limite di tempo, il campione arricchito può essere conservato a 2-8 C fino a sette giorni. La conservazione a lungo termine di campioni arricchiti può invalidare i risultati.

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Assicurarsi che i reagenti del kit raggiungano temperatura ambiente (21-27 C) prima dell'uso. Si potrebbero ottenere risultati incorretti se i reagenti non vengono portati a temperatura ambiente prima dell'uso.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

NOTA: assicurarsi che l'*illumipro-10* sia acceso e che le necessarie verifiche delle prestazioni siano state completate prima di dare inizio alla PREPARAZIONE DEI CAMPIONI. Consultare il Manuale dell'operatore dell'*illumipro-10* per ulteriori informazioni sulla configurazione e sul funzionamento dello strumento.

1. Etichettare 1 di provetta per il trattamento termico per ogni campione da analizzare.
2. Aggiungere 200 µL del reagente di controllo *illumigene* a ciascuna provetta per il trattamento termico.
3. Miscelare accuratamente ciascun brodo di coltura arricchito.

4. Aggiungere 50 µL del brodo di coltura mescolato e arricchito al reagente di controllo *illumigene*. I campioni diluiti nel reagente di controllo *illumigene* possono essere conservati a temperatura ambiente (21-27 °C) per un massimo di 15 minuti prima di procedere. Risultati incorretti potrebbero ottenersi se i campioni diluiti vengono conservati oltre 15 minuti prima del trattamento termico.
5. Agitare con il Vortex ciascuna miscela campione/ controllo per almeno 10 secondi.
6. Riscaldare ciascuna miscela campione/ controllo in un blocco termostatico a 95 ± 5 °C per 10 ± 2 minuti. Monitorare la fase del trattamento termico con il termometro digitale e il timer.
7. Rimuovere ciascun provetta per il trattamento termico blocco termostatico e agitare con il Vortex per circa 10 secondi. I campioni trattati a caldo possono essere conservati a 19-29 °C fino a 45 minuti prima dell'aggiunta al tampone di reazione. I campioni trattati termicamente non devono essere congelati.

PROCEDURA DEL TEST

NOTA: è possibile analizzare un massimo di 10 campioni in un singolo ciclo *illumipro-10*.

1. Trasferire 50 µL di campione trattato termicamente a tubo provetta con il tampone di reazione *illumigene* appropriatamente etichettato.
2. Agitare con il Vortex la provetta con il tampone di reazione contenente il campione trattato termicamente per circa 10 secondi.
3. Ripetere i punti 1 e 2 per tutti i campioni da analizzare prima di procedere.
4. Estrarre 1 dispositivo di analisi *illumigene* GBS per ciascun campione dalla busta protettiva. Aprire con attenzione il dispositivo, camere maneggiando le provette in maniera tale che il reagente liofilizzato non cada fuori all'apertura. Porre il dispositivo su una superficie piana o in un portaprovette in grado di contenere il dispositivo.
5. Usando un nuovo puntale per micropipetta, trasferire 50 µL dal del provetta con il tampone di reazione contenente il campione trattato termicamente alla provetta TEST (granulo bianco) del dispositivo di analisi *illumigene*. Non introdurre bolle d'aria. Usando un nuovo puntale per micropipetta, trasferire 50 µL dalla provetta con il tampone di reazione contenente il campione trattato termicamente alla provetta di controllo (granulo giallo) del dispositivo di analisi *illumigene*. Non introdurre bolle d'aria. Chiudere il dispositivo di analisi *illumigene* e fissando bene la chiusura.
6. Picchiettare leggermente il dispositivo sul banco di lavoro o agitare per rimuovere le bolle d'aria. Esaminare attentamente il dispositivo di analisi per verificare che non siano rimaste bolle d'aria nella provetta e che non sia rimasto liquido nel tappo del dispositivo.
7. Inserire il dispositivo di analisi *illumigene* nell'*illumipro-10* e iniziare la reazione di amplificazione e di rilevamento. I risultati saranno visualizzati alla conclusione del ciclo.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

ID campione	Risultato riportato	Interpretazione
Campione del paziente	POSITIVO	Il campione contiene il DNA target di <i>Streptococcus agalactiae</i> .
	NEGATIVO	Nessun DNA di <i>Streptococcus agalactiae</i> rilevato.
	NON VALIDO	Nessun risultato refertabile. Ripetere il test utilizzando il campione originale arricchito in brodo. Campione del paziente con effetto inibitorio, preparazione del campione non corretta, deterioramento del reagente, guasto dello strumento o fallimento del controllo interno.
Controllo positivo	POSITIVO	Risultato del controllo positivo valido. Reagenti reattivi al momento dell'uso, <i>illumipro-10</i> correttamente funzionante.
	NEGATIVO	Risultato del controllo non corretto. Ripetere il test di controllo come prima azione per la determinazione dell'insuccesso. Se i fallimenti del controllo sono ripetuti contattare l'Assistenza tecnica Meridian al numero 1-800-343-3858 (USA) o il proprio distributore locale.
	NON VALIDO	Nessun risultato refertabile. Ripetere l'intero ciclo di analisi usando i campioni originali. Preparazione del campione non corretta, deterioramento del reagente, guasto dello strumento o fallimento del controllo interno.
Controllo negativo	POSITIVO	Risultato di controllo non corretto. Ripetere il test di controllo come prima azione per la determinazione dell'insuccesso. Se insuccessi fallimenti del controllo sono ripetuti contattare l'Assistenza tecnica Meridian al numero 1-800-343-3858 (USA) o il proprio distributore locale.
	NEGATIVO	Risultato di controllo negativo valido. Reagenti reattivi al momento dell'uso, <i>illumipro-10</i> correttamente funzionante.
	NON VALIDO	Nessun risultato refertabile. Ripetere l'intero ciclo di analisi usando i campioni originali. Preparazione del campione non corretta, deterioramento del reagente, guasto dello strumento o fallimento del controllo interno.
POZZETTO VUOTO	NESSUNO	Nessun dispositivo di analisi <i>illumigene</i> nel pozzetto dell' <i>illumipro-10</i> . OPPURE Il dispositivo di analisi <i>illumigene</i> presente è compromesso a causa di un errore nella preparazione del campione, dispositivo sporco o dispositivo non propriamente alloggiato. Ripetere il test utilizzando il campione originale.

CONTROLLO QUALITÀ

Il test va eseguito conformemente ai requisiti stabiliti dai competenti enti locali, statali, nazionali o dagli enti di accreditamento.

1. Ogni dispositivo contiene una provetta per il controllo interno che verifica l'eventuale inibizione dell'amplificazione, l'efficacia dei reagenti e dell'analisi del campione.

2. Il passaggio del trattamento termico è monitorato con un termometro esterno e con un timer. Utilizzare la registrazione della temperatura max/min del termometro per garantire che sia garantita una temperatura di 95 ± 5 °C. Usare il timer per garantire che la durata del trattamento termico sia di 10 ± 2 minuti.
3. Una buona pratica di laboratorio raccomanda l'uso dei reagenti di controllo. Gli utilizzatori devono attenersi alle appropriate linee guida federali, statali e locali riguardanti l'analisi dei controlli di qualità esterni.
4. I reagenti di controllo esterni *illumigene* GBS sono forniti separatamente (Numero di Catalogo 279900). Si raccomanda che la reattività di ciascun nuovo lotto e di ogni nuova spedizione di *illumigene* GBS venga verificata al momento della ricezione e prima dell'uso. Le analisi dei controlli esterni vanno eseguite quindi, in conformità con le appropriate linee guida federali, statali e locali. Il test del kit *illumigene* GBS non va utilizzato per l'analisi dei pazienti se i controlli esterni non producono i risultati corretti.
5. Deve essere utilizzato un dispositivo per ciascun reagente di controllo esterno.
6. Il trattamento termico dei campioni di controllo positivi o negativi esterni GBS non è necessario.

VALORI ATTESI

Circa il 10-30% delle donne antepartum sono colonizzate da *Streptococcus* Gruppo B nella vagina o nel retto.⁴ L'incidenza complessiva della colonizzazione di GBS nelle donne antepartum analizzata durante questo studio è stata del 24,3% (201/826) L'incidenza della colonizzazione di GBS a seguito di arricchimento del campione con brodo di coltura Lim è stata del 25,1% (101/403); mentre l'incidenza per campioni arricchiti con TransVag è stata del 23,6% (100/423).

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

1. Il test *illumigene* GBS non distingue tra organismi vitali e non vitali.
2. Il test *illumigene* GBS è destinato all'uso con campioni di tamponi vaginali/rettali raccolti in conformità alle linee guida stabilite per la raccolta di campioni di coltura di *Streptococcus* Gruppo B. I campioni cervicali, perianali, perirettali o perineali non sono tipi di campioni accettabili. Per la raccolta dei campioni non si deve utilizzare uno speculum.
3. Il test *illumigene* GBS non fornisce risultati di suscettibilità agli antibiotici. Isolati culturali sono necessari per eseguire l'analisi di suscettibilità, come raccomandato per le donne allergiche alla penicillina.
4. La colonizzazione da GBS durante la gravidanza può essere intermittente, persistente o transitoria. L'utilità clinica dello screening di GBS diminuisce quando l'analisi viene eseguita più di cinque settimane prima del parto.
5. La valutazione di colonie non-emolitiche non è stata eseguita poiché parte dell'indagine delle prestazioni per sito clinico.
6. Durante l'indagine delle prestazioni specifiche è stata osservata cross-reattività con *Enterococcus* dispar. Campioni negativi arricchiti in Lim broth inoculati con *Enterococcus* dispar ad una concentrazione finale di 1,2 x 10⁸ CFU/mL hanno prodotto risultati positivi per uno dei sette replicati analizzati.

PRESTAZIONI SPECIFICHE

illumigene GBS è stato valutato nel 2011 da quattro laboratori di analisi cliniche indipendenti situati nelle regioni del Midwest e del Sud degli Stati Uniti. Le informazioni sulle prestazioni complessive sono mostrate nella Tabella 1.

Tabella 1. Risultati complessivi delle prestazioni

Coltura di <i>Streptococcus</i> Gruppo B	<i>illumigene Streptococcus</i> Gruppo B (GBS)		
	Positivo	Negativo	Totale
Positivo	150	4	154
Negativo	51	610	661
Totale	201	614	815
			95% CI
Sensibilità	150/154	97,4%	91,9 – 99,0%
Specificità	610/661	92,3%	90,0 – 94,1%
Correlazione	760/815	93,3%	91,3 – 94,8%

Quarantotto dei 51 risultati falsi positivi erano positivi ad un altro metodo molecolare. Sono stati ottenuti risultati non validi per 11/826 campioni analizzati, ovvero 1,3%. Due degli 11 campioni sono rimasti non validi dopo aver ripetuto l'analisi del campione originale.

È stato valutato un totale di 826 campioni di pazienti qualificati. I campioni sono stati ottenuti in base alle linee guida stabilite per la raccolta di campioni clinici per la coltura di *Streptococcus* Gruppo B e sono stati arricchiti per 18-24 ore in brodo Lim o brodo TransVag. Un totale di 403 (48,8%) campioni arricchiti con brodo Lim sono stati analizzati dal Laboratorio Clinico 2 (210) e dal Laboratorio Clinico 4 (193). Un totale di 423 (51,2%) campioni arricchiti con brodo TransVag sono stati analizzati dal Laboratorio Clinico 1 (234) e dal Laboratorio Clinico 3 (189). I gruppi di età dei pazienti analizzati andavano da 15 a 44 anni, con età sconosciuta per 3 (0,4%) individui della popolazione dei pazienti. Non sono state osservate differenze nelle prestazioni del test in base al mezzo di arricchimento o all'età dei pazienti. La Tabella 2 mostra le prestazioni dell'analisi in base al brodo di arricchimento; la Tabella 3 riassume le prestazioni dell'analisi per laboratorio clinico.

Tabella 2. Caratteristiche prestazionali per terreno di arricchimento

	Campioni positivi			Campioni negativi		
	<i>illumigene</i> / Coltura GBS	Sensibilità %	95% CI	<i>illumigene</i> / Coltura GBS	Specificità %	95% CI
Totale	150/154	97,4%	91,9 – 99,0%	610/661	92,3%	90,0 – 94,1%
Brodo Lim	82/84	97,6%	91,7 – 99,3%	296/315	94,0%	90,8 – 96,1%
Brodo TransVag	68/70	97,1%	90,2 – 99,2%	314/346	90,8%	87,2 – 93,4%

Tabella 3. Caratteristiche prestazionali per sito clinico

Laboratorio	Campioni positivi			Campioni negativi		
	<i>illumigene</i> / Coltura GBS	Sensibilità %	95% CI	<i>illumigene</i> / Coltura GBS	Specificità %	95% CI
Totale	150/154	97,4%	91,9 – 99,0%	610/661	92,3%	90,0 – 94,1%
Laboratorio 1	32/33	97,0%	84,7 – 99,5%	197/199	99,0%	96,4 – 99,7%
Laboratorio 2	38/39	97,4%	86,8 – 99,5%	162/168	96,4%	92,4 – 98,4%
Laboratorio 3	36/37	97,3%	86,2 – 99,5%	117/147	79,6%	72,4 – 85,3%
Laboratorio 4	44/45	97,8%	88,4 – 99,6%	134/147	97,8%	85,5 – 94,8%

SENSIBILITÀ ANALITICA

La sensibilità analitica o limite di rilevazione per l'analisi *illumigene Streptococcus* Gruppo B (GBS) è stata determinata per i comuni ceppi e sierotipi di *S. agalactiae*.

Il limite di rilevamento è stato determinato seguendo l'arricchimento in brodo Lim, usando un minimo di 20 repliche per ciascuna quantità da misurare e una probabilità fissata (es. 95% dove 19/20 repliche sono positive) di ottenere risposte positive. L'analisi della sensibilità analitica è sintetizzata in tabella:

Sierotipo	Descrizione della varietà di <i>Streptococcus agalactiae</i>	CFU/Test
Ia	NCTC 11248	60
Ib	ATCC 12401	80
Ic	NCTC 11253	640
II	II/2	320
III	ATCC 12403	160
V	ATCC BAA-611	1280

REATTIVITÀ DEL TEST

I seguenti ceppi di *S. agalactiae* sono stati testati e hanno prodotto reazioni positive a 1280 CFU/test con *illumigene* GBS: NCTC 11930 (sierotipo IV), NCTC 08188 (sierotipo VIa), VII/2 (sierotipo VII), VIII/2 (sierotipo VIII), NCTC 11249 (sierotipo X); ATCC 13813 e ATCC12386.

RIPRODUCIBILITÀ

Per gli studi di riproducibilità sono stati forniti a tre laboratori indipendenti pannelli di 10 campioni codificati in cieco. I campioni sono stati assortiti casualmente all'interno di ciascun pannello per mascherare le identità dei campioni. I pannelli includevano campioni artificiali prodotti come campioni bassi positivi (ie. vicino al limite di rilevazione, n = 3) e campioni alti negativi, (n = 3). I pannelli comprendevano anche campioni artificiali positivi (n = 3) e campioni negativi (n = 1). L'analisi è stata condotta da diversi operatori in ciascun laboratorio lo stesso giorno (variabilità intra-saggio) per cinque giorni (variabilità inter-saggio). Tre lotti di *illumigene* GBS e cinque strumenti *illumipro-10* sono stati utilizzati in questo studio. I controlli positivi e negativi sono stati testati ogni giorno di analisi. I risultati sono mostrati nella tabella sotto:

Tipo campione	Laboratorio clinico 1		Laboratorio clinico 2		Laboratorio clinico 4		Totale	
	Percentuale di concordanza	Percentuale di concordanza	Percentuale di concordanza	Percentuale di concordanza	Percentuale di concordanza	Percentuale di concordanza	Percentuale di concordanza	
Negativo	10/10	100%	10/10	100%	10/10	100%	10/10	100%
Alto Negativo	30/30	100%	30/30	100%	30/30	100%	30/30	100%
Basso Positivo	30/30	100%	30/30	100%	30/30	100%	30/30	100%
Positivo	30/30	100%	30/30	100%	30/30	100%	30/30	100%
Controllo Negativo	10/10	100%	10/10	100%	10/10	100%	10/10	100%
Controllo Positivo	10/10	100%	10/10	100%	10/10	100%	10/10	100%

CROSS-REATTIVITÀ

Gli studi di reattività crociata sono stati eseguiti con campioni di brodo Lim positivi e negativi inoculati con organismi batterici o fungini a una concentrazione finale di $1,2 \times 10^8$ CFU/mL o virus a un minimo di 1×10^5 TCID₅₀/mL. Cross-reattività con *Enterococcus* dispar è stata osservata in uno dei sette replicati analizzati. Nessuno dei seguenti organismi ha reagito con *illumigene* GBS:

Aeromonas hydrophila, *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacteroides fragilis*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter jejuni*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium bifementans*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium histolyticum*, *Clostridium novyi*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium septicum*, *Clostridium sordellii*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium genitalium*, *Corynebacterium urealyticum*, *Corynebacterium xerosis*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus avium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii*, *Gardnerella vaginalis*, *Haemophilus ducreyi*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii subspecies lactis*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactococcus lactis*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Moraxella osloensis*, *Morganella morgani*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Plesiomonas shigelloides*, *Porphyromonas asaccharolytica*, *Prevotella melaninogenica*, *Propionibacterium acnes*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella* Gruppo B, *Salmonella* Gruppo C, *Salmonella* Gruppo D, *Salmonella* Gruppo E, *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens*, *Shigella boydii*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* (Cowan), *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus dysgalactiae equisimilis*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguinis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, Adenovirus 40, Adenovirus 41, BK virus, Coxsackievirus, Echovirus, Epstein Barr virus, Herpes simplex virus-1, Herpes simplex virus-2, Rotavirus.

Mycoplasma genitalium, *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum* sono stati testati a concentrazioni finali comprese tra $1,6 \times 10^6$ e $9,9 \times 10^6$ CFU/mL con nessuna reazione con il test *illumigene* GBS.

ANALISI DI SOSTANZE INTERFERENTI

Le seguenti sostanze, alle concentrazioni di solvente/diluente saturate indicate, non interferiscono con i risultati dei test: Liquido amniotico (10% v/v), DNA umano (100 ng/Test), Urina (30% v/v), sangue intero (2,5% v/v). Sangue intero a concentrazioni superiori a 2,5% v/v interferisce con l'analisi *illumigene* GBS.

Sono state svolte analisi addizionali ricoprendo i tamponi di cotone con sostanze potenzialmente interferenti. I tamponi ricoperti sono stati miscelati con un campione di brodo Lim ed elaborati attraverso l'analisi *illumigene* GBS. Le seguenti sostanze non interferiscono con i risultati dei test: Meconio, feci, crema emorroidale (30,65 mg/100 mg), miconazolo (fungicida), mucina (0,5-1,5%), gel spermicida (nonoxinol 9) (4 mg/100 mg). Il gel lubrificante ha prodotto risultati falsi negativi in una delle 11 repliche testate. Il talco ha prodotto risultati falsi negativi in una delle 10 repliche testate.

FRANÇAIS



Test d'amplification ADN pour la détection du streptocoque de groupe B sur prélèvement vaginal et rectal anténatal

REF 280350

IVD Dispositif médical de diagnostic in vitro

BUT DE LA METHODE

Le test *illumigene streptocoque* du groupe B (SGB), obtenu à l'aide de l'*illumipro-10* est un test de diagnostic in vitro qualitatif pour la détection du *Streptococcus agalactiae* dans des cultures enrichies obtenues d'un prélèvement vaginal/rectal chez des femmes enceintes, avant l'accouchement. Les cultures sont enrichies par incubation d'un prélèvement vaginal/rectal pendant 18 à 24 heures dans un milieu liquide sélectif, soit du bouillon Lim, soit du bouillon TransVag.

Le test *illumigene streptocoque* du groupe B utilise la technique dite LAMP (loop-mediated isothermal DNA amplification ou amplification isotherme de l'ADN facilitée par boucle)^{1,2} pour détecter le *Streptococcus agalactiae* en ciblant un segment du génome dudit *Streptococcus agalactiae*. Les résultats du test *illumigene streptocoque* du groupe B peuvent être utilisés comme dépistage anténatal de la colonisation vaginale et rectale de la femme enceinte. Ce test ne permet pas d'établir ou surveiller le traitement des infections par le SGB.

Le test *illumigene streptocoque* du groupe B ne fournit pas de résultats de sensibilité. Des isolats de culture sont nécessaires pour effectuer les tests de sensibilité tels que recommandés chez les femmes allergiques à la pénicilline.

Le test *illumigene streptocoque* du groupe B est conçu pour être utilisé dans les hôpitaux, les centres de référence ou les laboratoires médicaux. Le produit n'est pas destiné aux points-santé.

RESUME ET EXPLICATION DU TEST

Le test d'amplification de l'ADN *illumigene streptocoque* du groupe B (SGB) repose sur la technologie d'amplification isotherme (LAMP) qui utilise des amorces conçues spécifiquement pour le *Streptococcus agalactiae* et assure l'amplification isotherme continue et spécifique de l'ADN. Le pyrophosphate de magnésium, produit dérivé de cette amplification, forme un précipité blanc entraînant la turbidité de la solution de réaction. Les absorbances du mélange réactionnel de l'échantillon sont suivies par l'Incubateur/Lecteur *illumipro-10* de Meridian. Le changement dans l'absorbance de l'échantillon, produit par le précipité de pyrophosphate de magnésium, indique la présence de *Streptococcus* du groupe B et est reporté comme « positif » par l'instrument *illumipro-10*. L'absence de l'ADN cible a pour résultat une absence de changement détectable et reportée comme résultat « négatif » par l'Incubateur/Lecteur *illumipro-10*.

Le test *illumigene streptocoque* du groupe B cible une séquence de 213 paires de base (bp) fortement conservée du génome du *Streptococcus agalactiae*. La séquence d'ADN ciblée se retrouve dans les huit souches de SGB pour lesquelles des informations concernant la séquence génomique du *Streptococcus agalactiae* sont disponibles, et elle est présente dans les onze sérotypes du SGB.

Le coffret *illumigene streptocoque* du groupe B comprend un réactif de contrôle et des dispositifs de test. Le réactif de contrôle est une solution tampon contenant de l'ADN de *Staphylococcus aureus*. Le dispositif de test *illumigene streptocoque* du groupe B est formé de deux compartiments séparés contenant chacun une bille de réactif lyophilisé: un compartiment de TEST contenant des amorces spécifiques pour le SGB et un compartiment de CONTROLE contenant des amorces spécifiques pour *S. aureus*. Ensemble, l'ADN de *S. aureus* du réactif de contrôle et les amorces spécifiques *S. aureus* des billes lyophilisées du compartiment de CONTROLE jouent le rôle de témoin interne du dosage. Au cours de la préparation de l'échantillon, chaque spécimen de patiente est dilué avec le réactif de contrôle, avant l'amplification. L'ajout d'ADN de *S. aureus* à l'échantillon d'une patiente permet de traiter en parallèle, par amplification et détection, l'ADN ciblé et l'ADN de contrôle. Le contrôle interne permet de déceler un problème d'inhibition de l'amplification et de réactivité des composants du test ou de préparation des échantillons. Il faut avoir amplifié et détecté la cible de contrôle *S. aureus* dans la réaction finale. Dans le cas contraire, le test est considéré comme étant non valide et les résultats de la patiente ne sont pas rapportés.

PRINCIPE DU TEST

La maladie invasive provoquée par le streptocoque de groupe B s'est révélée être, dans les années 70, la cause principale des maladies infectieuses chez les nourrissons.³ Les nourrissons atteints d'infection précoce (âgés de < 7 jours), peuvent présenter des symptômes de détresse respiratoire, d'apnée ou de septicémie. L'infection précoce est associée le plus fréquemment à la septicémie et à la pneumonie, mais elle peut entraîner la méningite. Le taux de mortalité des nourrissons présentant une maladie précoce causée par le streptocoque du groupe B est estimé être actuellement de 4 à 6 %.⁴ Les nourrissons qui survivent peuvent présenter des incapacités à long terme, notamment une perte d'audition, une perte de vision ou un retard mental.⁵ Le facteur de risque principal de maladie précoce causée par le streptocoque du groupe B est la colonisation maternelle des voies génito-urinaire et gastro-intestinale.

Le streptocoque du groupe B (*Streptococcus agalactiae* ou SGB) est une bactérie à Gram-positif que l'on trouve fréquemment dans les voies gastro-intestinales, génitales et urinaires d'adultes en bonne santé. Environ 10 à 30 % de l'ensemble des femmes enceintes sont porteuses de colonies de SGB dans le vagin ou le rectum. Alors que les mères porteuses de colonies de *streptocoque* du groupe B ne présentent normalement aucun symptôme ou effet dans leur état de santé, les bactéries peuvent être transmises à leur enfant pendant le travail et l'accouchement.

Les infections de nouveaux-nés par le *streptocoque* du groupe B surviennent le plus fréquemment lorsque le *Streptococcus agalactiae* remonte dans le vagin pour pénétrer dans le fluide amniotique après rupture de la membrane. La transmission peut également survenir à travers des membranes intactes par aspiration ou par exposition de la muqueuse pendant le passage à travers le canal génital. La transmission intrapartum du *streptocoque* du groupe B ou infection précoce peut être évitée par l'administration d'une antibioprophyxie avant l'accouchement.⁴

Le dépistage anténatal de la colonisation SGB chez les femmes enceintes de 35 à 37 semaines, suivi par l'administration d'un traitement antibiotique chez les femmes à portage positif s'est révélé être un mécanisme efficace de prévention de la maladie périnatale causée par le streptocoque de groupe B. Comme la colonisation peut être transitoire, intermittente ou persistante pendant toute la grossesse, le dépistage est le plus efficace lorsqu'il est effectué sur des échantillons prélevés cinq semaines (35 – 37 semaines de gestation) au plus avant l'accouchement, après enrichissement dans un milieu liquide sélectif.

MATERIEL FOURNI

Le nombre maximal de tests pouvant être réalisés à partir de ce coffret est indiqué sur la boîte.

1. **Réactif de contrôle *illumigene***: solution tampon Tris contenant de l'ADN plasmidique non infectieux (*S. aureus*) avec l'azoture de sodium (0,09 %) comme conservateur.
2. **Tampon de réaction *illumigene***: solution tampon Tris contenant de l'azoture de sodium (0,09 %) comme conservateur.
3. **Dispositif de test *illumigene streptocoque*** du groupe B: deux compartiments séparés contenant des billes de réactif lyophilisé composé d'ADN polymérase, de la solution de triphosphate de désoxyribonucléoside (dNTP) et, soit des amorces spécifiques pour le SGB (compartiment de TEST), soit des amorces pour *S. aureus* (compartiment de CONTROLE).
4. **Tubes de traitement thermique *illumigene***

MATERIEL FOURNI SEPARÉMENT

Kit de contrôle externe *illumigene streptocoque* du groupe B, numéro de référence: 279900

MATERIEL NON FOURNI

1. Gants jetables en latex, non poudrés
2. Embouts de pipettes sans désoxyribonucléase/ribonucléase, résistant aux aérosols
3. Frottis vaginal/rectal: écouvillons en rayonne, coton, Dacron/polyester, Nylon floqué, mousse, Amies liquide, Stuart modifiés. *L'utilisation d'autres matériels d'écouvillonnage n'a pas été validée pour le test *illumigene streptocoque* du groupe B.*
4. Bouillon d'enrichissement:
 - Bouillon Lim [bouillon Todd Hewitt complété par de la colistine (10 µg/mL) et de l'acide nalidixique (15 µg/mL)] OU
 - Bouillon TransVag [bouillon Todd Hewitt complété par de la gentamicine (8 µg/mL) et de l'acide nalidixique (15 µg/mL)]

EQUIPEMENT NON FOURNI

1. Bloc chauffant pour microtubes de 12 mm pouvant atteindre 95 C
2. Thermomètre numérique avec mémoire de température maximale/minimale (par ex., thermomètre étanche/antichoc Traceable® Lollipop™)
3. Mélangeur Vortex
4. Minuterie
5. Micropipette d'une contenance de 50 µL
6. Micropipette d'une contenance de 200 µL
7. *illumipro-10™*, Meridian Bioscience, Inc. Numéro de référence: 610172

PRECAUTIONS D'EMPLOI

1. Tous les réactifs sont pour usage in vitro uniquement.
2. Ne pas mélanger des réactifs de contrôle et des dispositifs de test appartenant à des lots différents. Le tampon de réaction et les tubes de traitement thermique sont interchangeables à condition de se trouver dans les limites de la date de péremption au moment de leur utilisation.
3. Suivre les consignes de sécurité biologique de niveau 2 et les bonnes pratiques de laboratoire pendant les tests.⁶ Traiter tous les échantillons et tous les dispositifs de test comme s'ils étaient susceptibles de transmettre des agents infectieux. Ne pas manger, boire ou fumer dans les espaces où les échantillons ou les réactifs du kit sont manipulés.
4. Porter des gants jetables lors de la manipulation des échantillons. Se laver minutieusement les mains après la manipulation.
5. Suivre les programmes de contrôle de la qualité pour les laboratoires de diagnostic moléculaire.⁷
6. Le dispositif de test *illumigene streptocoque* du groupe B contient des réactifs lyophilisés. Ne pas retirer la pochette de protection avant d'être prêt à effectuer l'analyse.
7. Le dispositif de test *illumigene streptocoque* du groupe B est muni d'un loquet conçu pour éviter la contamination de la zone de test avec le produit d'amplification. NE PAS utiliser les dispositifs de test dont le loquet est endommagé.
8. Jeter les dispositifs de test *illumigene streptocoque* du groupe B immédiatement après le traitement en laissant le loquet bien en place. Ne PAS ouvrir le dispositif de test après le traitement. L'ouverture du dispositif après l'amplification peut contaminer la zone de test avec le produit d'amplification.

DUREE DE VIE ET CONSERVATION

La date de péremption figure sur l'étiquette du kit. Conserver le kit à une température comprise entre 2 et 27 C.

PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Type d'échantillon: frottis vaginal/rectal anténatal chez la femme enceinte.

Prélèvement des échantillons: Le prélèvement d'échantillon vaginal et rectal doit être effectué conformément aux directives publiées pour le prélèvement de spécimens cliniques de *streptocoque* du groupe B.⁴ Le spécimen vaginal et rectal peut être prélevé avec un même écouvillon ou deux écouvillons différents. *Les spécimens cervicaux, périanaux, péirectaux ou périnéens ne sont pas des types d'échantillon acceptables. On ne doit pas utiliser de spéculum pour prélever l'échantillon.*

Placer le ou les écouvillon(s) dans un milieu de transport non nutritif (par ex., des milieux de Stuart ou Amies sans charbon) et le(s) transporter au laboratoire. Dans l'éventualité où l'on a utilisé deux écouvillons différents pour effectuer le prélèvement, on peut utiliser un seul dispositif de transport.

Enrichissement des échantillons: Sortir le frottis vaginal/rectal du dispositif de transport et les placer dans du bouillon de culture pour les enrichir (bouillon Lim ou bouillon TransVag). Faire incuber les échantillons dans le bouillon de culture à 37 ± 2 C pendant 18 à 24 heures.

Les échantillons enrichis doivent être testés dès que possible. Les échantillons enrichis doivent être conservés à la température ambiante pendant six heures maximum avant de leur faire subir des tests. Si l'on ne commence pas les tests dès ce moment-là, on peut conserver l'échantillon enrichi à une température de 2 à 8 C pendant sept jours maximum. La conservation à long terme des échantillons enrichis risque de fournir des résultats non valides.

PREPARATION DES REACTIFS

S'assurer que les réactifs du kit sont à la température ambiante (21 à 27 C) avant leur emploi. En cas de non respect, des résultats incorrects peuvent être observés.

PREPARATION DES ECHANTILLONS

REMARQUE: s'assurer que l'appareil *illumipro-10* est allumé et que les vérifications de performance requises sont terminées avant d'initier la PREPARATION DES ECHANTILLONS. Se reporter au manuel d'utilisation de l'*illumipro-10* pour plus d'informations au sujet de l'installation, la configuration et le fonctionnement de l'appareil.

1. Etiqueter un (1) tube de traitement thermique pour chaque échantillon à tester.

- Ajouter 200 µL de réactif de contrôle *illumigene* à chacun des tubes de traitement thermique.
- Mélanger soigneusement chacun des bouillons de culture enrichis.
- Ajouter 50 µL de bouillon liquide enrichi au réactif de contrôle *illumigene*. Les spécimens dilués dans le réactif de contrôle *illumigene* peuvent être conservés à la température ambiante (21 à 27 C) pendant 15 minutes maximum avant de poursuivre. On peut obtenir des résultats incorrects si les spécimens dilués sont conservés plus de 15 minutes avant leur soumission au traitement thermique.
- Passer chaque mélange échantillon/réactif de contrôle au Vortex pendant 10 secondes au minimum.
- Chauffer chaque mélange échantillon/réactif de contrôle dans un bloc chauffant à 95 ± 5 C pendant 10 ± 2 minutes. Surveiller l'étape de traitement thermique à l'aide d'un thermomètre numérique et d'une minuterie.
- Sortir chaque tube de traitement thermique du bloc chauffant et mélanger au Vortex pendant environ 10 secondes. Les échantillons traités à la chaleur peuvent être conservés entre 19 et 29 C pendant 45 minutes maximum avant d'ajouter le tampon de réaction. Les échantillons traités thermiquement ne peuvent pas être congelés.

PROCEDURE DE TEST

REMARQUE: 10 échantillons au maximum peuvent être analysés au cours d'une seule exécution de l'*illumipro-10*.

- Transférer 50 µL d'échantillon traité thermiquement dans un tube de tampon de réaction *illumigene* marqué de façon appropriée.
- Passer le tube de tampon de réaction contenant l'échantillon traité thermiquement au Vortex pendant environ 10 secondes.
- Répéter les étapes 1 et 2 pour tous les échantillons à analyser avant de poursuivre.
- Retirer un (1) dispositif de test *illumigene streptocoque* du groupe B de sa pochette de protection pour chaque échantillon. Ouvrir le dispositif avec précaution en tenant les compartiments de sorte que le réactif lyophilisé ne tombe pas au moment de l'ouverture. Placer le dispositif sur une surface plane ou un portoir approprié.
- A l'aide d'un embout de pipette neuf, transférer 50 µL du tube de tampon de réaction contenant l'échantillon traité thermiquement dans la chambre de TEST (bille blanche) d'un dispositif de test *illumigene*. Ne pas introduire de bulles d'air. A l'aide d'un embout de pipette neuf, transférer 50 µL du tube de tampon de réaction contenant l'échantillon traité thermiquement dans la chambre de CONTROLE (bille jaune) d'un dispositif de test *illumigene*. Ne pas introduire de bulles d'air. Fermer le dispositif de test *illumigene* et enclencher correctement le loquet.
- Tapoter le dispositif sur la pailleuse ou mélanger pour éliminer les bulles d'air. Examiner le dispositif de test avec soin pour vérifier qu'il n'existe plus de bulles d'air dans le tube et qu'aucun liquide ne reste dans le capuchon.
- Insérer chaque dispositif de test *illumigene* dans l'*illumipro-10* et lancer la réaction d'amplification et la détection. Les résultats seront affichés à la fin de l'exécution.

INTERPRETATION DES RESULTATS

ID échantillon	Résultats indiqués	Interprétation
Echantillon de patiente	POSITIF	L'échantillon contient l'ADN cible du <i>Streptococcus agalactiae</i> .
	NEGATIF	Aucun ADN de <i>Streptococcus agalactiae</i> n'a été détecté.
	NON VALIDE	Aucun rendu de résultat possible. Recommencer le test à l'aide de l'échantillon d'origine, enrichi dans le bouillon de culture. Spécimen de patiente inhibiteur, mauvaise préparation de l'échantillon, échec du réactif, erreur de l'instrument ou échec du contrôle interne.
Contrôle positif	POSITIF	Résultat de contrôle positif valide. Réactifs actifs au moment de l'utilisation, fonctionnement correct de l' <i>illumipro-10</i> .
	NEGATIF	Résultat de contrôle non valide. En premier lieu, recommencer le test de contrôle pour déterminer la cause de l'échec. Si les échecs de contrôle se reproduisent, s'adresser au service technique de Meridian au 1-800-343-3858 (Etats-Unis) ou au distributeur local.
	NON VALIDE	Aucun rendu de résultat possible. Recommencer l'intégralité de l'analyse à l'aide des échantillons d'origine. Mauvaise préparation de l'échantillon, échec du réactif, erreur de l'instrument ou échec du contrôle interne.
Contrôle négatif	POSITIF	Résultat de contrôle non valide. En premier lieu, recommencer le test de contrôle pour déterminer la cause de l'échec. Si les échecs de contrôle se reproduisent, s'adresser au service technique de Meridian au 1-800-343-3858 (Etats-Unis) ou au distributeur local.
	NEGATIF	Résultat de contrôle négatif valide. Réactifs actifs au moment de l'utilisation, fonctionnement correct de l' <i>illumipro-10</i> .
	NON VALIDE	Aucun rendu de résultat possible. Recommencer l'intégralité de l'analyse à l'aide des échantillons d'origine. Mauvaise préparation de l'échantillon, échec du réactif, erreur de l'instrument ou échec du contrôle interne.
PUITS VIDE	AUCUN	Aucun dispositif de test <i>illumigene</i> dans le puits de l' <i>illumipro-10</i> . OU Le dispositif de test <i>illumigene</i> présent ne répond pas en raison d'une mauvaise préparation de l'échantillon, de saleté ou d'un mauvais positionnement du dispositif. Recommencer le test à partir des échantillons d'origine.

CONTROLE DE QUALITE

Ce test doit être réalisé en fonction des exigences des réglementations locales et/ou nationales ou des directives des organismes d'accréditation.

- Chaque dispositif contient un puits de contrôle interne qui permet de déceler un problème d'inhibition de l'amplification, d'efficacité des réactifs du test ou de traitement des échantillons.
- L'étape du traitement thermique est surveillée avec un thermomètre et une minuterie externes. Utiliser la mémoire des températures maximum/minimum du thermomètre pour vérifier qu'une température de 95 ± 5 C est maintenue. Utiliser la minuterie pour vérifier que la durée du traitement thermique est de 10 ± 2 minutes.
- Les bonnes pratiques de laboratoire recommandent l'utilisation de réactifs de contrôle. Les utilisateurs doivent suivre les directives locales, régionales et/ou nationales relatives à l'exécution des contrôles externes de qualité.
- Les réactifs de contrôle externes *illumigene streptocoque* du groupe B sont vendus séparément (référence 279900). Il est recommandé de vérifier la réactivité de chaque nouveau lot et chaque nouvel envoi de coffret *illumigene streptocoque* du groupe B dès leur réception et avant l'emploi. Les tests de contrôle externe doivent être effectués en fonction des exigences locales, fédérales et/ou nationales. La trousse *illumigene streptocoque* du groupe B ne devrait pas être utilisée pour les tests d'échantillons de patient lorsque les contrôles ne produisent les résultats escomptés.
- Utiliser un dispositif séparé pour chaque réactif de contrôle externe.
- Le traitement thermique des échantillons de contrôle négatifs ou positifs externes du SGB n'est pas exigé.

VALEURS ATTENDUES

Environ 10 à 30 % des femmes enceintes sont porteuses, avant l'accouchement, de *streptocoques* de groupe B dans le vagin ou le rectum.⁴ L'incidence globale de la colonisation SGB anténatale chez les femmes testées dans cette étude était de 24,3% (201 sur 826). L'incidence de la colonisation SGB par enrichissement en utilisant le bouillon Lim était de 25,1% (101 sur 403); tandis que l'incidence pour les échantillons enrichis en utilisant le bouillon TransVag était de 23,6% (100 sur 423).

LIMITES DU TEST

- Le test *illumigene streptocoque* du groupe B ne fait pas de distinction entre les organismes viables et non viables.
- Le test *illumigene streptocoque* du groupe B est destiné à être utilisé à partir de frottis vaginaux/rectaux prélevés conformément aux directives établies pour le prélèvement des spécimens de culture de *streptocoques* du groupe B. Les spécimens cervicaux, périaux, pèirectaux ou périnéaux ne sont pas des types d'échantillon acceptables. On ne doit pas utiliser de spéculum pour prélever l'échantillon.
- Le test *illumigene streptocoque* du groupe B ne fournit pas de résultats de sensibilité aux antibiotiques. Des isolats de culture sont nécessaires pour effectuer les tests de sensibilité tels que recommandés chez les femmes allergiques à la pénicilline.
- L'infection par le SGB pendant la grossesse peut être intermittente, persistante ou transitoire. L'utilité clinique du dépistage du SGB diminue lorsque les tests sont effectués plus de cinq semaines avant l'accouchement.
- L'évaluation de colonies non-hémolytiques n'a pas été étudiée dans le cadre des tests cliniques.
- Il a été observé une réaction croisée avec *Enterococcus dispar* durant les tests de performances. Des échantillons de bouillon Lim négatifs, inoculés avec *Enterococcus dispar* à une concentration finale de 1,2 x 10⁸ CFU/mL produit des résultats positifs pour un des sept réplicats testés.

PERFORMANCES DU TEST

Le test *illumigene streptocoque* du groupe B a été évalué en 2011 par quatre centres d'analyse clinique indépendants situés dans les régions du centre et du sud des Etats-Unis. Les performances globales sont présentées en table 1.

Table 1. Performances globales

Culture de streptocoques du groupe B	<i>illumigene streptocoque</i> du groupe B (SGB)		
	Positif	Négatif	Total
Positif	150	4	154
Négatif	51	610	661
Total	201	614	815
			IC à 95 %
Sensibilité	150/154	97,4 %	91,9 à 99,0 %
Spécificité	610/661	92,3 %	90,0 à 94,1 %
Corrélation	760/815	93,3 %	91,3 à 94,8 %

Sur un total de 51, quarante-huit résultats faux positifs étaient positifs par d'autres méthodes moléculaires. Des résultats non valides ont été obtenus pour 11 sur les 826 échantillons analysés, soit 1,3 %. Deux échantillons sur 11 sont demeurés non valides après répétition du test sur l'échantillon original.

Au total, 826 échantillons qualifiés de patientes ont été évalués. Les échantillons furent obtenus conformément aux directives établies pour le prélèvement de spécimens cliniques destinés à la culture de *streptocoques* du groupe B, enrichis pendant 18 à 24 heures, soit dans du bouillon Lim, soit dans du bouillon TransVag. Au total, 403 (48,8 %) des spécimens enrichis par culture dans du bouillon Lim furent testés par le Centre clinique 2 (210) et le Centre clinique 4 (193). Au total, 423 (51,2 %) des spécimens enrichis par culture dans du bouillon TransVag furent testés par le Centre clinique 1 (234) et le Centre clinique 3 (189). Les groupes d'âge des patientes soumises aux tests s'étendaient sur une plage allant de l'âge de 15 ans à l'âge de 44 ans, avec un âge inconnu pour trois (3) patientes (0,4 % de la population). Aucune différence dans l'efficacité des tests n'a été observée en fonction du milieu ayant servi à l'enrichissement ou de l'âge des patientes. La Table 2 indique les performances du dosage en fonction du milieu d'enrichissement; la Table 3 résume les performances des dosages par Centre clinique.

Table 2. Caractéristiques des performances en fonction de la méthode d'enrichissement

	Echantillons positifs			Echantillons négatifs		
	<i>illumigene</i> / culture du SGB	Sensibilité %	IC à 95 %	<i>illumigene</i> / culture du SGB	Spécificité %	IC à 95 %
Total	150/154	97,4 %	91,9 à 99,0 %	610/661	92,3 %	90,0 à 94,1 %
Bouillon de culture Lim	82/84	97,6 %	91,7 à 99,3 %	296/315	94,0 %	90,8 à 96,1 %
Bouillon de culture TransVag	68/70	97,1 %	90,2 à 99,2 %	314/346	90,8 %	87,2 à 93,4 %

Table 3. Caractéristiques des performances en fonction du centre clinique

Centre	Echantillons positifs			Echantillons négatifs		
	<i>illumigene</i> / culture du SGB	Sensibilité %	IC à 95 %	<i>illumigene</i> / culture du SGB	Spécificité %	IC à 95 %
Total	150/154	97,4 %	91,9 à 99,0 %	610/661	92,3 %	90,0 à 94,1 %
Centre 1	32/33	97,0 %	84,7 à 99,5 %	197/199	99,0 %	96,4 à 99,7 %
Centre 2	38/39	97,4 %	86,8 à 99,5 %	162/168	96,4 %	92,4 à 98,4 %
Centre 3	36/37	97,3 %	86,2 à 99,5 %	117/147	79,6 %	72,4 à 85,3 %
Centre 4	44/45	97,8 %	88,4 à 99,6 %	134/147	97,8 %	85,5 à 94,8 %

SENSIBILITE ANALYTIQUE

La sensibilité analytique ou limite de détection du dosage par la technique *illumigene streptocoque* du groupe B (SGB) a été déterminée pour toutes les souches et tous les sérotypes de *S. agalactiae* courants.

La limite de détection a été déterminée en suivant la méthode d'enrichissement par le bouillon de culture Lim, à l'aide d'un minimum de 20 réplicats pour chaque mesurande avec une probabilité fixe (par ex., 95 % lorsque 19 réplicats sur 20 étaient positifs) d'obtenir des réponses positives. Les tests de sensibilité analytique sont résumés ci-dessous:

Sérotype	Description de la souche <i>Streptococcus agalactiae</i>	CFU/Test
Ia	NCTC 11248	60
Ib	ATCC 12401	80
Ic	NCTC 11253	640
II	II/2	320
III	ATCC 12403	160
V	ATCC BAA-611	1280

REACTIVITE DU DOSAGE

Les souches de *S. agalactiae* suivantes ont été testées et ont fourni des réactions positives à 1280 CFU/test avec le test *illumigene streptocoque* du groupe B: NCTC 11930 (Sérotype IV), NCTC 08188 (Sérotype VIa), VII/2 (Sérotype VII), VIII/2 (Sérotype VIII), NCTC 11249 (Sérotype X); ATCC 13813 et ATCC12386.

REPRODUCTIBILITE DU TEST

Des panels de 10 échantillons, codés à l'aveugle, ont été fournis à trois laboratoires indépendants pour des études de reproductibilité. Les échantillons ont été triés de façon aléatoire pour chaque panel afin de masquer l'identité de l'échantillon. Les panels comprenaient des échantillons artificiels tels des échantillons positifs faibles (proches de la limite de détection, n = 3) et des échantillons négatifs élevés (n = 3). Les panels comprenaient aussi des échantillons artificiels positifs (n = 3) et des échantillons naturels négatifs (n = 1). Les tests furent exécutés par des techniciens différents dans chaque centre, le même jour (variabilité intra-dosage), et pendant cinq jours (variabilité inter-dosage). Trois lots de *illumigene streptocoque* du groupe B et cinq instruments *illumipro-10* furent utilisés dans cette étude. Les contrôles positifs et négatifs furent testés chaque jour de test. Les résultats sont indiqués dans le tableau ci-dessous:

Type d'échantillon	Centre clinique 1		Centre clinique 2		Centre clinique 4		Total	
	Concordance en pourcentage	Concordance en pourcentage	Concordance en pourcentage	Concordance en pourcentage	Concordance en pourcentage	Concordance en pourcentage	Concordance en pourcentage	
Négatif	10/10	100 %	10/10	100 %	10/10	100 %	10/10	100 %
Fortement négatif	30/30	100 %	30/30	100 %	30/30	100 %	30/30	100 %
Faiblement positif	30/30	100 %	30/30	100 %	30/30	100 %	30/30	100 %
Positif	30/30	100 %	30/30	100 %	30/30	100 %	30/30	100 %
Contrôle négatif	10/10	100 %	10/10	100 %	10/10	100 %	10/10	100 %
Contrôle positif	10/10	100 %	10/10	100 %	10/10	100 %	10/10	100 %

REACTIONS CROISEES

Des études de réactivité croisée ont été effectuées sur des spécimens enrichis au bouillon Lim positifs et négatifs, inoculés avec des organismes bactériens et fongiques de manière à obtenir une concentration finale de $1,2 \times 10^5$ CFU/mL ou virus à la dose médiane d'infection d'une culture de tissus de 1×10^5 TCID₅₀/mL. Il a été observé une réaction croisée avec *Enterococcus dispar* avec un des sept réplicats testés. Aucun des organismes suivants n'a réagi avec l'*illumigene streptocoque* du groupe B:

Aeromonas hydrophila, *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacteroides fragilis*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter jejuni*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium bifermens*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium histolyticum*, *Clostridium novyi*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium septicum*, *Clostridium sordellii*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium genitalium*, *Corynebacterium urealyticum*, *Corynebacterium xerosis*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus avium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii*, *Gardnerella vaginalis*, *Haemophilus ducreyi*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii subspecies lactis*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactococcus lactis*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Moraxella osloensis*, *Morganella morganii*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Plesiomonas shigelloides*, *Porphyromonas asaccharolytica*, *Prevotella melaninogenica*, *Propionibacterium acnes*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella* Groupe B, *Salmonella* Groupe C, *Salmonella* Groupe D, *Salmonella* Groupe E, *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens*, *Shigella boydii*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* (Cowan), *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus dysgalactiae equisimilis*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguinis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, Adenovirus 40, Adenovirus 41, BK virus, Coxsackievirus, Echovirus, Epstein Barr virus, Herpes simplex virus-1, Herpes simplex virus-2, Rotavirus.

Des *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis* et *Ureaplasma urealyticum* furent testés à des concentrations finales comprises dans une plage de $1,6 \times 10^6$ à $9,9 \times 10^6$ CFU/mL sans aucune réaction avec le test *illumigene streptocoque* du groupe B.

TESTS POUR LES SUBSTANCES INTERFERENTES

Les substances suivantes, aux concentrations solvant/diluant spécifiées, n'influencent pas les résultats de test: fluide amniotique (10 % v/v), ADN humain (100 ng/Test), urine (30 % v/v), sang total (2,5 % v/v). Le sang total à des concentrations supérieures à 2,5 % v/v interfère avec le test *illumigene streptocoque* du groupe B.

Des tests supplémentaires ont été effectués après avoir revêtu des écouvillons en coton de substances susceptibles d'exercer une influence. Les écouvillons ainsi contaminés furent combinés avec l'échantillon enrichi (bouillon Lim) et testés avec l'*illumigene streptocoque* du groupe B. Les substances suivantes n'interfèrent pas avec les résultats de test: méconium, selles, crème anti-hémorroïdes (30,65 mg/100 mg), miconazole (fongicide), mucine (0,5 à 1,5 %), gel spermicide (nonoxynol 9) (4 mg/100 mg). Le gel lubrifiant a produit des résultats faux négatifs dans un des 11 réplicats testés. La poudre pour le corps a produit des résultats faux négatifs dans un des 10 réplicats testés.



Ensayo de amplificación del ADN para la detección de estreptococo grupo B en muestras de anteparto vaginales/rectales

REF 280350

IVD Dispositivo médico para diagnóstico in vitro

USO INDICADO

El ensayo *illumigene* de *estreptococo* grupo B (EGB), realizado en el *illumipro-10*, es un diagnóstico in vitro cualitativo para la detección de *Streptococcus agalactiae* en cultivos enriquecidos obtenidos de muestras de hisopo vaginales/rectales de mujeres anteparto. Los cultivos enriquecidos se obtienen por una incubación de 18-24 horas de muestras de hisopo en un medio de caldo selectivo, o bien Caldo Lim Broth o Caldo TransVag.

El ensayo *illumigene* para EGB utiliza una tecnología de amplificación de ADN isotermal mediada por bucle (LAMP),^{1,2} para detectar el *Streptococcus agalactiae* al dirigirse a un segmento de genoma del *Streptococcus agalactiae*. Los resultados del ensayo EGB de *illumigene* pueden usarse como ayuda para establecer el estado de la colonización de EGB de las mujeres anteparto. Este ensayo no diagnostica ni supervisa el tratamiento de infecciones de EGB.

El ensayo para EGB de *illumigene* no proporciona resultados de susceptibilidad. Los extractos del cultivo se necesitan para realizar pruebas de susceptibilidad, tal y como se recomienda para las mujeres alérgicas a la penicilina.

El dispositivo *illumigene* para *estreptococo* grupo B (EGB) está destinado para su uso en hospitales, ámbitos de laboratorio estatal o de referencia. El dispositivo no está destinado a su uso en los centros de atención.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

El ensayo molecular *illumigene* para *estreptococo* grupo B (EGB) se basa en la tecnología de amplificación mediada por bucle, que usa un cebador específicamente diseñado para el *Streptococcus agalactiae* para proporcionar una amplificación del ADN isotermal específica y continua. Un subproducto de esta amplificación es el pirofosfato de magnesio, que forma un precipitado blanco que lleva a una solución de reacción turbia. Las características de absorción de la mezcla de la muestra se monitorizan con el Lector/Incubadora Meridian *illumipro-10*. El cambio en la absorción de la muestra creado por la precipitación del pirofosfato de magnesio indica la presencia de *estreptococo* grupo B y se notifica por parte del *illumipro-10* como "Positivo". La ausencia de ADN objetivo resulta en un cambio no detectable en la absorción de la muestra y se notifica por el *illumipro-10* como "Negativo".

El ensayo para EGB de *illumigene* se dirige específicamente a una secuencia de 213 pares de base (pb) altamente conservados en el genoma del *Streptococcus agalactiae*. La secuencia de enfoque en el ADN se encuentra en las ocho cepas del EGB, por lo que la información de la secuencia del genoma del *Streptococcus agalactiae* está disponible y presente en los 11 serotipos de EGB.

El equipo para EGB *illumigene* incluye un Reactivo de Control y los dispositivos de la prueba. El Reactivo de Control es una solución tamponadora que contiene el ADN del *Staphylococcus aureus*. El dispositivo de prueba EGB del *illumigene* contiene una liosfera de reactivo seco en cada una de las dos cámaras; una cámara de TEST con cebadores específicos para el EGB y una cámara de CONTROL con cebadores específicos para *S. aureus*. Juntos, el ADN del *S. aureus* del reactivo de control y los cebadores específicos para el *S. aureus* en la liosfera de la cámara de CONTROL funcionan como un control interno para el ensayo. Cada muestra de la paciente se diluye con el Reactivo de Control durante la preparación de la muestra y antes de la amplificación. La adición del ADN del *S. aureus* a la muestra de la paciente permite el procesamiento paralelo del ADN del objetivo y el ADN del control a través de la amplificación y detección. El control interno monitoriza la inhibición de la amplificación, el rendimiento de los reactivos del ensayo y la eficacia del procesamiento de la muestra. El objetivo de control del *S. aureus* debe amplificarse y detectarse en la reacción final, o la prueba se considerará no válida y no se darán a conocer los resultados de la paciente.

PRINCIPIOS BIOLÓGICOS

La Enfermedad Invasiva de Estreptococo Grupo B surgió en la década de 1970 como la causa principal de enfermedad infecciosa en niños.³ Los niños con una infección de inicio temprano (< 7 días de edad) pueden mostrar síntomas de dificultad respiratoria, apnea o sepsis. El inicio temprano se asocia con frecuencia a sepsis y neumonía, aunque puede causar meningitis. La tasa de mortalidad para los niños con una Enfermedad de Estreptococo Grupo B de inicio temprano se estima actualmente en el 4-6%.⁴ Los niños supervivientes pueden experimentar discapacidades a largo plazo que incluyen pérdida auditiva, de visión o retraso mental.⁵ El factor de riesgo principal para la Enfermedad de Estreptococo Grupo B de inicio temprano es la colonización materna en los tractos genitourinario y gastrointestinal.

El estreptococo grupo B (*Streptococcus agalactiae* o EGB) es una bacteria grampositiva que se encuentra normalmente en el tracto urinario, genital o gastrointestinal de los adultos saludables. Aproximadamente el 10-30% de todas las mujeres embarazadas están colonizadas por EGB en la vagina o el recto. Mientras que las madres colonizadas por *estreptococo* grupo B normalmente no muestran síntomas o efectos en la salud, las bacterias pueden pasar al hijo durante el parto.

La infección de *estreptococo* grupo B de los neonatos se produce normalmente cuando el *Streptococcus agalactiae* asciende por la vagina hasta el líquido amniótico después de la rotura de la membrana. La transmisión también puede ocurrir a través de membranas intactas, por aspiración o por exposición a la membrana de la mucosa durante el paso a través del canal del parto. La transmisión intraparto del *estreptococo* grupo B o la infección de inicio temprano se pueden evitar con la administración de profilaxis antibiótica antes del parto.⁴

Las revisiones para la colonización de EGB en mujeres anteparto con una gestación de entre 35 y 37 semanas, seguidas por un tratamiento de antibiótico intraparto para mujeres con un estado de colonización positivo, han demostrado ser un mecanismo eficaz para la prevención de la enfermedad de *estreptococo* grupo B perinatal. Como la colonización puede ser transitoria, intermitente o constante a lo largo del embarazo, las revisiones son más eficaces cuando se realizan obteniendo muestras no más de cinco semanas (35 – 37 semanas de gestación) antes del parto y después de enriquecerlas con un medio de caldo selectivo.

REACTIVOS/MATERIALES PROPORCIONADOS

El número máximo de pruebas que se pueden obtener con este equipo está indicado en el exterior de la caja.

1. **illumigene Reactivo de Control:** Solución tamponada con Tris que contiene un ADN plásmido no infeccioso (con *S. aureus* añadido) con ázida sódica (0,09%) como conservante.
2. **illumigene Tampón de Reacción:** Solución tamponada con Tris que contiene ázida sódica (0,09%) como conservante.
3. **illumigene Dispositivo de Prueba de EGB:** Dos cámaras separadas que contienen liosferas de reactivo seco compuestas de polimerasa de ADN, solución de trifosfato desoxirribonucleósido (dNTPs) y cebadores específicos para EGB (cámara de TEST) o cebadores de *S. aureus* (cámara de CONTROL).
4. **illumigene Tubos para el tratamiento térmico**

MATERIALES PROPORCIONADOS POR SEPARADO

illumigene equipo de Control Externo del EGB, número de catálogo: 279900

MATERIALES NO PROPORCIONADOS

1. Guantes desechables de látex, sin polvo
2. Puntas de pipeta resistentes al aerosol, libres de ribonucleasa/desoxirribonucleasa
3. Hisopos vaginales/rectales: Rayón, algodón, dacrón/poliéster, nylon texturado, espuma, hisopos en medio Amies, hisopos en medio Stuarts modificado. *El uso de material de hisopo alterno no ha sido validado con el ensayo de EGB de illumigene.*
4. Caldo de enriquecimiento:
 - Caldo Lim [Caldo Todd Hewitt complementado con colistina (10 µg/mL) y ácido nalidíxico (15 µg/mL)] O
 - Caldo TransVag [Caldo Todd Hewitt complementado con gentamicina (8 µg/mL) y ácido nalidíxico (15 µg/mL)]

EQUIPO NO PROPORCIONADO

1. Baño seco con 12 mm de bloqueo de calor capaz de 95 C
2. Termómetro digital con memoria de temperatura máx/mín (p. ej., termómetro sumergible y a prueba de golpes Traceable® Lollipop™)
3. Mezclador Vortex
4. Cronómetro de intervalos
5. Micropipeta capaz de administrar 50 µL
6. Micropipeta capaz de administrar 200 µL
7. *illumipro-10™*, Meridian Bioscience, Inc. Número de catálogo: 610172

PRECAUCIONES

1. Todos los reactivos son solamente para uso de diagnóstico in vitro.
2. No intercambie los Reactivos de Control o los Dispositivos de Prueba entre lotes. El Tampón de Reacción y los tubos de tratamiento térmico son intercambiables siempre y cuando se usen dentro de la fecha de caducidad asignada.
3. Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio y Bioseguridad de Nivel 2 durante la prueba.⁶ Trate todas las muestras y los dispositivos de prueba como capaces de transmitir agentes infecciosos. No coma, beba ni fume en las zonas donde se manejan los reactivos del equipo o las muestras.
4. Use guantes desechables cuando maneje las muestras y lávese bien las manos después.
5. Deberían emplearse Programas para el Control de Calidad para los Laboratorios de Pruebas Moleculares.⁷
6. El Dispositivo de Prueba de EGB de *illumigene* contiene reactivos liofilizados. La bolsa de protección no debería abrirse hasta que esté listo para realizar el ensayo.
7. El Dispositivo de Prueba de EGB de *illumigene* incluye una característica de cierre que está diseñada para evitar la contaminación de la zona de prueba con el producto de amplificación. NO use dispositivos de prueba con cierres rotos.
8. Deseche los Dispositivos de Prueba usados inmediatamente después del proceso, poniendo el cierre del dispositivo en su lugar firmemente. NO abra el dispositivo de prueba después del procesamiento. Abrir el dispositivo después de la amplificación puede provocar una contaminación de la zona de prueba con el producto de amplificación.

VIDA UTIL Y ALMACENAMIENTO

La fecha de caducidad se indica en la etiqueta de la caja. Almacene el equipo a una temperatura de 2 a 27 C.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Tipo de muestra: Hisopos vaginales/rectales tomados de mujeres anteparto.

Toma de muestras: La toma de muestras vaginales y rectales debe realizarse de conformidad con las directrices publicadas para la toma de muestras clínicas para cultivos de *Streptococo* grupo B.⁴ Las muestras vaginales y rectales deben tomarse usando un mismo hisopo o dos diferentes. *Las muestras cervicales, perianales, perirectales o perineales no son muestras aceptables. No se debe usar un espéculo para la toma de muestras.*

Coloque el/los hisopo(s) en un medio de transporte no nutritivo (p. ej., un Stuart o Amies sin carbón) y transpórtelo(s) al laboratorio. En el caso de que se usen dos hisopos diferentes para la toma de muestras, se puede usar un solo dispositivo de transporte.

Enriquecimiento de las muestras: Saque los hisopos vaginales/rectales del dispositivo de transporte y colóquelos en el caldo de enriquecimiento del cultivo (Caldo Lim o TransVag). Incube la(s) muestra(s) en el caldo de enriquecimiento del cultivo a 37 ± 2 C de 18 a 24 horas.

Debe realizar la prueba de las muestras enriquecidas tan pronto como sea posible. Las muestras enriquecidas pueden mantenerse a temperatura ambiente durante un máximo de seis horas antes de hacerles la prueba. Si no se realiza la prueba en este tiempo, la muestra enriquecida puede almacenarse a 2-8 C durante un máximo de siete días. Un almacenamiento a largo plazo de las muestras enriquecidas puede dar resultados no válidos.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Asegúrese de que los reactivos del equipo están a temperatura ambiente (21-27 C) antes de su uso. Se pueden obtener resultados incorrectos si los reactivos no están a temperatura ambiente antes del uso.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

NOTA: Asegúrese de que el *illumipro-10* está encendido y que se hayan completado las verificaciones de rendimiento necesarias antes de iniciar la PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS. Consulte el Manual del operador de *illumipro-10* para obtener más información acerca de la instalación y el funcionamiento del instrumento.

1. Marque 1 tubo de tratamiento térmico para cada muestra que se va a someter a prueba.
2. Añada 200 µL del Reactivo de Control de *illumigene* a cada tubo de tratamiento térmico.
3. Mezcle completamente cada cultivo de caldo enriquecido.
4. Añada 50 µL de caldo enriquecido y mezclado al Reactivo de Control de *illumigene*. Las muestras diluidas en el Reactivo de Control de *illumigene* se pueden mantener a temperatura ambiente (21-27 C) durante un máximo de 15 minutos antes de continuar. Se pueden obtener resultados incorrectos si las muestras diluidas se mantienen así más de 15 minutos antes del tratamiento térmico.
5. Mezcle en el Vortex la mezcla de muestra/control durante un mínimo de 10 segundos.
6. Incube cada mezcla de muestra/control en un baño seco/bloque de calor a 95 ± 5 C durante 10 ± 2 minutos. Monitoree el paso de tratamiento térmico con un termómetro digital y un cronómetro de intervalos.
7. Saque cada tubo de tratamiento térmico del baño seco/bloque de calor y póngalo en el Vortex durante 10 segundos aproximadamente. Las muestras tratadas térmicamente se pueden mantener a 19-29 C durante un máximo de 45 minutos antes de la adición del Tampón de Reacción. Las muestras tratadas térmicamente no pueden congelarse.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

NOTA: Se pueden procesar un máximo de 10 muestras en cada proceso del *illumipro-10*.

1. Transfiera 50 µL de la muestra tratada térmicamente a un tubo de Tampón de Reacción de *illumigene* debidamente marcado.
2. Ponga en el Vortex el tubo con el Tampón de Reacción que contiene la muestra tratada térmicamente durante 10 segundos aproximadamente.
3. Repita los pasos 1 y 2 para todas las muestras que se deban analizar antes de continuar.
4. Saque 1 Dispositivo de Prueba de EGB de *illumigene* de su bolsa de protección por cada muestra. Abra el dispositivo cuidadosamente, sujetando las cámaras de tal modo que el reactivo liofilizado no se caiga al abrir el dispositivo. Coloque el dispositivo en una superficie plana o en un estante que pueda albergar el dispositivo.
5. Usando una punta de pipeta nueva, transfiera 50 µL del tubo del Tampón de Reacción que contiene la muestra tratada térmicamente a la cámara de TEST (microesfera blanca) del Dispositivo de Prueba *illumigene*. No introduzca burbujas de aire. Usando una punta de pipeta nueva, transfiera 50 µL del tubo del Tampón de Reacción que contiene la muestra tratada térmicamente a la cámara de CONTROL (microesfera amarilla) del Dispositivo de Prueba *illumigene*. No introduzca burbujas de aire. Cierre el Dispositivo de Prueba de *illumigene* y asegure el cierre con firmeza.
6. Dé unos golpecitos en la parte superior del banco o mezcle para remover las burbujas de aire. Examine cuidadosamente el Dispositivo de Prueba para asegurarse de que no deja burbujas de aire en el tubo y que no queda líquido en la parte superior del dispositivo.

7. Introduzca el Dispositivo de Prueba de *illumigene* en el *illumipro-10* e inicie la reacción de amplificación y detección. Los resultados se mostrarán al final del proceso.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

ID de la muestra	Resultado notificado	Interpretación
Muestra de la paciente	POSITIVO	La muestra contiene ADN del <i>Streptococcus agalactiae</i> .
	NEGATIVO	No se ha detectado ADN del <i>Streptococcus agalactiae</i> .
	NO VÁLIDO	Sin resultados notificables. Repita la prueba usando la muestra de caldo enriquecido original. Muestra de la paciente inhibitoria, preparación de la muestra inadecuada, fallo del reactivo, fallo del instrumento o fallo de control interno.
Control positivo	POSITIVO	Resultado de control positivo válido. Reactivos activos en el momento del uso, el <i>illumipro-10</i> funciona correctamente.
	NEGATIVO	Resultado de control incorrecto. Repita la prueba de control como primer paso para determinar la causa de origen del fallo. Si los fallos de control se repiten, póngase en contacto con los servicios técnicos de Meridian al 1-800-343-3858 (EE. UU.) o con su distribuidor local.
	NO VÁLIDO	Sin resultados notificables. Repita todo el proceso de ensayo usando las muestras originales. Preparación de la muestra inadecuada, fallo del reactivo, fallo del instrumento o fallo de control interno.
Control negativo	POSITIVO	Resultado de control incorrecto. Repita la prueba de control como primer paso para determinar la causa de origen del fallo. Si los fallos de control se repiten, póngase en contacto con los servicios técnicos de Meridian al 1-800-343-3858 (EE. UU.) o con su distribuidor local.
	NEGATIVO	Resultado de control negativo válido. Reactivos activos en el momento del uso, el <i>illumipro-10</i> funciona correctamente.
	NO VÁLIDO	Sin resultados notificables. Repita todo el proceso de ensayo usando las muestras originales. Preparación de la muestra inadecuada, fallo del reactivo, fallo del instrumento o fallo de control interno.
POCILLO VACIO	NINGUNO	No hay ningún dispositivo de prueba de <i>illumigene</i> en el pocillo del <i>illumipro-10</i> . O El dispositivo de prueba del <i>illumigene</i> no funciona bien debido a un fallo en la preparación de la muestra o a que el dispositivo está sucio o mal colocado. Repita la prueba usando la muestra original.

CONTROL DE CALIDAD

Este ensayo debe ser realizado siguiendo las regulaciones de acreditación locales, estatales o federales.

1. Cada dispositivo contiene una cámara de control interno que controla la inhibición de la amplificación, la eficacia de los reactivos del ensayo y el procesamiento de la muestra.
2. El paso del tratamiento térmico se monitoriza con un termómetro externo y un cronómetro de intervalos. Use la memoria de temperatura máx/mín del termómetro para asegurarse de que se mantiene una temperatura de 95 ± 5 C. Use el cronómetro de intervalos para asegurarse de que la duración del tratamiento térmico es de 10 ± 2 minutos.
3. Las Buenas Prácticas de Laboratorio recomiendan el uso de materiales de control. Los usuarios deberían seguir las directrices federales, estatales y locales adecuadas relativas a la ejecución de controles de calidad externos.
4. Los reactivos de control externo de *illumigene* EGB se suministran por separado (Catálogo 279900). Se recomienda que la reactividad de cada nuevo lote y cada nuevo envío de *illumigene* EGB se verifique a la recepción y antes de su uso. Se deberían realizar pruebas de control externo a partir de ese momento, de conformidad con las directrices federales, estatales y locales adecuadas. El equipo de prueba *illumigene* para EGB no debe usarse en la prueba de pacientes si los controles externos no ofrecen los resultados correctos.
5. Se debe usar un dispositivo aparte para cada reactivo de control externo.
6. No se requiere tratamiento térmico de las muestras de control negativo o positivo externo de EGB.

VALORES ESPERADOS

Aproximadamente el 10-30% de las mujeres anteparto están colonizadas con *Streptococo* grupo B en la vagina o en el recto.⁴ La incidencia de colonización de EGB en pruebas de anteparto de mujeres que fueron probadas durante este estudio fue 24,3% (201 de 826). La incidencia de colonización de EGB con enriquecimiento obtenido usando Caldo Lim se encontro ser 25,1% (101 de 403); mientras que las muestras enriquecidas en Caldo TransVag se encontro ser de 23,6% (100 de 423).

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. El ensayo de EGB de *illumigene* no distingue entre organismos viables y no viables.
2. El ensayo de EGB de *illumigene* es para uso con hisopos vaginales/rectales tomados de conformidad con las directrices establecidas para la toma de muestras de cultivo de *Streptococo* grupo B. *Las muestras cervicales, perianales, perirectales o perineales no son muestras aceptables. No se debe usar un espéculo para la toma de muestras.*
3. El ensayo EGB de *illumigene* no proporciona resultados de susceptibilidad. Los extractos del cultivo se necesitan para realizar pruebas de susceptibilidad, tal y como se recomienda para las mujeres alérgicas a la penicilina.

- La colonización de EGB durante el embarazo puede ser intermitente, constante o transitoria. La utilidad clínica de la revisión de EGB disminuye cuando la prueba se realiza más de cinco semanas antes del parto.
- No se evaluaron colonias no-hemolíticas como parte de las pruebas en el Estudio Clínico.
- Reacción cruzada con *Enterococcus dispar* fue observada durante las pruebas de características de funcionamiento. Muestra negativa inoculada en Caldo Lim con *Enterococcus dispar* a una concentración de $1,2 \times 10^9$ CFU/mL produjo un resultado positivo en una de siete replicas.

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

El ensayo con *illumigene* para EGB se evaluó en el 2011 por parte de cuatro centros de pruebas clínicas independientes localizados en las regiones del medio oeste y sur de los Estados Unidos. La información del rendimiento global se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Datos del rendimiento global

Cultivo de <i>estreptococo</i> grupo B	Ensayo con <i>illumigene</i> para <i>estreptococo</i> grupo B (EGB)		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	150	4	154
Negativo	51	610	661
Total	201	614	815
			IC 95%
Sensibilidad	150/154	97,4%	91,9 – 99,0%
Especificidad	610/661	92,3%	90,0 – 94,1%
Correlación	760/815	93,3%	91,3 – 94,8%

48 de los 51 resultados falsos positivos fueron positivos por otro método molecular. Se obtuvieron resultados no válidos para 11/826 muestras probadas o 1,3%. Dos de las 11 muestras siguieron siendo no válidas después de repetir la prueba de la muestra original.

Se evaluaron un total de 826 muestras de pacientes aptas para participar. Las muestras se obtuvieron de conformidad con las directrices establecidas para la toma de muestras clínicas para el cultivo de *estreptococo* grupo B y enriquecidas de 18 a 24 horas en Caldo Lim o TransVag. Un total de 403 (48,8%) muestras enriquecidas en Caldo Lim se probaron en el centro clínico 2 (210) y centro clínico 4 (193). Un total de 423 (51,2%) muestras enriquecidas en Caldo TransVag se probaron en el centro clínico 1 (234) y centro clínico 3 (189). Los grupos de edad de las pacientes variaban entre 15 y 44 años, con una edad desconocida para 3 (0,4%) de la población de pacientes. No se observaron diferencias en el rendimiento de la prueba basado en el medio de enriquecimiento o la edad de la paciente. La Tabla 2 muestra el rendimiento de la prueba por medio de enriquecimiento; la Tabla 3 muestra el rendimiento de la prueba por centro clínico.

Tabla 2. Características de rendimiento por método de enriquecimiento

	Muestras positivas			Muestras negativas		
	<i>illumigene</i> / cultivo de EGB	Sensibilidad %	IC 95%	<i>illumigene</i> / cultivo de EGB	Especificidad %	IC 95%
Total	150/154	97,4%	91,9 – 99,0%	610/661	92,3%	90,0 – 94,1%
Caldo Lim	82/84	97,6%	91,7 – 99,3%	296/315	94,0%	90,8 – 96,1%
Caldo TransVag	68/70	97,1%	90,2 – 99,2%	314/346	90,8%	87,2 – 93,4%

Tabla 3. Características de rendimiento por centro clínico

Centro	Muestras positivas			Muestras negativas		
	<i>illumigene</i> / cultivo de EGB	Sensibilidad %	IC 95%	<i>illumigene</i> / cultivo de EGB	Especificidad %	IC 95%
Total	150/154	97,4%	91,9 – 99,0%	610/661	92,3%	90,0 – 94,1%
Centro 1	32/33	97,0%	84,7 – 99,5%	197/199	99,0%	96,4 – 99,7%
Centro 2	38/39	97,4%	86,8 – 99,5%	162/168	96,4%	92,4 – 98,4%
Centro 3	36/37	97,3%	86,2 – 99,5%	117/147	79,6%	72,4 – 85,3%
Centro 4	44/45	97,8%	88,4 – 99,6%	134/147	97,8%	85,5 – 94,8%

SENSIBILIDAD ANALÍTICA

Se determinó la sensibilidad analítica o límite de detección para el ensayo con *illumigene* para *estreptococo* grupo B (EGB) para todos los serotipos y cepas comunes de *S. agalactiae*.

El límite de detección se determinó tras el enriquecimiento del Caldo Lim, usando un mínimo de 20 réplicas para cada cantidad sujeta a medida y una probabilidad determinada (p. ej. 95%, donde 19/20 réplicas son positivas) de obtener respuestas positivas. La prueba de sensibilidad analítica se resume a continuación:

Serotipo	<i>Streptococcus agalactiae</i> Descripción de la cepa	CFU/Prueba
Ia	NCTC 11248	60
Ib	ATCC 12401	80
Ic	NCTC 11253	640
II	II/2	320
III	ATCC 12403	160
V	ATCC BAA-611	1280

REACTIVIDAD DEL ENSAYO

Las siguientes cepas del *S. agalactiae* se probaron y produjeron reacciones positivas en 1,280 CFU/prueba con *illumigene* para EGB: NCTC 11930 (Serotipo IV), NCTC 08188 (Serotipo VIa), VII/2 (Serotipo VII), VIII/2 (Serotipo VIII), NCTC 11249 (Serotipo X); ATCC 13813 y ATCC12386.

REPRODUCIBILIDAD

Los paneles codificados ciegos de 10 muestras se enviaron a tres laboratorios independientes para estudios de reproducibilidad. Las muestras se eligieron aleatoriamente dentro de cada panel para enmascarar las identidades de las muestras. Los paneles incluían muestras ingenieradas fabricadas como muestras positivas baja (ej. cerca del límite de detección del ensayo, $n = 3$) y muestras negativas alta ($n = 3$). Los paneles también incluían muestras positivas ingenieradas ($n = 3$) y muestras negativas naturales ($n = 1$). La prueba fue realizada por diferentes operadores en cada centro el mismo día (variabilidad intraensayo) durante cinco días (variabilidad interensayo). En este estudio se usaron tres lotes de *illumigene* para EGB y cinco instrumentos *illumipro-10*. Se probaron los controles negativos y positivos cada día de pruebas. Los resultados aparecen en la tabla que sigue:

	Centro clínico 1		Centro clínico 2		Centro clínico 4		Total	
Tipo de muestra	Acuerdo en porcentaje		Acuerdo en porcentaje		Acuerdo en porcentaje		Acuerdo en porcentaje	
Negativo	10/10	100%	10/10	100%	10/10	100%	10/10	100%
Negativo alto	30/30	100%	30/30	100%	30/30	100%	30/30	100%
Positivo bajo	30/30	100%	30/30	100%	30/30	100%	30/30	100%
Positivo	30/30	100%	30/30	100%	30/30	100%	30/30	100%
Control negativo	10/10	100%	10/10	100%	10/10	100%	10/10	100%
Control positivo	10/10	100%	10/10	100%	10/10	100%	10/10	100%

REACTIVIDAD CRUZADA

Se realizaron estudios de reactividad cruzada con muestras de Caldo Lim positivas y negativas inoculadas con organismos micóticos y bacterianos para una concentración final de $1,2 \times 10^5$ CFU/mL o virus con un mínimo de 1×10^5 TCID₅₀/mL. Reacción cruzada con *Enterococcus dispar* se observó en una de siete replicas probadas. Ninguno de los siguientes organismos reaccionó con *illumigene* para EGB:

Aeromonas hydrophila, *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacteroides fragilis*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter jejuni*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium bifementans*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium histolyticum*, *Clostridium novyi*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium septicum*, *Clostridium sordellii*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium genitalium*, *Corynebacterium urealyticum*, *Corynebacterium xerosis*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus avium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii*, *Gardnerella vaginalis*, *Haemophilus ducreyi*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii subspecies lactis*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactococcus lactis*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Moraxella osloensis*, *Morganella morganii*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Plesiomonas shigelloides*, *Porphyromonas asaccharolytica*, *Prevotella melaninogenica*, *Propionibacterium acnes*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella* Grupo B, *Salmonella* Grupo C, *Salmonella* Grupo D, *Salmonella* Grupo E, *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens*, *Shigella boydii*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* (Cowan), *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus dysgalactiae equisimilis*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguinis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, Adenovirus 40, Adenovirus 41, BK virus, Coxsackievirus, Echovirus, Epstein Barr virus, Herpes simplex virus-1, Herpes simplex virus-2, Rotavirus.

Mycoplasma genitalium, *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* se probaron en concentraciones finales que tenían entre $1,6 \times 10^6$ y $9,9 \times 10^5$ CFU/mL sin reacción con el ensayo *illumigene* para EGB.

PRUEBAS PARA SUSTANCIAS INTERFERENTES

Las siguientes sustancias, en las concentraciones de solvente/diluyente saturadas que se especificaron, no interfirieron en los resultados de la prueba: Líquido amniótico (10% v/v), ADN humano (100 ng/Prueba), orina (30% v/v), sangre total (2,5% v/v). La sangre total en concentraciones superiores a 2,5% v/v interfiere en el ensayo *illumigene* para EGB.

Se realizó una prueba adicional al recubrir los hisopos de algodón con sustancias potencialmente interfirientes. Los hisopos recubiertos se combinaron con la muestra de Caldo Lim y se procesaron a través del ensayo *illumigene* para EGB. Las siguientes sustancias no interfirieron en los resultados de la prueba: Meconio, heces, crema hemorroidal (30,65 mg/100 mg), miconazol (fungicida), mucina (0,5-1,5%), gel espermicida (nonoxinol 9) (4 mg/100 mg). El gel lubricante produjo resultados falsos negativos en una de las 11 réplicas probadas. Los polvos corporales produjeron resultados falsos negativos en una de las 10 réplicas probadas.

illumigene®

Group B *Streptococcus* (GBS)

DNA-Amplifikationsanalyse zum Nachweis von Gruppe-B-*Streptokokken* bei vaginalen/rektalen antepartalen Proben

REF 280350

IVD In-vitro-Diagnostikum

VERWENDUNGSZWECK

Der *illumigene* Gruppe B *Streptococcus* (GBS), Assay der auf dem *illumipro-10* durchgeführt wird, ist ein qualitatives In-vitro-Diagnostikum zum Nachweis von *Streptococcus agalactiae* in angereicherten Kulturen aus vaginalen/rektalen Abstrichen von Frauen vor der Niederkunft. Angereicherte Kulturen werden durch eine 18-24-stündige Inkubation vaginaler/rektaler Probenabstriche in den selektiven Kulturbrühen Lim Broth oder TransVag Broth erhalten.

Der *illumigene* GBS Assay nutzt die Loop-mediated isothermal DNA amplification (LAMP),^{1, 2} Technologie zur Erkennung von *Streptococcus agalactiae*, indem sie ein Segment des *Streptococcus agalactiae*-Genoms anvisiert. Ergebnisse der *illumigene* GBS-Analyse können als Unterstützung bei der Festlegung des GBS-Kolonisierungsstatus bei Frauen vor der Niederkunft verwendet werden. Diese Analyse dient nicht zur Diagnose oder Überwachung der Behandlung von GBS-Infektionen.

Der *illumigene* GBS Assay liefert keine Ergebnisse zur Suszeptibilität. Kulturisolate sind notwendig, um Suszeptibilitätstests durchzuführen, die bei Frauen mit Penicillin-Allergie empfohlen werden.

Der *illumigene* Group B *Streptococcus* ist für den Einsatz im Krankenhaus sowie in Referenz- oder staatlichen Laboreinrichtungen bestimmt. Das Gerät ist nicht zur Point-of-Care-Anwendung bestimmt.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DES TESTS

Der *illumigene* Group B *Streptococcus* (GBS)-Molekularassay basiert auf der im Kreislauf-wiederholenden Amplifikationstechnologie, die für eine spezifische und kontinuierliche isotherme DNA-Amplifikation speziell entwickelte Primer für *Streptococcus agalactiae* verwendet. Ein Nebenprodukt dieser Amplifikation ist Magnesiumpyrophosphat, das durch Bildung eines weißen Niederschlags zu einer Trübung der Reaktionslösung führt. Die Absorptionsmerkmale der Probenmischung werden im *Meridian illumipro-10*-Inkubator/Reader verfolgt. Änderungen in der Probenabsorption, die durch den Niederschlag von Magnesiumpyrophosphat erzeugt werden, zeigen die Anwesenheit von *Streptokokken* der Gruppe-B an und werden vom *illumipro-10* als „Positiv“ angezeigt. Bei Fehlen der Ziel-DNA wird keine nachweisbare Veränderung der Probenabsorption gemessen und der *illumipro-10* zeigt „Negativ“ an.

Der *illumigene* GBS Assay versiert spezifisch eine hoch konservierte 213 Basenpaar (bp)-Sequenz des *Streptococcus agalactiae*-Genoms an. Die Ziel-DNA-Sequenz wird in allen acht GBS-Stämmen gefunden, für die die Information der *Streptococcus agalactiae*-Genomsequenz verfügbar ist und die in allen elf GBS-Serotypen vorhanden ist.

Das *illumigene* GBS Kit beinhaltet Kontrollreagenz und Testgerät. Das Kontrollreagenz ist eine Pufferlösung, die *Staphylococcus aureus*-DNA enthält. Das *illumigene* GBS Testgerät enthält eine Trockenreagenz-Lyosphäre in jeder der zwei Kammern: eine TEST-Kammer mit GBS-spezifischen Primern und eine Kontroll-Kammer mit *S. aureus*-spezifischen Primern. Die *S. aureus*-DNA aus dem Kontrollreagens und die *S. aureus*-spezifischen Primer in der Kontroll-Kammer-Lyosphäre wirken zusammen als interne Kontrolle für den Test. Jede Patientenprobe wird während der Probenvorbereitung und vor der Amplifikation mit dem Kontrollreagenz verdünnt. Die Zugabe von *S. aureus*-DNA zur Patientenprobe ermöglicht die parallele Verarbeitung der Ziel- und Control-DNA während der Amplifikation und dem Nachweis. Die interne Kontrolle kontrolliert die Amplifikationsinhibition, die Leistung des Test-Reagenz und die Wirksamkeit der Probenverarbeitung. Das Kontrollziel *S. aureus* muss amplifiziert und in der endgültigen Reaktion nachgewiesen werden, sonst ist der Test ungültig und die Patientenergebnisse werden nicht angezeigt.

TESTPRINZIP

Die invasive Gruppe-B-*Streptokokken*-Erkrankung trat um 1970 als führende Ursache von Infektionskrankheiten bei Säuglingen auf.³ Säuglinge mit einer Frühinfektion (< 7 Tage alt) können Symptome von Atemnot, Atemstillstand oder Sepsis aufweisen. Eine Frühinfektion wird meistens mit Sepsis und Lungenentzündung assoziiert, kann jedoch zu einer Hirnhautentzündung führen. Die Sterblichkeitsrate bei Säuglingen mit einer frühen Gruppe-B-*Streptokokken*-Erkrankung wird derzeit auf 4-6% geschätzt.⁴ Überlebende Säuglinge können langfristige Behinderungen einschließlich Hörverlust, Verlust der Sehkraft oder mentale Retardierung erleiden.⁵ Der primäre Risikofaktor für die frühe Gruppe-B-*Streptokokken*-Erkrankung ist eine mütterliche Infektion im urogenitalen oder gastrointestinalen Trakt.

Die Gruppe-B-*Streptokokken* (*Streptococcus agalactiae* oder GBS) ist ein gram-positives Bakterium, das normalerweise im Magen-Darm-, Genital- und Harntrakt gesunder Erwachsener gefunden wird. Etwa 10-30 % aller schwangeren Frauen sind in der Vagina oder im Rektum mit GBS infiziert. Während die mit Gruppe-B-*Streptokokken* infizierten Mütter typischerweise keine Symptome oder Gesundheitsbeeinträchtigung aufweisen, können die Bakterien während der Wehen und der Geburt an ihr Kind weitergeben werden.

Die Gruppe-B-*Streptokokken*-Infektion des Neugeborenen tritt am häufigsten auf, wenn *Streptococcus agalactiae* nach dem Blasensprung ins Fruchtwasser in der Vagina hinaufsteigt. Die Übertragung kann auch während der Passage durch den Geburtskanal durch Absaugen oder durch Schleimhautfreilegung durch die intakte Membranen stattfinden. Eine Intrapartale-Übertragung von Gruppe-B-*Streptokokken* oder eine frühe Infektion kann durch die Gabe von Antibiotika-Prophylaxe vor der Niederkunft verhindert werden.⁴

Ein Screening auf GBS-Infektion von Frauen in der 35 bis 37 Schwangerschaftswoche, mit anschließender intrapartaler Antibiotikabehandlung von Frauen mit positivem Infektionsstatus, hat sich als eine wirksame Maßnahme zur Prävention der perinatalen *Streptokokken*-Erkrankung der Gruppe B erwiesen. Da die Infektion während der Schwangerschaft vorübergehend, periodisch oder persistierend sein kann, ist die Durchführung des Screening am effektivsten, wenn die Proben nicht mehr als fünf Wochen (35 bis 37 Schwangerschaftswoche) vor der Niederkunft und nach der Anreicherung mit selektiver Kulturbrühe gesammelt werden.

REAGENZEN/ENTHALTENE MATERIALIEN

Die Höchstzahl der mit diesem Testkit durchführbaren Tests ist auf der Aussenseite der Packung angegeben.

- illumigene Kontroll-Reagenz:** Tris-gepufferte Lösung, die nicht-infektiöse Plasmid-DNA (*S. aureus*-Insert) mit Natriumazid (0,09 %) als Konservierungsmittel enthält.
- illumigene Reaktionspuffer:** Tris-gepufferte Lösung, die Natriumazid (0,09 %) als Konservierungsmittel enthält.
- illumigene GBS Testgerät:** Zwei separate Kammern, die Trockenreagenz-Lyosphären bestehend aus DNA-Polymerase, Desoxyribonukleosidtriphosphat-Lösung (dNTPs) und entweder GBS-spezifischen Primern (TEST-Kammer) oder *S. aureus*-Primern (Control-Kammer) enthalten.
- illumigene Wärmebehandlungsröhrchen**

GETRENNT GELIEFERTE MATERIALIEN

illumigene GBS externe Kontrollen, Katalognummer: 279900

BENÖTIGTE, ABER NICHT ENTHALTENE MATERIALIEN

- Einweg-Latexhandschuhe, ungepudert
- DNase-/RNase-freie, Aerosol-resistente Pipettenspitzen
- Vaginale/rektale Tupfer: Viskose, Baumwolle, Dacron/Polyester, beflocktes Nylon, Schaum, Flüssige Amies-Tupfer, modifizierte Stuarts-Tupfer. *Der Gebrauch von alternativem Tupfermaterial wurde mit dem illumigene GBS Assay nicht bestätigt.*
- Anreicherungsbrühe:
 - Lim Broth [Todd Hewitt Broth angereichert mit Colistin (10 µg/mL) und Nalidixinsäure (15 µg/mL)] ODER
 - TransVag Broth [Todd Hewitt Broth angereichert mit Gentamicin (8 µg/mL) und Nalidixinsäure (15 µg/mL)]

NICHT MITGELIEFERTE AUSRÜSTUNG

- Trockenbad mit 12 mm Wärmeblock bis zu 95 C
- Digital-Thermometer mit Max./Min.-Temperaturspeicher (z.B. Traceable® Lollipop™ wasserdichtes/schlagfestes Thermometer)
- Vortex-Mixer
- Intervall-Stoppuhr
- 50 µL-Mikropipette
- 200 µL-Mikropipette
- illumipro-10™*, Meridian Bioscience, Inc. Katalognummer: 610172

VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle Reagenzien sind ausschließlich in der In-vitro-Diagnostik einzusetzen.
- Kontrollreagenzien oder Testgeräte dürfen zwischen Chargen nicht ausgetauscht werden. Reaktionspuffer und Wärmebehandlungsröhrchen können, sofern sie innerhalb der zugeordneten Ablaufdaten verwendet werden, ausgetauscht werden.
- Befolgen Sie während des Tests die Sicherheitsstufe II und die Geeigneten Laborverfahren.⁶ Behandeln Sie alle Proben und verwendeten Testgeräte als potentielle Überträger von Infektionserregern. Essen, trinken oder rauchen Sie nicht in Bereichen, in denen Proben oder Kits benutzt werden.
- Bei der Handhabung der Proben sind Einweghandschuhe zu tragen. Nach der Arbeit sind die Hände gründlich zu waschen.
- Qualitätskontrollprogramme für Labors, die Molekulartests durchführen, müssen eingesetzt werden.⁷
- Das *illumigene* GBS Testgerät enthält lyophilisierte Reagenzien. Der Schutzbeutel darf erst dann geöffnet werden, wenn der Assay durchgeführt wird.
- Das *illumigene* GBS Testgerät ist mit einer Sperrvorrichtung ausgestattet, um eine Kontamination der Testfläche mit dem Amplifikationsprodukt zu verhindern. Testgeräte mit defekter Sperrvorrichtung NICHT verwenden.
- Gebrauchte *illumigene* Testgeräte sofort nach Gebrauch entsorgen und die Sperrvorrichtung sicher arretieren. Öffnen Sie das Testgerät nach der Verwendung NICHT. Öffnen des Geräts nach der Amplifikation kann zur Kontamination des Testbereichs mit dem Amplifikationsprodukt führen.

HALTBARKEIT UND LAGERUNG

Das Verfallsdatum ist auf dem Etikett des Kits angegeben. Kit bei 2-27 C aufbewahren.

PROBENNAHME UND VORBEREITUNG

Probenart: Vaginale/rektale Abstriche von Frauen vor der Niederkunft.

Probenentnahme: Vaginale und rektale Probenentnahmen sollten unter Einhaltung der veröffentlichten Richtlinien für die Sammlung von klinischen Proben für die Kultur von Gruppe-B-*Streptokokken* durchgeführt werden.⁴ Vaginale und rektale Proben können mit demselben Tupfer oder mit zwei verschiedenen Tupfern gesammelt werden. *Zervikale, perianale, perirektale oder perineale Proben sind keine akzeptablen Probenarten. Ein Spekulum sollte für die Probenentnahme nicht verwendet werden.*

Legen Sie den/die Tupfer in ein nicht-nutritives Transportmedium (z.B. Stuart- oder Amies ohne Kohle) und bringen Sie ihn/sie ins Labor. Für den Fall, dass zwei verschiedene Tupfer für die Probenentnahme verwendet werden, kann ein einziges Transportgerät verwendet werden.

Probenanreicherung: Nehmen Sie den/die vaginalen/rektalen Tupfer aus dem Transportgerät und legen Sie ihn/sie in die Kultur-Anreicherungsbrühe (Lim Broth oder TransVag Broth). Inkubieren Sie die Probe(n) in der Kultur-Anreicherungsbrühe 18-24 Stunden bei 37 ± 2 C.

Angereicherte Proben sollten so schnell wie möglich getestet werden. Angereicherte Proben können bis zu sechs Stunden vor dem Test bei Raumtemperatur aufbewahrt werden. Wenn der Test nicht innerhalb dieser Zeit begonnen wird, kann die angereicherte Probe bis zu sieben Tage bei 2-8 C aufbewahrt werden. Eine langfristige Aufbewahrung der angereicherten Proben kann zu ungültigen Ergebnissen führen.

VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Stellen Sie sicher, dass die Kit-Reagenzien vor Gebrauch Raumtemperatur (21-27 C) erreicht haben. Werden Reagenzien vor Gebrauch nicht auf Raumtemperatur gebracht, kann dies zu falschen Ergebnissen führen.

VORBEREITUNG DER PROBEN

HINWEIS: Stellen Sie sicher, dass der *illumipro-10* eingeschaltet ist und die erforderlichen Leistungsüberprüfungen vor Beginn der PROBENVORBEREITUNG abgeschlossen wurden. Weitere Informationen zum Aufbau und Betrieb des Instruments finden Sie in der *illumipro-10*-Bedienungsanleitung.

1. Etikett 1 Wärmebehandlungsröhrchen für jede zu testende Probe.
2. Geben Sie 200 µL des *illumigene* Kontroll-Reagenzes in jedes Wärmebehandlungsröhrchen.
3. Vermischen Sie jede angereicherte Brühekultur sorgfältig.
4. Geben Sie 50 µL der gemischten, angereicherten Brüheflüssigkeit in das Wärmebehandlungsröhrchen mit Kontroll-Reagenz. Verdünnte Proben im *illumigene* Kontroll-Reagenz können bei Raumtemperatur (21-27 C) bis zu 15 Minuten aufbewahrt werden, bevor Sie fortfahren. Werden verdünnte Proben länger als 15 Minuten vor der Wärmebehandlung aufbewahrt, kann dies zu falschen Ergebnissen führen.
5. Vortexen Sie jede Probe/Kontroll-Mischung mindestens 10 Sekunden.
6. Erhitzen Sie jede Probe/Kontroll-Mischung in einem Trockenbad/Hitzblock 10 ± 2 Minuten bei 95 ± 5 C. Überwachen Sie den Wärmebehandlungsschritt mit digitalem Thermometer und Intervall-Stoppuhr.
7. Entfernen Sie jedes Wärmebehandlungsröhrchen aus dem Trockenbad/Hitzblock und mischen Sie es mit dem Vortexmischer ungefähr 10 Sekunden. Wärmebehandelte Proben können bis zu 45 Minuten bei 19-29 C vor der Zugabe in das Reaktionspuffer aufbewahrt werden. Wärmebehandelte Proben dürfen nicht eingefroren werden.

TESTDURCHFÜHRUNG

HINWEIS: Es können maximal 10 Proben in einem einzigen *illumipro-10* bearbeitet werden.

1. Geben Sie 50 µL der wärmebehandelten Probe in ein entsprechend gekennzeichnetes *illumigene* Reaktionspufferröhrchen.
2. Mischen Sie das Reaktionspufferröhrchen mit der wärmebehandelten Probe etwa 10 Sekunden lang mit dem Vortex-Mixer.
3. Wiederholen Sie die Schritte 1 und 2 für alle zu analysierenden Proben, bevor Sie fortfahren.
4. Entnehmen Sie 1 *illumigene* GBS Testgerät pro Probe einzeln aus seiner Schutzhülle. Öffnen Sie das Gerät vorsichtig, indem Sie die Kammern so halten, dass das lyophilisierte Reagenz beim Öffnen nicht herausfällt. Stellen Sie das Testgerät auf eine ebene Oberfläche oder in ein Gestell.
5. Geben Sie mit einer neuen Pipettenspitze 50 µL des Reaktionspufferröhrchens, das die wärmebehandelte Probe enthält, in die TEST-Kammer (weiße Kugel) des *illumigene*-Testgeräts. Keine Luftblasen einbringen. Geben Sie mit einer neuen Pipettenspitze 50 µL des Reaktionspufferröhrchens, das die wärmebehandelte Probe enthält, in die Kontroll-Kammer (gelbe Kugel) des *illumigene*-Testgeräts. Keine Luftblasen einbringen. Schließen Sie das *illumigene*-Testgerät und verschließen Sie die Sperrvorrichtung gut zu.
6. Mischen Sie jedes Gerät behutsam durch Klopfen oder Schnippen und achten Sie darauf, dass keine Luftblasen entstehen und die Reaktionsmischung nicht in den Deckel des Geräts gelangt.
7. Geben Sie das *illumigene*-Testgerät in den *illumipro-10* und starten Sie die Amplifikationsreaktion und den Nachweis. Die Ergebnisse werden am Ende des Laufs angezeigt.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Proben-ID	Ausgegebenes Ergebnis	Interpretation
Patientenprobe	POSITIV	Probe enthält <i>Streptococcus agalactiae</i> -Ziel-DNA.
	NEGATIV	Keine <i>Streptococcus agalactiae</i> -DNA nachgewiesen.
	UNGÜLTIG	Kein angezeigtes Ergebnis. Wiederholen Sie den Test mit der ursprünglichen Anreicherungsprobe. Inhibitorische Patientenprobe, unsachgemäße Probenvorbereitung, Reagenzversagen, Instrumentenversagen oder interner Kontrollfehler.
Positivkontrolle	POSITIV	Gültiges positives Kontrollergebnis. Reagenzien, die zum Zeitpunkt der Verwendung aktiv sind, funktionieren mit dem <i>illumipro-10</i> korrekt.
	NEGATIV	Falsches Kontrollergebnis. Wiederholen Sie den Kontrolltest als ersten Schritt zur Bestimmung der Fehlerquelle. Bitte wenden Sie sich bei wiederholten fehlerhaften Kontrollen an die technische Unterstützung von Meridian unter +1-800-343-3858 (USA) oder an Ihren Vertriebshändler vor Ort.
	UNGÜLTIG	Kein angezeigtes Ergebnis. Wiederholen Sie den gesamten -Testlauf unter Verwendung der ursprünglichen Proben. Falsche Probenvorbereitung, Reagenzversagen, z. Instrumentenversagen oder interner Kontrollfehler.
Negativkontrolle	POSITIV	Falsches Kontrollergebnis. Wiederholen Sie den Kontrolltest als ersten Schritt zur Bestimmung der Fehlerquelle. Bitte wenden Sie sich bei wiederholten fehlerhaften Kontrollen an die technische Unterstützung von Meridian unter +1-800-343-3858 (USA) oder an Ihren Vertriebshändler vor Ort.
	NEGATIV	Gültiges negatives Kontrollergebnis. Reagenzien, die zum Zeitpunkt der Verwendung aktiv sind, funktionieren mit dem <i>illumipro-10</i> korrekt.
	UNGÜLTIG	Kein angezeigtes Ergebnis. Wiederholen Sie den gesamten -Testlauf unter Verwendung der ursprünglichen Proben. Falsche Probenvorbereitung, Reagenzversagen, Instrumentenversagen oder interner Kontrollfehler.
LEERER SCHACHT	KEINER	Kein <i>illumigene</i> -Testgerät in der <i>illumipro-10</i> -Vertiefung. ODER Das vorhandene <i>illumigene</i> -Testgerät ist aufgrund fehlerhafter Probenvorbereitung, verunreinigtem Gerät oder falsch aufgestelltem Gerät beeinträchtigt. Wiederholen Sie den Test unter Verwendung der ursprünglichen Proben.

QUALITÄTSKONTROLLE

Den Test ist gemäß der einschlägigen lokalen, bundesstaatlichen oder nationalen bzw. zulassungsbehördlichen Auflagen durchführen.

1. Jedes Testgerät enthält eine interne Kontroll-Kammer, die die Amplifizierungsinhibition, Analyse-Reagenzien und Wirksamkeit der Probenverarbeitung überprüft.
2. Die Wärmebehandlung wird mit einem externen Thermometer und Intervall-Stoppuhr überwacht. Verwenden Sie den Max./Min.-Temperaturspeicher des Thermometers, um sicherzustellen, dass eine Temperatur von 95 ± 5 C eingehalten wird. Verwenden Sie die Intervall-Stoppuhr, um sicherzustellen, dass die Wärmebehandlungsdauer 10 ± 2 Minuten beträgt.
3. Geeignete Laborverfahren empfehlen die Verwendung von Kontroll-Materialien. Beachten Sie bitte die entsprechenden Bundes-, Landes- und örtlichen Richtlinien über die Durchführung externer Qualitätskontrollen.
4. Die *illumigene*-GBS externen Kontrollen sind separat erhältlich (Bestellnummer 279900). Es wird empfohlen, dass die Reaktivität jeder neuen Charge und jeder neuen Sendung von *illumigene* GBS nach Erhalt und vor dem Einsatz überprüft wird. Allerdings, ist die Anzahl der zusätzlich durchzuführenden Tests mit externen Kontrollen abhängig von den örtlichen, staatlichen oder bundesstaatlichen Bestimmungen, sowie zulassungsbehördlichen Auflagen. Den *illumigene* GBS Test-Kit nicht verwenden, wenn die Kontrolltests keine korrekten Ergebnisse erbringen.
5. Für jede Kontrolle muss ein separates Testgerät verwendet werden.
6. Die externen positiven und negativen Kontrollen NICHT erhitzen.

ERWARTETE WERTE

Etwa 10-30 % der Frauen vor der Niederkunft sind mit Gruppe-B-*Streptokokken* in der Vagina oder im Rektum infiziert.⁴ Die globale Inzidenz der GBS Kolonisation bei Frauen vor der Niederkunft, die während dieser Studie getestet wurden, lag bei 24,3% (201 von 826). Wenn mit Lim Broth angereicherte Proben verwendet wurden, lag die Inzidenz der GBS Kolonisation bei 25,1% (101 von 403), während bei mit TransVag Broth angereicherten Proben die Inzidenz der GBS Kolonisation bei 23,6% (100 von 423) lag.

EINSCHRÄNKUNGEN

1. Der *illumigene* GBS Assay unterscheidet nicht zwischen lebensfähigen und nicht lebensfähigen Organismen.
2. Der *illumigene* GBS Assay ist für den Einsatz mit vaginalen/rektalen Probenabstrichen, die in Übereinstimmung mit den festgelegten Richtlinien für die Sammlung von Gruppe-B-*Streptokokken*-Kulturproben gesammelt wurden. *Zervikale, perianale, perirektale oder perineale* Proben sind keine akzeptablen Probentypen. Ein Spekulum sollte für die Probenentnahme nicht verwendet werden.
3. Der *illumigene* GBS Assay liefert keine Suszeptibilitätsergebnisse. Kultur-Isolate sind nötig, um Suszeptibilitätstests durchzuführen, die bei Frauen mit Penicillin-Allergie empfohlen werden.

- GBS-Infektion während der Schwangerschaft kann periodisch, persistierend oder vorübergehend sein. Der klinische Nutzen des rGBS-Screening wird vermindert, wenn der Test mehr als fünf Wochen vor der Niederkunft durchgeführt wird.
- Das Auswerten von nicht hämolytischen Kolonien wurde nicht als ein Teil des klinischen Tests ausgeführt.
- Kreuzreaktivität mit *Enterococcus dispar* wurde während der Testleistungsmerkmale beobachtet. Negative Lim Broth Proben, die mit *Enterococcus dispar* beimpft wurden, ergaben eine Endkonzentration von $1,2 \times 10^9$ CFU/mL. Diese Proben ergaben positive Ergebnisse für eine der sieben Wiederholungsteste.

LEISTUNGSMERKMALE

illumigene GBS wurde im Jahr 2011 an vier unabhängigen klinischen Teststellen im Mittleren Westen und Süden der Vereinigten Staaten untersucht. Die Gesamtleistungsinformationen sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1. Gesamtleistungsdaten

Gruppe-B- <i>Streptokokken</i> -Kultur	<i>illumigene</i> Group B <i>Streptococcus</i> (GBS)		
	Positiv	Negativ	Gesamt
Positiv	150	4	154
Negativ	51	610	661
Gesamt	201	614	815
			95 % CI
Empfindlichkeit	150/154	97,4 %	91,9 – 99,0 %
Spezifität	610/661	92,3 %	90,0 – 94,1 %
Korrelation	760/815	93,3 %	91,3 – 94,8 %

Achtundvierzig der 51 falschen positiven Ergebnisse waren positiv bei einer anderen molekularen Methode. Ungültige Ergebnisse wurden für 11/826 getestete Proben oder 1,3 % erhalten. Zwei der 11 Proben blieben nach einer Wiederholung des Tests mit der ursprünglichen Probe ungültig.

Eine Summe von 826 qualifizierten Patientenproben wurde ausgewertet. Die Proben wurden nach festgelegten Richtlinien für die Sammlung von klinischen Proben für die Kultur von Gruppe-B-*Streptokokken* erhalten und während 18-24 Stunden in Lim Broth oder TransVag Broth angereichert. Insgesamt wurden 403 (48,8 %) in Lim Broth angereicherte Proben an der klinischen Prüfstelle 2 (210) und der klinischen Prüfstelle 4 (193) getestet. Insgesamt wurden 423 (51,2 %) in TransVag Broth angereicherte Proben an der klinischen Prüfstelle 1 (234) und der klinischen Prüfstelle 3 (189) getestet. Die Altersgruppen der getesteten Patienten reichten von 15 Jahren bis 44 Jahren; bei 3 (0,4 %) der Patientenpopulation war das Alter unbekannt. Es wurden keine Unterschiede in Testleistung aufgrund des Anreicherungsmediums oder des Alters der Patienten beobachtet. Tabelle 2 zeigt die Analyseleistung per Anreicherungsmedium; Tabelle 3 fasst die Testleistung per klinische Prüfstelle zusammen.

Tabelle 2. Leistungsmerkmale per Anreicherungsverfahren

	Positive Proben			Negative Proben		
	<i>illumigene</i> / GBS Kultur	Empfind- lichkeit %	95 % CI	<i>illumigene</i> / GBS Kultur	Spezifität %	95 % CI
Gesamt	150/154	97,4 %	91,9 – 99,0 %	610/661	92,3 %	90,0 – 94,1 %
Lim Broth	82/84	97,6 %	91,7 – 99,3 %	296/315	94,0 %	90,8 – 96,1 %
TransVag Broth	68/70	97,1 %	90,2 – 99,2 %	314/346	90,8 %	87,2 – 93,4 %

Tabelle 3. Leistungsmerkmale per klinische Prüfstelle

Prüfstelle	Positive Proben			Negative Proben		
	<i>illumigene</i> / GBS Kultur	Empfind- lichkeit %	95 % CI	<i>illumigene</i> / GBS Kultur	Spezifität %	95 % CI
Gesamt	150/154	97,4 %	91,9 – 99,0 %	610/661	92,3 %	90,0 – 94,1 %
Prüfstelle 1	32/33	97,0 %	84,7 – 99,5 %	197/199	99,0 %	96,4 – 99,7 %
Prüfstelle 2	38/39	97,4 %	86,8 – 99,5 %	162/168	96,4 %	92,4 – 98,4 %
Prüfstelle 3	36/37	97,3 %	86,2 – 99,5 %	117/147	79,6 %	72,4 – 85,3 %
Prüfstelle 4	44/45	97,8 %	88,4 – 99,6 %	134/147	97,8 %	85,5 – 94,8 %

ANALYTISCHE EMPFINDLICHKEIT

Die analytische Empfindlichkeit oder Nachweisgrenze des *illumigene* Gruppe B-*Streptokokkus* (GBS) Tests wurde für alle gängigen *S. agalactiae*-Stämme und -Serotypen bestimmt.

Die Nachweisgrenze wurde gemäß Lim Broth-Anreicherung bestimmt, wobei ein Minimum von 20 Wiederholungen für jede Messgröße und eine angegebene Wahrscheinlichkeit (z. B. 95 % wobei 19/20 Wiederholungen positiv sind) verwendet wurden, um positive Reaktionen zu erhalten. Der analytische Empfindlichkeitstest ist im Folgenden zusammengefasst:

Serotyp	<i>Streptococcus agalactiae</i> Stamm- Beschreibung	CFU/Test
Ia	NCTC 11248	60
Ib	ATCC 12401	80
Ic	NCTC 11253	640
II	II/2	320
III	ATCC 12403	160
V	ATCC BAA-611	1280

ANALYSE-REAKTIVITÄT

Die folgenden *S. agalactiae*-Stämme wurden getestet und produzierten positive Reaktionen bei 1280 CFU/Test mit *illumigene* GBS: NCTC 11930 (Serotyp IV), NCTC 08188 (Serotyp VIa), VII/2 (Serotyp VII), VIII/2 (Serotyp VIII), NCTC 11249 (Serotyp X); ATCC 13813 und ATCC12386.

REPRODUZIERBARKEIT

Blind kodierte Tafeln von 10 Proben wurden für Reproduzierbarkeitsstudien an drei unabhängige Labors geliefert. Proben wurden nach dem Zufallsprinzip in jeder Tafel sortiert, um Probe-Identitäten zu maskieren. Die Tafeln enthielten künstliche Proben, wie schwach positive Proben (ie. Nähe der Nachweisgrenze, $n = 3$) und hoch negative Proben ($n = 3$). Die Tafeln enthielten ebenfalls künstlich positive ($n = 3$) Proben und natürlich negative Proben ($n = 1$). Die Tests wurden von unterschiedlichen Anwender an jedem Standort am selben Tag (Intra-Analyse-Variabilität) im Verlauf von fünf Tagen (Inter-Analyse-Variabilität) durchgeführt. Drei Chargen von *illumigene* GBS und fünf *illumipro-10*-Instrumente wurden in dieser Studie verwendet. Positive und negative Kontrollen wurden an jedem Testtag geprüft. Die Ergebnisse sind in der nachstehenden Tabelle angegeben:

Probenart	Klinische Prüfstelle 1		Klinische Prüfstelle 2		Klinische Prüfstelle 4		Gesamt	
	Prozentuale Übereinstimmung		Prozentuale Übereinstimmung		Prozentuale Übereinstimmung		Prozentuale Übereinstimmung	
Negativ	10/10	100 %	10/10	100 %	10/10	100 %	10/10	100 %
sehr negativ	30/30	100 %	30/30	100 %	30/30	100 %	30/30	100 %
schwach positiv	30/30	100 %	30/30	100 %	30/30	100 %	30/30	100 %
Positiv	30/30	100 %	30/30	100 %	30/30	100 %	30/30	100 %
Negativkontrolle	10/10	100 %	10/10	100 %	10/10	100 %	10/10	100 %
Positivkontrolle	10/10	100 %	10/10	100 %	10/10	100 %	10/10	100 %

KREUZREAKTIVITÄT

Kreuzreaktivitätsstudien wurden mit positiven und negativen Lim Broth-Proben durchgeführt, die mit Bakterien oder Pilzorganismen bis zu einer Endkonzentration von $1,2 \times 10^8$ CFU/mL oder Virus bei einem Minimum von 1×10^5 TCID₅₀/mL angeimpft waren. Kreuzreaktivität mit *Enterococcus dispar* wurde bei einem der sieben Wiederholungstests beobachtet. Keiner der folgenden Organismen reagierte mit *illumigene* GBS:

Aeromonas hydrophila, *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacteroides fragilis*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter jejuni*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium bifementans*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium histolyticum*, *Clostridium novyi*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium septicum*, *Clostridium sordellii*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium genitalium*, *Corynebacterium urealyticum*, *Corynebacterium xerosis*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus avium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii*, *Gardnerella vaginalis*, *Haemophilus ducreyi*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii subspecies lactis*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactococcus lactis*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Moraxella osloensis*, *Morganella morganii*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Plesiomonas shigelloides*, *Porphyromonas asaccharolytica*, *Prevotella melaninogenica*, *Propionibacterium acnes*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella* Gruppe B, *Salmonella* Gruppe C, *Salmonella* Gruppe D, *Salmonella* Gruppe E, *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens*, *Shigella boydii*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* (Cowan), *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus dysgalactiae equisimilis*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguinis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, Adenovirus 40, Adenovirus 41, BK virus, Coxsackievirus, Echovirus, Epstein Barr virus, Herpes simplex virus-1, Herpes simplex virus-2, Rotavirus.

Mycoplasma genitalium, *Mycoplasma hominis* und *Ureaplasma urealyticum* wurden in Endkonzentrationen im Bereich zwischen $1,6 \times 10^6$ und $9,9 \times 10^6$ CFU/mL getestet und ergaben keine Reaktion mit dem *illumigene* GBS- Test..

STÖRSUBSTANZEN-TESTS

Die folgenden Substanzen beeinträchtigen bei den angegebenen gesättigten Lösungsmittel-/Verdünnungsmittel-Konzentrationen die Testergebnisse nicht: Fruchtwasser (10 % v/v), menschliche DNA (100 ng/Test), Urin (30 % v/v), Vollblut (2,5 % v/v). Vollblut bei Konzentrationen von mehr als 2,5 % v/v beeinträchtigt den *illumigene* GBS Assay.

Zusätzliche Tests wurden durch Beschichtung von Wattestäbchen mit potenziell störenden Substanzen durchgeführt. Beschichtete Abstriche wurden mit Lim Broth-Probe kombiniert und im *illumigene* GBS Assay verarbeitet. Die folgenden Substanzen beeinträchtigen die Testergebnisse nicht: Mekonium, Stuhl, Hämorrhoiden-Creme (30,65 mg/100 mg), Miconazol (Fungizid), Mucin (0,5-1,5 %), Spermizid-Gel (Nonoxynol 9) (4 mg/100 mg). Gleitgel produzierte falsch negative Ergebnisse in einer von 10 Wiederholungen. Körperpuder produzierte falsch negative Ergebnisse in einer von 10 Wiederholungen.

REFERENCES

- Nagamine, K., Hase, T., Notoni, T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplifications using loop primers. *Mol Cell Probes* 2002;16:223-29.
- Mori, Y., Kitao, M., Tomita, N., Notoni, T. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantitating template DNA. *J Biochem Biophys* 2004;59:145-47.
- Van Dyke, M., et al. Evaluation of Universal Antigen Screening for Group B Streptococcus. *N Engl J Med* 2009; 360:2626-36.
- Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease, Revised Guidelines from CDC, 2010. *MMWR* 2010;59
- Schrag, S., et al. A Population-Based Comparison of Strategies to Prevent Early-Onset Group B Streptococcal Disease in Neonates. *N Engl J Med* 2002;347: 233-239.
- US Department of Health and Human Services PHS/CDC/NIH. Biosafety in microbiology and biomedical laboratories, Washington DC: US Government Printing Office, 2007.
- CLSI: MM3-A2 Molecular diagnostic methods for infectious disease; approved guideline, 2nd ed. Wayne PA: Clinical Laboratory Standards Institute. 2006.



SN11181

REV. 11/11

Meridian Bioscience, Inc.
USA/Corporate Office
3471 River Hills Drive
Cincinnati, Ohio 45244
Telephone: (513) 271-3700
Orders/Customer Service:
(800) 543-1980
Technical Support Center:
(800) 343-3858
Information Fax:(513) 272-5432
Ordering Fax:(513) 271-0124

Manufactured By

Meridian Bioscience Europe
Via dell'Industria, 7
20020 Villa Cortese (MI)
Italy
Tel.: +39 0331 433636
Fax: +39 0331 433616
e-mail: info@mdeur.com

Authorized Representative

Meridian Bioscience Europe France
Le Quadra
455, Promenade des Anglais
06299 Nice Cedex-3
France
Tel.: +33 (4) 93 18 72 10
Fax: +33 (4) 93 18 72 11
e-mail: info@meridianbioscience.fr

Meridian Bioscience Europe s.a. / n.v.
Rue de l'Industrie 7
1400 Nivelles
Belgium
Tel.: +32 (0) 67 89 59 59
Fax: +32 (0) 67 89 59 58
e-mail: info@mdeur.be

Meridian Bioscience Europe b.v.
Halderheiweg 6
5282 SN Bostel
The Netherlands
Tel.: +31 (411) 621166
Fax: +31 (411) 624841
e-mail: meridian.info@planet.nl

INTERNATIONAL SYMBOL 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 symbols, Guia de simbolos, Erläuterung der gaphischen symbole)

	Use By / Utilizzare entro / Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis	CONTROL +	Positive control / Controllo positivo / Contrôle positif / Control positivo / Positive Kontrolle
LOT	Batch Code / Codice del lotto / Code du lot / Código de lote / Chargenbezeichnung	CONTROL -	Negative control / Controllo negativo / Contrôle négatif / Control negativo / Negative Kontrolle
IVD	In vitro diagnostic medical device / Dispositivo medico-diagnostico in vitro / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / In-Vitro-Diagnostikum	EC REP	Authorized Representative in the European Community / Rappresentante Autorizzato nella Comunità Europea / Mandataire dans la Communauté européenne / Representante autorizado en la Comunidad Europea / Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft
CE	This product fulfills the requirements of Directive 98/79/EC on in vitro diagnostic medical devices / Questo prodotto soddisfa i requisiti della Direttiva 98/79/CE sui dispositivi medico-diagnostici in vitro / Ce produit répond aux exigences de la Directive 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / Este producto cumple con las exigencias de la Directiva 98/79/CE sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Dieses Produkt entspricht den Anforderungen der Richtlinie über In Vitro Diagnostica 98/79/EG.	SMP PREP DIL SPE	Sample Preparation Apparatus containing Sample Diluent / Dispositivo per la preparazione del campione contenente il diluente del campione / Système pour la préparation de l'échantillon, diluant inclus / Aparato para Preparación de Muestra con Diluyente de Muestra / System zur Probenvorbereitung, in dem sich Probenverdünnungspuffer befindet
REF	Catalogue number / Numero di catalogo / Référence du catalogue / Número de catálogo / Bestellnummer		Do not freeze / Non congelare / Ne pas congeler / No congelar / Nicht Einfrieren
	Consult Instructions for Use / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulter les instructions d'utilisation / Consulte las instrucciones de uso / Gebrauchsanweisung beachten	RoHS	Restriction of Hazardous Substances / Restrizione all'uso di sostanze pericolose / Limitation de substances dangereuses / Restricción de Substancias Nocivas / Beschränkung der Verwendung bestimmter gefährlicher Stoffe
	Manufacturer / Fabricante / Fabricant / Fabricante / Hersteller		Caution, consult accompanying documents / Attenzione, vedere le istruzioni per l'uso / Attention voir notice d'instructions / Atención, ver instrucciones de uso / Achtung, Begleitdokumente beachten
	Contains sufficient for n tests / Contenuto sufficiente per n saggi / Contenu suffisant pour n tests / Contenido suficiente para n ensayos / Inhalt ausreichend für n Prüfungen	BUF RXN	Reaction Buffer / Tampone di reazione / Solution de réaction / Tamponée / Tampon de Réaction / Reaktionspuffer
	Temperature limitation / Limite di temperatura / Limites de température / Limite de temperatura / Temperaturbegrenzung		ETL Registered Mark Certified / Marchio di certificazione registrato a livello nazionale / Certifié Conforme ETL / Marca de Certificación Registrada Nacional / ETL Konform beglaubigt
SN	Serial number / Numero di serie / Numéro de série / Número de serie / Seriennummer		Recycle - do not dispose of as general waste / Riciclare - non eliminare come rifiuto generico / Recycler - ne pas jeter dans une poubelle / Recycle - no desecha como basura general / Recycle - dieses Produkt nicht über den Hausmüll entsorgen
TEST	Test Device / Dispositivo test / Dispositif de test / Dispositivo de Prueba / Testgerät	HT TUBE	Heat Treatment Tube / Provetta per il Trattamento termico / Tube pour le traitement thermique / Tubo de tratamiento de calor / Röhren zur Hitzebearbeitung
	Date of manufacture / Data di fabbricazione / Date de fabrication / Fecha de fabricación / Herstellungsdatum		For IVD Performance Evaluation Only / Solamente per valutazione delle prestazioni / Réactifs IVD réservés à l'évaluation des performances / Sólo para evaluación del funcionamiento / Nur zur IVD Leistungsbewertung
	LASER RADIATION: Avoid Exposure to Beam / RADIAZIONE LASER: Evitare l'esposizione al raggio / RAYONNEMENT LASER: Eviter toute exposition au faisceau / Radiación Laser: Evite Exposición a los Rayos / LASERSTRAHLUNG: Direkten Kontakt mit dem Strahl vermeiden		HOT SURFACE: Keep hands Away from Hot Surfaces / Superficie calda: tenere le mani lontane dalle superfici calde / SURFACES CHAUDES: Ne pas toucher les surfaces chaudes / Superficie Caliente: Mantenga las manos alejadas de la superficie caliente / Heiße Oberfläche: Kontakt mit heißen Oberflächen vermeiden
	CAUTION: Laser Radiation / ATTENZIONE: Radiazione Laser / AVERTISSEMENT: Rayonnement Laser / Precaution: Radiación Laser / WARNUNG: Laserstrahlung	IPX-0	CAUTION: Protect from water / ATTENZIONE: Proteggere dall'acqua / AVERTISSEMENT: Protéger de l'humidité / Precaution: Proteja del agua / WARNUNG: Vor Feuchtigkeit schützen
	CAUTION: Risk of Danger / ATTENZIONE: Pericolo / AVERTISSEMENT: Risques de danger / Precaution: Peligroso / WARNUNG: Risikogefahr	CONTROL	Assay Control / Controllo del test / Test de contrôle / Control de Ensayo / Kontrolltest
BUF	Buffer / Soluzione tampone / Solution tamponnée / Tampon / Puffer	REAG	Reagent / Reagente / Réactifs / Reactivos / Reagenzien
CONJ	Conjugate / Coniugato / Conjugué / Conjugado / Konjugat	BUF WASH	Wash Buffer / Soluzione di lavaggio / Solution de lavage / Tampon de lavado / Waschpuffer
SUBS	Substrate / Substrato / Substrat / Substrato / Substrat		Warning / Avvertenze / Mise En Garde / Advertencia / Warnhinweise
SOLN STOP	Stopping Solution / Soluzione di Stop / Solution d'arrêt / Solución de parada / StoppLösung	DIL SPE	Specimen Diluent (or Sample Diluent) / Diluente del Campione / Diluant échantillons / Diluyente de muestra / Probenverdünnungspuffer
CONJ ENZ	Enzyme Conjugate / Coniugato enzimatico / Conjugé enzymatique / Conjugado enzimático / Enzymkonjugat	BUF WASH 20X	Wash Buffer Concentration: 20X / Soluzione di lavaggio 20X / Solution de lavage concentrée 20X / Solución tampón de lavado 20X / höchst konzentriertes Waschkonzentrat

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.