

# alethia™

## Mycoplasma Direct DNA Amplification Assay

### DNA Amplification Assay for the Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in human throat swab specimens

REF 480250

IVD

Rx Only

#### INTENDED USE

The Alethia Mycoplasma Direct DNA amplification assay, performed on the Alethia Reader, is a qualitative in vitro diagnostic test for the direct detection of DNA from *Mycoplasma pneumoniae* in human throat swabs obtained from patients suspected of having *Mycoplasma pneumoniae* infection.

The Alethia Mycoplasma Direct assay utilizes loop-mediated isothermal DNA amplification (LAMP) technology to detect *Mycoplasma pneumoniae* by targeting a segment of the *Mycoplasma pneumoniae* genome.

Results from the Alethia Mycoplasma Direct DNA amplification assay should be used in conjunction with clinical presentation, other laboratory findings, and epidemiological risk factors as an aid in the diagnosis of *Mycoplasma* infection and should not be used as the sole basis for treatment or other patient management. Positive results do not rule out co-infection with other organisms and negative results in persons with respiratory tract infections may be due to pathogens not detected by this assay. Lower respiratory tract infections due to *M. pneumoniae* may not be detected by this assay. If lower respiratory tract infection due to *M. pneumoniae* is suspected, additional laboratory testing using methods other than the Alethia Mycoplasma Direct DNA Amplification Assay may be necessary.

#### SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

The Alethia Mycoplasma Direct DNA Amplification Assay is based on loop-mediated amplification (LAMP) technology.<sup>1,2</sup> The assay targets a 208 base pair (bp) sequence of the *Mycoplasma pneumoniae* genome. The target DNA sequence is found in the intracellular protease-like protein gene and is found in all sequences comprising twenty genomes of *Mycoplasma pneumoniae*.

Loop-mediated amplification uses specially designed primers to provide for specific and continuous isothermal DNA amplification. A by-product of amplification is the formation of magnesium pyrophosphate, which forms a white precipitate leading to a turbid reaction solution. Reaction solution absorbance characteristics are monitored by the Meridian Alethia Incubator/Reader. Changes in reaction solution absorbance characteristics created by precipitation of magnesium pyrophosphate indicate the presence of target DNA. The absence of target DNA results in no significant change in sample absorbance.

The Alethia Mycoplasma Direct kit includes Alethia Sample Preparation Apparatus II/Negative Control III (SMP PREP), Alethia Mycoplasma Direct Test Devices, and Heat Treatment Tubes. The Alethia Sample Preparation Apparatus II, used for specimen dilution and preparation, is filled with a buffered solution containing formalin treated *E. coli* harboring *Staphylococcus aureus* DNA. The Alethia Mycoplasma Direct Test Device contains one lyophilized amplification reagent bead in each of two chambers: a TEST chamber with *Mycoplasma*-specific primers and a CONTROL chamber with *S. aureus*-specific primers. The *S. aureus* DNA from the Control Reagent and the *S. aureus*-specific primers in the CONTROL chamber function as the Internal Control for the assay. During specimen preparation, each patient specimen is added to the Sample Preparation Apparatus and combined with the *S. aureus* DNA prior to amplification. Addition of *S. aureus* DNA to the patient specimen allows for parallel processing of target DNA and Control DNA through sample preparation, 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.

The Alethia Reader monitors changes in absorbance characteristics by measuring transmission of light through the Test and Control reaction solutions. Light transmission is checked at the assay Run Start (Signal<sub>initial</sub>, S) and at the assay Run End (Signal<sub>final</sub>, S). The Alethia Reader calculates the change in light transmission between Run End and Run Start (S<sub>r</sub>:S<sub>i</sub>) and compares the ratio to a fixed cut-off value.

Fixed cut-off values for the TEST chamber are used to report sample results. TEST chamber S<sub>r</sub>:S<sub>i</sub> ratios less than 82% are reported as 'POSITIVE'; TEST chamber S<sub>r</sub>:S<sub>i</sub> ratios greater than or equal to 82% are reported as 'NEGATIVE'. Numerical values are not reported.

Fixed cut-off values for the CONTROL chamber are used to determine validity. CONTROL chamber S<sub>r</sub>:S<sub>i</sub> ratios less than 90% are considered valid and allow for reporting of TEST chamber results (POSITIVE, NEGATIVE). CONTROL chamber S<sub>r</sub>:S<sub>i</sub> ratios greater than or equal to 90% are considered invalid and prevent reporting of TEST chamber results. Invalid CONTROL chamber reactions are reported as 'INVALID'. Numerical values are not reported.

More stringent cut-off criteria are applied to the CONTROL chamber reaction to ensure amplification is not inhibited, reagents are performing as intended and that sample processing was performed appropriately.

#### BIOLOGICAL PRINCIPLES

*Mycoplasma pneumoniae* is a common cause of human upper and lower respiratory infections, including pharyngitis, acute bronchitis and pneumonia.<sup>3</sup> *Mycoplasma* became recognized as a human pathogen in the 1960s, with *Mycoplasma pneumoniae* the best known and most studied.<sup>4</sup> *M. pneumoniae* contains a triple-layered cell membrane rather than a structured cell wall,<sup>4</sup> which prevents identification by traditional gram stain methods and visualization by light microscopy.

*M. pneumoniae* has been associated with up to 40%<sup>3-4</sup> of community-acquired pneumonia cases. Infection occurs in both children and adults without geographical, gender or climate-related restrictions.<sup>4,7</sup> *M. pneumoniae* is most often associated with atypical pneumonia, presenting with symptoms that include headache, malaise, myalgia, fever, and sore throat accompanied by dry, paroxysmal cough.<sup>4,5,7</sup> While the clinical course of mycoplasmal pneumonia is generally mild and self-limiting, it has been associated with a mortality rate of approximately 1.4%.<sup>5</sup> An estimated 2 million cases of *M. pneumoniae* infection occur annually with approximately 100,000 pneumonia-related hospitalizations in the United States each year.<sup>9</sup> It is estimated as many as 18% of children requiring hospitalization with community-acquired pneumonia are caused by *M. pneumoniae*.<sup>4</sup>

Transmission of *M. pneumoniae* is generally from person to person by aerosol with a reported incubation period of one to four weeks.<sup>6</sup> As patients with active infection carry *Mycoplasma* in the nose, throat, trachea, and sputum, the spread of the disease is facilitated by its accompanying cough.<sup>4</sup> This mode of transmission lends itself to outbreaks in close personal contact settings such as schools, military barracks, businesses, summer camps, colleges or institutions. Similarly, the disease is commonly spread among family members within a household.<sup>4-7</sup>

Diagnosis of acute *M. pneumoniae* infection is difficult. Basic diagnostic strategies in clinical practice include culture and serology. *M. pneumoniae* culture is often impractical for patient management as the organism may take as many as six weeks to culture.<sup>3</sup> Serology products are widely available and offer practical diagnostic solutions, however, may be limited in their ability to detect acute infection. Serological assays are often directed at specific IgM and IgG antibodies. IgM antibodies are generally not detectable within the first seven days of symptom onset and may persist for months after active infection.<sup>4</sup> Studies indicate that less than 50% of patients with acute infection demonstrate a positive IgG response.<sup>4</sup>

New diagnostic techniques, including DNA-amplification methods, may enable more rapid diagnosis and earlier identification of outbreaks for prevention of secondary cases through implementation of control measures.<sup>6</sup>

#### REAGENTS/MATERIALS PROVIDED

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

1. **Alethia Sample Preparation Apparatus II/Negative Control III (SMP PREP):** Tris-buffered solution containing formalin-treated *E. coli* harboring *S. aureus* DNA and sodium azide (0.09%) as a preservative.
2. **Alethia Mycoplasma Test Device:** Two-chambered device containing lyophilized amplification reagents (DNA polymerase, deoxynucleotide triphosphates) and either *Mycoplasma*-specific primers (TEST Chamber) or control primers (CONTROL Chamber).
3. **Alethia Heat Treatment Tubes**

#### MATERIALS PROVIDED SEPARATELY

1. Alethia Mycoplasma Direct External Control Kit, Catalog Number: 479890

#### MATERIALS NOT PROVIDED

1. Disposable latex gloves, powder free
2. DNase/RNase-free, aerosol resistant pipette tips
3. Specimen collection and transport materials:
  - **Swabs with a breakable, plastic shaft (single or double swab):** Polyester, Flocked Nylon, or Rayon
  - **Non-nutritive Transport Medium on Pledge/Sponge** (Maximum Volume: 1.2 mL): Liquid Amies (without charcoal) or Liquid Stuart

#### EQUIPMENT NOT PROVIDED

1. Dry-bath with 12 mm heat block capable of 95 C
2. Digital thermometer with max/min temperature memory (e.g., Traceable® Lollipop™ waterproof/shockproof thermometer)
3. Vortex mixer
4. Interval timer
5. Micropipette(s) capable of dispensing 50 µL
6. Alethia Reader, Meridian Bioscience, Inc. Catalog Number: 610189

#### PRECAUTIONS

1. All reagents are for in vitro diagnostic use only.
2. Mini-tip swabs (absorbance capacity less than 60 µL) are not acceptable for Alethia Mycoplasma Direct specimen collection.
3. Do not interchange the Sample Preparation Apparatus or Test Devices between lots. Heat treatment tubes are interchangeable provided they are within assigned expiration dates when used.
4. Follow Biosafety Level 2 and Good Laboratory practices during testing.<sup>8</sup> 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.
5. Wear disposable gloves while handling specimens and thoroughly wash hands afterwards. Change gloves often.
6. Quality Control Programs for Molecular Testing Laboratories should be employed.<sup>9</sup> To avoid risk of false positives due to organism/amplicon contamination, employ prevention measures (eg, clean work area with suitable cleaner that destroys nucleic acid, use only aerosol resistant pipette tips, handle one specimen at a time) as required by Good Molecular Practices.
7. The Alethia Mycoplasma Test Device contains lyophilized reagents. The protective pouch should not be opened until ready to perform the assay.
8. The Alethia Mycoplasma 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.
9. Dispose of used Alethia 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.

#### HAZARD AND PRECAUTIONARY STATEMENTS

There are no known hazards associated with this product.

#### SHELF LIFE AND STORAGE

The expiration date is indicated on the kit label. Store the kit components at the temperature indicated on the label.

#### REAGENT PREPARATION

Ensure kit reagents are at room temperature (19-29 C) before use. Incorrect results may be obtained if reagents are not brought to room temperature prior to use.

#### SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

**Sample type:** Throat swab specimens.

**Sample Collection:** Sample collection should be performed in accordance with institutional guidelines for collection of throat swab specimens. Samples should be collected by vigorously swabbing the tonsils and the posterior pharynx. Swab sample(s) should be collected with suitable swab types (e.g. Rayon, Flocked Nylon, or Polyester). **NOTE: Mini-tip swabs (absorbance capacity less than 60 µL) are not acceptable for specimen collection.**

Place swab(s) in a non-nutritive transport medium (e.g. Liquid Amies, without charcoal; Liquid Stuart) containing pledget and transport to the laboratory. Samples should be held at 2-29 C during transport.

Samples may be held at room temperature (19-29 C) for up to 24 hours prior to testing. When testing will not be initiated within this time, the sample may be stored at 2-8 C for up to 14 days prior to testing.

**SPECIMEN PREPARATION**

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

1. Add single throat swab to the Alethia SMP PREP. Break off the handle of the swab. Replace and secure SMP PREP cap. Vortex the SMP PREP for a minimum of 10 seconds.
2. Remove the tip cap from the SMP PREP and squeeze 5 - 10 drops of sample into a clean Alethia Heat Treatment Tube.
3. Repeat Sample Preparation Steps for all samples to be processed.
4. 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.
5. Remove each Heat Treatment Tube from the dry-bath/heat block. Heat-treated samples may be held at 19-29 C for up to 3 hours for repeat testing. **NOTE: Heat treatment must be re-performed (95 ± 5 C for 10 ± 2 minutes) according to Step 4 if heat-treated samples are stored prior to testing.**

**TEST PROCEDURE**

**NOTE:** A maximum of 10 samples can be processed in a single Alethia Reader run. Refer to the Alethia Operator’s Manual for further information regarding instrument set-up and operation.

1. Vortex heat-treated samples for approximately 10 seconds.
2. Remove 1 Alethia Mycoplasma 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.
3. Using a micropipette, first transfer 50 µL of the heat-treated sample to the TEST chamber (left/White Bead), and then transfer 50 µL of the heat treated sample to the CONTROL chamber (right/Yellow Bead) of the Alethia Test Device. Take care not to introduce air to the reaction mixture. Do not mix reactions with pipette. Close the Alethia Test Device and fasten the latch securely.
4. Tap device on the bench top or mix to remove air bubbles. Carefully examine the test device for dissolution of the Control/Test Bead, for air bubbles left in the tube and liquid in the top of the device. If undissolved beads, air bubbles or liquid is noted, tap the device on the bench top and repeat the visual inspection. Amplification and detection should be initiated within 15 minutes.
5. Insert the Alethia Test Device into the Alethia Reader 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>Mycoplasma pneumoniae</i> target DNA.
	NEGATIVE	No <i>Mycoplasma pneumoniae</i> DNA detected.
	INVALID	<b>No reportable result. Repeat the test using the original sample.</b> 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, Alethia Reader performing correctly.
	NEGATIVE	<b>Incorrect control result. Patient results not reportable.</b> Repeat the control test 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	<b>No reportable result. Repeat entire assay run using original samples.</b> Improper sample preparation, reagent failure, instrument failure or internal control failure.
Negative Control	POSITIVE	<b>Incorrect control result. Patient results not reportable.</b> Repeat the control test 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, Alethia Reader performing correctly.
	INVALID	<b>No reportable result. Repeat entire assay run using original samples.</b> Improper sample preparation, reagent failure, instrument failure or internal control failure.
EMPTY WELL	NONE	No Alethia Test Device in the Alethia Reader Well. <b>OR</b> The Alethia Test Device present is compromised due to sample preparation failure, dirty device or improperly seated device. <b>Repeat the test using original sample.</b>

**QUALITY CONTROL**

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

1. Each device contains an internal control chamber that controls for amplification inhibition, assay reagents and sample processing effectiveness.
2. 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.
- Alethia Mycoplasma Direct External Positive Control Reagent is supplied separately (Catalog 479890). The Sample Preparation Apparatus II/Negative Control III reagent supplied within the Alethia Mycoplasma Direct kit (Catalog 480250) serves as the External Negative Control. It is recommended that the reactivity of each new lot and each new shipment of Alethia Mycoplasma Direct be verified on receipt or before use. External control tests should be performed thereafter in accordance with appropriate federal, state and local guidelines. The Alethia Mycoplasma Direct test kit should not be used in patient testing if the external controls do not produce the correct results.
- A separate Test Device must be used for each external control reagent.

**EXPECTED VALUES**

The incidence of *Mycoplasma pneumoniae* was established during clinical studies conducted in 2015-2016. The overall prevalence of *M. pneumoniae* in prospective throat swab specimens was 7.5% (34/456). Prevalence by patient age is provided below.

Patient Age	Total Positive	Total Samples	Prevalence (%)
0 to 1 Month	0	7	0.0%
2 Months to 2 Years	5	157	3.2%
3 Years to 12 Years	22	147	15.0%
13 Years to 21 Years	5	38	13.2%
22 Years to 65 Years	2	86	2.3%
>65 Years	0	21	0.0%

**LIMITATIONS OF THE PROCEDURE**

- This product can be used only with the Alethia instrument.
- The Alethia Mycoplasma Direct DNA assay is a qualitative assay and does not provide quantitative values or information about organism load.
- This device has not been evaluated for monitoring treatment of *Mycoplasma pneumoniae* infections.
- Respiratory infections can be caused by *Mycoplasma pneumoniae* as well as other pathogens. Positive results do not preclude coinfection with other respiratory pathogens.
- Performance of Alethia Mycoplasma Direct has been established with prospective human throat swab specimens only. Performance has not been established for other specimen types (nasopharyngeal specimens, samples from immunocompromised individuals, or from asymptomatic patients.)
- The detection of nucleic acid is dependent upon proper specimen collection, handling, transportation, storage and preparation. Failure to observe proper procedure in any one of these steps can lead to incorrect results.
- Prevalence of *M. pneumoniae* infection will affect the test's predictive value.
- Organism nucleic acids may persist *in vivo* independent of organism viability. Detection of analyte DNA target may not imply causative agents for clinical symptoms. The Alethia Mycoplasma Direct assay does not differentiate between carriers and infected individuals.
- Results should be interpreted together with clinical history, epidemiological data, and other information available to the physician. As with all molecular based tests, (A) False negative results may occur from the presence of inhibitors, technical error, sample mix-up or low numbers of organisms in the clinical specimen, (B) False positive results may occur from the presence of cross-contamination by target organisms, their nucleic acids or amplified product, and from non-specific signals.
- Nasal decongestants containing Phenylephrine HCl at concentrations greater than 0.595 mg/mL may produce false negative results with low positive specimens.
- Whole blood at concentrations greater than 2% may interfere with the Alethia Mycoplasma Direct assay.
- It has been observed that Starplex collection devices can generate a higher rate of invalid results when used in conjunction with the Alethia Mycoplasma Direct assay.

**SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS**

The performance characteristics of the Alethia Mycoplasma Direct DNA Amplification Assay were established in clinical studies conducted in 2015-2016 at independent clinical test sites representing three geographically distinct regions throughout the United States. Performance characteristics of the assay were compared to a reference molecular in vitro diagnostic method, the Alethia Mycoplasma DNA Amplification Assay (Meridian Bioscience, Inc., Cincinnati, OH). A total of 458 prospective, deidentified, throat swab specimens collected under informed consent from symptomatic male and female patients were evaluated. Two samples (0.4%) were excluded from the clinical sample population due to an instrument error during testing (1) or an unacceptable sample type (1) for a total of 456 eligible samples for analysis. There were no invalid results generated by the Alethia Mycoplasma Direct assay during the clinical study (0.0%; 95% CI: 0.0 – 0.8%). Performance characteristics of the Alethia Mycoplasma Direct assay are summarized below.

Alethia Mycoplasma Direct	Alethia Mycoplasma			Total
	Positive	Negative	Invalid	
Positive	24	10 <sup>a</sup>	0	34
Negative	1 <sup>b</sup>	421	0	422
Invalid	0	0	0	0
<b>Total</b>	<b>25</b>	<b>431</b>	<b>0</b>	<b>456</b>
				<b>95% CI</b>
<b>Positive Percent Agreement</b>	24/25	96.0%		80.5 - 99.3%
<b>Negative Percent Agreement</b>	421/431	97.7%		95.8 - 98.7%
<b>Overall Percent Agreement</b>	445/456	97.6%		95.7 - 98.6%
<b>Invalid Rate</b>	0/456	0.0%		0.0 - 0.8%

<sup>a</sup> 4/10 samples were identified positive by Alethia Mycoplasma after testing with an additional frozen sample.

<sup>b</sup> Repeat testing by Alethia Mycoplasma with the original patient sample and an additional frozen sample produced negative results.

The eligible study population included throat swab specimens from pediatric, adult, and geriatric patients ranging in age from 3 weeks to 97 years. There was no difference in assay performance based on patient age. The study population included 230 (50.4%) female and 226 (49.6%) male specimens. There was no difference in assay performance based on gender.

**ANALYTICAL SENSITIVITY**

The analytical sensitivity or Limit of Detection for the Alethia Mycoplasma Direct assay was determined for two *M. pneumoniae* strains (FH and M129). Limit of Detect was determined using a minimum of 20 replicates for each measurand and a stated probability (e.g., 95% where 19/20 replicates are positive) of obtaining positive responses. Analytical sensitivity testing is summarized below:

<i>Mycoplasma pneumoniae</i> Strain	CFU/mL
FH (ATCC 15531)	2350
M129 (ATCC 29342)	200

**ASSAY REACTIVITY**

The following *M. pneumoniae* strains were tested with Alethia Mycoplasma and produced positive reactions at or below stated assay limit of detect of 2350 CFU/mL: PI 1428 (ATCC 29085), MAC (ATCC 15492), M52 (ATCC 15293), Bru (ATCC 15377), M129-B170 (ATCC 29343), Mutant 22 (ATCC 39505) UAB 55612, UAB 56317, UMTB-10G (ATCC 49899). Testing demonstrated that both Type 1 and Type 2 strains are detected with the assay. The same reactivity is expected with the Alethia Mycoplasma Direct assay.

**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 manufactured as low positive samples (near the limit of detect, n=3), moderate positive samples (n=3), and high negative samples (n=3). The panel also included one natural negative sample. 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 Alethia Mycoplasma Direct and eight Alethia instruments were used in the study. Positive and Negative Controls were tested with each panel. The results are provided in the table below:

Sample Type	Site 1		Site 2		Site 3		Total	
	Percent Agreement		Percent Agreement		Percent Agreement		Percent Agreement	
High Negative	30/30	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90	100.0%
Low Positive	30/30	100.0%	30/30	100.0%	29/30	96.7%	89/90	98.9%
Moderate Positive	30/30	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90	100.0%
Negative	9/10	90.0%	10/10	100.0%	10/10	100.0%	29/30	96.7%
Negative Control	10/10	100.0%	10/10	100.0%	10/10	100.0%	30/30	100.0%
Positive Control	10/10	100.0%	10/10	100.0%	10/10	100.0%	30/30	100.0%

**CROSSREACTIVITY**

Crossreactivity studies were previously performed with the Alethia Mycoplasma DNA Amplification assay. Positive and negative specimens were inoculated with potentially interfering bacterial or fungal organisms to minimum final concentrations of 1.0 x 10<sup>8</sup> CFU/mL. Viruses were tested at concentrations greater than 1.0 x 10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub>/mL or 1.0 x 10<sup>6</sup> copies/mL. Human DNA was tested at 2.0 ng/test with no crossreactivity observed. Positive specimens contained *M. pneumoniae* concentrations near the limit of detection. None of the following organisms or materials were identified as crossreactive or interfering in the Alethia Mycoplasma assay:

*Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Actinomyces odontolyticus*, *Bacillus subtilis*, *Bacteroides fragilis*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella pertussis*, *Burkholderia cepacia*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium difficile*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* (ESBL), *Fusobacterium nucleatum*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* (KPC), *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Moraxella catarrhalis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Neisseria cinerea*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Nocardia asteroides*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella paratyphi* (Group A), *Salmonella typhimurium* (Group B), *Serratia liquefaciens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* (Group B), *Streptococcus anginosus* (Group F), *Streptococcus bovis* (Group D), *Streptococcus canis* (Group G), *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus salivarius*, *Ureaplasma urealyticum*, Adenovirus, Coronavirus, Coxsackievirus, Cytomegalovirus, Epstein Barr virus, Herpes simplex virus 1, Herpes simplex virus 2, Human metapneumovirus, Influenza A, Influenza B, Parainfluenza virus 1, Parainfluenza virus 2, Parainfluenza virus 3, Respiratory syncytial virus A, Respiratory syncytial virus B, Rhinovirus, Human DNA. No crossreactivity is expected with the Alethia Mycoplasma Direct assay.

**TESTS FOR INTERFERING SUBSTANCES**

Potentially interfering substances were tested with simulated negative and contrived low positive (*M. pneumoniae* strains M129 and FH) samples. The following substances, at the saturated solvent/diluent concentrations indicated, do not interfere with Alethia Mycoplasma Direct assay: Acetaminophen (18.1 mg/mL), Albuterol Sulfate (20 mg/mL), Aspirin (9.1 mg/mL), Azithromycin dehydrate (2.0 mg/mL), Cepacol® Mouthwash [Alcohol (1.4% v/v), Cetylpyridinium chloride (0.005% v/v)], Contac® Cold + Flu Tablets [Acetaminophen (14.8 mg/mL), Chlorpheniramine maleate (0.06 mg/mL), Phenylephrine HCl (0.15 mg/mL)], Diphenhydramine HCl (2.6 mg/mL), Erythromycin (20.0 mg/mL), HALLS® Cough Drops [Menthol (0.06 mg/mL)], Ibuprofen (12.7 mg/mL), Phenylephrine HCl (0.595 mg/mL), Prednisone (20.0 mg/mL), "Robitussin® Cough+Chest Congestion Cough Syrup [Dextromethorphan HBr (0.20 mg/mL), Guaifenesin (2.0 mg/mL)], Saine Nasal Spray [Sodium chloride (0.65 mg/mL)], Mucus (5.0mg/mL), and White Blood Cells (0.5% v/v).

Whole blood was found to produce invalid results at concentrations greater than 2%.

Phenylephrine HCl at concentrations greater than 0.595 mg/mL may produce false negative results with low positive samples.

\* *Robitussin® Cough+Congestion Cough Syrup initially produced 1/3 invalid results with Positive Sample P2 that produced acceptable results during repeat testing (1/1 positive). Robitussin® Cough+Congestion Cough Syrup is not considered an interferent.*

**ITALIANO**

# alethia™

## Mycoplasma Direct DNA Amplification Assay

**Test di amplificazione del DNA per il rilevamento di *Mycoplasma pneumoniae* in campioni biologici umani prelevati con tamponi faringei**

**REF** 480250

**IVD**

**Rx Only**

### FINALITÀ D'USO

Il test di amplificazione del DNA Alethia Mycoplasma Direct, eseguito sul lettore Alethia, è un esame diagnostico in vitro per il rilevamento diretto del DNA di *Mycoplasma pneumoniae* in tamponi faringei umani ottenuti da pazienti con sospetta infezione da *Mycoplasma pneumoniae*.

Il test Alethia Mycoplasma Direct utilizza la tecnologia LAMP (loop-mediated isothermal DNA amplification, amplificazione isoterma del DNA loop-mediata) per il rilevamento del *Mycoplasma pneumoniae*, utilizzando come bersaglio un segmento del genoma del batterio.

I risultati del test di amplificazione del DNA Alethia Mycoplasma Direct vanno utilizzati congiuntamente al quadro clinico, ai risultati degli altri test di laboratorio e ai fattori di rischio epidemiologico come ausilio nella diagnosi dell'infezione da *Mycoplasma* e non come unica base di trattamento o per altra gestione dei pazienti. I risultati positivi non escludono co-infezioni da parte di altri organismi e i risultati negativi in soggetti con infezioni del tratto respiratorio potrebbero essere dovuti a patogeni non rilevati con questo test. Le infezioni del tratto respiratorio inferiore dovute a *M. pneumoniae* potrebbero non essere rilevate con questo test. Se si sospetta un'infezione del tratto respiratorio inferiore dovuta a *M. pneumoniae*, potrebbe essere necessario ricorrere ad altri esami di laboratorio che utilizzano metodi diversi dal test di amplificazione del DNA Alethia Mycoplasma Direct.

### SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

Il test di amplificazione del DNA Alethia Mycoplasma Direct si basa sulla tecnologia LAMP (amplificazione loop-mediata).<sup>1,2</sup> Il test ha come target una sequenza di 208 paia di basi (bp) del genoma di *Mycoplasma pneumoniae*. La sequenza di DNA target è localizzata nel gene di una proteina intracellulare protease-like e si trova in tutte le sequenze dei genomi di venti ceppi di *Mycoplasma pneumoniae*.

L'amplificazione loop-mediata utilizza dei primer appositamente progettati per fornire l'amplificazione isoterma, specifica e continua del DNA. Un sottoprodotto dell'amplificazione è il magnesio pirofosfato, il quale forma un precipitato bianco che crea una soluzione di reazione torbida. Le caratteristiche di assorbanza della soluzione di reazione vengono monitorate dall'incubatore/lettore Meridian Alethia. I cambiamenti nelle caratteristiche di assorbanza della soluzione di reazione, creati dalla precipitazione del magnesio pirofosfato, indicano la presenza del DNA target. L'assenza del DNA target non causa un cambiamento significativo dell'assorbanza del campione.

Il kit Alethia Mycoplasma Direct include l'Apparato di Preparazione dei Campioni II / Controllo Negativo III (SMP PREP) Alethia, i Dispositivi Test Alethia Mycoplasma Direct e le Provette per Trattamento termico. L'Apparato di Preparazione dei Campioni II, utilizzato per la diluizione e la preparazione dei campioni, è riempito con una soluzione tamponata contenente *E. coli* trattato con formalina, che ospita DNA di *Staphylococcus aureus*. Il Dispositivo Test Alethia Mycoplasma Direct contiene una microsfera di reagente di amplificazione liofilizzato in ognuna delle due camere: una camera di TEST con primer specifici per *Mycoplasma* e una camera di CONTROLLO con primer specifici per *S. aureus*. Il DNA di *S. aureus* presente nel Reagente di Controllo e i primer specifici per *S. aureus* nella camera di CONTROLLO funzionano come controllo interno per il test. Durante la preparazione dei campioni, ciascun campione del paziente viene aggiunto all'Apparato di Preparazione dei Campioni e combinato con DNA di *S. aureus* prima dell'amplificazione. L'aggiunta del DNA di *S. aureus* al campione biologico del paziente consente di effettuare un trattamento parallelo del DNA target e del DNA di controllo attraverso la preparazione del campione, l'amplificazione e il rilevamento. Il controllo interno esegue un monitoraggio sull'estrazione del DNA, sull'inibizione dell'amplificazione, sulle prestazioni del reagente analitico e sull'efficacia del trattamento del campione. Il target del controllo di *S. aureus* deve essere amplificato e rilevato nella reazione finale, altrimenti il test è considerato in valido e i risultati non vengono referatati.

Il lettore Alethia monitora le variazioni nelle caratteristiche di assorbanza misurando la trasmissione della luce attraverso le soluzioni di reazione contenute nelle camere Test e Controllo. La trasmissione della luce viene controllata all'inizio dell'analisi (Signal<sub>initial</sub>, S<sub>i</sub>) nonché alla fine (Signal<sub>final</sub>, S<sub>f</sub>). Il lettore Alethia calcola la variazione nella trasmissione della luce tra la fine e l'inizio dell'analisi (Sr:S<sub>i</sub>) e confronta il rapporto con un valore fisso di cut-off.

I valori fissi di cut-off per la camera di TEST vengono utilizzati per referare i risultati del campione. I rapporti Sr:S<sub>i</sub> della camera di TEST inferiori all'82% vengono referatati come "POSITIVI"; i rapporti Sr:S<sub>i</sub> della camera di TEST superiori o pari all'82% vengono referatati come "NEGATIVI". I valori numerici non vengono riportati.

I valori fissi di cut-off per la camera di CONTROLLO vengono utilizzati per determinare la validità. I rapporti Sr:S<sub>f</sub> della camera di CONTROLLO inferiori al 90% sono considerati validi e consentono di referare i risultati della camera di TEST (POSITIVI, NEGATIVI). I rapporti Sr:S<sub>f</sub> della camera di CONTROLLO superiori o pari al 90% sono considerati non validi e impediscono di referare i risultati della camera di TEST. Le reazioni della camera di CONTROLLO non valide vengono referate come "NON VALIDE". I valori numerici non vengono riportati.

Per la reazione della camera di CONTROLLO valgono criteri di cut-off più rigorosi per garantire che l'amplificazione non sia inibita, i reagenti reagiscano come previsto e l'elaborazione del campione avvenga correttamente.

#### PRINCIPI BIOLOGICI

*Mycoplasma pneumoniae* è un comune agente eziologico delle infezioni del tratto respiratorio umano superiore e inferiore, tra cui faringite, bronchite acuta e polmonite.<sup>3</sup> I micoplasmi sono stati riconosciuti come patogeni umani negli anni '60 e *Mycoplasma pneumoniae* è stato il patogeno più conosciuto e studiato.<sup>4</sup> *M. pneumoniae* contiene una membrana cellulare a triplo strato anziché una parete cellulare strutturata,<sup>4</sup> che impedisce l'identificazione con i tradizionali metodi di colorazione di Gram e la visualizzazione mediante microscopia ottica.

Fino al 40% delle polmoniti contratte nella comunità sono state associate a *M. pneumoniae*.<sup>3,4</sup> L'infezione si verifica sia nei bambini che negli adulti senza alcuna restrizione di tipo geografico, sessuale o climatico.<sup>4,7</sup> *M. pneumoniae* è più spesso associato alla polmonite atipica, i cui sintomi includono emicrania, malessere, malgia, febbre e faringite accompagnati da tosse secca e convulsa.<sup>4,5,7</sup> Mentre il decorso clinico della polmonite micoplasmaica è generalmente lieve e autolimitante, il tasso di mortalità associato alla malattia è pari a circa l'1,4%.<sup>5</sup> Secondo le stime, ogni anno negli Stati Uniti si verificano 2 milioni di casi di infezione da *M. pneumoniae* con circa 100.000 ricoveri annuali correlati a polmonite.<sup>6</sup> Si stima che, nei bambini, fino al 18% dei ricoveri correlati alla polmonite contratta all'interno della comunità sono causati da *M. pneumoniae*.<sup>4</sup>

La trasmissione di *M. pneumoniae* avviene generalmente per via aerea tra un soggetto e l'altro, con un periodo di incubazione variabile da una a quattro settimane.<sup>9</sup> Poiché i pazienti con infezione micoplasmaica attiva risultano portatori del *Mycoplasma* all'interno del naso, della gola, della trachea e dell'espettorato, la diffusione della malattia viene facilitata dalla tosse ad essa associata.<sup>4</sup> Questa modalità di trasmissione si presta alla comparsa di focolai epidemici negli ambienti in cui gli individui si trovano a stretto contatto tra loro, come le scuole, le caserme militari, le aziende, i campi estivi, i collegi o gli istituti. Allo stesso modo, in un ambiente domestico la malattia si diffonde comunemente tra i membri della famiglia.<sup>4,7</sup>

L'infezione acuta da *M. pneumoniae* è di difficile diagnosi. Le strategie diagnostiche di base nella pratica clinica includono tecniche colturali e sierologiche. La coltura di *M. pneumoniae* risulta spesso di scarsa praticità per la gestione dei pazienti in quanto l'organismo può richiedere fino a sei settimane per riprodursi in coltura.<sup>3</sup> Mentre i test sierologici sono ampiamente disponibili in commercio e offrono pratiche soluzioni diagnostiche, possono tuttavia presentare dei limiti per quanto riguarda la capacità di rilevamento dell'infezione acuta. I test sierologici hanno spesso come bersaglio specifici anticorpi IgM e IgG. Generalmente, gli anticorpi IgM non sono rilevabili nei primi sette giorni di insorgenza dei sintomi e possono persistere per mesi dopo la fase attiva dell'infezione.<sup>4</sup> Gli studi indicano che meno del 50% dei pazienti con infezione acuta mostra una risposta positiva alle IgG.<sup>4</sup>

Le nuove tecniche diagnostiche, inclusi i metodi di amplificazione del DNA, possono portare a una diagnosi più rapida e all'identificazione precoce dei focolai di infezione per la prevenzione dei casi secondari attraverso l'implementazione delle misure di controllo.<sup>6</sup>

#### REAGENTI/MATERIALI FORNITI

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

1. **Apparato di Preparazione dei Campioni II / Controllo Negativo III (SMP PREP) Alethia:** soluzione con tampone Tris contenente *E. Coli* che ospita DNA di *Staphylococcus aureus* e sodio azide (0,09%) come conservante.
2. **Dispositivo Test Alethia Mycoplasma:** dispositivo a due camere contenente i reagenti di amplificazione (DNA polimerasi, deossinucleotidi trifosfati) e i primer specifici per il *Mycoplasma* (camera di TEST) o i primer di controllo (camera di CONTROLLO).
3. **Provette per Trattamento Termico Alethia.**

#### MATERIALI FORNITI SEPARATAMENTE

1. Kit di controllo esterno Alethia Mycoplasma Direct, Numero di Catalogo: 479890

#### MATERIALI NON FORNITI

1. Guanti in lattice monouso, senza talco
2. Puntali per pipetta privi di DNasi/RNasi e resistenti alla contaminazione da aerosol
3. Materiali per il prelievo e il trasporto dei campioni:
  - **Tamponi, con impugnatura in plastica frangibile (tampone singolo o doppio):** poliestere, nylon floccato o rayon
  - **Terreno di trasporto non nutritivo su spugna** (volume massimo: 1,2 mL): Liquido di Amies (senza carbone) o Liquido di Stuart

#### STRUMENTI NON FORNITI

1. Bagno a secco con blocco termico di 12 mm in grado di arrivare a 95 °C
2. Termometro digitale con memoria temperatura max/min (ad es., termometro impermeabile/a prova d'urto Traceable® Lollipop™)
3. Vortex
4. Timer a intervalli
5. Micropipette in grado di erogare 50 µL
6. Lettore Alethia, Meridian Bioscience, Inc. Numero di catalogo: 610189

#### PRECAUZIONI

1. Tutti i reagenti sono esclusivamente per uso diagnostico in vitro.
2. I tamponi mini-tip (capacità di assorbimento inferiore a 60 µL) non sono idonei per il prelievo di campioni per il test Alethia Mycoplasma Direct.
3. Non scambiare l'Apparato di Preparazione dei Campioni o i Dispositivi Test tra lotti diversi. Le provette per trattamento termico sono intercambiabili, a patto che non siano ancora scadute quando vengono utilizzate.
4. Seguire le procedure di Biosicurezza di Livello 2 e le buone pratiche di laboratorio durante l'esecuzione dei test.<sup>8</sup> Trattare tutti i campioni e i dispositivi di test usati come capaci di trasmettere agenti infettivi. Non mangiare, bere o fumare in aree in cui vengono manipolati i campioni o i reagenti del kit.
5. Durante la manipolazione dei campioni indossare guanti monouso e subito dopo lavarsi accuratamente le mani. Cambiare spesso i guanti.
6. Si consiglia di aderire a programmi di Controllo Qualità per i laboratori di biologia molecolare.<sup>9</sup> Per evitare il rischio di falsi positivi dovuto alla contaminazione da parte di organismi o ampliconi, adottare misure di prevenzione (ad esempio, pulire l'area di lavoro con un detergente idoneo che distrugga gli acidi nucleici, usare solo puntali per pipetta resistenti agli aerosol, manipolare un campione biologico alla volta) come richiesto dalla buona pratica del laboratorio molecolare.
7. Il Dispositivo Test Alethia Mycoplasma contiene reagenti liofilizzati. La busta protettiva non deve essere aperta fino a quando non si è pronti a eseguire il test.
8. Il Dispositivo Test Alethia Mycoplasma è dotato di un sistema di chiusura ideato per evitare la contaminazione dell'area di analisi con il prodotto di amplificazione. NON utilizzare Dispositivi Test con la chiusura rotta.

9. Smaltire i Dispositivi Test Alethia Mycoplasma subito dopo l'uso, lasciando la chiusura saldamente in posizione. NON aprire il Dispositivo Test dopo il processamento. L'apertura del dispositivo dopo l'amplificazione può comportare la contaminazione dell'area di lavoro con il prodotto di amplificazione.

#### DICHIARAZIONI DI PERICOLO E PRUDENZA

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

#### STABILITÀ E CONSERVAZIONE

La data di scadenza è riportata sull'etichetta del kit. Conservare i componenti del kit alla temperatura indicata sull'etichetta.

#### PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Assicurarsi che i reagenti del kit siano a temperatura ambiente (19-29 C) prima dell'uso. Se i reagenti non vengono portati a temperatura ambiente prima dell'uso si potrebbero ottenere risultati non corretti.

#### RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

**Tipo di campione:** campioni prelevati mediante tamponi faringei.

**Prelievo del campione:** il prelievo dei campioni deve essere eseguito in conformità alle linee guida della struttura sanitaria in relazione al prelievo di campioni mediante tamponi faringei. I campioni devono essere prelevati strofinando vigorosamente le tonsille e la parte posteriore della faringe. Il prelievo dei campioni deve essere effettuato con tipologie di tamponi adatti (ad es., rayon, nylon floccato o poliestere). **NOTA: i tamponi mini-tip (capacità di assorbanza inferiore a 60 µL) non sono idonei per il prelievo di campioni.**

Collocare i tamponi in un mezzo di trasporto non nutritivo con spugna (ad es., Liquido di Stuart o di Amies, senza carbone) e trasportarli al laboratorio. Durante il trasporto, i campioni devono essere tenuti ad una temperatura compresa tra 2 e 29 C.

Prima dell'analisi, i campioni possono essere conservati a temperatura ambiente (19-29 C) per un massimo di 24 ore. Se l'analisi non viene iniziata entro tale limite di tempo, il campione può essere conservato a 2-8 C per un massimo di 14 giorni.

#### PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

**NOTA:** assicurarsi che il lettore Alethia sia acceso e che siano state completate le necessarie verifiche del funzionamento prima di dare inizio alla PREPARAZIONE DEI CAMPIONI. Per ulteriori informazioni sulla configurazione e sul funzionamento dello strumento, consultare il Manuale d'uso del lettore Alethia.

1. Aggiungere il tampone faringeo all'SMP PREP Alethia. Rompere l'impugnatura del tampone. Riposizionare il cappuccio sull'SMP PREP e richiuderlo. Agitare su Vortex l'SMP PREP per un minimo di 10 secondi.
2. Rimuovere il cappuccio dall'SMP PREP e versare 5-10 gocce di campione in una Provetta per Trattamento Termico Alethia pulita.
3. Ripetere i passaggi di preparazione del campione per tutti i campioni da analizzare.
4. Riscaldare ciascun Campione/miscela di controllo in un bagno a secco/blocco termico a  $95 \pm 5$  C per  $10 \pm 2$  minuti. Monitorare la fase del trattamento termico con il termometro digitale e il timer a intervalli.
5. Rimuovere ciascuna Provetta per Trattamento Termico dal bagno a secco/blocco termico. I campioni sottoposti a trattamento termico possono essere tenuti a 19-29 C fino a 3 ore prima di procedere con l'analisi. **NOTA: è necessario ripetere il trattamento termico ( $95 \pm 5$  C per  $10 \pm 2$  minuti) seguendo il punto 4, se i campioni sottoposti a trattamento termico vengono conservati per più di 3 ore.**

#### PROCEDURA DEL TEST

**NOTA:** è possibile analizzare un massimo di 10 campioni in un singolo ciclo Alethia. Per ulteriori informazioni sulla configurazione e sul funzionamento dello strumento, consultare il Manuale d'Uso del lettore Alethia.

1. Agitare su Vortex i campioni sottoposti a trattamento termico per circa 10 secondi.
2. Rimuovere dalla relativa busta protettiva 1 Dispositivo Test Alethia Mycoplasma. Aprire con attenzione il dispositivo, tenendo le camere in maniera tale che il reagente liofilizzato non fuoriesca all'apertura. Collocare il Dispositivo Test su una superficie piana o su un vassoio in grado di contenere il Dispositivo Test.
3. Usando una micropipetta, trasferire prima 50 µL del campione trattato termicamente nella camera del TEST (Sinistra/microsfera bianca), poi trasferire 50 µL del campione trattato termicamente nella camera del CONTROLLO (Destra/microsfera gialla) del Dispositivo Test Alethia. Fare attenzione a non introdurre aria nella miscela di reazione. Non miscelare la soluzione di reazione con la pipetta. Chiudere il Dispositivo Test Alethia assicurando bene la linguetta di chiusura.
4. Picchiettare il Dispositivo Test sul bancone o miscelarlo per rimuovere le bolle d'aria. Esaminare attentamente il Dispositivo Test per verificare la dissoluzione della microsfera di controllo/test e per escludere la presenza di bolle d'aria residue nella provetta e di liquido nella parte superiore del dispositivo. Se si nota la presenza di microsfere non disciolte, bolle d'aria o liquido nei tappi, battere con delicatezza il dispositivo sul ripiano e ripetere l'ispezione visiva. L'amplificazione e il rilevamento devono iniziare entro 15 minuti.
5. Inserire il Dispositivo Test Alethia nell'lettore Alethia e dare inizio al processo di amplificazione e rilevamento. I risultati saranno visualizzati alla conclusione della seduta.



## INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

ID campione	Risultato refertato	Interpretazione
Campione del paziente	POSITIVO	Il campione contiene il DNA target di <i>Mycoplasma pneumoniae</i> .
	NEGATIVO	Nessun DNA di <i>Mycoplasma pneumoniae</i> rilevato.
	NON VALIDO	<b>Nessun risultato refertabile.</b> Ripetere il test utilizzando il campione originale del paziente. 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 di controllo positivo valido. Reagenti attivi al momento dell'uso, corretto funzionamento del lettore Alethia.
	NEGATIVO	<b>Risultato del controllo non corretto. Risultato del paziente non refertabile.</b> Come prima opzione per identificare la causa del fallimento ripetere i test di controllo. Se i fallimenti del controllo sono ripetuti contattare l'Assistenza Tecnica Meridian al numero 1-800-343-3858 (USA) o il proprio Distributore Locale (in Italia, +390331433636)
	NON VALIDO	<b>Nessun risultato refertabile. Ripetere l'intera seduta di analisi usando i campioni originali.</b> Preparazione del campione non corretta, deterioramento del reagente, guasto dello strumento o fallimento del controllo interno.
Controllo negativo	POSITIVO	<b>Risultato del controllo non corretto. Risultato del paziente non refertabile.</b> Come prima opzione per identificare la causa del fallimento ripetere i test di controllo. Se i fallimenti del controllo sono ripetuti contattare l'Assistenza Tecnica Meridian al numero 1-800-343-3858 (USA) o il proprio Distributore Locale (in Italia, +390331433636)
	NEGATIVO	Risultato di controllo negativo valido. Reagenti attivi al momento dell'uso, corretto funzionamento del lettore Alethia.
	NON VALIDO	<b>Nessun risultato refertabile. Ripetere l'intera seduta di analisi usando i campioni originali.</b> Preparazione del campione non corretta, deterioramento del reagente, guasto dello strumento o fallimento del controllo interno.
POZZETTO VUOTO	NESSUNO	Nessun Dispositivo Test Alethia nel pozzetto del lettore Alethia. <b>OPPURE</b> Il Dispositivo Test Alethia presente è compromesso a causa di un errore nella preparazione del campione, dispositivo sporco o dispositivo non correttamente alloggiato. <b>Ripetere il test utilizzando il campione originale.</b>

## CONTROLLO DI QUALITÀ

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

- Ogni dispositivo contiene una camera di controllo interna che controlla l'inibizione dell'amplificazione, i reagenti dell'analisi e l'efficacia nella manipolazione del campione.
- La fase di trattamento termico viene monitorata con un termometro esterno e con un timer a intervalli. Utilizzare la memoria di temperatura max/min del termometro per garantire il mantenimento di una temperatura di  $95 \pm 5$  C. Usare il timer a intervalli per garantire che la durata del trattamento termico sia di  $10 \pm 2$  minuti.
- La buona pratica di laboratorio raccomanda l'uso di materiali di controllo. Gli operatori devono attenersi alle pertinenti linee guida federali, statali e locali riguardanti l'utilizzo dei controlli di qualità esterni.
- Il reagente di Controllo Positivo Esterno Alethia Mycoplasma Direct è disponibile separatamente (numero di catalogo 479890). L'Apparato di Preparazione dei Campioni II / Reagente di Controllo Negativo III, fornito nel kit Alethia Mycoplasma Direct (numero di catalogo 480250) può essere utilizzato come Controllo Negativo Esterno. Si raccomanda di verificare la reattività del kit al momento della ricezione e prima dell'utilizzo per ogni nuovo lotto e per ogni nuova spedizione. I test di controllo esterni vanno quindi eseguiti in conformità alle linee guida statali e locali vigenti in materia. Il kit Alethia Mycoplasma Direct non va utilizzato per l'analisi dei pazienti se i controlli esterni non producono i risultati corretti.
- È necessario utilizzare un Dispositivo Test differente per ciascun reagente di controllo esterno.

## VALORI ATTESI

L'incidenza di *Mycoplasma pneumoniae* è stata stabilita nel corso di studi clinici condotti nel periodo 2015-2016. La prevalenza complessiva di *M. pneumoniae* in campioni da tamponi faringei prospettici è risultata essere pari al 7,5% (34/456). Di seguito è riportata la prevalenza in base all'età dei pazienti.

Età paziente	Totale positivo	Totale campioni	Prevalenza (%)
Da 0 a 1 mese	0	7	0,0%
Da 2 mesi a 2 anni	5	157	3,2%
Da 3 anni a 12 anni	22	147	15,0%
Da 13 anni a 21 anni	5	38	13,2%
Da 22 anni a 65 anni	2	86	2,3%
> 65 anni	0	21	0,0%

## LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

- Questo prodotto può essere usato solo con lo strumento Alethia.
- Il test per il DNA Alethia Mycoplasma Direct è un test qualitativo e non fornisce valori quantitativi o informazioni relative alla carica dell'organismo.
- Questo dispositivo non è stato valutato per monitorare il trattamento delle infezioni da *Mycoplasma pneumoniae*.

4. Le infezioni del tratto respiratorio possono essere causate da *Mycoplasma pneumoniae* come pure da altri patogeni. I risultati positivi non precludono co-infezioni da parte di altri patogeni del tratto respiratorio.
5. Le prestazioni del test Alethia Mycoplasma Direct sono state determinate esclusivamente con campioni prospettici da tamponi faringei umani. Non sono state determinate le prestazioni per altri tipi di campioni (campioni nasofaringei, campioni di soggetti immunocompromessi o di pazienti asintomatici).
6. Il rilevamento degli acidi nucleici dipende dall'adeguatezza delle procedure di prelievo, manipolazione, trasporto, conservazione e preparazione dei campioni. Il mancato rispetto della procedura appropriata per ciascuna di queste fasi può portare a risultati errati.
7. La prevalenza dell'infezione da *M. pneumoniae* influenzerà il valore predittivo del test.
8. È possibile che gli acidi nucleici degli organismi persistano *in vivo* indipendentemente dalla vitalità degli organismi stessi. Il rilevamento del DNA target dell'analisi potrebbe non implicare la presenza dell'organismo responsabile dei sintomi clinici. Il test Alethia Mycoplasma Direct non è in grado di distinguere tra soggetti portatori e soggetti infetti.
9. I risultati devono essere interpretati unitamente all'anamnesi, ai dati epidemiologici e alle altre informazioni a disposizione del medico. Come per tutti i test molecolari vale quanto segue: (A) i risultati falsi negativi possono verificarsi in presenza di inibitori, errori tecnici, scambio di campioni o basso numero di organismi nel campione clinico; (B) i risultati falsi positivi possono verificarsi in presenza di contaminazione crociata da parte degli organismi bersaglio, dei rispettivi acidi nucleici o del prodotto di amplificazione, nonché a causa di segnali aspecifici.
10. I decongestionanti nasali contenenti fenilefrina HCl a concentrazioni superiori a 0,595 mg/mL possono produrre risultati falsi negativi nel caso di campioni debolmente positivi.
11. Il sangue intero a concentrazioni superiori al 2% può interferire con il test Alethia Mycoplasma Direct.
12. E' stato osservato che i dispositivi di raccolta Starplex possono generare una maggior percentuale di risultati invalidi se utilizzati in combinazione con il test Alethia Mycoplasma Direct.

#### PRESTAZIONI SPECIFICHE

Le caratteristiche prestazionali del test di amplificazione del DNA Alethia Mycoplasma Direct sono state definite nel corso di studi clinici condotti nel periodo 2015-2016 presso laboratori indipendenti che rappresentano tre distinte regioni geografiche degli Stati Uniti. Le caratteristiche prestazionali del test sono state confrontate con un metodo diagnostico molecolare *in vitro* di riferimento, il test di amplificazione del DNA Alethia Mycoplasma (Meridian Bioscience, Inc., Cincinnati, OH). Sono stati valutati 458 campioni prospettici, resi anonimi, di tamponi faringei prelevati dopo consenso informato da pazienti sintomatici maschi e femmine. Due campioni (0,4%) sono stati esclusi dalla popolazione di campioni clinici a causa di un errore dello strumento durante l'analisi (1) o di un tipo di campione inaccettabile (1), ottenendo così un totale di 456 campioni idonei all'analisi. Non sono stati generati risultati non validi mediante il test Alethia Mycoplasma Direct durante lo studio clinico (0,0%; IC 95%: 0,0-0,8%). Le caratteristiche prestazionali del test Alethia Mycoplasma Direct sono riassunte di seguito.

Alethia Mycoplasma Direct	Alethia Mycoplasma			
	Positivo	Negativo	Non valido	Totale
Positivo	24	10 <sup>a</sup>	0	34
Negativo	1 <sup>b</sup>	421	0	422
Non valido	0	0	0	0
Totale	25	431	0	456
				<b>IC 95%</b>
Percentuale di concordanza positivi	24/25	96,0%		80,5-99,3%
Percentuale di concordanza negativi	421/431	97,7%		95,8-98,7%
Percentuale di concordanza complessiva	445/456	97,6%		95,7-98,6%
Tasso di invalidità	0/456	0,0%		0,0-0,8%

<sup>a</sup> 4 campioni su 10 sono stati identificati come positivi dal test per Alethia Mycoplasma dopo l'analisi di un ulteriore campione congelato.

<sup>b</sup> La ripetizione dell'analisi con il test Alethia Mycoplasma sul campione originale e su un campione congelato aggiuntivo ha generato risultati negativi.

La popolazione di campioni idonea allo studio includeva campioni di tamponi faringei provenienti da pazienti pediatrici, adulti e geriatrici di età compresa fra 3 settimane e 97 anni. Non si sono rilevate differenze nelle prestazioni del test dovute all'età dei pazienti. La popolazione dello studio includeva 230 (50,4%) pazienti di sesso femminile e 226 (49,6%) pazienti di sesso maschile. Non si sono rilevate differenze nelle prestazioni del test dovute al sesso dei pazienti.

#### SENSIBILITÀ ANALITICA

La sensibilità analitica o limite di rilevabilità per il test Alethia Mycoplasma Direct è stata determinata per due ceppi di *M. pneumoniae* (FH e M129). Il limite di rilevamento è stato determinato usando un minimo di 20 replicati per ciascuna quantità da misurare e una probabilità fissa di ottenere risposte positive (ad es., 95%, dove 19 su 20 replicati sono positivi). L'analisi della sensibilità analitica è sintetizzata sotto:

Ceppo di <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	UFC/mL
FH (ATCC 15531)	2350
M129 (ATCC 29342)	200

#### REATTIVITÀ DEL TEST

I seguenti ceppi di *M. pneumoniae* sono stati analizzati con il test Alethia Mycoplasma e hanno prodotto reazioni positive al limite di rilevamento del test, pari a 2350 UFC/mL, o al di sotto di esso:

PI 1428 (ATCC 29085), MAC (ATCC 15492), M52 (ATCC 15293), Bru (ATCC 15377), M129-B170 (ATCC 29343), Mutante 22 (ATCC 39505) UAB 55612, UAB 56317, UMTB-10G (ATCC 49899). L'analisi ha dimostrato che con il test vengono rilevati sia i ceppi di tipo 1 che i ceppi di tipo 2. La stessa reattività è attesa con il test Alethia Mycoplasma Direct.

## RIPRODUCIBILITÀ

Per gli studi di riproducibilità, sono stati forniti a tre laboratori indipendenti pannelli codificati in cieco di 10 campioni. I campioni sono stati ordinati casualmente all'interno di ciascun pannello per mascherare le identità dei campioni. I pannelli includevano campioni artificiali prodotti come campioni positivi bassi (ossia, vicino al limite di rilevamento, n=3), campioni positivi moderati, (n=3) e campioni negativi alti (n=3). Il pannello includeva altresì un campione negativo naturale. L'analisi è stata condotta da diversi operatori in ciascun laboratorio lo stesso giorno (variabilità intra-analisi) per cinque giorni (variabilità inter-analisi). In questo studio sono stati utilizzati tre lotti di test Alethia Mycoplasma Direct e otto strumenti Alethia. I controlli positivi e negativi sono stati analizzati con ciascun pannello. I risultati sono illustrati nella tabella seguente:

Tipo di campione	Laboratorio 1		Laboratorio 2		Laboratorio 3		Totale	
	Percentuale di concordanza		Percentuale di concordanza		Percentuale di concordanza		Percentuale di concordanza	
Negativo alto	30/30	100,0%	30/30	100,0%	30/30	100,0%	90/90	100,0%
Positivo basso	30/30	100,0%	30/30	100,0%	29/30	96,7%	89/90	98,9%
Positivo moderato	30/30	100,0%	30/30	100,0%	30/30	100,0%	90/90	100,0%
Negativo	9/10	90,0%	10/10	100,0%	10/10	100,0%	29/30	96,7%
Controllo negativo	10/10	100,0%	10/10	100,0%	10/10	100,0%	30/30	100,0%
Controllo positivo	10/10	100,0%	10/10	100,0%	10/10	100,0%	30/30	100,0%

## CROSS-REATTIVITÀ

Gli studi di crossreattività sono stati eseguiti in precedenza con il test Alethia Mycoplasma. Campioni biologici positivi e negativi sono stati inoculati con organismi batterici o funghi potenzialmente interferenti a concentrazioni finali di  $1,0 \times 10^5$  UFC/mL. I virus sono stati analizzati a concentrazioni superiori a  $1,0 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL o  $1,0 \times 10^6$  copie/mL. Il DNA umano è stato analizzato a 2,0 ng/test e non è stata osservata alcuna reattività crociata. I campioni biologici positivi contenevano concentrazioni di *M. pneumoniae* vicine al limite di rilevamento. Nessuno dei seguenti organismi o materiali è stato identificato come cross-reattivo o interferente con il test Alethia Mycoplasma:

*Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Actinomyces odontolyticus*, *Bacillus subtilis*, *Bacteroides fragilis*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella pertussis*, *Burkholderia cepacia*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium difficile*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* (ESBL), *Fusobacterium nucleatum*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* (KPC), *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Moraxella catarrhalis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Neisseria cinerea*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Nocardia asteroides*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella paratyphi* (gruppo A), *Salmonella typhimurium* (gruppo B), *Serratia liquefaciens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* (gruppo B), *Streptococcus anginosus* (gruppo F), *Streptococcus bovis* (gruppo D), *Streptococcus canis* (gruppo G), *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus salivarius*, *Ureaplasma urealyticum*, Adenovirus, Coronavirus, Coxsackievirus, Cytomegalovirus, virus di Epstein Barr, virus Herpes simplex 1, virus Herpes simplex 2, metapneumovirus umano, Influenza A, Influenza B, virus della Parainfluenza 1, virus della Parainfluenza 2, virus della Parainfluenza 3, RSV A, RSV B, Rhinovirus, DNA umano. Nessuna cross reattività è attesa con il test Alethia Mycoplasma Direct.

## ANALISI DI SOSTANZE INTERFERENTI

Le sostanze potenzialmente interferenti sono state analizzate con campioni simulati negativi e falsi forzati positivi (ceppi M129 e FH di *M. pneumoniae*). Le seguenti sostanze, alle specifiche concentrazioni di solvente/diluente saturate, non interferiscono con i risultati del test Alethia Mycoplasma Direct:

acetaminofene (18,1 mg/mL), albuterolo solfato (20 mg/mL), aspirina (9,1 mg/mL), azitromicina deidrato (2,0 mg/mL), Cepacol® collutorio [(alcolol 1,4% v/v), cetilpiridinio cloruro (0,005% v/v)], compresse Contac® raffreddore + influenza [acetaminofene (14,8 mg/mL), clorfeniramina maleato (0,06 mg/mL), fenilefrina HCl (0,15 mg/mL)], difenidramina HCl (2,6 mg/mL), eritromicina (20,0 mg/mL), HALLS® gocce per la tosse [mentolo (0,06 mg/mL)], ibuprofene (12,7 mg/mL), fenilefrina HCl (0,595 mg/mL), prednisone (20,0 mg/mL), \*Robitussin® sciroppo per la tosse + congestione toracica [dextrometorfano HBr (0,20 mg/mL), guaifenesina (2,0 mg/mL)], spray nasale con fisiologica [cloruro di sodio (0,65 mg/mL)], muco (5,0 mg/mL) e leucociti (0,5% v/v).

È stato verificato che il sangue intero produce risultati non validi se presente in concentrazioni superiori al 2%.

La fenilefrina HCl a concentrazioni superiori a 0,595 mg/mL può produrre risultati falsi negativi nel caso di campioni debolmente positivi.

\* Lo sciroppo per la tosse Robitussin® Tosse + Congestione ha inizialmente dato origine ad 1 risultato invalido su 3 con un Campione Positivo P2, che una volta ripetuto ha dato origine a risultati accettabili (1 su 1 positivo). Lo sciroppo Robitussin® Tosse + Congestione non è considerato un interferente.

# alethia™

## Mycoplasma Direct DNA Amplification Assay

### Test d'amplification de l'ADN pour la détection de *Mycoplasma pneumoniae* dans des prélèvements humains de gorge sur écouvillon

REF 480250

IVD

Rx Only

#### BUT DE LA METHODE

Le test d'amplification de l'ADN Alethia Mycoplasma Direct, réalisé sur l'instrument Alethia, est un test qualitatif de diagnostic in vitro pour la détection directe de l'ADN de *Mycoplasma pneumoniae* dans des écouvillons de gorge humains prélevés chez des patients suspectés de présenter une infection à *Mycoplasma pneumoniae*.

Le test Alethia Mycoplasma Direct utilise la technologie d'amplification génique isotherme (LAMP, loop-mediated isothermal DNA amplification) pour détecter *Mycoplasma pneumoniae* en ciblant un segment du génome de *Mycoplasma pneumoniae*.

Les résultats du test d'amplification de l'ADN Alethia Mycoplasma Direct doivent être utilisés conjointement avec le tableau clinique, les autres résultats de laboratoire et les facteurs de risque épidémiologique en tant qu'aide au diagnostic de l'infection à *Mycoplasma* et ils ne doivent pas être utilisés seuls pour le traitement ou une autre prise en charge du patient. Les résultats positifs n'excluent pas une co-infection par d'autres organismes, et les résultats négatifs obtenus chez des personnes atteintes d'infections des voies respiratoires peuvent être dus à des pathogènes n'étant pas détectés par ce test. Les infections des voies respiratoires basses dues à *M. pneumoniae* peuvent ne pas être détectées par ce test. Si une infection des voies respiratoires basses due à *M. pneumoniae* est suspectée, des analyses de laboratoire supplémentaires utilisant des procédés autres que le test d'amplification de l'ADN Alethia Mycoplasma Direct peuvent être nécessaires.

#### RESUME ET EXPLICATION DU TEST

Le test d'amplification de l'ADN Alethia Mycoplasma Direct repose sur la technique d'amplification génique isotherme (LAMP).<sup>1,2</sup> Il vise une séquence de 208 paires de base (pb) du génome *Mycoplasma pneumoniae*. La séquence d'ADN cible se situe dans le gène de la protéine analogue à la protéase intracellulaire et elle se retrouve dans toutes les séquences comprenant vingt génomes de *Mycoplasma pneumoniae*.

L'amplification génique isotherme utilise des amorces spécialement conçues pour obtenir une amplification isotherme et continue de l'ADN. Le pyrophosphate de magnésium est un produit secondaire de cette amplification et forme un précipité blanc qui trouble la solution de réaction. Les caractéristiques d'absorbance de la solution de réaction sont suivies par l'incubateur/lecteur Alethia de Meridian. La présence de l'ADN cible est signalée par la modification des caractéristiques d'absorbance de la solution de réaction en raison de la précipitation de pyrophosphate de magnésium. En l'absence de l'ADN cible, aucune modification significative de l'absorbance de l'échantillon n'est observée.

Le kit Alethia Mycoplasma Direct comprend un Système de préparation des échantillons II Alethia / Contrôle Négatif III (SMP PREP), des dispositifs de test Alethia Mycoplasma Direct et des tubes de traitement thermique. Le Système de préparation Alethia, utilisé pour la dilution et la préparation des échantillons, est une solution tamponnée qui contient des cellules *E. coli* traitées au formol abritant de l'ADN de *Staphylococcus aureus*. Le dispositif de test Alethia Mycoplasma Direct contient une bille de réactif d'amplification lyophilisée dans chacune des puits: un puits TEST comprenant des amorces spécifiques du *Mycoplasma* et un puits CONTRÔLE comprenant des amorces spécifiques de *S. aureus*. L'ADN de *S. aureus* du réactif de contrôle et les amorces spécifiques de *S. aureus* dans le puits CONTRÔLE jouent le rôle de contrôle interne du dosage. Au cours de la préparation des spécimens, chaque échantillon de patient est ajouté au Système de préparation de l'échantillon II et combiné à l'ADN de *S. aureus* avant amplification. L'ajout d'ADN de *S. aureus* à l'échantillon du patient permet de traiter en parallèle l'ADN cible et l'ADN de contrôle par la préparation, l'amplification et de la détection de l'échantillon. Le contrôle interne permet de déceler un problème d'inhibition de l'amplification et l'efficacité des réactifs du test ou du traitement des échantillons. La cible de contrôle de *S. aureus* doit être amplifiée et détectée dans la réaction finale. Dans le cas contraire, le test est considéré comme étant non valide et les résultats du patient ne sont pas présentés.

L'instrument Alethia suit les modifications des caractéristiques d'absorbance en mesurant la transmission de la lumière à travers les solutions de réaction de test et de contrôle. La transmission de la lumière est contrôlée au début (Signal<sub>initial</sub>, S) et à la fin (Signal<sub>final</sub>, Sf) de l'exécution du test. L'instrument Alethia calcule la variation de la transmission de la lumière entre le début et la fin de l'exécution du test (Sf:S) et il compare le rapport à une valeur seuil prédéfinie.

Des valeurs seuil prédéfinies pour le puits TEST sont utilisées pour présenter les résultats des échantillons. Les rapports Sf:S inférieurs à 82 % dans le puits TEST sont présentés en résultat « POSITIF »; les rapports Sf:S supérieurs ou égaux à 82 % dans le puits TEST sont présentés en résultat « NÉGATIF ». Les valeurs numériques ne sont pas présentées.

Des valeurs seuil prédéfinies pour le puits CONTRÔLE sont utilisées pour confirmer la validité du test. Les rapports Sf:S inférieurs à 90 % dans le puits CONTRÔLE sont considérés comme valides et conduisent au rendu des résultats du puits TEST (POSITIF, NÉGATIF). Les rapports Sf:S supérieurs ou égaux à 90 % dans le puits CONTRÔLE sont considérés comme non valides et empêchent le rendu des résultats pour le puits TEST. Les puits CONTRÔLE non valides entraînent un résultat patient "NON VALIDE". Les valeurs numériques ne sont pas présentées.

Des critères d'exclusion plus sévères sont appliqués à la réaction du puits CONTRÔLE pour s'assurer que l'amplification n'est pas inhibée, que les réactifs fonctionnent comme prévu et que l'échantillon a été traité de manière appropriée.

## PRINCIPE DU TEST

*Mycoplasma pneumoniae* est une cause fréquente d'infections des voies respiratoires hautes et basses chez l'homme, notamment la pharyngite, la bronchite aiguë et la pneumonie.<sup>3</sup> Le *Mycoplasma* a été identifié en tant que pathogène humain dans les années 1960, *Mycoplasma pneumoniae* étant le mieux connu et le plus étudié.<sup>4</sup> *pneumoniae* présente une membrane cellulaire à trois couches plutôt qu'une paroi cellulaire structurée.<sup>4</sup> Celle-ci empêche l'identification par les procédés traditionnels de coloration de Gram et de visualisation au microscope optique.

*M. pneumoniae* a été associé à une proportion de pneumonies communautaires pouvant atteindre 40 %.<sup>3,4</sup> L'infection se produit chez les enfants comme chez les adultes, sans restriction de localisation géographique, de sexe ou de climat.<sup>4,7</sup> *M. pneumoniae* est généralement associé à une pneumonie atypique, présentant des symptômes qui comprennent notamment les céphalées, les maux de gorge, la fièvre et le mal de gorge, accompagnés d'une toux sèche paroxystique.<sup>4,5,7</sup> La pneumonie à mycoplasme présente généralement une évolution clinique bénigne et elle guérit spontanément, mais elle a été associée à un taux de mortalité d'environ 1,4 %.<sup>5</sup> Le nombre annuel d'infections à *M. pneumoniae* est estimé à 2 millions de cas, avec environ 100 000 hospitalisations liées à la pneumonie aux États-Unis chaque année.<sup>6</sup> On estime que 18 % des cas de pneumonie communautaire nécessitant une hospitalisation chez les enfants sont provoqués par *M. pneumoniae*.<sup>4</sup>

La transmission de *M. pneumoniae* se produit généralement de personne à personne par les aérosols avec une période d'incubation signalée comprise entre une et quatre semaines.<sup>6</sup> Comme les patients atteints d'infection active sont porteurs de *Mycoplasma* dans le nez, la gorge, la trachée et les expectorations, la dissémination de la maladie est facilitée par la toux qui l'accompagne.<sup>4</sup> Ce mode de transmission se prête à des épidémies dans des structures à contact personnel rapproché, telles que les écoles, les casernes militaires, les entreprises, les camps d'été, les universités ou les instituts. De la même manière, la maladie se transmet fréquemment entre les membres d'une famille vivant dans le même foyer.<sup>4,7</sup>

Le diagnostic de l'infection aiguë à *M. pneumoniae* est difficile. Les stratégies de base du diagnostic en pratique clinique comprennent la culture et la sérologie. La culture de *M. pneumoniae* est souvent inadaptée à la prise en charge du patient, car l'organisme peut nécessiter une durée pouvant atteindre six semaines pour être cultivé.<sup>3</sup> Les produits de sérologie sont largement répandus et offrent des solutions pratiques de diagnostic. Cependant leur capacité à détecter une infection aiguë peut être limitée. Les tests sérologiques ciblent souvent des anticorps IgM et IgG spécifiques. Les anticorps IgM ne sont généralement pas détectables pendant les sept premiers jours d'apparition des symptômes, et ils peuvent persister pendant des mois après une infection active.<sup>4</sup> Les études indiquent que moins de 50 % des patients atteints d'une infection aiguë présentent une réponse positive aux IgG.<sup>4</sup>

Les nouvelles techniques de diagnostic, notamment les procédés d'amplification de l'ADN, peuvent permettre un diagnostic plus rapide et une identification plus précoce des épidémies pour la prévention des cas secondaires par la mise en œuvre de mesures de contrôle.<sup>6</sup>

## MATERIEL FOURNI

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

1. **Système de préparation des échantillons II / Contrôle Négatif III (SMP PREP) Alethia:** solution tamponnée Tris contenant des *E. coli* traités au formaldéhyde et contenant de l'ADN de *S. aureus* ainsi que de l'azide de sodium (0,09 %) comme agent de conservation.
2. **Dispositif de test Alethia Mycoplasma:** dispositif à deux puits contenant les réactifs d'amplification lyophilisés (ADN polymérase, désoxynucléotide triphosphates) et, soit des amorces spécifiques de *Mycoplasma* (puits TEST), soit des amorces de contrôle (puits CONTRÔLE).
3.  **Tubes de traitement thermique Alethia.**

## MATERIEL FOURNI SEPARÉMENT

1. Kit de contrôle externe Alethia Mycoplasma Direct, numéro de référence: 479890

## MATERIEL NON FOURNI

1. Gants jetables en latex, non poudrés
2. Embouts de pipettes résistant aux aérosols, exempts de DNase/RNase
3. Prélèvement des échantillons et matériel de transport :
  - **Écouvillons avec tige en plastique cassable (écouvillon simple ou double):** polyester, nylon floqué ou rayoné
  - **Milieu de transport non nutritif sur éponge** (volume maximum : 1,2 mL): liquide Amies (sans charbon) ou Liquide de Stuart

## EQUIPEMENT NON FOURNI

1. Bain à sec pour tube de 12 mm pouvant atteindre 95 C
2. Thermomètre numérique avec mémoire de température maximale/minimale (par ex., thermomètre étanche/antichoc Traceable® Lollipop™)
3. Agitateur-mélangeur Vortex
4. Minuteur
5. Micropipette(s) pouvant distribuer 50 µL
6. Alethia Lecteur, Meridian Bioscience, Inc., numéro de référence: 610189

## PRECAUTIONS D'EMPLOI

1. Tous les réactifs sont pour un usage diagnostique in vitro.
2. Les écouvillons à mini-embouts (capacité d'absorbance inférieure à 60 µL) ne sont pas acceptables pour le prélèvement d'échantillons Alethia Mycoplasma Direct.
3. Ne pas intervertir les systèmes de préparation des échantillons ou les dispositifs de test entre les lots. Les tubes de traitement thermique sont interchangeables à condition de se trouver dans les limites de dates de péremption au moment de leur utilisation.
4. Respecter les recommandations de biosécurité de niveau 2 et les bonnes pratiques de laboratoire pendant l'analyse.<sup>8</sup> Traiter tous les échantillons et tous les dispositifs de tests usagés comme 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.
5. Porter des gants jetables lors de la manipulation des échantillons. Se laver minutieusement les mains après la manipulation. Changer souvent de gants.
6. Des programmes de contrôle de qualité pour laboratoires d'analyse moléculaire doivent être utilisés.<sup>9</sup> Pour éviter le risque de faux positifs dus à la contamination par un organisme ou un amplicon, prendre des mesures de prévention (par ex., nettoyer la zone de travail avec un nettoyant approprié qui détruit l'acide nucléique, utiliser uniquement des embouts de pipette ne créant pas d'aérosols, manipuler un seul échantillon à la fois) comme l'exigent les bonnes pratiques moléculaires.
7. Le dispositif de test Alethia Mycoplasma contient des réactifs lyophilisés. Ne pas retirer la pochette de protection avant d'être prêt à effectuer le test.
8. Le dispositif de test Alethia Mycoplasma est muni d'un loquet conçu pour éviter la contamination de la zone de test avec le produit d'amplification. NE PAS utiliser de dispositif de test dont le loquet serait brisé.

9. Jeter les dispositifs de test Alethia utilisés 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 risque de contaminer la zone de test avec le produit d'amplification.

#### DANGER ET MISES EN GARDE

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

#### DUREE DE CONSERVATION ET STOCKAGE

La date d'expiration figure sur l'étiquette du kit. Stocker les composants du kit à la température indiquée sur l'étiquette.

#### PRÉPARATION DES REACTIFS

S'assurer que les réactifs du kit sont à la température ambiante (19 à 29 C) avant leur emploi. Si les réactifs ne sont pas à la température ambiante avant l'emploi, les résultats pourraient être erronés.

#### PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

**Type d'échantillon:** prélèvement de gorge sur écouvillon.

**Prélèvement des échantillons:** le prélèvement des échantillons doit être effectué conformément aux directives de l'établissement pour le recueil des écouvillonnages de gorge. Les échantillons doivent être recueillis en frottant vigoureusement l'écouvillon sur les amygdales et la partie postérieure du pharynx. Le ou les écouvillonnages doivent être recueillis avec les types appropriés d'écouvillon (par ex., en rayonne, nylon floqué ou polyester). **REMARQUE: les écouvillons à mini-embouts (capacité d'absorbance inférieure à 60 µL) ne sont pas acceptables pour le prélèvement d'échantillons.**

Placer l'écouvillon dans un milieu de transport non nutritif (par ex., des milieux Amies liquide sans charbon, Liquide de Stuart) contenu dans du matériel absorbant/éponge et le transporter au laboratoire. Les échantillons doivent être conservés entre 2 et 29°C pendant le transport.

Les échantillons peuvent être conservés à température ambiante (19 et 29 C) jusqu'à 24 heures avant d'être analysés. Si l'on ne commence pas l'analyse dans ce délai, on peut conserver l'échantillon à une température de 2 à 8 C pendant 14 jours maximum avant analyse.

#### PREPARATION DES ECHANTILLONS

**REMARQUE:** s'assurer que l'instrument Alethia est sous tension et que la vérification de ses performances a été effectuée avant le commencement de la PRÉPARATION DES ECHANTILLONS. Consulter le manuel de l'utilisateur du lecteur Alethia pour obtenir de plus amples renseignements sur l'installation et le fonctionnement de l'appareil.

1. Ajouter un seul écouvillon de gorge au SMP PREP Alethia. Briser la tige de l'écouvillon. Remettre en place et bien fermer le bouchon du SMP PREP. Passer le SMP PREP au Vortex pendant au moins 10 secondes.
2. Enlever le bouchon de l'embout du SMP PREP et presser pour faire tomber 5 à 10 gouttes d'échantillon dans un tube de traitement thermique Alethia propre.
3. Recommencer les étapes de préparation des échantillons pour tous les échantillons à traiter.
4. Traiter chaque mélange échantillon contrôle dans un bain thermique à sec à 95 ± 5 C pendant 10 ± 2 min. Surveiller l'étape de traitement thermique à l'aide d'un thermomètre numérique et d'un minuteur.
5. Retirer chaque tube de traitement thermique du bain sec/bloc chauffant. Les échantillons ayant été traités thermiquement peuvent être conservés entre 19 et 29 C pendant un maximum de 3 heures pour une éventuelle répétition du test. **REMARQUE: si les échantillons ayant été traités thermiquement sont stockés avant analyse, le traitement thermique doit être répété (95 ± 5 °C pendant 10 ± 2 min) conformément à l'étape 4.**

#### PROCEDURE DE TEST

**REMARQUE:** L'Incubateur/Lecteur Alethia peut traiter un maximum de 10 dispositifs de test par série. Consulter le manuel de l'utilisateur du lecteur Alethia pour obtenir de plus amples renseignements sur l'installation et le fonctionnement de l'appareil.

1. Passer au Vortex les échantillons traités thermiquement pendant environ 10 secondes.
2. Retirer 1 dispositif de test Alethia Mycoplasma de sa pochette de protection par 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 sur un support adapté pour le recevoir.
3. À l'aide d'une micropipette, transférer 50 µL d'échantillon traité thermiquement dans le puits TEST (gauche / bille blanche), puis transférer 50 µL d'échantillon traité thermiquement dans le puits CONTRÔLE (droite / bille jaune) du dispositif de test Alethia. Ne pas mélanger les mélanges réactionnels à la pipette. Veiller à ne pas introduire d'air dans le mélange réactionnel.
4. Tapoter le dispositif sur la paillasse ou mélanger pour éliminer les bulles d'air. Observer soigneusement la dissolution de la bille de contrôle/ test du dispositif de test, rechercher la présence de bulles d'air dans le tube et de liquide au sommet du dispositif. En cas de billes non dissoutes, de bulles d'air ou de liquide, tapoter le dispositif sur le dessus de la paillasse et répéter l'examen visuel. L'amplification et la détection doivent commencer dans les 15 minutes.
5. Insérer chaque dispositif de test Alethia dans le lecteur Alethia et lancer la réaction d'amplification et la détection. Les résultats seront affichés à la fin de l'exécution du test.

## INTERPRETATION DES RESULTATS

ID échantillon	Résultats indiqués	Interprétation
Échantillon du patient	POSITIF	L'échantillon contient de l'ADN cible de <i>Mycoplasma pneumoniae</i> .
	NÉGATIF	Aucun ADN de <i>Mycoplasma pneumoniae</i> n'a été détecté.
	NON VALIDE	<b>Résultat non exploitable. Recommencer le test à l'aide des échantillons originaux.</b> Échantillon de patient inhibiteur, mauvaise préparation des échantillons, échec du réactif, panne 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 du lecteur Alethia.
	NÉGATIF	<b>Résultat de contrôle incorrect. Résultats de patient non exploitables.</b> La première étape pour déterminer la cause de l'échec est de répéter les tests de contrôle. Contacter le Service Technique de Meridian Bioscience ou son distributeur local pour assistance si les résultats de contrôle escomptés ne sont pas observés de façon répétée.
	NON VALIDE	<b>Résultat non exploitable. Recommencer l'intégralité de l'analyse à l'aide des échantillons originaux.</b> Mauvaise préparation des échantillons, échec du réactif, panne de l'instrument ou échec du contrôle interne.
Contrôle négatif	POSITIF	<b>Résultat de contrôle incorrect. Résultats de patient non exploitables.</b> La première étape pour déterminer la cause de l'échec est de répéter les tests de contrôle. Contacter le Service Technique de Meridian Bioscience ou votre distributeur local pour assistance si les résultats de contrôle escomptés ne sont pas observés de façon répétée.
	NÉGATIF	Résultat de contrôle négatif valide. Réactifs actifs au moment de l'utilisation, fonctionnement correct du lecteur Alethia.
	NON VALIDE	<b>Résultat non exploitable. Recommencer l'intégralité de l'analyse à l'aide des échantillons originaux.</b> Mauvaise préparation des échantillons, échec du réactif, panne de l'instrument ou échec du contrôle interne.
PUITS VIDE	AUCUN	Aucun dispositif de test Alethia dans le puits du lecteur Alethia. <b>OU</b> Le dispositif de test Alethia présent ne répond pas en raison d'une mauvaise préparation des échantillons, de saleté ou d'un mauvais positionnement du dispositif. <b>Recommencer le test à l'aide des échantillons originaux.</b>

## CONTRÔLE 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 contrôle interne contrôlant l'inhibition de l'amplification, les réactifs de test et l'efficacité du traitement des échantillons.
- L'étape du traitement thermique est surveillée avec un thermomètre et un minuteur externes. Utiliser la mémoire des températures maximum/minimum du thermomètre pour vérifier qu'une température de  $95 \pm 5$  C est maintenue. Utiliser le minuteur pour vérifier que la durée du traitement thermique est de  $10 \pm 2$  minutes.
- Les bonnes pratiques de laboratoire recommandent l'emploi de matériels de contrôle. Les utilisateurs doivent suivre les directives locales, nationales ou fédérales appropriées relatives à l'exécution de contrôles de qualité externes.
- Le réactif de contrôle externe positif Alethia Mycoplasma Direct est fourni séparément (référence 479890). Le Système de préparation des échantillons II / réactif de contrôle négatif III fourni avec le kit Alethia Mycoplasma Direct (référence 480250) sert de contrôle négatif externe. Il est recommandé de vérifier la réactivité de chaque nouveau lot et de chaque nouvel envoi d'Alethia Mycoplasma Direct dès leur réception ou avant l'emploi. Les tests de contrôle externe doivent être exécutés par la suite conformément aux directives locales, nationales et fédérales. Le kit de test Alethia Mycoplasma Direct ne doit pas être utilisé pour tester les patients si les contrôles externes ne fournissent pas de résultats corrects.
- Utiliser un dispositif de test séparé pour chaque réactif de contrôle externe.

## VALEURS ATTENDUES

L'incidence globale de *Mycoplasma pneumoniae* a été définie au cours d'études cliniques réalisées en 2015 et 2016. La prévalence globale de *M. pneumoniae* dans les échantillons prospectifs de gorge sur écouvillon était de 7,5 % (34/456). La prévalence en fonction de l'âge du patient est indiquée ci-dessous.

Âge du patient	Total positifs	Total échantillons	Prévalence (%)
0 à 1 mois	0	7	0,0 %
2 mois à 2 ans	5	157	3,2 %
3 à 12 ans	22	147	15,0 %
13 à 21 ans	5	38	13,2 %
22 à 65 ans	2	86	2,3 %
> 65 ans	0	21	0,0 %

## LIMITES DU TEST

- Ce produit peut uniquement être utilisé avec l'instrument Alethia.
- Le test d'amplification génique Alethia Mycoplasma Direct est un test qualitatif qui ne fournit pas de valeurs quantitatives ou d'informations sur la charge en organismes.

3. Ce dispositif n'a pas été évalué pour le suivi du traitement des infections à *Mycoplasma pneumoniae*.
4. Les infections respiratoires peuvent être provoquées par *Mycoplasma pneumoniae* ainsi que par d'autres pathogènes. Des résultats positifs n'excluent pas une co-infection par d'autres pathogènes respiratoires.
5. La performance d'Alethia Mycoplasma Direct a été établie sur des écouvillonnages prospectifs de gorge humains uniquement. La performance du test n'a pas été établie pour d'autres types d'échantillons (échantillons nasopharyngés, échantillons prélevés chez des personnes immunodéprimées ou chez des patients asymptomatiques).
6. La détection de l'acide nucléique dépend d'un prélèvement, d'une manipulation, d'un transport, d'un stockage et d'une préparation adaptés. Le non-respect de la procédure appropriée lors de l'une de ces étapes peut entraîner des résultats incorrects.
7. La prévalence de l'infection à *M. pneumoniae* influence la valeur prédictive du test.
8. Les acides nucléiques de l'organisme peuvent persister *in vivo*, indépendamment de la viabilité de l'organisme. La détection de l'analyte cible d'ADN peut ne pas impliquer la présence d'agents responsables de symptômes cliniques. Le test Alethia Mycoplasma Direct ne fait pas la distinction entre les porteurs et les personnes infectées.
9. Les résultats doivent être interprétés conjointement avec les antécédents cliniques, les données épidémiologiques et les autres informations à disposition du médecin. Comme avec tous les tests moléculaires, (A) des résultats faussement négatifs peuvent se produire en raison de la présence d'inhibiteurs, d'erreurs techniques, de mélanges d'échantillons ou de faibles quantités d'organismes dans l'échantillon clinique; (B) des résultats faussement positifs peuvent se produire en raison de la présence d'une contamination croisée par des organismes cibles, leurs acides nucléiques ou leur produit amplifié, et en raison de signaux non spécifiques.
10. Les décongestionnants nasaux contenant de l'hydrochlorure de phényléphrine à des concentrations supérieures à 0,595 mg/mL, peuvent produire des résultats faussement négatifs avec des échantillons faiblement positifs.
11. Le sang total à des concentrations supérieures à 2 %, peut interférer avec le test Alethia Mycoplasma Direct.
12. Il a été observé un taux de résultats non valides plus élevé avec le test Alethia Mycoplasma Direct lorsque le dispositif de collecte Starplex est utilisé.

#### PERFORMANCES DU TEST

Les caractéristiques de performance du test d'amplification de l'ADN Alethia Mycoplasma Direct ont été évaluées dans des tests cliniques réalisés en 2015 et 2016 par des centres de tests cliniques indépendants représentant trois régions géographiquement distinctes à travers les États-Unis. Les caractéristiques de performance du test ont été comparées à celles d'une méthode de référence en diagnostic moléculaire *in vitro*, le test d'amplification de l'ADN Alethia Mycoplasma (Meridian Bioscience, Inc., Cincinnati, OH). Un total de 458 échantillons prospectifs de gorge sur écouvillon, sans identification, prélevés avec le consentement éclairé de patients symptomatiques masculins et féminins, ont été évalués. Deux échantillons (0,4 %) ont été exclus de la population d'échantillons cliniques en raison d'une erreur instrument pendant l'analyse (1) ou d'un type d'échantillon non acceptable (1) sur un total de 456 échantillons éligibles pour l'analyse. Le test Alethia Mycoplasma Direct n'a généré aucun résultat non valide pendant l'étude clinique (0,0 % ; IC à 95 % : 0,0 à 0,8 %). Les caractéristiques de performance du test Alethia Mycoplasma Direct sont résumées ci-dessous.

Alethia Mycoplasma				
Alethia Mycoplasma Direct	Positif	Négatif	Non valide	Total
Positif	24	10 <sup>a</sup>	0	34
Négatif	1 <sup>b</sup>	421	0	422
Non valide	0	0	0	0
Total	25	431	0	456
				<b>IC à 95 %</b>
Pourcentage de concordance positive	24/25	96,0 %		80,5 à 99,3 %
Pourcentage de concordance négative	421/431	97,7 %		95,8 à 98,7 %
Concordance globale en pourcentage	445/456	97,6 %		95,7 à 98,6 %
Taux de résultats non valides	0/456	0,0 %		0,0 à 0,8 %

<sup>a</sup> 4 échantillons sur 10 ont été identifiés positifs par le test Alethia Mycoplasma après analyse avec un échantillon congelé supplémentaire.

<sup>b</sup> La répétition du test avec Alethia Mycoplasma sur l'échantillon d'origine du patient et un échantillon congelé supplémentaire a produit des résultats négatifs.

La population éligible à l'étude comprenait les écouvillonnages de gorge de patients enfants, adultes et gériatriques, âgés de 3 semaines à 97 ans. Les résultats du test n'ont pas été affectés par l'âge des patients. La population de l'étude comprenait les échantillons de 230 (50,4 %) patientes (femmes) et 226 (49,6 %) patients (hommes). Les résultats du test n'ont pas été affectés par le sexe des patients.

#### SENSIBILITE ANALYTIQUE

La sensibilité analytique ou Limite de détection du test Alethia Mycoplasma Direct a été déterminée pour deux souches de *M. pneumoniae* (FH et M129). La limite de détection a été déterminée à l'aide d'un minimum de 20 réplicats pour chaque mesure et d'une probabilité déclarée (par ex., 95 % lorsque 19 réplicats sur 20 sont positifs) d'obtenir des réponses positives. Les tests de sensibilité analytique sont résumés ci-dessous.

Souche de <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	UFC/mL
FH (ATCC 15531)	2350
M129 (ATCC 29342)	200

#### REACTIVITE DU TEST

Les souches suivantes de *M. pneumoniae* ont été testées avec l'Alethia Mycoplasma et ont donné des réactions positives au niveau ou au-dessous de la limite déclarée du test, soit 2350 UFC/mL:

PI 1428 (ATCC 29085), MAC (ATCC 15492), M52 (ATCC 15293), Bru (ATCC 15377), M129-B170 (ATCC 29343), Mutant 22 (ATCC 39505) UAB 55612, UAB 56317, UMTB-10G (ATCC 49899). L'analyse a démontré que le test détecte à la fois les souches de type 1 et de type 2. Une réactivité similaire est attendue avec le test Alethia Mycoplasma Direct.



## 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 avaient été répartis au hasard pour chaque panel afin de masquer les identités. Les panels comprenaient des échantillons artificiels faiblement positifs (près de la limite de détection, n=3), des échantillons modérément positifs (n=3) et des échantillons fortement négatifs (n=3). Ces panels incluaient aussi un échantillon négatif natif. Les tests ont été exécutés par des techniciens différents dans chaque centre, le même jour (variabilité intra-test), pendant cinq jours (variabilité inter-tests). Trois lots de test Alethia Mycoplasma Direct et huit instruments Alethia ont été utilisés dans l'étude. Les contrôles positifs et négatifs furent testés avec chaque panel. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Type d'échantillon	Centre 1		Centre 2		Centre 3		Total	
	Concordance en pourcentage		Concordance en pourcentage		Concordance en pourcentage		Concordance en pourcentage	
<b>Fortement négatif</b>	30/30	100,0 %	30/30	100,0 %	30/30	100,0 %	90/90	100,0 %
<b>Faiblement positif</b>	30/30	100,0 %	30/30	100,0 %	29/30	96,7 %	89/90	98,9 %
<b>Modérément positif</b>	30/30	100,0 %	30/30	100,0 %	30/30	100,0 %	90/90	100,0 %
<b>Négatif</b>	9/10	90,0 %	10/10	100,0 %	10/10	100,0 %	29/30	96,7 %
<b>Contrôle négatif</b>	10/10	100,0 %	10/10	100,0 %	10/10	100,0 %	30/30	100,0 %
<b>Contrôle positif</b>	10/10	100,0 %	10/10	100,0 %	10/10	100,0 %	30/30	100,0 %

## REACTIONS CROISEES

Des études de réactivité croisée ont été précédemment menées avec le test d'amplification génique Alethia Mycoplasma. Des échantillons positifs et négatifs ont été inoculés avec des organismes bactériens ou fongiques à une concentration finale minimale de  $1,0 \times 10^8$  UFC/mL. Les virus ont été testés à des concentrations supérieures à  $1,0 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL ou  $1,0 \times 10^6$  copies/mL. L'ADN humain a été testé à 2,0 ng/test et aucune réactivité croisée n'a été constatée. Les échantillons positifs contenaient des concentrations de *M. pneumoniae* proches de la limite de détection. Aucun des organismes ou produits suivants n'a été identifié comme présentant une réaction croisée ou une interférence avec le test Alethia Mycoplasma:

*Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Actinomyces odontolyticus*, *Bacillus subtilis*, *Bacteroides fragilis*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella pertussis*, *Burkholderia cepacia*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium difficile*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* (ESBL), *Fusobacterium nucleatum*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* (KPC), *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Moraxella catarrhalis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Neisseria cinerea*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Nocardia asteroides*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella paratyphi* (groupe A), *Salmonella typhimurium* (groupe B), *Serratia liquefaciens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* (groupe B), *Streptococcus anginosus* (groupe F), *Streptococcus bovis* (groupe D), *Streptococcus canis* (groupe G), *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus salivarius*, *Ureaplasma urealyticum*, adénovirus, coronavirus, coxsackievirus, cytomégalo virus, virus d'Epstein Barr, virus Herpès simplex 1, virus Herpès simplex 2, métagonovirus humain, Influenza A, Influenza B, virus Parainfluenza 1, virus Parainfluenza 2, virus Parainfluenza 3, virus respiratoire syncytial A, virus respiratoire syncytial B, rhinovirus, ADN humain. Une même non réactivité vis à vis des organismes listés est attendue avec le test Alethia Mycoplasma Direct.

## TESTS POUR LES SUBSTANCES INTERFERENTES

Des substances susceptibles de provoquer des interférences ont été testées avec des échantillons simulés négatifs et artificiellement faiblement positifs (souches M129 et FH de *M. pneumoniae*). Les substances chimiques suivantes, aux concentrations solvant/diluant saturées spécifiées, n'influencent pas les résultats du test Alethia Mycoplasma Direct:

acétaminophène (18,1 mg/mL), sulfate d'albutérol (20 mg/mL), aspirine (9,1 mg/mL), azithromycine déshydratée (2,0 mg/mL), Cepacol® lavage buccal (alcool [1,4 % v/v], chlorure de cétylepyridinium [0,005 % v/v]), Contac® comprimés contre le rhume et la grippe (acétaminophène [14,8 mg/mL], maléate de chlorphéniramine [0,06 mg/mL], hydrochlorure de phényléphrine [0,15 mg/mL]), hydrochlorure de diphenhydramine (2,6 mg/mL), érythromycine (20,0 mg/mL), HALLS® gouttes contre la toux (menthol [0,06 mg/mL], ibuprofène [12,7 mg/mL]), hydrochlorure de phényléphrine (0,595 mg/mL), prednisone (20,0 mg/mL), \*Robitussin® sirop contre la toux et la congestion bronchique (bromhydrate de dextrométhorphan [0,20 mg/mL], guaifénésine [2,0 mg/mL]), pulvérisation nasale saline (chlorure de sodium [0,65 mg/mL]), mucus (5,0 mg/mL) et leucocytes (0,5 % v/v).

À des concentrations supérieures à 2 %, le sang total s'est avéré produire des résultats non valides.

À des concentrations supérieures à 0,595 mg/mL, l'hydrochlorure de phényléphrine peut produire des résultats faussement négatifs avec des échantillons faiblement positifs.

\* *Robitussin® Cough+Congestion Cough Syrup*, sirop contre la toux, produisait initialement 1/3 résultats non valides avec l'échantillon positif P2. Le résultat était valide après répétition du test (1/1 positif). De ce fait, *Robitussin® Cough+Congestion Cough Syrup* n'est pas considéré comme interférant.

# alethia™

## Mycoplasma Direct DNA Amplification Assay

### Ensayo de amplificación de ADN para la detección de *Mycoplasma pneumoniae* en muestras de exudados faríngeos humanos

REF 480250

IVD

Rx Only

#### USO INDICADO

El ensayo directo de amplificación de ADN para micoplasma Alethia, que se realiza en el sistema Alethia lectores una prueba cualitativa de diagnóstico in vitro para la detección directa de ADN de *Mycoplasma pneumoniae* en exudados faríngeos humanos obtenidos de pacientes con sospecha de que puedan estar infectados por *Mycoplasma pneumoniae*.

El ensayo directo Alethia para micoplasma utiliza una tecnología de amplificación isotérmica del ADN mediante tallo-bucle (LAMP, por sus siglas en inglés) para detectar *Mycoplasma pneumoniae* usando como diana un segmento del genoma de *Mycoplasma pneumoniae*.

Los resultados del ensayo directo de amplificación de ADN para micoplasma Alethia deben utilizarse junto con el cuadro clínico, otros datos analíticos y los factores de riesgo epidemiológico para ayudar a diagnosticar infecciones por *Mycoplasma*, y no deben ser lo único en lo que se base el tratamiento u otras medidas de atención al paciente. Los resultados positivos no permiten descartar infecciones simultáneas de otros microorganismos, mientras que los resultados negativos obtenidos en personas con infecciones de las vías respiratorias pueden deberse a microorganismos patógenos que este ensayo no detecte. E ste ensayo puede que no detecte infecciones de las vías respiratorias bajas por *M. pneumoniae*. En caso de sospecha de infección de las vías respiratorias bajas por *M. pneumoniae*, puede que sea necesario hacer otras pruebas analíticas distintas del ensayo directo de amplificación de ADN para micoplasma Alethia.

#### RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

El ensayo directo de amplificación de ADN Alethia se basa en la técnica de amplificación mediante tallo-bucle (LAMP),<sup>1,2</sup> y utiliza como diana una secuencia de 208 pares de bases (pb) del genoma de *Mycoplasma pneumoniae*. La secuencia selectiva de ADN se encuentra en el gen de una proteína homóloga de la proteasa intracelular, y está presente en todas las secuencias de veinte genomas de *Mycoplasma pneumoniae*.

En la amplificación mediante tallo-bucle se utilizan cebadores especialmente diseñados para conseguir una amplificación isotérmica continua y específica del ADN. Un subproducto que se produce en esta amplificación es el pirofosfato de magnesio, un precipitado blanco que enturbia la solución de la reacción. El incubador/lector Alethia de Meridian monitoriza la absorbencia de la solución de reacción. Los cambios de absorbencia de la solución de reacción por la precipitación del pirofosfato de magnesio indican la presencia del ADN buscado. En ausencia del ADN buscado, la absorbencia de la muestra no cambia de forma significativa.

El kit directo Alethia para micoplasma incluye el aparato para la preparación de muestras II/control negativo III Alethia (SMP PREP), dispositivos de prueba directa para micoplasma y tubos de tratamiento térmico Alethia. El aparato de preparación de muestras II Alethia, que se emplea para diluir y preparar la muestra, está lleno de una solución tamponada que contiene *E. coli* tratada con formalina portadora de ADN de *Staphylococcus aureus*. El dispositivo de prueba directa Alethia para micoplasma contiene una microesfera de reactivo de amplificación liofilizado en cada una de sus dos cámaras: una cámara de PRUEBA con cebadores específicos para *Mycoplasma* y una cámara de CONTROL con cebadores específicos para *S. aureus*. El ADN de *S. aureus* del reactivo de control y los cebadores específicos para *S. aureus* de la cámara de CONTROL funcionan como control interno del ensayo. Durante la preparación de la muestra, se añade cada muestra del paciente al aparato de preparación de muestras II y se combina con el ADN de *S. aureus* antes de la amplificación. El hecho de añadir ADN de *S. aureus* a la muestra del paciente permite procesar en paralelo el ADN buscado y el ADN de *S. aureus* durante la preparación, amplificación y detección de la muestra. El control interno sirve para verificar la inhibición de la amplificación, el rendimiento de los reactivos del ensayo y la eficacia del procesamiento de la muestra. La diana de control de *S. aureus* debe amplificarse y detectarse en la reacción final; si no es así, la prueba no se considera válida y no se notifican los resultados del paciente.

El Alethia lector monitoriza los cambios de absorbencia midiendo la transmisión de luz a través de las soluciones de las reacciones de Prueba y Control. La transmisión de la luz se comprueba al comienzo (Señal<sub>inicial</sub>, S<sub>i</sub>) y al final del análisis (Señal<sub>final</sub>, S<sub>f</sub>). El Alethia lector calcula el cambio de la transmisión lumínica entre el final y el comienzo del análisis (S<sub>f</sub>:S<sub>i</sub>) y compara el cociente con un valor de corte fijo.

Los valores de corte fijos de la cámara de PRUEBA se utilizan para notificar los resultados de las muestras. Si el cociente S<sub>f</sub>:S<sub>i</sub> de la cámara de PRUEBA es inferior al 82 % se indica como un resultado 'POSITIVO', mientras que si es superior o igual al 82 % se indica como un resultado 'NEGATIVO'. No se notifican valores numéricos.

Los valores de corte fijos de la cámara de CONTROL se utilizan para determinar la validez. Si el cociente S<sub>f</sub>:S<sub>i</sub> de la cámara de CONTROL es inferior al 90 %, la reacción se considera válida y se puede notificar el resultado de la cámara de PRUEBA (POSITIVO, NEGATIVO). Si el cociente S<sub>f</sub>:S<sub>i</sub> de la cámara de CONTROL es superior o igual al 90 %, la reacción no se considera válida y no se puede notificar el resultado de la cámara de PRUEBA. Si la reacción de la cámara de CONTROL no es válida, el resultado indicado es 'NO VÁLIDO'. No se notifican valores numéricos.

A la reacción de la cámara de CONTROL se le aplican criterios de corte más rigurosos para garantizar que no hay una inhibición de la amplificación, que los reactivos funcionan según lo previsto y que las muestras se han procesado correctamente.

## PRINCIPIOS BIOLÓGICOS

*Mycoplasma pneumoniae* es una de las causas frecuentes de infección de las vías respiratorias superiores e inferiores en los seres humanos, produciendo por ejemplo faringitis, bronquitis aguda y neumonía.<sup>3</sup> El descubrimiento de que las especies del género *Mycoplasma* eran patógenos humanos tuvo lugar en la década de 1960, siendo *Mycoplasma pneumoniae* la especie mejor conocida y más estudiada.<sup>4</sup> *M. pneumoniae* contiene una membrana celular de tres capas en lugar de una pared celular estructurada,<sup>4</sup> lo cual impide que se pueda identificar mediante los métodos tradicionales de tinción de Gram y microscopía óptica.

*M. pneumoniae* parece ser el responsable de hasta un 40 %<sup>3,4</sup> de las neumonías extrahospitalarias. Esta infección se produce tanto en niños como en adultos, independientemente de la localización geográfica, del sexo y del clima.<sup>4,7</sup> *M. pneumoniae* se asocia sobre todo a la neumonía atípica, cuyos síntomas incluyen cefaleas, malestar general, mialgias, fiebre y faringitis, acompañados por una tos seca y convulsiva.<sup>4, 5, 7</sup> Aunque la evolución clínica de la neumonía por micoplasma suele ser leve y remitir espontáneamente, tiene un índice de mortalidad de aproximadamente el 1,4 %.<sup>5</sup> Se calcula que en Estados Unidos se producen cada año 2 millones de casos de infección por *M. pneumoniae*, con alrededor de 100 000 hospitalizaciones relacionadas con la neumonía.<sup>8</sup> Según las estimaciones, hasta un 18 % de los casos de niños que requieren hospitalización por neumonía extrahospitalaria se deben a *M. Pneumoniae*.<sup>4</sup>

Por lo general, *M. pneumoniae* se transmite de una persona a otra por vía aérea en forma de aerosol, con un período de incubación de una a cuatro semanas.<sup>6</sup> Dado que en los pacientes con una infección activa por *Mycoplasma*, el microorganismo está presente en la nariz, la garganta, la tráquea y el esputo, lo que la acompaña facilita la propagación de la enfermedad.<sup>4</sup> Este modo de transmisión se presta a la aparición de brotes en entornos donde existe un contacto personal estrecho, como colegios, cuarteles, empresas, campamentos de verano, universidades o instituciones. Asimismo, la enfermedad se suele contagiar de un miembro a otro de una familia que conviva en la misma casa.<sup>4,7</sup>

La infección aguda por *M. pneumoniae* es difícil de diagnosticar. Algunas de las estrategias básicas para diagnosticarla en la práctica clínica son los cultivos y las pruebas serológicas. El cultivo de *M. pneumoniae* suele ser poco práctico para tratar al paciente, ya que el microorganismo puede tardar hasta seis semanas en proliferar.<sup>3</sup> Aunque se comercializan numerosos productos para pruebas serológicas que ofrecen soluciones de diagnóstico prácticas, su capacidad para detectar una infección aguda puede ser limitada. El objetivo de los ensayos serológicos suele ser la detección de anticuerpos IgM e IgG específicos. Por lo general, no es posible detectar anticuerpos IgM en los siete días posteriores a la aparición de los síntomas, y pueden persistir durante meses tras la infección activa.<sup>4</sup> Existen estudios que indican que menos del 50 % de los pacientes que padecen una infección aguda muestran una respuesta positiva para IgG.<sup>4</sup>

Las nuevas técnicas de diagnóstico, como los métodos de amplificación del ADN, pueden agilizar el diagnóstico al permitir una detección más rápida de los brotes y prevenir casos secundarios mediante la implantación de medidas de control.<sup>6</sup>

## REACTIVOS/MATERIALES PROPORCIONADOS

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

1. **Aparato para la preparación de muestras II/control negativo III (SMP PREP) Alethia:** solución tamponada con Tris que contiene *E. coli* tratada con formolina portadora de ADN de *S. aureus* y azida sódica (0,09 %) como conservante.
2. **Dispositivo de prueba Alethia para micoplasma:** dispositivo de dos cámaras que contiene reactivos de amplificación liofilizados (ADN polimerasa, desoxirribonucleótidos trifosfato) y cebadores específicos para micoplasma (cámara de PRUEBA) o cebadores de control (cámara de CONTROL).
3. **Tubos de tratamiento térmico Alethia.**

## MATERIALES PROPORCIONADOS POR SEPARADO

1. Kit de control externo directo Alethia para micoplasma, número de catálogo: 479890

## MATERIALES NO PROPORCIONADOS

1. Guantes desechables de látex, sin polvo
2. Puntas de pipeta resistentes a los aerosoles, sin ribonucleasa/desoxirribonucleasa
3. Materiales para la obtención y transporte de muestras:
  - **Hisopos para exudados con varilla plástico que pueda romperse (simple o doble):** de poliéster, flocado de nylon o rayón.
  - **Medio de transporte no nutritivo en compresa de gasa/esponja** (volumen máximo: 1,2 mL); líquido de Stuart o Amies (sin carbón).

## EQUIPO NO PROPORCIONADO

1. Baño seco con bloque de calor de 12 mm y una capacidad térmica de 95 °C
2. Termómetro digital de máxima y mínima (p. ej., termómetro sumergible a prueba de golpes Traceable® Lollipop™)
3. Agitador vórtex
4. Temporizador de intervalos
5. Micropipetas capaces de dispensar 50 µL
6. Alethia lector, Meridian Bioscience, Inc. Número de catálogo: 610189

## PRECAUCIONES

1. Todos los reactivos son sólo para uso diagnóstico in vitro.
2. Los hisopos con puntas pequeñas (capacidad de absorción inferior a 60 µL) no valen para obtener las muestras del ensayo directo Alethia para micoplasma.
3. No intercambie el aparato para la preparación de muestras ni los dispositivos de prueba de lotes diferentes. Los tubos de tratamiento térmico son intercambiables siempre y cuando se usen dentro de la fecha de caducidad asignada.
4. Siga las buenas prácticas de laboratorio y las prácticas del nivel 2 de bioseguridad durante la prueba.<sup>8</sup> Trate todas las muestras y los dispositivos de prueba usados como si pudieran transmitir agentes infecciosos. No coma, beba ni fume en las zonas donde se manipulan los reactivos del kit o las muestras.
5. Utilice guantes desechables para manipular las muestras y lávese después muy bien las manos. Cámbiese los guantes a menudo.
6. Deben emplearse programas de control de calidad para laboratorios de pruebas moleculares.<sup>9</sup> Para evitar falsos positivos por la contaminación con microorganismos/amplicones, adopte las medidas de prevención que requieran las buenas prácticas de laboratorio para biología molecular (p. ej., limpiar la zona de trabajo con un producto adecuado que destruya los ácidos nucleicos, utilizar únicamente puntas de pipeta resistentes a los aerosoles, manipular las muestras de una en una, etc.).
7. El dispositivo de prueba Alethia para micoplasma contiene reactivos liofilizados. No debe abrir la bolsa de protección hasta que esté listo para hacer el ensayo.
8. El dispositivo de prueba Alethia para micoplasma incluye un sistema de cierre diseñado para evitar la contaminación de la zona de pruebas con el producto de amplificación. NO utilice dispositivos de prueba con cierres rotos.

9. Deseche los dispositivos de prueba Alethia usados inmediatamente después del procesamiento, con el cierre de los dispositivos bien sujeto. NO abra el dispositivo de prueba después del procesamiento. Si se abre el dispositivo después de la amplificación, el producto de amplificación puede contaminar la zona de pruebas.

#### DECLARACIONES DE RIESGO Y PRECAUCIÓN

No se conoce ningún riesgo asociado con este producto.

#### VIDA ÚTIL Y ALMACENAMIENTO

La fecha de caducidad se indica en la etiqueta del kit. Almacene los componentes del kit a la temperatura indicada en la etiqueta.

#### PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Asegúrese de que los reactivos del kit estén a temperatura ambiente (19–29 C) antes de usarlos. Si los reactivos no están a temperatura ambiente antes de usarlos, se pueden obtener resultados incorrectos.

#### RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

**Tipo de muestra:** muestras de exudados faríngeos en hisopos.

**Toma de muestras:** las muestras debe obtenerse siguiendo las directrices del centro para la toma de muestras de exudados faríngeos en hisopos. Para obtener las muestras hay que frotar enérgicamente las amígdalas y la parte posterior de la faringe con un hisopo. Las muestras de exudados se obtienen empleando hisopos adecuados (p. ej., de rayón, flocado de nylon o poliéster). **NOTA: los hisopos con puntas pequeñas (capacidad de absorción inferior a 60 µL) no valen para obtener las muestras.**

Coloque el hisopo o hisopos en una compresa con medio de transporte no nutritivo (p. ej., líquido de Stuart o Amies sin carbón) y llévelos al laboratorio. Las muestras deben mantenerse a una temperatura de 2–29 C durante el traslado.

Las muestras pueden mantenerse a temperatura ambiente (19–29°C) durante un máximo de 24 horas antes de analizarlas. Si el análisis no va a comenzar dentro de este plazo, es posible conservar la muestra a 2–8 C durante un máximo de 14 días.

#### PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

**NOTA:** compruebe que el Alethia lector está encendido y que se han efectuado las verificaciones de funcionamiento necesarias antes de empezar la PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS. Consulte el Manual del operador del Alethia Lector para obtener más información sobre la instalación y funcionamiento del instrumento.

1. Añada un solo hisopo de exudado faríngeo al SMP PREP del Alethia. Rompa la varilla del hisopo para quitarla. Tape de nuevo y cierre bien el SMP PREP. Agite el SMP PREP en un vórtex durante al menos 10 segundos.
2. Quite la tapa de la punta y apriete el SMP PREP para dispensar 5–10 gotas de muestra en un tubo de tratamiento térmico Alethia limpio y debidamente etiquetado.
3. Repita los pasos de preparación de la muestra para todas las muestras que se vayan a procesar.
4. Caliente cada mezcla de muestra/control en un baño seco/bloque de calor a  $95 \pm 5$  C durante  $10 \pm 2$  minutos. Controle el tratamiento térmico con un termómetro digital y un temporizador de intervalos.
5. Saque cada tubo de tratamiento térmico del baño seco/bloque de calor. Las muestras tratadas térmicamente pueden mantenerse a una temperatura de 19–29 C durante un máximo de 3 horas para repetir la prueba. **NOTA: si las muestras tratadas térmicamente se almacenan antes de la prueba, es necesario repetir el tratamiento térmico ( $95 \pm 5$  C durante  $10 \pm 2$  minutos) siguiendo el Paso 4.**

#### PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

**NOTA:** en cada análisis del Alethia lector se pueden procesar hasta 10 muestras. Consulte el Manual del operador del Alethia para obtener más información sobre la instalación y funcionamiento del instrumento.

1. Agite las muestras tratadas térmicamente en un vórtex durante aproximadamente 10 segundos.
2. Saque 1 dispositivo de prueba Alethia para micoplasma de su bolsa de protección por cada muestra. Abra el dispositivo con cuidado y sujetando las cámaras de modo que el reactivo liofilizado no se caiga al abrirlo. Ponga el dispositivo sobre una superficie plana o en una gradilla en la que se pueda colocar.
3. Usando una micropipeta, primero transfiera 50 µL de la muestra tratada con calor a la cámara de TEST (lado izquierdo/Perla Blanca), y luego transfiera 50 µL de la muestra tratada con calor a la cámara de CONTROL (lado derecho/Perla Amarilla) en el Dispositivo de Prueba Alethia. Tenga cuidado de no introducir aire a la mezcla de reacción. No mezcle las reacciones con pipeta. Cierre el Dispositivo de Prueba Alethia y asegure que el cierre queda seguro.
4. Golpee ligeramente el dispositivo contra la superficie de la mesa de laboratorio o mezcle bien para quitar las burbujas de aire. Examine atentamente el dispositivo de prueba para comprobar que se han disueltos las microesferas de control y de prueba, y la presencia de burbujas de aire en el tubo y de líquido en la parte superior del dispositivo. Si advierte microesferas sin disolver, burbujas de aire o líquido, golpee ligeramente el dispositivo contra la superficie de la mesa de laboratorio y repita la inspección visual. La amplificación y la detección deben comenzar en un plazo de 15 minutos.
5. Introduzca el dispositivo de prueba Alethia en el Alethia lector e inicie la reacción de amplificación y la detección. Los resultados se indican al final del análisis.

## INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

ID de la muestra	Resultado notificado	Interpretación
Muestra del paciente	POSITIVO	La muestra contiene el ADN objetivo de <i>Mycoplasma pneumoniae</i> .
	NEGATIVO	No se ha detectado ADN de <i>Mycoplasma pneumoniae</i> .
	NO VÁLIDO	<b>Sin resultados notificables. Repita la prueba usando la muestra original.</b> 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 del Control Positivo válido. Reactivos activos en el momento del uso, el Alethia lector funciona correctamente.
	NEGATIVO	<b>Resultado de control incorrecto. No se pueden notificar los resultados del paciente.</b> Repita la prueba de control como primer paso para determinar la causa del falla. Si se repite la falla luego de repetir el control contacte el Departamento de Servicios Técnicos de Meridian al 1-800-343-3858 (USA) o su distribuidor local.
	NO VÁLIDO	<b>Sin resultados notificables. Repita todo el proceso de ensayo usando las muestras originales.</b> Preparación de la muestra inadecuada, fallo del reactivo, fallo del instrumento o fallo de control interno.
Control negativo	POSITIVO	<b>Resultado de control incorrecto. No se pueden notificar los resultados del paciente.</b> Repita la prueba de control como primer paso para determinar la causa del falla. Si se repite la falla luego de repetir el control contacte el Departamento de Servicios Técnicos de Meridian al 1-800-343-3858 (USA) o su distribuidor local.
	NEGATIVO	Resultado del Control Negativo válido. Reactivos activos en el momento del uso, el Alethia lector funciona correctamente.
	NO VÁLIDO	<b>Sin resultados notificables. Repita todo el proceso de ensayo usando las muestras originales.</b> Preparación de la muestra inadecuada, fallo del reactivo, fallo del instrumento o fallo de control interno.
POCILLO VACÍO	NINGUNO	No hay ningún dispositivo de prueba Alethia en el pocillo del Alethia lector. <b>O</b> El dispositivo de prueba Alethia no funciona bien debido a un fallo en la preparación de la muestra o a que el dispositivo está sucio o mal colocado. <b>Repita la prueba usando la muestra original.</b>

## CONTROL DE CALIDAD

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

- 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.
- El paso de tratamiento térmico se controla con un termómetro externo y un temporizador de intervalos. Use la temperatura máxima y mínima registradas por el termómetro para comprobar que la temperatura se mantiene a  $95 \pm 5$  C. Use el temporizador de intervalos para comprobar que el tratamiento térmico dura  $10 \pm 2$  minutos.
- Las buenas prácticas de laboratorio recomiendan usar materiales de control. Los usuarios deberían seguir las correspondientes directrices federales, estatales y locales relativas al análisis de controles de calidad externos.
- El reactivo del control positivo externo directo Alethia para micoplasma se suministra por separado (número de catálogo 479890). El aparato para la preparación de muestras II/reactivo de control negativo III suministrado con el kit directo Alethia para micoplasma (número de catálogo 480250) se usa como control negativo externo. Se recomienda verificar la reactividad de cada nuevo lote y cada nuevo envío de Alethia para micoplasma en el momento de la recepción y antes de usarlo. A partir de entonces, deben realizarse pruebas de control externo de conformidad con las directrices federales, estatales y locales correspondientes. El kit de prueba directa Alethia para micoplasma no debe usarse para analizar a pacientes si los controles externos no dan los resultados correctos.
- Debe utilizarse un dispositivo de prueba distinto para cada reactivo de control externo.

## VALORES ESPERADOS

La incidencia de *Mycoplasma pneumoniae* se estableció en diversos estudios clínicos realizados en 2015–2016. La prevalencia global de *M. pneumoniae* en muestras prospectivas de exudados faríngeos fue del 7,5 % (34/456). A continuación se indica la prevalencia en función de la edad del paciente.

Edad del paciente	Total de positivos	Total de muestras	Prevalencia (%)
0–1 mes	0	7	0,0 %
2 meses–2 años	5	157	3,2 %
3–12 años	22	147	15,0 %
13–21 años	5	38	13,2 %
22–65 años	2	86	2,3 %
> 65 años	0	21	0,0 %

## LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Este producto solo se puede utilizar con el instrumento Alethia
- El ensayo Alethia directo de ADN de micoplasma es un ensayo cualitativo y no proporciona valores cuantitativos ni información sobre la cantidad de microorganismos.

3. No se ha evaluado el uso de este dispositivo para supervisar el tratamiento de las infecciones por *Mycoplasma pneumoniae*.
4. Las infecciones respiratorias las pueden causar tanto *Mycoplasma pneumoniae* como otros microorganismos patógenos. El hecho de que se obtengan resultados positivos no significa que no exista una infección simultánea de las vías respiratorias por otros microorganismos patógenos.
5. El rendimiento del ensayo directo Alethia para micoplasma se ha establecido únicamente con muestras prospectivas de hisopos de exudados faríngeos humanos. No se ha establecido el rendimiento con otros tipos de muestras (muestras nasofaríngeas, muestras de individuos inmunodeprimidos o de pacientes asintomáticos).
6. Para poder detectar ácidos nucleicos es imprescindible obtener, manipular, transportar, almacenar y preparar adecuadamente las muestras. Si no se utiliza el procedimiento adecuado en cualquiera de estos pasos pueden obtenerse resultados incorrectos.
7. La prevalencia de la infección por *M. pneumoniae* afecta al valor predictivo de la prueba.
8. Los ácidos nucleicos de los microorganismos pueden perdurar *in vivo* independientemente de la viabilidad del microorganismo. El hecho de que se detecte el ADN analizado no quiere decir que sea el agente causante de los síntomas clínicos. El ensayo directo Alethia para micoplasma no distingue entre individuos portadores e infectados.
9. Los resultados deben interpretarse teniendo en cuenta el historial médico, los datos epidemiológicos y otra información que pueda tener el médico. Al igual que sucede con todas las pruebas de biología molecular, pueden obtenerse (A) falsos resultados negativos por la presencia de inhibidores, errores técnicos, por confundir las muestras o porque haya muy pocos microorganismos en la muestra clínica, y (B) falsos resultados positivos por contaminación cruzada con los microorganismos analizados, sus ácidos nucleicos o el producto amplificado, así como señales inespecíficas.
10. Los descongestivos nasales que contienen clorhidrato de fenilefrina a concentraciones superiores a 0,595 mg/ml pueden producir falsos negativos en muestras con valores positivos bajos.
11. La sangre completa a concentraciones superiores al 2 % puede interferir con el ensayo directo Alethia para micoplasma.
12. Se ha observado que el medio de colección Starplex puede generar un nivel elevado de resultados inválidos cuando se usa con la prueba de Alethia Mycoplasma Direct.

### CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

Las características de rendimiento del ensayo directo de amplificación de ADN Alethia para micoplasma se determinaron en diversos estudios clínicos realizados en los años 2015 y 2016 en centros independientes de pruebas clínicas que representaban tres regiones geográficamente diferenciadas de los Estados Unidos. Las características de rendimiento del ensayo se compararon con un método de referencia molecular de diagnóstico *in vitro*, el ensayo de amplificación de ADN para micoplasma Alethia (Meridian Bioscience, Inc., Cincinnati, OH). Se evaluaron un total de 458 muestras prospectivas anonimizadas en hisopos de exudados faríngeos procedentes de varones y mujeres sintomáticas con su consentimiento informado. Se excluyeron dos muestras (0,4 %) de la población de muestras clínicas debido a un error del instrumento durante las pruebas (1) o porque se trataba de un tipo de muestra inaceptable (1), quedando entonces 456 muestras aptas para el análisis. En el ensayo directo Alethia para micoplasma no se obtuvieron resultados durante el estudio clínico que no fueran válidos (0,0 %; IC del 95 %: 0,0–0,8 %). Las características de rendimiento del ensayo directo Alethia para micoplasma se resumen a continuación.

Alethia para micoplasma				
Alethia directo para micoplasma	Positivo	Negativo	No válido	Total
Positivo	24	10 <sup>a</sup>	0	34
Negativo	1 <sup>b</sup>	421	0	422
No válido	0	0	0	0
Total	25	431	0	456
				<b>IC del 95 %</b>
Porcentaje de concordancia positiva	24/25	96,0 %		80,5–99,3 %
Porcentaje de concordancia negativa	421/431	97,7 %		95,8–98,7 %
Porcentaje de concordancia total	445/456	97,6 %		95,7–98,6 %
Tasa de resultados no válidos	0/456	0,0 %		0,0–0,8 %

<sup>a</sup> Cuatro de las diez muestras dieron un resultado positivo con Alethia para micoplasma tras analizar una muestra congelada adicional.

<sup>b</sup> Al repetir el análisis de la muestra original del paciente y una muestra congelada adicional con Alethia para micoplasma se obtuvieron resultados negativos.

La población apta para el estudio incluía muestras de hisopos faríngeos de pacientes pediátricos, adultos y geriátricos con edades que oscilaban entre las 3 semanas y los 97 años. No hubo diferencias en el rendimiento del ensayo atribuibles a la edad de los pacientes. La población del estudio incluyó muestras de 230 (50,4 %) mujeres y 226 (49,6 %) varones. No hubo diferencias en el rendimiento del ensayo atribuibles al sexo de los pacientes.

### SENSIBILIDAD ANALÍTICA

Se determinó la sensibilidad analítica o límite de detección del ensayo directo Alethia para micoplasma con dos cepas de *M. pneumoniae* (FH y M129). El límite de detección se determinó usando un mínimo de 20 réplicas para cada mensurando y una probabilidad establecida (p. ej., el 95 % o 19/20 réplicas positivas) de obtener respuestas positivas. A continuación se resume la prueba de sensibilidad analítica:

Cepa de <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	UFC/mL
FH (ATCC 15531)	2350
M129 (ATCC 29342)	200

### REACTIVIDAD DEL ENSAYO

Las siguientes cepas de *M. pneumoniae* fueron probadas por Alethia Mycoplasma y produjeron reacciones positivas a nivel o abajo del corte del límite de detección de 2350 CFU/mL:

PI 1428 (ATCC 29085), MAC (ATCC 15492), M52 (ATCC 15293), Bru (ATCC 15377), M129-B170 (ATCC 29343), Mutant 22 (ATCC 39505) UAB 55612, UAB 56317, UMBT-10G (ATCC 49899). Las pruebas demostraron que el ensayo detectaba cepas de los tipos 1 y 2. La misma reactividad se espera con el Alethia Mycoplasma Direct.

## REPRODUCIBILIDAD

Para los estudios de reproducibilidad se enviaron paneles de 10 muestras codificadas con enmascaramiento a tres laboratorios independientes. Las muestras se distribuyeron aleatoriamente dentro de cada panel para enmascarar las identidades de las muestras. Los paneles incluían muestras artificiales positivas bajas (es decir, próximas al límite de detección, n=3), positivas moderadas (n=3) y negativas altas (n=3) preparadas ex profeso. El panel también incluía una muestra negativa natural. La prueba fue realizada por técnicos diferentes en cada centro el mismo día (variabilidad intranalítica) durante cinco días (variabilidad interanalítica). En el estudio se utilizaron tres lotes de ensayo directo Alethia para micoplasma y ocho instrumentos Alethia. Con cada panel se analizaron controles positivos y negativos. Los resultados figuran en la tabla a continuación:

Tipo de muestra	Centro 1		Centro 2		Centro 3		Total	
	Porcentaje de concordancia		Porcentaje de concordancia		Porcentaje de concordancia		Porcentaje de concordancia	
Negativa alta	30/30	100,0 %	30/30	100,0 %	30/30	100,0 %	90/90	100,0 %
Positiva baja	30/30	100,0 %	30/30	100,0 %	29/30	96,7 %	89/90	98,9 %
Positiva moderada	30/30	100,0 %	30/30	100,0 %	30/30	100,0 %	90/90	100,0 %
Negativa	9/10	90,0 %	10/10	100,0 %	10/10	100,0 %	29/30	96,7 %
Control negativo	10/10	100,0 %	10/10	100,0 %	10/10	100,0 %	30/30	100,0 %
Control positivo	10/10	100,0 %	10/10	100,0 %	10/10	100,0 %	30/30	100,0 %

## REACTIVIDAD CRUZADA

Estudios de reacción cruzada fueron llevados a cabo con el ensayo de Alethia Mycoplasma de Amplificación de ADN. Muestras positivas y negativas fueron inoculadas con organismos que tienen el potencial de interferir como bacterias o hongos a una concentración de  $1.0 \times 10^6$  CFU/mL. Se analizaron virus a concentraciones superiores a  $1,0 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL o  $1,0 \times 10^6$  copias/mL. Se analizó ADN humano a 2,0 ng/prueba sin que se observase reactividad cruzada. Las muestras positivas contenían concentraciones de *M. pneumoniae* próximas al límite de detección. No se detectó reactividad cruzada o interferencia en el ensayo Alethia Mycoplasma con ninguno de los siguientes microorganismos o materiales:

*Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Actinomyces odontolyticus*, *Bacillus subtilis*, *Bacteroides fragilis*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella pertussis*, *Burkholderia cepacia*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium difficile*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* (ESBL), *Fusobacterium nucleatum*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* (KPC), *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Moraxella catarrhalis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Neisseria cinerea*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Nocardia asteroides*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella paratyphi* (grupo A), *Salmonella typhimurium* (grupo B), *Serratia liquefaciens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* (grupo B), *Streptococcus anginosus* (grupo F), *Streptococcus bovis* (grupo D), *Streptococcus canis* (grupo G), *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus salivarius*, *Ureaplasma urealyticum*, adenovirus, coronavirus, virus de Coxsackie, citomegalovirus, virus de Epstein Barr, virus del herpes común 1, virus del herpes común 2, metaneumovirus humano, gripe A, gripe B, virus paragripal 1, virus paragripal 2, virus paragripal 3, virus respiratorio sincitial A, virus respiratorio sincitial B, rinovirus, ADN humano. No se espera reacción cruzada con el ensayo Alethia Mycoplasma Direct.

## PRUEBAS PARA SUSTANCIAS INTERFERENTES

Se analizaron sustancias potencialmente interferentes con muestras negativas simuladas y positivas bajas artificiales (cepas de *M. pneumoniae* M129 y FH). A las concentraciones saturadas de disolvente/diluyente indicadas, las siguientes sustancias no interfirieron con los resultados del ensayo directo Alethia para micoplasma:

Paracetamol (18,1 mg/mL), sulfato de salbutamol (20 mg/mL), ácido acetilsalicílico (9,1 mg/mL), azitromicina dihidrato (2,0 mg/mL), enjuague bucal Cepacol® [alcohol (1,4 % v/v), cloruro de cetilpiridinio (0,005 % v/v)], comprimidos anticatarrales y antigripales Contac® [paracetamol (14,8 mg/mL), maleato de clorfeniramina (0,06 mg/mL)], clorhidrato de fenilefrina (0,15 mg/mL)], clorhidrato de difenhidramida (2,6 mg/mL), eritromicina (20,0 mg/mL), gotas para la tos HALLS® [mentol (0,06 mg/mL)], ibuprofeno (12,7 mg/mL), clorhidrato de fenilefrina (0,595 mg/mL), prednisona (20,0 mg/mL), jarabe para la tos y la tos de pecho congestiva \*Robitussin® [bromhidrato de dextrometorfano (0,20 mg/mL), guaifenesina (2,0 mg/mL)], nebulizador nasal de solución salina [cloruro sódico (0,65 mg/mL)], mucosidad (5,0 mg/mL) y leucocitos (0,5 % v/v).

Con sangre completa a concentraciones superiores al 2% se observó que los resultados obtenidos no eran válidos.

A concentraciones superiores a 0,595 mg/mL, el clorhidrato de fenilefrina puede producir falsos negativos en muestras con valores positivos bajos.

\* *Robitussin® Cough+Congestion Cough Syrup inicialmente dio 1/3 resultados invalidos con muestra Positiva P2, la cual produjo resultado aceptable cuando se repitió la prueba (1/11 positivo). Robitussin® Cough+Congestion Cough Syrup no se considera que interfiere.*

# alethia™

## Mycoplasma Direct DNA Amplification Assay

### DNA-Amplifikationstest für den Nachweis von *Mycoplasma pneumoniae* in Rachenabstrichproben beim Menschen

REF 480250

IVD

Rx Only

#### VERWENDUNGSZWECK

Der Alethia Mycoplasma Direkt-DNA-Amplifikationstest (Alethia Mycoplasma Direkt Test), der auf dem Alethia Lesegerät durchgeführt wird, ist ein qualitativer In-vitro-Diagnostiktest für den direkten Nachweis von DNA aus *Mycoplasma pneumoniae* in Rachenabstrichproben von Patienten, bei denen eine Infektion mit *Mycoplasma pneumoniae* vermutet wird.

Bei dem Alethia Mycoplasma Direkt Test wird die „Loop-Mediated Isothermal DNA Amplification“ (LAMP)-Technologie zum Nachweis von *Mycoplasma pneumoniae* verwendet. Dabei wird gezielt ein DNA-Abschnitt im Genom von *Mycoplasma pneumoniae* durch isotherme Amplifikation nachgewiesen.

Die mit dem Alethia Mycoplasma Direkt Test erzielten Ergebnisse dienen zusammen mit dem klinischen Erscheinungsbild, anderen Laborbefunden und epidemiologischen Risikofaktoren zur Unterstützung bei der Diagnose einer Infektion mit *Mycoplasma* und dienen nicht als alleinige Grundlage für Therapieentscheidungen beim Patienten. Positive Ergebnisse schließen eine Koinfektion mit anderen Organismen nicht aus, und negative Ergebnisse bei Personen mit Atemwegsinfektionen können auf Pathogene zurückzuführen sein, die mit diesem Test nicht nachgewiesen werden. Infektionen der unteren Atemwege infolge von *M. pneumoniae* werden möglicherweise mit diesem Test nicht nachgewiesen. Wenn eine durch *M. pneumoniae* verursachte Infektion der unteren Atemwege vermutet wird, sind unter Umständen zusätzliche Labortests mit anderen Verfahren als dem Alethia Mycoplasma Direkt Test erforderlich.

#### ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DES TESTS

Der Alethia Mycoplasma Direkt Test basiert auf der „Loop-Mediated Isothermal DNA Amplification“ (LAMP)-Technologie.<sup>1,2</sup> Mit dem Test wird eine DNA-Sequenz von 208-Basenpaaren (bp) im Genom von *Mycoplasma pneumoniae* nachgewiesen. Die DNA-Zielssequenz befindet sich in einem Gen, das ein intrazelluläres Protease-ähnliches Protein kodiert und so in allen zwanzig Genomen von *Mycoplasma pneumoniae* vorkommt.

Bei der LAMP-Methode sorgen spezielle Primer für eine spezifische und kontinuierliche isotherme DNA-Amplifikation. Ein Nebenprodukt der Amplifikation ist Magnesiumpyrophosphat, das einen weißen Niederschlag bildet, wodurch eine trübe Reaktionslösung entsteht. Die Extinktion der Reaktionslösung wird von dem Meridian Alethia Inkubator/Lesegerät gemessen. Die durch den Niederschlag von Magnesiumpyrophosphat erzeugten Änderungen der Extinktion der Reaktionslösung deuten auf die Anwesenheit der Ziel-DNA hin. Die Abwesenheit der Ziel-DNA bewirkt keine signifikante Änderung der Extinktion der Probe.

Das Alethia Mycoplasma Direkt Kit enthält den Alethia Probenvorbereitungsapparat II (SMP PREP) mit der Negativkontrolle III, das Alethia Mycoplasma Direkt Analysegefäß und das Hitzebehandlungsrohrchen. Der zur Probenverdünnung und -vorbereitung verwendete Alethia Probenvorbereitungsapparat II ist mit einer gepufferten Lösung gefüllt, die mit Formalin behandelte *E. coli* enthält, welche DNA von *Staphylococcus aureus* enthalten. In den beiden Kammern des Alethia Mycoplasma Direkt Analysegefäßes befindet sich je ein Kugelchen aus lyophilisierten Reagenzien für die Amplifikation und entweder spezifische Primer gegen *Mycoplasma* (TEST-Kammer) oder spezifische Primer gegen *S. aureus* (KONTROLL-Kammer). Die *S. aureus*-DNA in dem Gefäß für die Probenvorbereitung dient zusammen mit den *S. aureus*-spezifischen Primer in der KONTROLL-Kammer als interne Kontrolle für den Test. Während der Probenvorbereitung wird jede Patientenprobe in das Gefäß für die Probenvorbereitung gegeben und vor der Amplifikation mit der *S. aureus*-DNA kombiniert. Durch die Zugabe der *S. aureus*-DNA zu der Patientenprobe wird die Ziel-DNA und die Kontroll-DNA parallel extrahiert, amplifiziert und nachgewiesen. Mit der internen Kontrolle wird die Effizienz der DNA-Extraktion, der Probenverarbeitung, die Inhibition der Amplifikation und die Leistung der Testreagenzien überwacht. Die Kontroll-DNA von *S. aureus* muss amplifiziert und in der endgültigen Reaktion nachgewiesen werden, oder der Test wird als ungültig erachtet und die Patientenergebnisse werden nicht weitergegeben.

Zur Überwachung der Änderungen der Extinktionsmerkmale misst das Alethia Lesegerät den Lichtdurchlass durch die Test- und die Kontroll-Reaktionslösungen. Der Lichtdurchlass wird zu Beginn des Testdurchlaufs (Signal<sub>initial</sub>, S<sub>i</sub>) und am Ende des Testdurchlaufs (Signal<sub>final</sub>, S<sub>f</sub>) bestimmt. Die Änderung des Lichtdurchlasses zwischen Ende und Beginn des Testdurchlaufs (Sr:S<sub>f</sub>) wird von dem Alethia Lesegerät gemessen und das resultierende Verhältnis wird mit einem festgelegten Cutoff-Wert verglichen.

Die Probenergebnisse werden anhand festgelegter Cutoff-Werte für die TEST-Kammer gemeldet: Sr:S<sub>f</sub>-Verhältnisse der TEST-Kammer von weniger als 82 % werden als „POSITIV“, Sr:S<sub>f</sub>-Verhältnisse der TEST-Kammer größer als oder gleich 82 % werden als „NEGATIV“ gemeldet. *Es werden keine numerischen Werte ausgegeben.*

Die Gültigkeit wird anhand festgelegter Cutoff-Werte für die KONTROLL-Kammer beurteilt. Sr:S<sub>f</sub>-Verhältnisse der KONTROLL-Kammer von weniger als 90 % werden für gültig erachtet und lassen die Meldung der Ergebnisse der TEST-Kammer zu (POSITIV, NEGATIV). Sr:S<sub>f</sub>-Verhältnisse der KONTROLL-Kammer größer als oder gleich 90 % werden für ungültig erachtet und verhindern die Meldung der Ergebnisse der TEST-Kammer. Ungültige Ergebnisse für die KONTROLL-Kammer werden als „UNGÜLTIG“ gemeldet. *Es werden keine numerischen Werte gemeldet.*

Die Cutoff-Kriterien für die KONTROLL-Kammer sind strenger, um zu gewährleisten, dass die Amplifikation nicht gehemmt wird, dass die Reagenzien bestimmungsgemäß funktionieren und dass die Probenverarbeitung sachgemäß durchgeführt wurde.

#### BIOLOGISCHE PRINZIPIEN

*Mycoplasma pneumoniae* ist eine häufige Ursache von Infektionen der oberen und unteren Atemwege beim Menschen, wie z.B. Pharyngitis, akute Bronchitis und Pneumonie.<sup>3</sup> Mykoplasmen wurden in den sechziger Jahren als menschliche Pathogene erkannt, wobei *Mycoplasma pneumoniae* das bekannteste und am meisten untersuchte Bakterium der Gruppe der Mykoplasmen ist.<sup>4</sup> *M. pneumoniae* besteht aus einer dreischichtigen Zellmembran anstelle einer strukturierten Zellwand,<sup>4</sup> wodurch eine positive Identifikation mithilfe herkömmlicher Gramfärbung und Visualisierung unter dem Lichtmikroskop verhindert wird.



*M. pneumoniae* wurde mit bis zu 40 %<sup>3,4</sup> der ambulant erworbenen Pneumonie-Erkrankungen assoziiert. Zur Infektion kommt es bei Kindern und Erwachsenen ohne geographische, geschlechtsspezifische oder klimabezogene Einschränkungen.<sup>4,7</sup> *M. pneumoniae* wird in der Regel mit atypischer Pneumonie mit Symptomen wie Kopfschmerzen, Unwohlsein, Myalgien, Fieber und Rachenschmerzen nebst trockenem, paroxysmalem Husten assoziiert.<sup>4,5,7</sup> Obwohl der klinische Verlauf der Mykoplasmen-Pneumonie im Allgemeinen mild und selbstbegrenzend ist, wird ihr eine Mortalitätsrate von ca. 1,4 % zugeschrieben.<sup>5</sup> Jedes Jahr treten schätzungsweise 2 Millionen Fälle einer Infektion mit *M. pneumoniae* auf, davon sind in den USA ca. 100.000 Krankenhauseinweisungen aufgrund von Pneumonie zu verzeichnen.<sup>8</sup> Es wird davon ausgegangen, dass bis zu 18 % der Krankenhauseinweisungen von Kindern mit ambulant erworbener Pneumonie auf *M. pneumoniae* zurückzuführen sind.<sup>4</sup>

Die Übertragung von *M. pneumoniae* erfolgt in der Regel durch Tröpfcheninfektion von einer Person zu anderen, und die Inkubationszeit beträgt eine bis vier Wochen.<sup>6</sup> Da sich bei Patienten mit einer aktiven Infektion Mykoplasmen in der Nase, dem Rachen, der Luftröhre und dem Sputum befinden, wird die Übertragung der Erkrankung durch den dabei auftretenden Husten begünstigt.<sup>4</sup> Durch diesen Übertragungsweg kommt es häufig zu Ausbrüchen in Umfeldern mit engem zwischenmenschlichem Kontakt, wie z.B. Schulen, Kasernen, Unternehmen, Ferienlagern, Universitäten oder anderen Einrichtungen. Ebenso wird die Erkrankung häufig unter Familienmitgliedern übertragen, die im selben Haushalt leben.<sup>4,7</sup>

Die Diagnose einer akuten Infektion mit *M. pneumoniae* gestaltet sich schwierig. Zu den grundlegenden diagnostischen Strategien in der klinischen Praxis gehören die Kultur und die Serologie. Eine Kultur mit *M. pneumoniae* ist im Rahmen der Behandlung des Patienten oft nicht praktikabel, da die Kultivierung des Organismus bis zu sechs Wochen in Anspruch nehmen kann.<sup>3</sup> Obgleich Produkte auf serologischer Basis weitläufig erhältlich sind und praktische diagnostische Lösungen bieten, ist die Möglichkeit, eine akute Infektion nachzuweisen, hier häufig beschränkt. Serologische Tests sind häufig gegen spezifische IgM- und IgG-Antikörper gerichtet. IgM-Antikörper lassen sich im Allgemeinen in den ersten sieben Tagen nach Einsetzen der Symptome nicht nachweisen und können noch Monate nach der aktiven Infektion weiterbestehen.<sup>7</sup> Studien haben gezeigt, dass weniger als 50 % der Patienten mit einer akuten Infektion IgG-positiv sind.<sup>4</sup>

Neue diagnostische Verfahren wie beispielsweise Methoden zur DNA-Amplifikation, ermöglichen unter Umständen eine schnellere Diagnose und somit ein frühzeitigeres Erkennen von Ausbrüchen und die Prävention von Sekundärfällen durch die Durchführung von Kontrollmaßnahmen.<sup>5</sup>

#### REAGENZIEN/ENTHALTENE MATERIALIEN

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

1. **Alethia Probenvorbereitungsapparat II /Negativkontrolle III (SMP PREP):** Tris-gepufferte Lösung mit Formalin-behandelten *E. coli*, die *S. aureus*-DNA enthalten; die Lösung enthält Natriumazid (0,09 %) als Konservierungsmittel.
2. **Alethia Mycoplasma-Analysegefäß:** Gefäß mit zwei Kammern, das lyophilisierte Amplifikationsreagenzien (DNA-Polymerase, Deoxynucleotridiphosphate) und entweder *Mycoplasma*-spezifische Primer (TEST-Kammer) oder Primer gegen *S. aureus*-DNA (KONTROLL-Kammer) enthält.
3. **Alethia Hitzebehandlungsröhrchen.**

#### SEPARAT GELIEFESTE MATERIALIEN

1. Alethia Mycoplasma Direkt Externes Kontrollkit, Bestellnummer: 479890

#### BENÖTIGTE, ABER NICHT ENTHALTENE MATERIALIEN

1. Einweg-Latexhandschuhe, ungepudert
2. DNase/RNase-freie, aerosolbeständige Pipettenspitzen
3. Materialien für die Probennahme und Transportmedium:
  - **Abstrichupfer mit zerbrechlichem Kunststoffiel (Einzel- oder Doppeltupfer):** Polyester, beflocktes Nylon oder Rayon
  - **Nicht-nutritives Transportmedium mit Tupfer/Schwamm** (maximale Menge: 1,2 mL): Flüssiges Amies-Medium (ohne Kohle) oder flüssiges Stuart-Medium

#### NICHT MITGELIEFESTE AUSTRÜSTUNG

1. Trockenbad mit 12-mm-Heizblock für die Erhitzung auf 95 °C
2. Digitalthermometer mit Max-/Min-Temperaturspeicher (z.B. wasserdichtes/stoßfestes Thermometer Traceable® Lollipop™)
3. Vortexmischer
4. Intervall-Stoppuhr
5. Mikropipette(n) zur Abgabe von 50 µL
6. Alethia Lesegerät, Meridian Bioscience, Inc. Bestellnummer: 610189

#### VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Sämtliche Reagenzien sind ausschließlich für die In-vitro-Diagnostik bestimmt.
2. Abstrichupfer mit einer Minispitze (Absorption unter 60 µL) sind für die Alethia Mycoplasma Direkt-Probennahme nicht geeignet.
3. Kombinieren Sie keine Kitreagenzien oder Analysegefäße unterschiedlicher Chargen miteinander. Bei Kits des gleichen Typs können jedoch Einzelchargen von den Hitzebehandlungsröhrchen frei miteinander kombiniert werden, solange das jeweilige Haltbarkeitsdatum bei der Verwendung noch nicht abgelaufen ist.
4. Befolgen Sie bei der Durchführung des Tests den Richtlinien der biologischen Sicherheitsstufe 2 und der guten Laborpraxis.<sup>9</sup> Behandeln Sie alle Proben und gebrauchten Analysegefäße so als könnten sie infektiöse Erreger übertragen. In den Bereichen, in denen die Proben und Reagenzien der Kits bearbeitet werden, darf weder gegessen, noch getrunken oder geraucht werden.
5. Tragen Sie bei der Bearbeitung der Proben Einweghandschuhe. Waschen Sie sich nach der Arbeit gründlich die Hände. Wechseln Sie gegebenenfalls öfter die Handschuhe.
6. Labore, die molekulare Tests durchführen, sollten allgemeine Maßnahmen zur Qualitätssicherung im Labor umsetzen.<sup>9</sup> Um das Risiko eines falschen positiven Ergebnisses aufgrund einer Kontamination mit einem Organismus oder Applikon zu vermeiden, sind entsprechende vorbeugende Maßnahmen gemäß bewährten molekularen Praktiken anzuwenden (z.B. sauberer Arbeitsbereich mit geeignetem Reinigungsmittel, welches Nukleinsäuren vernichtet, ausschließliche Verwendung von Aerosol-resistenten Pipettenspitzen, einzelne Handhabung der Proben).
7. Das Alethia Mycoplasma-Analysegefäß enthält lyophilisierte Reagenzien. Der Schutzbeutel soll erst unmittelbar vor Gebrauch geöffnet werden.
8. Das Alethia Mycoplasma-Analysegefäß ist mit einer Sperrvorrichtung ausgestattet, um eine Kontamination des Testbereichs mit dem Amplifikationsprodukt zu verhindern. Benutzen Sie deshalb KEINE Gefäße mit einer defekten Sperrvorrichtung.
9. Entsorgen Sie die Alethia - Analysegefäße unmittelbar nach dem Gebrauch mit geschlossenen Deckeln. Öffnen Sie das Analysegefäß nach dem Probenlauf NICHT mehr. Ein Öffnen des Gefäßes nach der Amplifikation kann zu einer Kontamination des Testbereichs mit dem Amplifikationsprodukt führen.

## GEFAHREN- UND SICHERHEITSHINWEISE

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

## HALTBARKEIT UND LAGERUNG

Das Verfallsdatum ist auf dem Etikett des Kits angegeben. Lagern Sie die Komponenten des Kits bei der auf dem Etikett angegebenen Temperatur.

## VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Stellen Sie sicher, dass die Kitreagenzien vor dem Gebrauch Raumtemperatur (19 - 29 C) erreicht haben. Werden die Reagenzien vor dem Gebrauch nicht auf Raumtemperatur gebracht, kann dies zu falschen Ergebnissen führen.

## PROBENNAHME UND -VORBEREITUNG

**Probentyp:** Rachenabstrichproben.

**Probenahme:** Die Probenahme sollte übereinstimmend mit den Vorgaben der jeweiligen Einrichtung zur Entnahme klinischer Rachenabstrichproben erfolgen. Die Proben sollten durch kräftiges Abreiben der Tonsillen und Rachenhinterwand mit geeigneten Tupfern (z.B. Rayon, beflochtetes Nylon oder Polyester) entnommen werden. **HINWEIS: Abstrichtupfer mit einer Minispitze (Absorption unter 60 µL) sind für die Probenahme nicht geeignet.**

Überführen Sie die Abstrichtupfer in ein nicht-nutritives Transportmedium (z.B. flüssiges Amies-Medium ohne Kohle oder flüssiges Stuart-Medium), das einen Schwamm enthält, und transportieren Sie diese anschließend in das Labor. Die Proben müssen während des Transports auf einer Temperatur von 2 - 29 C gehalten werden.

Die Proben können vor dem Test bis zu 24 Stunden bei Raumtemperatur (19 – 29 C) aufbewahrt werden. Proben, die nicht innerhalb dieses Zeitraums getestet werden, können bis zu 14 Tagen bei 2 – 8 C aufbewahrt werden.

## PROBENVORBEREITUNG

**HINWEIS:** Achten Sie darauf, dass das Alethia Lesegerät eingeschaltet ist und die erforderlichen Leistungsüberprüfungen vor Beginn der PROBENVORBEREITUNG durchgeführt worden sind. Weitere Informationen zur Einrichtung und zum Betrieb des Geräts finden Sie in dem Alethia Lesegerät-Bedienhandbuch.

1. Geben Sie den Einzeltupfer für den Rachenabstrich in den Alethia SMP PREP. Brechen Sie den Stiel des Tupfers ab. Setzen Sie die Kappe des SMP PREPs wieder fest auf. Mischen Sie den SMP PREP mindestens 10 Sekunden lang mit dem Vortexmischer.
2. Entfernen Sie die Kappe der Spitze von dem SMP PREP und drücken Sie 5 bis 10 Tropfen der Probe in ein sauberes Alethia Hitzebehandlungsröhrchen.
3. Wiederholen Sie die Probenvorbereitungsschritte für alle zu verarbeitenden Proben.
4. Erhitzen Sie jede Proben-/Kontrollmischung in einem Trockenbad/Heizblock  $10 \pm 2$  Minuten bei  $95 \pm 5$  C. Überwachen Sie den Hitzebehandlungsschritt mit dem Digitalthermometer und der Intervall-Stoppuhr.
5. Nehmen Sie jedes Hitzebehandlungsröhrchen aus dem Trockenbad/Heizblock. Hitzebehandelte Proben können bis zu 3 Stunden für eine Wiederholung des Tests bei 19 - 29 C aufbewahrt werden. **HINWEIS: Wenn die hitzebehandelten Proben vor dem Test aufbewahrt werden, muss die Hitzebehandlung ( $95 \pm 5$  C für  $10 \pm 2$  Minuten) gemäß Schritt 4 erneut durchgeführt werden.**

## TESTDURCHFÜHRUNG

**HINWEIS:** Es können maximal 10 Proben in einem Testlauf in dem Alethia Lesegerät bearbeitet werden. Weitere Informationen zur Einrichtung und zum Betrieb des Geräts finden Sie in dem Alethia Lesegerät-Bedienhandbuch.

1. Mischen Sie die hitzebehandelten Proben etwa 10 Sekunden lang mit dem Vortexmischer
2. Nehmen Sie pro Probe ein Alethia -Mycoplasma-Analysegefäß aus dem Schutzbeutel. Öffnen Sie vorsichtig das Gefäß und halten Sie die Kammern so, dass das lyophilisierte Reagenz beim Öffnen nicht herausfällt. Setzen Sie das Gefäß auf eine ebene Oberfläche oder in einen dafür passenden Probenständer.
3. Überführen Sie mit einer Mikropipette zunächst 50 µL der hitzebehandelten Probe in die TEST-Kammer (Links/weißes Kügelchen) und anschließend 50 µL der hitzebehandelten Probe in die KONTROLL-Kammer (Rechts/gelbes Kügelchen) des Alethia Analysegefäßes. Achten Sie darauf, dass keine Luft in die Reaktionsmischung gelangt. Mischen Sie die Reaktionen nicht mit der Pipette. Schließen Sie das Alethia Analysegefäß und verschließen Sie die Sperrvorrichtung fest.
4. Klopfen Sie das Analysegefäß leicht auf die Arbeitsfläche auf oder schwenken Sie es, um Luftblasen zu entfernen. Überprüfen Sie das Analysegefäß sorgfältig auf die Auflösung der Kontroll-/Test-Kügelchen sowie auf Luftblasen in der Kammer und Flüssigkeit im oberen Teil des Gefäßes. Falls nicht gelöste Kügelchen, Luftblasen oder Flüssigkeit zu erkennen sind, klopfen Sie das Gefäß vorsichtig auf die Arbeitsfläche und wiederholen Sie die Sichtkontrolle. Die Amplifikation und Detektion sollten innerhalb von 15 Minuten initiiert werden.
5. Stellen Sie das Alethia -Analysegefäß in das Alethia Lesegerät und starten Sie die Amplifikationsreaktion und -detektion. Die Ergebnisse werden am Ende des Testlaufs angezeigt.

## AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Proben-ID	Ausgewiesenes Ergebnis	Auswertung
Patientenprobe	POSITIV	Die Probe enthält <i>Mycoplasma pneumoniae</i> -Ziel-DNA.
	NEGATIV	Die Probe enthält keine <i>Mycoplasma pneumoniae</i> -Ziel-DNA.
	UNGÜLTIG	<b>Kein verwertbares Ergebnis. Wiederholen Sie den Test unter Verwendung der originalen Patientenprobe.</b> Inhibitoren in der Patientenprobe, die Probenvorbereitung wurde nicht sachgemäß durchgeführt, ein Fehler des Reagenzes des Instruments, oder ein Ausfall der internen Kontrolle ist aufgetreten.
Positivkontrolle	POSITIV	<b>Gültiges positives Kontrollergebnis.</b> Die Reagenzien waren zum Zeitpunkt der Benutzung aktiv, das Alethia Lesegerät arbeitet korrekt.
	NEGATIV	<b>Falsches Kontrollergebnis. Die Patientenergebnisse können nicht herausgegeben werden.</b> Wiederholen Sie als ersten Schritt die Kontrolltests, um die Fehlerquelle zu ermitteln. Lassen sich auch bei wiederholten Tests die erwarteten Reaktionen nicht erzielen, rufen Sie bitte den Technischen Support von Meridian Bioscience an (USA): (001) 800-343-3858 oder wenden Sie sich an Ihren zuständigen Vertriebspartner.
	UNGÜLTIG	<b>Kein verwertbares Ergebnis. Wiederholen Sie den gesamten Probenlauf mit den originalen Patientenproben.</b> Die Probenvorbereitung wurde nicht sachgemäß durchgeführt, ein Fehler des Reagenzes, des Instruments, oder ein Ausfall der internen Kontrolle ist aufgetreten.
Negativkontrolle	POSITIV	<b>Falsches Kontrollergebnis. Die Patientenergebnisse können nicht herausgegeben werden.</b> Wiederholen Sie als ersten Schritt die Kontrolltests, um die Fehlerquelle zu ermitteln. Lassen sich auch bei wiederholten Tests die erwarteten Reaktionen nicht erzielen, rufen Sie bitte den Technischen Support von Meridian Bioscience an (USA): (001) 800-343-3858 oder wenden Sie sich an Ihren zuständigen Vertriebspartner.
	NEGATIV	<b>Gültiges negatives Kontrollergebnis.</b> Die Reagenzien waren zum Zeitpunkt der Benutzung aktiv, das Alethia Lesegerät arbeitet korrekt.
	UNGÜLTIG	<b>Kein verwertbares Ergebnis. Wiederholen Sie den gesamten Probenlauf mit den originalen Patientenproben.</b> Die Probenvorbereitung wurde nicht sachgemäß durchgeführt, ein Fehler des Reagenzes, des Instruments oder ein Ausfall der internen Kontrolle ist aufgetreten.
LEERER SCHACHT	KEINERS	Kein Alethia -Analysegefäß in der Alethia Lesegerät-Vertiefung. <b>ODER</b> Das vorhandene Alethia Analysegefäß ist aufgrund unsachgemäßer Probenvorbereitung, vorhandener Verunreinigungen oder falscher Platzierung im Gerät beeinträchtigt. <b>Wiederholen Sie den Test unter Verwendung der Originalprobe.</b>

## QUALITÄTSKONTROLLE

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

- Jedes Analysegefäß enthält eine interne Kontrolle, mit der die Effizienz der Testreagenzien, der DNA-Extraktion, der Probenbearbeitung und die Inhibition der Amplifikation überwacht und kontrolliert wird.
- Verwenden Sie ein digitales Thermometer und eine Intervall-Stoppuhr für die Überwachung der Hitzebehandlung. Verwenden Sie dafür den Max-/Min-Temperaturspeicher des Thermometers, um sicherzustellen, dass eine Temperatur von  $95 \pm 5$  C beibehalten wird. Verwenden Sie die Intervall-Stoppuhr, um sicherzustellen, dass die Dauer der Hitzebehandlung  $10 \pm 2$  Minuten beträgt.
- Gemäß der guten Laborpraxis wird die Verwendung von Kontrollen empfohlen. Die Anwender sollten die vor Ort geltenden Richtlinien zur Mitführung von externen Qualitätskontrollen befolgen.
- Die externen positiven Kontrollreagenzien für den Alethia Mycoplasma Direkt Test sind separat erhältlich (Bestell-Nr. 479890). Der in dem Alethia Mycoplasma Direkt Test (Bestell-Nr. 480250) enthaltene Probenvorbereitungsapparat II mit dem negativem Kontrollreagenz III dient als externe negative Kontrolle. Es wird empfohlen, die Reaktivität jeder neuen Kitcharge und jeder neuen Lieferung des Alethia Mycoplasma Direkt Tests bei Erhalt und vor dem Gebrauch zu überprüfen. Externe Kontrolltests sollten übereinstimmend mit den vor Ort bestehenden Richtlinien durchgeführt werden. Der Alethia Mycoplasma Direkt Test sollte nicht für die Testung an Patientenproben verwendet werden, wenn die externen Kontrollen nicht die richtigen Resultate ergeben.
- Für jedes externe Kontrollreagenz muss ein separates Analysegefäß verwendet werden.

## ERWARTETE WERTE

Für die Ermittlung der Inzidenz von *Mycoplasma pneumoniae* wurden in 2015 bis 2016 klinischen Studien durchgeführt. Dabei betrug die Gesamtprävalenz von *M. pneumoniae* in Rachenabstrichproben 7,5 % (34/456). Die Prävalenz nach Patientenalter ist unten aufgeführt.

Patientenalter	Insgesamt positiv	Gesamtzahl der Proben	Prävalenz (%)
0 bis 1 Monat	0	7	0,0 %
2 Monate bis 2 Jahre	5	157	3,2 %
3 bis 12 Jahre	22	147	15,0 %
13 bis 21 Jahre	5	38	13,2 %
22 bis 65 Jahre	2	86	2,3 %
>65 Jahre	0	21	0,0 %

## EINSCHRÄNKUNGEN

1. Dieses Produkt kann nur mit dem Alethia Lesegerät verwendet werden.
2. Der Alethia Mycoplasma Direkt Test ist ein qualitativer Test, und gibt keine Auskunft über quantitative Parameter z.B Hinweise auf die Belastung mit den Organismen.
3. Dieser Test wurde nicht für die Überwachung der Behandlung von Infektionen mit *Mycoplasma pneumoniae* geprüft.
4. Atemwegsinfektionen können von *Mycoplasma pneumoniae* sowie anderen Pathogenen verursacht werden. Ein positives Ergebnis schließt eine Koinfektion mit anderen Pathogenen der Atemwege nicht aus.
5. Die Leistung des Alethia Mycoplasma Direkt Tests wurde ausschließlich mit prospektiven Rachenabstrichproben vom Menschen ermittelt. Die Leistung mit anderen Probenarten (Nasopharyngealproben, Proben von immungeschwächten oder asymptomatischen Personen) wurde nicht überprüft.
6. Der Nachweis von Nukleinsäuren hängt von der korrekten Probenentnahme sowie von der Handhabung, dem Transport, der Lagerung und der Vorbereitung der Proben ab. Wird bei einem dieser Schritte die korrekte Vorgehensweise nicht eingehalten, kann dies zu falschen Ergebnissen führen.
7. Die Prävalenz einer Infektion mit *M. pneumoniae* beeinflusst den prädiktiven Wert des Tests.
8. Die Nukleinsäuren des Organismus können unabhängig von der Lebensfähigkeit des Organismus *in vivo* fortbestehen. Der Nachweis der Ziel-DNA deutet nicht notwendigerweise auf krankheitsverursachende Erreger hin, die klinische Symptome auslösen. Mit dem Alethia Mycoplasma Direkt Test kann nicht zwischen Trägern und infizierten Personen unterscheiden werden.
9. Die Ergebnisse sollten im Rahmen der klinischen Vorgeschichte, der epidemiologischen Daten und weiteren dem Arzt zur Verfügung stehenden Informationen interpretiert werden. Wie bei allen anderen Tests auf molekularer Grundlage können (A) falsch-negative Ergebnisse als Folge des Vorhandenseins von Inhibitoren, technischen Fehlern, Vertauschen der Proben und geringer Organismenzahl in der klinischen Probe entstehen. Desweiteren können (B) falsch-positive Ergebnisse infolge einer Kreuzkontamination mit Zielorganismen, deren Nukleinsäuren oder dem amplifizierten Produkt sowie durch nicht-spezifische-Signale entstehen.
10. Abschwellende Nasensprays, die Phenylephrin-HCl in Konzentrationen von über 0,595 mg/mL enthalten, können zu falsch-negativen Ergebnissen bei schwach positiven Proben führen.
11. Patientenproben, die Konzentrationen von mehr als 2 % Vollblut enthalten, können den Alethia Mycoplasma Direkt Test beeinträchtigen.
12. Es wurde beobachtet, dass bei der Verwendung der Gefäße zur Probenentnahme von Starplex zusammen mit dem Alethia Mycoplasma Direct Test eine höhere Rate an invaliden Ergebnissen erzeugt werden kann.

## LEISTUNGSMERKMALE

Die Leistungsfähigkeit des Alethia Mycoplasma Direkt Tests wurde in klinischen Studien in einem Zeitraum von 2015 bis 2016 an unabhängigen, klinischen Prüfzentren, an drei geografisch unterschiedlichen Regionen in den USA ermittelt. Die Leistungsmerkmale des Tests wurden mit einem molekularbiologischen, diagnostischen In-vitro-Verfahren, dem Alethia Mycoplasma Test verglichen (Meridian Bioscience, Inc., Cincinnati, OH). Dafür wurden insgesamt 458 prospektive, anonymisierte Rachenabstrichproben vom symptomatischen Patienten und Patientinnen genommen, die vorher eine informierte Einwilligungserklärung abgegeben hatten. Es wurden zwei Proben (0,4 %) aus der klinischen Probenpopulation ausgeschlossen, da während der Testdurchführung ein Instrumentenfehler (1) aufgetreten oder die Probenart (1) ungeeignet war. Es blieben also insgesamt 456 für die Analyse in Frage kommende Proben. Mit dem Alethia Mycoplasma Direkt Test wurden während der klinischen Studie keine ungültigen Ergebnisse generiert (0,0 %; 95 %-KI: 0,0 - 0,8 %). Die Leistungsmerkmale des Alethia Mycoplasma Direkt Tests sind unten zusammengefasst.

Alethia Mycoplasma Direkt	Alethia Mycoplasma			Gesamt
	Positiv	Negativ	Ungültig	
Positiv	24	10 <sup>a</sup>	0	34
Negativ	1 <sup>b</sup>	421	0	422
Ungültig	0	0	0	0
Gesamt	25	431	0	456
			<b>95%-KI</b>	
Positive Übereinstimmung n Prozent	24/25	96,0 %		80,5 - 99,3 %
Negative Übereinstimmung in Prozent	421/431	97,7 %		95,8 - 98,7 %
Gesamtübereinstimmung in Prozent	445/456	97,6 %		95,7 - 98,6 %
Ungültige Ergebnisse	0/456	0,0 %		0,0 - 0,8 %

<sup>a</sup> 4/10 Proben wurden mittels des Alethia Mycoplasma Tests als positiv identifiziert, nachdem der Test mit einer zusätzlichen tiefgekühlten Probe durchgeführt wurde.

<sup>b</sup> Eine Testwiederholung mittels des Alethia Mycoplasma Tests mit den Originalproben des Patienten und einer zusätzlichen tiefgekühlten Probe führte zu negativen Ergebnissen.

Zur der in Frage kommenden Studienpopulation gehörten pädiatrische, erwachsene und geriatrische Patienten im Alter von 3 Wochen bis 97 Jahren, bei denen Rachenabstrichproben entnommen wurden. Es gab keinen Unterschied in der Testleistung aufgrund des Patientenalters. Die Studienpopulation umfasste 230 (50,4 %) weibliche Patienten und 226 (49,6 %) männliche Patienten. Es gab keinen Unterschied in der Testleistung aufgrund des Geschlechts der Patienten.

## ANALYTISCHE SENSITIVITÄT

Die analytische Sensitivität bzw. die Nachweisgrenze für den Alethia Mycoplasma Direkt Test wurde für zwei Stämme von *M. pneumoniae* (FH und M129) bestimmt. Die Nachweisgrenze wurde unter Verwendung von mindestens 20 Replikaten jeder Messgröße und anhand einer vorgegebenen Wahrscheinlichkeit (z.B. 95 % für den Fall, dass 19 von 20 Replikaten positiv sind) bei Erhalt einer positiven Reaktion bestimmt. Die Tests zur analytischen Sensitivität sind nachstehend zusammengefasst:

<i>Mycoplasma pneumoniae</i> -Stamm	KBE/mL
FH (ATCC 15531)	2350
M129 (ATCC 29342)	200

## ASSAY-REAKTIVITÄT

Die folgenden Stämme von *M. pneumoniae* wurden getestet und lieferten mit dem Alethia Mycoplasma Test in Konzentrationen bei oder unterhalb der angegebenen Nachweisgrenze des Tests von 2350 KBE/mL positive Reaktionen: P1 1428 (ATCC 29085), MAC (ATCC 15492), M52 (ATCC 15293), Bru (ATCC 15377), M129-B170 (ATCC 29343), Mutant 22 (ATCC 39505) UAB 55612, UAB 56317, UMTB-10G (ATCC 49899). In den Tests zeigte sich, dass sowohl Stämme des Typs 1 als auch Stämme des Typs 2 mit dem Test nachgewiesen werden können. Dieselbe Reaktivität wird mit dem Alethia Mycoplasma Direkt Test erwartet.

## REPRODUZIERBARKEIT

Die Reproduzierbarkeit wurde von drei unabhängigen Laboren untersucht. Den teilnehmenden Laboren wurden codierte Profile von 10 Proben übergeben. Die Proben waren innerhalb der einzelnen Profile nach dem Zufallsprinzip sortiert, um so ihre Probenidentität zu maskieren. Die Profile umfassten künstlich hergestellte Proben in Form von leicht positiven Proben (d.h. nahe der Nachweisgrenze des Tests, n=3), mäßig positiven Proben (n=3) und stark negativen Proben (n=3). Zum Profil gehörte auch eine natürliche negative Probe. Die Tests wurden am selben Tag von verschiedenen Benutzern in jeder Einrichtung (Intra-Assay-Variabilität) fünf Tage lang (Inter-Assay-Variabilität) durchgeführt. In dieser Studie wurden drei Chargen des Alethia Mycoplasma Direkt Kits und fünf Alethia Lesegeräte eingesetzt. Es wurden für jedes Profil die Positiv- und Negativkontrollen getestet. Die Ergebnisse sind in der nachstehenden Tabelle dargestellt:

Probentyp	Einrichtung 1		Einrichtung 2		Einrichtung 3		Gesamt	
	Übereinstimmung in Prozent	Übereinstimmung in Prozent	Übereinstimmung in Prozent	Übereinstimmung in Prozent	Übereinstimmung in Prozent	Übereinstimmung in Prozent	Übereinstimmung in Prozent	
Stark negativ	30/30	100,0 %	30/30	100,0 %	30/30	100,0 %	90/90	100,0 %
Schwach positiv	30/30	100,0 %	30/30	100,0 %	29/30	96,7 %	89/90	98,9 %
Mäßig positiv	30/30	100,0 %	30/30	100,0 %	30/30	100,0 %	90/90	100,0 %
Negativ	9/10	90,0 %	10/10	100,0 %	10/10	100,0 %	29/30	96,7 %
Negativ-kontrolle	10/10	100,0 %	10/10	100,0 %	10/10	100,0 %	30/30	100,0 %
Positiv-kontrolle	10/10	100,0 %	10/10	100,0 %	10/10	100,0 %	30/30	100,0 %

## KREUZREAKTIVITÄT

Es wurden vorher Kreuzreaktivitätsstudien mit dem Alethia Mycoplasma Test durchgeführt. Dafür wurden positive und negative Proben mit potentiell störenden Bakterien oder Pilzen mit einer minimalen Endkonzentration von  $1,0 \times 10^5$  CFU/mL und mit Virenkonzentrationen größer als  $1,0 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL oder  $1,0 \times 10^6$  Kopien/mL beimpft. Humane DNA wurde bei 2,0 mg/Test getestet, und es wurde keine Kreuzreaktivität beobachtet. Die positiven Proben enthielten Konzentrationen an *M. pneumoniae*, die nahe der Nachweisgrenze lagen. Keine der folgenden Organismen oder Materialien reagierte kreuzreaktiv oder interferierte mit dem Alethia Mycoplasma Test:

*Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Actinomyces odontolyticus*, *Bacillus subtilis*, *Bacteroides fragilis*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella pertussis*, *Burkholderia cepacia*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium difficile*, *Corynebacterium diptheriae*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* (ESBL), *Fusobacterium nucleatum*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* (KPC), *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Moraxella catarrhalis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Neisseria cinerea*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Nocardia asteroides*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella paratyphi* (Gruppe A), *Salmonella typhimurium* (Gruppe B), *Serratia liquefaciens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* (Gruppe B), *Streptococcus anginosus* (Gruppe F), *Streptococcus bovis* (Gruppe D), *Streptococcus canis* (Gruppe G), *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus salivarius*, *Ureaplasma urealyticum*, Adenovirus, Coronavirus, Coxsackievirus, Cytomegalovirus, Epstein-Barr-Virus, Herpes-simplex-Virus 1, Herpes-simplex-Virus 2, humanes Metapneumovirus, Influenza A, Influenza B, Parainfluenza-Virus 1, Parainfluenza-Virus 2, Parainfluenza-Virus 3, Respiratorisches Synzytial-Virus A, Respiratorisches Synzytial-Virus B, Rhinovirus, menschliche DNA. Es wird keine Kreuzreaktivität mit dem Alethia Mycoplasma Direkt Test erwartet.

## STÖRSUBSTANZEN-TESTS

Es wurden potenziell störende Substanzen mit simulierten negativen und künstlichen positiven Proben (*M. pneumoniae*-Stämmen M129 und FH) getestet. In den angegebenen Lösungsmittel-/Verdünnungsmittelkonzentrationen verursachen die folgenden Substanzen keine Störung der Testergebnisse des Alethia Mycoplasma Direkt Tests:

Acetaminophen (18,1 mg/mL), Albuterolsulfat (20 mg/mL), Aspirin (9,1 mg/mL), Azithromycindehydrat (2,0 mg/mL), Cepacol® Mundspülung [Alkohol (1,4 % v/v), Cetylpyridiniumchlorid (0,005 % v/v)], Contac® Erkältungs- und Grippe-Tabletten [Acetaminophen (14,8 mg/mL), Chlorpheniraminmaleat (0,06 mg/mL), Phenylephrin-HCl (0,15 mg/mL)], Diphenhydramin HCl (2,6 mg/mL), Erythromycin (20,0 mg/mL), HALLS® Hustenbonbons [Menthol (0,06 mg/mL)], Ibuprofen (12,7 mg/mL), Phenylephrin-HCl (0,595 mg/mL), Prednison (2,0 mg/mL), \*Robitussin® Husten+Brust Hustensaft [Dextromethorphan-HBr (0,20 mg/mL), Guaifenesin (2,0 mg/mL)], Kochsalzlösung-Nasenspray [Natriumchlorid (0,65 mg/mL)], Mukus (5,0 mg/mL) und Leukozyten (0,5 % v/v).

Es kam bei Konzentrationen von mehr als 2 % in der Probe vorkommendes Vollblut zu ungültigen Ergebnissen.

Phenylephrin HCl in Konzentrationen von über 0,595 mg/mL kann zu falsch-negativen Ergebnissen bei schwach positiven Proben führen.

\*Der Robitussin® Hustensaft verursachte anfänglich mit der positiven Probe P2 1/3 ungültige Ergebnisse, die während des Wiederholungstests akzeptierbare Ergebnisse lieferte. Der Robitussin® Hustensaft wird nicht als interferierende Substanz in Betracht gezogen.

## REFERENCES

1. Nagamine K, Hase T, Notoni, T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplifications using loop primers. Mol Cell Probes 2002;16:223-29.
2. 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.
3. Waites KB, et al. New insights into the pathogenesis and detection of *Mycoplasma pneumoniae* infections. Future Microbiol. 2008 December; 3(6):635-648.
4. Waites KB, Talkington DF. *Mycoplasma pneumoniae* and Its role as a human pathogen. Clin Microbiol Rev. 2004 October; 17(4):697-728.

5. Thibodeau KP, Viera, AJ. Atypical pathogens and challenges in community-acquired pneumonia. *American Family Physician*. 2004 April; Vol 66, Number 7.
6. US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. *Mycoplasma pneumoniae* Infection; <http://www.cdc.gov/pneumonia/atypical/mycoplasma/index.html>
7. American Academy of Pediatrics. *Red Book: 2012 Mycoplasma pneumoniae and Other Mycoplasma Species Infections*. Pickering LK, ed. 29th ed. Elk Grove Village, IL: American Academy of Pediatrics; 2012.
8. US Department of Health and Human Services PHS/CDC/NIH. Biosafety in microbiology and biomedical laboratories, Washington DC: US Government Printing Office, 2007.
9. CLSI: MM3-A2 Molecular diagnostic methods for infectious disease; approved guideline, 2nd ed. Wayne PA: Clinical Laboratory Standards Institute. 2006.



SN11039

REV. 10/18

 Manufactured By	<p><b>Meridian Bioscience, Inc.</b>  <b>Corporate Office</b>          3471 River Hills Drive          Cincinnati, Ohio 45244 USA  <b>Telephone: 513.271.3700</b>  <b>Orders/Customer Service:</b>          800.543.1980  <b>Technical Support Center:</b>          800.343.3858  <b>Information Fax: 513.272.5432</b>  <b>Ordering Fax: 513.271.0124</b></p>
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> <b>EC REP</b> </div> Authorized Representative	<p><b>Meridian Bioscience Europe S. r. L</b>          Via dell' Industria, 7          20020 Villa Cortese, Milano          ITALY  <b>Tel: +39 0331 43 36 36</b>  <b>Fax: +39 0331 43 36 16</b>  <b>Email: <a href="mailto:info@meridianbioscience.eu">info@meridianbioscience.eu</a></b>  <b>WEB: <a href="http://www.meridianbioscience.com/eu">www.meridianbioscience.com/eu</a></b></p>

**Meridian Bioscience Europe s.a./n.v.**  
 2 Avenue du Japon - 1420 Braine l'Alleud  
 BELGIUM  
 Tel: +32 (0) 67 89 59 59  
 Fax: +32 (0) 67 89 59 58  
 Email: [info.bnl@meridianbioscience.eu](mailto:info.bnl@meridianbioscience.eu)













**Meridian Bioscience Europe France**  
 34 rue de Ponthieu - 75008 Paris  
 FRANCE  
 Tel: +33 (0) 1 42 56 04 40  
 Fax: +33 (0) 9 70 06 62 10  
 Email: [info.fr@meridianbioscience.eu](mailto:info.fr@meridianbioscience.eu)















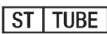






**Meridian Bioscience Europe b.v.**  
 Postbus 301 - 5460 AH Veghel  
 NETHERLANDS  
 Tel: +31 (0) 411 62 11 66  
 Fax: +31 (0) 411 62 48 41  
 Email: [info.bnl@meridianbioscience.eu](mailto:info.bnl@meridianbioscience.eu)

## 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 symboles, Guía de símbolos, Zeichenerklärung)**

	Use By / Utilizzare entro / Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis	<b>CONTROL</b> +	Positive control / Controllo positivo / Contrôle positif / Control positivo / Positive Kontrolle
<b>LOT</b>	Batch Code / Codice del lotto / Code du lot / Código de lote / Chargenbezeichnung	<b>CONTROL</b> -	Negative control / Controllo negativo / Contrôle négatif / Control negativo / Negative Kontrolle
<b>IVD</b>	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	<b>EC REP</b>	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
	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 Diagnostika 98/79/EG.	<b>SMP PREP DIL SPE</b>	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
		<b>STERILE R</b>	Sterilization by gamma irradiation / Sterilizzazione con raggi gamma / Sterilisation par irradiation aux rayons gamma / Esterilizado por irradiación gamma / Sterilisation durch Gammastrahlen
<b>REF</b>	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	<b>RoHS</b>	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
<b>SN</b>	Serial number / Numero di serie / Numéro de série / Número de serie / Seriennummer	<b>STERILE EO</b>	Sterilization by ethylene oxide / Sterilizzazione con ossido di etilene / Stérilisation par oxyde d'éthylène / Esterilizado por óxido de etileno / Sterilisation durch Ethylenoxid
	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	<b>BUF RXN</b>	Reaction Buffer / Tampone di reazione / Solution de réaction tamponnée / Tampón de Reacción / Reaktionspuffer
	Temperature limitation / Limiti 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
	Female / Femmineile / De sexe féminin / Hembra / Frau		Recycle - do not dispose of as general waste / Riciclare - non eliminare come rifiuto generico / Recycler - ne pas jeter dans une poubelle / Recicle - no desecho como basura general / Recycling- dieses Produkt nicht über den Hausmüll entsorgen
	Single Use Only / Prodotto Monouso / A usage unique / Para Un Solo Uso / nur für die einmalige Anwendung		

	Test Device / Dispositivo test / Dispositif de test / Dispositivo de Prueba / Testgerät		Heat Treatment Tube / Provetta per il Trattamento termico / Tube pour le traitement thermique / Tubo de tratamiento de calor / Röhrchen zur Hitzebearbeitung
	Date of manufacture / Data di fabbricazione / Date de fabrication / Fecha de fabricación / Herstellungsdatum		For IVD Performance Evaluation Only / Soltanto 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 / Precaución: Radiación Laser / WARNUNG: Lasersstrahlung		CAUTION: Protect from water / ATTENZIONE: Proteggere dall'acqua / AVERTISSEMENT: Protéger de l'humidité / Precaución: Proteja del agua / WARNUNG: Vor Feuchtigkeit schützen
	CAUTION: Risk of Danger / ATTENZIONE: Pericolo / AVERTISSEMENT: Risques de danger / Precaución: Peligroso / WARNUNG: Riskogefahr		Assay Control / Controllo del test / Test de contrôle / Control de Ensayo / Kontrolltest
	Buffer / Soluzione tampne / Solution tamponnée / Tampón / Puffer		Warning / Avvertenze / Mise En Garde / Advertencia / Warnhinweise
	Mineral Oil / Olio Minerale / Huile Minérale / Aceite Mineral / Mineralöl		Media / Terreno di trasporto / Milieux / Medio / Medium
	Screw Top Tube / Provetta con tappo a vite / Tube à bouchon vissé / Tubo con tapa de rosca / Röhrchen mit Schnappverschluss		Sample Preparation Column / Colonna di preparazione dei campione / Colonne pour la préparation de l'échantillon / Columna de preparación de muestra / Säule zur Probenaufarbeitung
	Sample Buffer / Soluzione tampone per il campione / Tampon de l'échantillon / Tampón de muestra / Probenpuffer		Pretreatment Reagent / Reagente di Prettrattamento / Réactif de prétraitement / Reactivo de pretratamiento / Reagenz für die Vorbehandlung
	Prescription Use Only / Per l'uso su prescrizione medica / Uniquement sur prescription / Solo Para Uso Por Receta / verschreibungspflichtig		Sample Preparation / Preparazione del campione / Préparation de l'échantillon / Preparación de Muestra / Probenvorbereitung
	Empty Tube / Provetta vuota / Tube vide / Tubo vacío / Leeres Gefäß		

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.