

alethia®

Group B Streptococcus

DNA Amplification Assay

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

REF 480350

IVD

Rx Only

INTENDED USE

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

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

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

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

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

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

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

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

BIOLOGICAL PRINCIPLES

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

Group B *Streptococcus* (*Streptococcus agalactiae* or GBS) is a gram positive bacteria commonly found in the gastrointestinal, genital and urinary tract of healthy adults. Approximately 10-30% of all pregnant women are colonized with GBS in the vagina or rectum. While Group B *Streptococcus* colonized mothers typically show no symptoms or health effects, the bacteria can be passed to their child during labor and delivery.

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

Screening for GBS colonization in antepartum women between 35 to 37 weeks gestation, followed by intrapartum antibiotic treatment for women with positive colonization status has proven to be an effective mechanism for prevention of perinatal Group B Streptococcal disease. As colonization may be transient, intermittent or persistent throughout pregnancy, screening is most effective when performed when specimens are collected no more than five weeks (35–37 weeks gestation) prior to delivery and after enrichment with selective broth medium.

REAGENTS/MATERIALS PROVIDED

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

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

MATERIALS PROVIDED SEPARATELY

Alethia GBS External Control Kit, Catalog Number: 479900

MATERIALS NOT PROVIDED

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

EQUIPMENT NOT PROVIDED

1. Dry-bath with 12 mm heat block capable of 95 C
2. Digital thermometer with Max/Min Temperature Memory (eg, Traceable® Lollipop™ Waterproof/Shockproof Thermometer)
3. Vortex mixer
4. Interval timer
5. Micropipette capable of dispensing 50 µL
6. Micropipette capable of dispensing 200 µL
7. Alethia Incubator/Reader Meridian Bioscience, Inc. Catalog Number: 610189

PRECAUTIONS

1. All reagents are for in vitro diagnostic use only.
2. Do not interchange Control Reagents or Test Devices between lots. Reaction Buffer and Heat Treatment Tubes are interchangeable provided they are within assigned expiration dates when used.
3. Follow Biosafety Level 2 and Good Laboratory practices during testing.⁵ 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.
4. Wear disposable gloves while handling specimens and thoroughly wash hands afterwards.
5. Quality Control Programs for Molecular Testing Laboratories should be employed.⁶
6. The Alethia GBS Test Device contains lyophilized reagents. The protective pouch should not be opened until ready to perform the assay.
7. The Alethia GBS Test Device includes a latch feature that is designed to prevent contamination of the test area with amplification product. Do NOT use Test Devices with broken latches.
8. 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 at 2-27 C.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Sample type: Vaginal/rectal swabs taken from antepartum women.
Sample Collection: Vaginal and rectal sample collection should be performed in accordance with published guidelines for collection of clinical specimens for culture of Group B *Streptococcus*.⁴ Vaginal and rectal specimens may be collected using the same swab or two different swabs. *Cervical, perianal, perirectal or perineal specimens are not acceptable sample types. A speculum should not be used for sample collection.*
Place swab(s) in a non-nutritive transport medium (eg. Stuart's or Amies without charcoal) and transported to the laboratory. In the event that two different swabs are used for sample collection, a single transport device may be used.
Sample Enrichment: Remove vaginal/rectal swab(s) from transport device and place in culture enrichment broth (Lim Broth, TransVag Broth or Carrot Broth). Incubate sample(s) in culture enrichment broth at 37 ± 2 C for 18-24 hours. Enriched samples should be tested as soon as possible. Enriched samples may be held at room temperature for up to six hours prior to testing. When testing will not be initiated within this time, the enriched sample may be stored at 2-8 C for up to seven days. Long-term storage of enriched samples may yield invalid results.

REAGENT PREPARATION

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

SPECIMEN PREPARATION

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

1. Label 1 Heat Treatment Tube for each sample to be tested.
2. Add 200 µL of the Alethia Control Reagent to each heat treatment tube.
3. Mix each enriched broth culture thoroughly.
4. Add 50 µL of the mixed, enriched broth liquid to the Alethia Control Reagent. Specimens diluted in Alethia Control Reagent may be held at room temperature (21-27 C) for up to 15 minutes prior to proceeding. Incorrect results may be obtained if diluted specimens are held longer than 15 minutes before heat treatment.
5. Vortex each Sample/Control mixture for a minimum of 10 seconds.
6. 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.
7. Remove each Heat Treatment Tube from the dry-bath/heat block and vortex for approximately 10 seconds. Heat-treated samples may be held at 19-29 C for up to 45 minutes prior to addition to Reaction Buffer. Heat-treated samples may not be frozen.

TEST PROCEDURE

NOTE: A maximum of 10 samples can be processed in a single Alethia Incubator/Reader run.

1. Transfer 50 µL of heat-treated sample to an appropriately labeled Alethia Reaction Buffer tube.
2. Vortex the Reaction Buffer tube containing heat-treated sample for approximately 10 seconds.
3. Repeat steps 1 and 2 for all the samples to be analyzed before proceeding.
4. Remove 1 Alethia GBS Test Device from its protective pouch per sample. Carefully open the device by lifting the latch, 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.
5. 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.
6. Tap device on the bench top or mix to remove air bubbles. Carefully examine the test device to ensure that there are no air bubbles left in the tube and no liquid remaining in the top of the device.
7. Insert the Alethia Test Device into the Alethia Incubator/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>Streptococcus agalactiae</i> target DNA.
	NEGATIVE	No <i>Streptococcus agalactiae</i> DNA detected.
	INVALID	No reportable result. Repeat the test using the original enriched broth sample. Inhibitory patient specimen, improper sample preparation, reagent failure, instrument failure or internal control failure.
Positive Control	POSITIVE	Valid positive control result. Reagents active at time of use, Alethia Incubator/Reader performing correctly.
	NEGATIVE	Incorrect control result. Repeat the control tests as the first step in determining the root cause of the failure. If control failures are repeated please contact Meridian's Technical Services Department at 1-800-343-3858 (US) or your local distributor.
	INVALID	No reportable result. Repeat entire assay run using original samples. Improper sample preparation, reagent failure, instrument failure or internal control failure.
Negative Control	POSITIVE	Incorrect control result. Repeat the control tests as the first step in determining the root cause of the failure. If control failures are repeated please contact Meridian's Technical Services Department at 1-800-343-3858 (US) or your local distributor.
	NEGATIVE	Valid negative control result. Reagents active at time of use, Alethia Incubator/Reader performing correctly.
	INVALID	No reportable result. Repeat entire assay run using original samples. Improper sample preparation, reagent failure, instrument failure or internal control failure.
EMPTY WELL	NONE	No Alethia Test Device in the Alethia Incubator/Reader Well. OR The Alethia Test Device present is compromised due to sample preparation failure, dirty device or improperly seated device. Repeat the test using original sample.

QUALITY CONTROL

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

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.
3. 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.
4. Alethia GBS External Control Reagents are supplied separately (Catalog 479900). It is recommended that the reactivity of each new lot and each new shipment of Alethia GBS 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 GBS test kit should not be used in patient testing if the external controls do not produce the correct results.
5. A separate device must be used for each external control reagent.
6. Heat-treatment of GBS External Positive or Negative Control samples is not required.

EXPECTED VALUES

Approximately 10-30% of antepartum women are colonized with Group B *Streptococcus* in the vagina or rectum.⁴ Clinical performance of the Alethia GBS Assay was established during two clinical studies completed in 2011 (Lim Broth and TransVag Broth) and 2012 (Carrot Broth).

The overall incidence of GBS colonization in antepartum women tested during the 2011 study was 24.3% (201 of 826). Incidence of GBS colonization for enrichment performed using Lim Broth was found to be 25.1% (101 of 403); while incidence for specimens enriched by TransVag Broth was found to be 23.6% (100 of 423).

The overall incidence of GBS colonization in antepartum women tested during the 2012 Carrot Broth study was found to be 22.5% (135 of 600).

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

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

SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Alethia GBS was evaluated in 2011 and 2012 in two separate studies (1) Lim and TransVag Broth enrichment and (2) Carrot Broth enrichment. Compiled clinical study information is described below.

Table 1. Performance characteristics by enrichment method

	Positive Samples			Negative Samples		
	Alethia / GBS Culture	Sensitivity %	95% CI	Alethia / GBS Culture	Specificity %	95% CI
Total	285/289	98.6%	96.5 – 99.5%	1045/1121	93.2%	91.6 – 94.5%
Lim Broth	82/84	97.6%	91.7 – 99.3%	296/315	94.0%	90.8 – 96.1%
TransVag Broth	68/70	97.1%	90.2 – 99.2%	314/346	90.8%	87.2 – 93.4%
Carrot Broth	135/135	100%	97.2 – 100.0%	435/460	94.6%	92.1 – 96.3%

(1) Lim and TransVag Broth Enrichment Study

Alethia GBS assay performance using Lim Broth and TransVag Broth enriched specimens was evaluated in 2011 by four independent clinical test sites located in the Midwestern and Southern regions of the United States. A total of 826 qualified patient samples were evaluated. Samples were obtained according to established guidelines for collection of clinical specimens for culture of Group B *Streptococcus* and enriched for 18-24 hours in either Lim Broth or TransVag Broth. A total 403 (48.8%) Lim Broth enriched specimens were tested by Clinical Site 2 (210) and Clinical Site 4 (193). A total of 423 (51.2%) TransVag Broth enriched specimens were tested by Clinical Site 1 (234) and Clinical Site 3 (189). The age groups of patients tested ranged from 15 years of age to 44 years of age, with age unknown for three (0.4%) of the patient population. No differences in test performance were observed based on enrichment medium or patient age. Lim and TransVag Broth enrichment study performance data is summarized in Table 2; Table 3 summarizes assay performance by Clinical Site.

Table 2. Lim and TransVag enrichment performance data

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

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

Table 3. Lim and TransVag enrichment performance characteristics by Clinical Site

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

(2) Carrot Broth Enrichment Study

Alethia GBS assay performance using Carrot Broth enriched specimens was completed in 2012 by three independent clinical test sites located in the Midwestern and Southern regions of the United States. A total of 600 qualified patient samples were evaluated. Samples were obtained according to established guidelines for collection of clinical specimens for culture of Group B *Streptococcus* and enriched in Carrot Broth prior to Alethia GBS testing. The age groups of patients tested ranged from 15 years of age to 48 years of age; no differences in test performance were observed based on patient age. Carrot Broth enrichment study performance data is summarized in Table 4; Table 5 summarizes assay performance by Clinical Site.

Table 4. Carrot Broth enrichment performance characteristics

Group B <i>Streptococcus</i> Culture	Alethia Group B <i>Streptococcus</i> (GBS)		
	Positive	Negative	Total
Positive	135	0	135
Negative	25	435	460
Total	160	435	595
			95% CI
Sensitivity	135/135	100.0%	97.2 – 100.0%
Specificity	435/460	94.6%	92.1 – 96.3%
Correlation	570/595	95.8%	93.9 – 97.1%

Twenty four of the 25 Alethia Positive: GBS Culture Negative specimens were further analyzed by an independent laboratory developed GBS Molecular Assay. Sixteen of the 24 discrepant samples were positive by the alternate molecular amplification assay. Invalid results were obtained for 5/600 (0.8%) samples. One of the five samples remained invalid after repeat testing.

Table 5. Carrot Broth enrichment performance characteristics by Clinical Site

Site	Positive Samples			Negative Samples		
	Alethia / GBS Culture	Sensitivity %	95% CI	Alethia / GBS Culture	Specificity %	95% CI
Total	135/135	100.0%	97.2 – 100.0%	435/460	94.6%	92.1 – 96.3%
Site 1	58/58	100.0%	93.8 – 100.0%	92/93	98.9%	94.2 – 99.8%
Site 2	36/36	100.0%	90.4 – 100.0%	145/149	97.3%	93.3 – 99.0%
Site 3	41/41	100.0%	91.4 – 100.0%	198/218	90.8%	86.3 – 94.0%

ANALYTICAL SENSITIVITY

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

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

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

ASSAY REACTIVITY

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

REPRODUCIBILITY

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

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

CROSSREACTIVITY

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

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

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

TESTS FOR INTERFERING SUBSTANCES

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

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

alethia®

Group B Streptococcus

DNA Amplification Assay

Test di amplificazione del DNA per il rilevamento dello *Streptococcus* Gruppo B in campioni da tamponi vaginali/rettali antepartum

REF 480350

IVD

Rx Only

FINALITÀ D'USO

Il test Alethia *Streptococcus* Gruppo B (GBS), eseguito sull'incubatore/lettore Alethia, è un test qualitativo diagnostico in vitro per il rilevamento di *Streptococcus agalactiae* in colture arricchite ottenute da tamponi vaginali/rettali di donne antepartum. Le colture arricchite sono ottenute mediante incubazione di 18-24 ore dei tamponi vaginali/rettali in un brodo di coltura selettivo Lim, TransVag oppure Carrot.

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

Il test Alethia GBS non fornisce risultati sulla suscettibilità agli antibiotici. Isolati colturali sono necessari per eseguire l'analisi di suscettibilità, come raccomandato per le donne allergiche alla penicillina.

Il test Alethia GBS è inteso per l'utilizzo in ospedale, laboratori statali o centri di il dispositivo non è destinato all'uso ambulatoriale (point of care) al di fuori del laboratorio.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

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

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

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

PRINCIPI BIOLOGICI

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

Lo *Streptococcus* Gruppo B (*Streptococcus agalactiae* o GBS) è un batterio gram-positivo che si trova comunemente nel tratto gastrointestinale, genitale e urinario degli adulti sani. Circa il 10-30% di tutte le donne incinte sono colonizzate con il GBS nella vagina o nel retto. Mentre lo *Streptococcus* Gruppo B ha colonizzato madri che tipicamente non mostrano sintomi o effetti sulla salute, i batteri possono essere trasmessi ai loro figli durante il travaglio e il parto.

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

Lo screening per la colonizzazione GBS nelle donne antepartum tra 35 e 37 settimane di gestazione, seguito dal trattamento antibiotico intrapartum per le donne con stato di colonizzazione positivo, si è dimostrato un meccanismo efficace per la prevenzione della malattia streptococcica del Gruppo B perinatale. Dal momento che la colonizzazione potrebbe essere transitoria, intermittente o persistente durante tutta la gravidanza, lo screening è più efficace quando i campioni vengono raccolti non più di cinque settimane (35 – 37 settimane di gestazione) prima del parto e dopo l'arricchimento con un brodo di coltura selettivo.

REAGENTI/MATERIALI FORNITI

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

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

MATERIALI FORNITI SEPARATAMENTE

Kit di controlli esterni Alethia GBS, numero di catalogo: 479900

MATERIALI NON FORNITI

1. Guanti in lattice monouso, senza talco
2. Puntali per pipette privi di DNase/RNase e resistenti alla contaminazione da aerosol,
3. Tamponi vaginali/rettali: rayon, cotone, dacron/poliestere, flocculati di nylon, gommapiuma, tamponi nel terreno liquido Amies, tamponi in terreno Stuart modificato. *L'uso di materiali alternativi per i tamponi non è stato convalidato con il test Alethia GBS.*
4. Brodo di arricchimento:
 - Brodo Lim [brodo Todd Hewitt arricchito con colistin (10 µg/mL) e acido nalidixico (15 µg/mL)] OPPURE
 - Brodo TransVag [brodo Todd Hewitt arricchito con gentamicina (8 µg/mL) e acido nalidixico (15 µg/mL)] OPPURE
 - Brodo Carrot

STRUMENTI NON FORNITI

1. Blocco termostatico a secco con pozzetti da 12 mm in grado di raggiungere 95 °C
2. Termometro digitale con registrazione della temperatura max/min (es., termometro impermeabile/a prova d'urto Traceable® Lollipop™)
3. Vortex
4. Timer
5. Micropipetta in grado di dispensare 50 µL
6. Micropipetta in grado di dispensare 200 µL
7. incubatore/lettore Alethia, Meridian Bioscience, Inc. Numero di catalogo: 610189

PRECAUZIONI

1. Tutti i reagenti sono esclusivamente per uso diagnostico in vitro.
2. Non scambiare i reagenti di controllo o i dispositivi test tra lotti diversi. Il tampone di reazione e le provette per il trattamento termico sono intercambiabili, a patto che non siano ancora scaduti quando vengono utilizzati.
3. Seguire le buone pratiche di laboratorio e il livello 2 di biosicurezza durante l'analisi.⁶ Trattare tutti i campioni e i dispositivi test usati come in grado di trasmettere agenti infettivi. Non mangiare, bere o fumare nelle aree in cui vengono maneggiati i campioni o i reagenti del kit.
4. Indossare guanti monouso quando si maneggiano i campioni e in seguito lavarsi con cura le mani.
5. Applicare i requisiti indicati nei programmi di controllo della qualità per laboratori di analisi molecolari.⁵
6. Il Dispositivo Test Alethia GBS contiene reagenti liofilizzati. Non aprire la busta protettiva fino a quando non si è pronti a eseguire l'analisi.
7. Il Dispositivo Test Alethia GBS comprende un sistema di chiusura progettato per prevenire la contaminazione dell'area di analisi con il prodotto di amplificazione. NON utilizzare dispositivi test con sistemi di chiusura danneggiati.
8. Smaltire i Dispositivi Test Alethia subito dopo l'uso, lasciando chiuse le linguette. NON aprire il dispositivo test dopo l'uso. L'apertura del dispositivo dopo l'amplificazione potrebbe comportare la contaminazione dell'area di analisi 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 il kit a 2-27 C.

RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

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

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

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

Arricchimento dei campioni: rimuovere il(i) tampone(i) vaginale/rettale dal dispositivo di trasporto e collocarlo(i) in un brodo di coltura di arricchimento (brodo Lim, TransVag o Carrot). Incubare il(i) campione(i) nel brodo di coltura di arricchimento a 37 ± 2 C per 18-24 ore. I campioni arricchiti vanno testati il prima possibile. I campioni arricchiti possono essere conservati a temperatura ambiente fino a un massimo di sei ore prima dell'analisi. Se l'analisi non viene iniziata entro tale limite di tempo, il campione arricchito può essere conservato a 2-8 C fino a sette giorni. La conservazione a lungo termine di campioni arricchiti può invalidare i risultati.

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

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

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

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

1. Etichettare 1 provetta per il trattamento termico per ogni campione da analizzare.
2. Aggiungere 200 µL del reagente di controllo Alethia a ciascuna provetta per il trattamento termico.
3. Miscelare accuratamente ciascun brodo di coltura arricchito.
4. Aggiungere 50 µL del brodo di coltura mescolato e arricchito al reagente di controllo Alethia. I campioni diluiti nel reagente di controllo Alethia possono essere conservati a temperatura ambiente (21-27 C) per un massimo di 15 minuti prima di procedere. Risultati incorretti potrebbero ottenersi se i campioni diluiti vengono conservati oltre 15 minuti prima del trattamento termico.
5. Agitare con il Vortex ciascuna miscela campione/ controllo per almeno 10 secondi.
6. Riscaldare ciascuna miscela campione/ controllo in un blocco termostatico a 95 ± 5 C per 10 ± 2 minuti. Monitorare la fase del trattamento termico con il termometro digitale e il timer.
7. Rimuovere ciascuna provetta per il trattamento termico dal blocco termostatico e agitare con il Vortex per circa 10 secondi. I campioni trattati termicamente possono essere conservati a 19-29 C fino a 45 minuti prima dell'aggiunta al tampone di reazione. I campioni trattati termicamente non devono essere congelati.

PROCEDURA DEL TEST

NOTA: è possibile analizzare un massimo di 10 campioni in un singolo ciclo Alethia.

1. Trasferire 50 µL di campione trattato termicamente in una provetta con il tampone di reazione Alethia adeguatamente etichettata.
2. Agitare con il Vortex la provetta con il tampone di reazione contenente il campione trattato termicamente per circa 10 secondi.
3. Ripetere i punti 1 e 2 per tutti i campioni da analizzare prima di procedere.
4. Estrarre dalla relativa busta protettiva un Dispositivo Test Alethia GBS per ciascun campione da analizzare. Aprire con attenzione il dispositivo sollevando il fermo, tenendo le camere in maniera tale che il reagente liofilizzato non fuoriesca dall'apertura. Porre il dispositivo su una superficie piana o in un portaprovette di misura adeguata.
5. 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. Non miscelare la soluzione di reazione con la pipetta. Fare attenzione a non introdurre aria nella miscela di reazione.
6. Picchiare leggermente il dispositivo sul banco di lavoro o agitare per rimuovere le bolle d'aria. Esaminare attentamente il Dispositivo Test per verificare che non siano rimaste bolle d'aria nella provetta e che non sia rimasto liquido nel tappo del dispositivo.
7. Inserire il Dispositivo Test Alethia nell'incubatore/lettore Alethia e iniziare la reazione di amplificazione e di rilevamento. I risultati saranno visualizzati alla conclusione del ciclo.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

ID campione	Risultato riportato	Interpretazione
Campione del paziente	POSITIVO	Il campione contiene il DNA target di <i>Streptococcus agalactiae</i> .
	NEGATIVO	Nessun DNA di <i>Streptococcus agalactiae</i> rilevato.
	NON VALIDO	Nessun risultato refertabile. Ripetere il test utilizzando il campione originale arricchito in brodo. Campione del paziente con effetto inibitorio, preparazione del campione non corretta, deterioramento del reagente, guasto dello strumento o fallimento del controllo interno.
Controllo positivo	POSITIVO	Risultato del controllo positivo valido. Reagenti reattivi al momento dell'uso, incubatore/lettore Alethia correttamente funzionante.
	NEGATIVO	Risultato del controllo non corretto. Come prima opzione per identificare la causa del fallimento ripetere i test di controllo. Se il fallimento dei test di controllo dovesse ripetersi, contattare il Servizio di Assistenza tecnica Meridian (negli USA 001-800-343-3858) o il Distributore Locale, (Italia +390331433636).
	NON VALIDO	Nessun risultato refertabile. Ripetere l'intero ciclo di analisi usando i campioni originali. Preparazione del campione non corretta, deterioramento del reagente, guasto dello strumento o fallimento del controllo interno.
Controllo negativo	POSITIVO	Risultato di controllo non corretto. Come prima opzione per identificare la causa del fallimento ripetere i test di controllo. Se il fallimento dei test di controllo dovesse ripetersi, contattare il Servizio di Assistenza tecnica Meridian (negli USA 001-800-343-3858) o il Distributore Locale, (in Italia +390331433636).
	NEGATIVO	Risultato di controllo negativo valido. Reagenti reattivi al momento dell'uso, incubatore/lettore Alethia correttamente funzionante.
	NON VALIDO	Nessun risultato refertabile. Ripetere l'intero ciclo di analisi usando i campioni originali. Preparazione del campione non corretta, deterioramento del reagente, guasto dello strumento o fallimento del controllo interno.
POZZETTO VUOTO	NESSUNO	Nessun Dispositivo Test Alethia nel pozzetto dell'incubatore/lettore Alethia. OPPURE Il Dispositivo Test Alethia presente è compromesso a causa di un errore nella preparazione del campione, dispositivo sporco o dispositivo non propriamente alloggiato. Ripetere il test utilizzando il campione originale.

CONTROLLO QUALITÀ

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

1. Ogni dispositivo contiene una camera per il controllo interno che controlla l'inibizione dell'amplificazione, i reagenti dell'analisi e l'efficacia nella manipolazione del campione.
2. La fase del trattamento termico è monitorato con un termometro esterno e con un timer a intervalli. Utilizzare la registrazione della temperatura max/min del termometro per garantire che sia garantita una temperatura di 95 ± 5 C. Usare il timer a intervalli per garantire che la durata del trattamento termico sia di 10 ± 2 minuti.
3. Una buona pratica di laboratorio raccomanda l'uso dei reagenti di controllo. Gli operatori devono attenersi alle pertinenti linee guida federali, statali e locali riguardanti l'utilizzo dei controlli di qualità esterni.
4. I reagenti di controllo esterni Alethia GBS sono forniti separatamente (Numero di Catalogo 479900). Si raccomanda che la reattività di ciascun nuovo lotto e di ogni nuova spedizione di Alethia GBS venga verificata al momento della ricezione o prima dell'uso. Le analisi dei controlli esterni vanno eseguite quindi, in conformità con le appropriate linee guida federali, statali e locali. Il test kit Alethia GBS non va utilizzato per l'analisi dei pazienti se i controlli esterni non producono i risultati corretti.
5. È necessario utilizzare un Dispositivo Test differente per ciascun reagente di controllo esterno.
6. Il trattamento termico dei Controlli esterni GBS positivo e negativo non è necessario.

VALORI ATTESI

Circa il 10-30% delle donne antepartum sono colonizzate da *Streptococcus* Gruppo B nella vagina o nel retto.⁴ Le prestazioni cliniche del test Alethia GBS sono state stabilite nel corso di due studi clinici completati nel 2011 (con brodo Lim e TransVag) e nel 2012 (con brodo Carrot).

L'incidenza complessiva della colonizzazione da GBS nelle donne antepartum testate durante lo studio del 2011 è stata del 24,3% (201 su 826). L'incidenza della colonizzazione da GBS a seguito di arricchimento del campione con brodo di coltura Lim è stata del 25,1% (101 su 403); mentre l'incidenza per campioni arricchiti con TransVag è stata del 23,6% (100 su 423).

L'incidenza complessiva della colonizzazione da GBS nelle donne antepartum testate durante lo studio del 2012 con brodo Carrot è stata del 22,5% (135 su 600).

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

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

PRESTAZIONI SPECIFICHE

Alethia GBS è stato valutato nel 2011 e nel 2012 da due studi distinti (1) con arricchimento in brodo Lim e TransVag e (2) con arricchimento in brodo Carrot. Di seguito sono riportate le informazioni sullo studio clinico effettuato.

Tabella 1. Caratteristiche prestazionali per metodo di arricchimento

	Campioni Positivi			Campioni Negativi		
	Alethia / Coltura GBS	Sensibilità %	95% CI	Alethia / Coltura GBS	Specificità %	95% CI
Totale	285/289	98,6%	96,5 – 99,5%	1045/1121	93,2%	91,6 – 94,5%
Brodo Lim	82/84	97,6%	91,7 – 99,3%	296/315	94,0%	90,8 – 96,1%
Brodo TransVag	68/70	97,1%	90,2 – 99,2%	314/346	90,8%	87,2 – 93,4%
Brodo Carrot	135/135	100%	97,2 – 100,0%	435/460	94,6%	92,1 – 96,3%

(1) Studio di arricchimento con brodo Lim e TransVag

Le prestazioni del test Alethia GBS su campioni arricchiti in brodo Lim e brodo TransVag sono state valutate nel 2011 da quattro laboratori clinici indipendenti situati nelle regioni del Midwest e del Sud degli Stati Uniti. È stato analizzato un totale di 826 campioni qualificati. I campioni sono stati ottenuti in conformità alle linee guida stabilite per la raccolta di campioni clinici per la coltura di *Streptococcus* Gruppo B e sono stati arricchiti per 18-24 ore in brodo Lim o brodo TransVag. Un totale di 403 (48,8%) campioni arricchiti con brodo Lim sono stati analizzati dal Laboratorio Clinico 2 (210) e dal Laboratorio Clinico 4 (193). Un totale di 423 (51,2%) campioni arricchiti con brodo TransVag sono stati analizzati dal Laboratorio Clinico 1 (234) e dal Laboratorio Clinico 3 (189). L'età dei pazienti analizzati andava da 15 a 44 anni, con età sconosciuta per tre (0,4%) individui. Non sono state osservate differenze nelle prestazioni del test in base al mezzo di arricchimento o all'età dei pazienti. I dati relativi alle prestazioni dello studio di arricchimento con brodo Lim e TransVag sono riassunti nella Tabella 2; la Tabella 3 riassume le prestazioni dell'analisi per laboratorio clinico.

Tabella 2. Dati sulle prestazioni per l'arricchimento con Lim e TransVag

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

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

Tabella 3. Caratteristiche prestazionali per l'arricchimento con Lim e TransVag per laboratorio clinico

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

(2) Studio di arricchimento con brodo Carrot

La prestazione dell'analisi di GBS Alethia mediante l'uso di campioni arricchiti in brodo Carrot è stata completata nel 2012 da tre laboratori clinici indipendenti situati nelle regioni del Midwest e del Sud degli Stati Uniti. È stato valutato un totale di 600 campioni qualificati. I campioni sono stati ottenuti in conformità alle linee guida stabilite per la raccolta di campioni clinici per la coltura di *Streptococcus* Gruppo B, e sono stati arricchiti nel brodo Carrot prima di eseguire il test GBS Alethia. L'età dei pazienti analizzati andavano da 15 a 48 anni; non sono state rilevate differenze nelle prestazioni del test in base all'età dei pazienti. I dati sulle prestazioni dello studio di arricchimento con brodo Carrot sono riepilogati nella Tabella 4; la Tabella 5 riassume le prestazioni dell'analisi per sito clinico.

Tabella 4. Caratteristiche prestazionali per l'arricchimento con brodo Carrot

Coltura <i>Streptococcus</i> Gruppo B	Alethia <i>Streptococcus</i> Gruppo B (GBS)		
	Positivo	Negativo	Totale
Positivo	135	0	135
Negativo	25	435	460
Totale	160	435	595
			95% CI
Sensibilità	135/135	100,0%	97,2 – 100,0%
Specificità	435/460	94,6%	92,1 – 96,3%
Correlazione	570/595	95,8%	93,9 – 97,1%

Ventiquattro dei 25 campioni positivi a Alethia: Negativi alla coltura GBS sono stati ulteriormente esaminati da un'analisi molecolare GBS sviluppata da un laboratorio indipendente. Sedici dei 24 campioni discrepanti sono risultati positivi in un'analisi alternativa di amplificazione molecolare. Risultati non validi sono stati ricavati per 5/600 (0,8%) dei campioni. Uno dei cinque campioni è rimasto non valido anche dopo la ripetizione del test.

Tabella 5. Caratteristiche prestazionali per l'arricchimento con brodo Carrot per laboratorio clinico

Laboratorio	Campioni positive			Campioni negativi		
	Alethia / Coltura GBS	Sensibilità %	95% CI	Alethia / Coltura GBS	Specificità %	95% CI
Totale	135/135	100,0%	97,2 – 100,0%	435/460	94,6%	92,1 – 96,3%
Laboratorio 1	58/58	100,0%	93,8 – 100,0%	92/93	98,9%	94,2 – 99,8%
Laboratorio 2	36/36	100,0%	90,4 – 100,0%	145/149	97,3%	93,3 – 99,0%
Laboratorio 3	41/41	100,0%	91,4 – 100,0%	198/218	90,8%	86,3 – 94,0%

SENSIBILITÀ ANALITICA

La sensibilità analitica o limite di rilevazione per il test Alethia *Streptococcus* Gruppo B (GBS) è stata determinata per i comuni ceppi e sierotipi di *S. agalactiae*.

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

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

REATTIVITÀ DEL TEST

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

RIPRODUCIBILITÀ

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

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

CROSS-REATTIVITÀ

Gli studi di reattività crociata sono stati eseguiti con campioni in brodo Lim positivi e negativi inoculati con organismi batterici o fungini a una concentrazione finale di 1,2 x 10⁸ CFU/mL o virus a un minimo di 1 x 10⁵ TCID₅₀/mL. Cross-reattività con *Enterococcus* dispar è stata osservata in uno dei sette replicati analizzati. Nessuno dei seguenti organismi ha reagito con Alethia GBS: *Aeromonas hydrophila*, *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacteroides fragilis*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter jejuni*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium bifermentans*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium histolyticum*, *Clostridium novyi*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium septicum*, *Clostridium sordellii*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium genitalium*, *Corynebacterium urealyticum*, *Corynebacterium xerosis*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus avium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii*, *Gardnerella vaginalis*, *Haemophilus ducreyi*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbruekii subspecies lactis*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactococcus lactis*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Moraxella osloensis*, *Morganella morganii*, *Neisseria gonorrhoeae*, *PeptoStreptococcus anaerobius*, *Plesiomonas shigelloides*, *Porphyromonas asaccharolytica*, *Prevotella melaninogenica*, *Propionibacterium acnes*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella* Gruppo B, *Salmonella* Gruppo C, *Salmonella* Gruppo D, *Salmonella* Gruppo E, *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens*, *Shigella boydii*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* (Cowan), *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus dysgalactiae equisimilis*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguinis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, Adenovirus 40, Adenovirus 41, BK virus, Coxsackievirus, Echovirus, Epstein Barr virus, Herpes simplex virus-1, Herpes simplex virus-2, Rotavirus.

Mycoplasma genitalium, *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum* sono stati testati a concentrazioni finali comprese tra 1,6 x 10⁶ e 9,9 x 10⁶ CFU/mL con nessuna reazione con il test Alethia GBS.

ANALISI DI SOSTANZE INTERFERENTI

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

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

alethia®

Group B Streptococcus

DNA Amplification Assay

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

REF 480350

IVD

Rx Only

BUT DE LA METHODE

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

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

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

Le test Alethia streptocoque du groupe B est conçu pour être utilisé dans les hôpitaux, les centres de référence ou les laboratoires médicaux. Le dispositif n'est pas destiné à être utilisé dans les points-santé dépourvus de laboratoire.

RESUME ET EXPLICATION DU TEST

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

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

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

PRINCIPE DU TEST

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

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

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

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

MATERIEL FOURNI

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

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

MATERIEL FOURNI SEPARÉMENT

Kit de contrôle externe Alethia streptocoque du groupe B, numéro de référence: 479900

MATERIEL NON FOURNI

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

EQUIPEMENT NON FOURNI

1. Bloc chauffant pour microtubes de 12 mm pouvant atteindre 95 °C
2. Thermomètre numérique avec mémoire de température maximale/minimale (par ex., thermomètre étanche/antichoc Traceable® Lollipop™)
3. Mélangeur Vortex
4. Minuterie
5. Micropipette d'une contenance de 50 µL
6. Micropipette d'une contenance de 200 µL
7. Incubateur/lecteur Alethia Numéro de référence: 610189

PRECAUTIONS D'EMPLOI

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

DANGER ET MISES EN GARDE
A notre connaissance, il n'y a pas de risque connu associé à ce produit.

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

PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS
Type d'échantillon: frottis vaginal/rectal anténatal chez la femme enceinte.
Prélèvement des échantillons: le prélèvement d'échantillon vaginal et rectal doit être effectué conformément aux directives publiées pour le prélèvement de spécimens cliniques de *streptocoque* du groupe B.⁴ Le spécimen vaginal et rectal peut être prélevé avec un même écouvillon ou deux écouvillons différents. *Les spécimens cervicaux, périanaux, périrectaux ou périnéens ne sont pas des types d'échantillon acceptables. On ne doit pas utiliser de spéculum pour prélever l'échantillon.* Placer le ou les écouvillon(s) dans un milieu de transport non nutritif (par ex., des milieux de Stuart ou Amies sans charbon) et le(s) transporter au laboratoire. Dans l'éventualité où l'on a utilisé deux écouvillons différents pour effectuer le prélèvement, on peut utiliser un seul dispositif de transport.
Enrichissement des échantillons: sortir le frottis vaginal/rectal du dispositif de transport et les placer dans du bouillon de culture pour les enrichir (bouillon Lim, bouillon TransVag ou bouillon Carrot). Faire incuber les échantillons dans le bouillon de culture à 37 ± 2 C pendant 18 à 24 heures. Les échantillons enrichis doivent être testés dès que possible. Les échantillons enrichis doivent être conservés à la température ambiante pendant six heures maximum avant de leur faire subir des tests. Si l'on ne commence pas les tests dès ce moment-là, on peut conserver l'échantillon enrichi à une température de 2 à 8 C pendant sept jours maximum. La conservation à long terme des échantillons enrichis risque de fournir des résultats non valides.

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

PREPARATION DES ECHANTILLONS
REMARQUE: s'assurer que l'appareil Incubateur/Lecteur Alethia est allumé et que les vérifications de performance requises sont terminées avant d'initier la PREPARATION DES ECHANTILLONS. Se reporter au manuel d'utilisation de l'Incubateur/Lecteur Alethia pour plus d'informations au sujet de l'installation, la configuration et le fonctionnement de l'appareil.
1. Etiqueter un (1) tube de traitement thermique pour chaque échantillon à tester.
2. Ajouter 200 µL de réactif de contrôle Alethia à chacun des tubes de traitement thermique.
3. Mélanger soigneusement chacun des bouillons de culture enrichis.
4. Ajouter 50 µL de bouillon liquide enrichi au réactif de contrôle Alethia. Les spécimens dilués dans le réactif de contrôle Alethia peuvent être conservés à la température ambiante (21 à 27 C) pendant 15 minutes maximum avant de poursuivre. On peut obtenir des résultats incorrects si les spécimens dilués sont conservés plus de 15 minutes avant leur soumission au traitement thermique.
5. Passer chaque mélange échantillon/réactif de contrôle au Vortex pendant 10 secondes au minimum.
6. Chauffer chaque mélange échantillon/réactif de contrôle dans un bloc chauffant à 95 ± 5 C pendant 10 ± 2 minutes. Surveiller l'étape de traitement thermique à l'aide d'un thermomètre numérique et d'une minuterie.
7. Sortir chaque tube de traitement thermique du bloc chauffant et mélanger au Vortex pendant environ 10 secondes. Les échantillons traités à la chaleur peuvent être conservés entre 19 et 29 C pendant 45 minutes maximum avant d'ajouter le tampon de réaction. Les échantillons traités thermiquement ne peuvent pas être congelés.

PROCEDURE DE TEST
REMARQUE:
Incubateur/Lecteur Alethia peut traiter un maximum de 10- dispositifs de test par série.
1. Transférer 50 µL d'échantillon traité thermiquement dans un tube de tampon de réaction Alethia marqué de façon appropriée.
2. Passer le tube de tampon de réaction contenant l'échantillon traité thermiquement au Vortex pendant environ 10 secondes.
3. Répéter les étapes 1 et 2 pour tous les échantillons à analyser avant de poursuivre.
4. Retirer un (1) dispositif de test Alethia *streptocoque* du groupe B de sa pochette de protection pour chaque échantillon. Ouvrir le dispositif avec précaution en soulevant le loquet et en tenant les puits de sorte que le réactif lyophilisé ne tombe pas au moment de l'ouverture. Placer le dispositif sur une surface plane ou un portoir approprié.
5. 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.
6. Tapoter le dispositif sur la paillasse ou mélanger pour éliminer les bulles d'air. Examiner le dispositif de test avec soin pour vérifier qu'il n'existe plus de bulles d'air dans le tube et qu'aucun liquide ne reste dans le capuchon.
7. Insérer chaque dispositif de test Alethia dans l'Incubateur/Lecteur Alethia et lancer la réaction d'amplification et la détection. Les résultats seront affichés à la fin de l'exécution.

ID échantillon	Résultats indiqués	Interprétation
Echantillon de patiente	POSITIF	L'échantillon contient l'ADN cible du <i>Streptococcus agalactiae</i> .
	NEGATIF	Aucun ADN de <i>Streptococcus agalactiae</i> n'a été détecté.
	NON VALIDE	Aucun rendu de résultat possible. Recommencer le test à l'aide de l'échantillon d'origine, enrichi dans le bouillon de culture. Spécimen de patiente inhibiteur, mauvaise préparation de l'échantillon, échec du réactif, erreur de l'instrument ou échec du contrôle interne.
Contrôle positif	POSITIF	Résultat de contrôle positif valide. Réactifs actifs au moment de l'utilisation, fonctionnement correct de l'Incubateur/Lecteur Alethia.
	NEGATIF	Résultat de contrôle non valide. 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.
	NON VALIDE	Aucun rendu de résultat possible. Recommencer l'intégralité de l'analyse à l'aide des échantillons d'origine. Mauvaise préparation de l'échantillon, échec du réactif, erreur de l'instrument ou échec du contrôle interne.
Contrôle négatif	POSITIF	Résultat de contrôle non valide. 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.
	NEGATIF	Résultat de contrôle négatif valide. Réactifs actifs au moment de l'utilisation, fonctionnement correct de l'Incubateur/Lecteur Alethia.
	NON VALIDE	Aucun rendu de résultat possible. Recommencer l'intégralité de l'analyse à l'aide des échantillons d'origine. Mauvaise préparation de l'échantillon, échec du réactif, erreur de l'instrument ou échec du contrôle interne.
PUITS VIDE	AUCUN	Aucun dispositif de test Alethia dans le puits de l' Incubateur/Lecteur Alethia. OU Le dispositif de test Alethia présent ne répond pas en raison d'une mauvaise préparation de l'échantillon, de saleté ou d'un mauvais positionnement du dispositif. Recommencer le test à partir des échantillons d'origine.

CONTROLE DE QUALITE
Ce test doit être réalisé en fonction des exigences des réglementations locales et / ou nationales ou des directives des organismes d'accréditation.
1. Chaque dispositif contient un puits de contrôle interne qui permet de déceler un problème d'inhibition de l'amplification, d'efficacité des réactifs du test ou de traitement des échantillons.
2. L'étape du traitement thermique est surveillée avec un thermomètre et une minuterie externes. Utiliser la mémoire des températures maximum/minimum du thermomètre pour vérifier qu'une température de 95 ± 5 C est maintenue. Utiliser la minuterie pour vérifier que la durée du traitement thermique est de 10 ± 2 minutes.
3. Les bonnes pratiques de laboratoire recommandent l'utilisation de réactifs de contrôle. Les utilisateurs doivent suivre les directives locales, régionales et/ou nationales relatives à l'exécution des contrôles externes de qualité.
4. Les réactifs de contrôle externes Alethia streptocoque du groupe B sont vendus séparément (référence 479900). Il est recommandé de vérifier la réactivité de chaque nouveau lot et chaque nouvel envoi de coffret Alethia streptocoque du groupe B dès leur réception ou avant l'emploi. Les tests de contrôle externe doivent être effectués en fonction des exigences locales, fédérales et/ou nationales. La trousse Alethia *streptocoque* du groupe B ne devrait pas être utilisée pour les tests d'échantillons de patient lorsqu'ils ne produisent pas les résultats escomptés.
5. Utiliser un dispositif séparé pour chaque réactif de contrôle externe.
6. Le traitement thermique des échantillons de contrôle négatifs ou positifs externes du SGB n'est pas exigé.

VALEURS ATTENDUES
Environ 10 à 30 % des femmes enceintes sont porteuses, avant l'accouchement, de *streptocoques* de groupe B dans le vagin ou le rectum.⁴ Les performances cliniques du dosage du SGB Alethia ont été établies au cours de deux études cliniques réalisées en 2011 (bouillon Lim et bouillon TransVag) ainsi qu'en 2012 (bouillon Carrot).

L'incidence globale de la colonisation SGB anténatale chez les femmes au cours de l'étude 2011 était de 24,3 % (201 sur 826). L'incidence de la colonisation SGB par enrichissement en utilisant le bouillon Lim était de 25,1 % (101 sur 403); tandis que l'incidence pour les échantillons enrichis en utilisant le bouillon TransVag était de 23,6 % (100 sur 423).

L'incidence globale des colonies de SGB antepartum chez les femmes enceintes testées au cours de l'étude 2012 avec le bouillon Carrot était de 22,5 % (135 sur 600).

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

PERFORMANCES DU TEST

Le test Alethia *streptocoque* du groupe B a été évalué en 2011 et en 2012 lors de deux études distinctes (1) enrichissement dans le bouillon Lim et TransVag et (2) enrichissement dans le bouillon Carrot. Les informations recueillies lors des études cliniques figurent ci-dessous.

Tableau 1. Caractéristiques des performances en fonction de la méthode d'enrichissement

	Echantillons positifs			Echantillons négatifs		
	Alethia / culture du SGB	Sensibilité %	IC à 95%	Alethia / culture du SGB	Spécificité %	IC à 95%
Total	285/289	98,6 %	96,5 – 99,5 %	1045/1121	93,2 %	91,6 – 94,5 %
Bouillon Lim	82/84	97,6 %	91,7 – 99,3 %	296/315	94,0 %	90,8 – 96,1 %
Bouillon TransVag	68/70	97,1 %	90,2 – 99,2 %	314/346	90,8 %	87,2 – 93,4 %
Bouillon Carrot	135/135	100 %	97,2 – 100,0 %	435/460	94,6 %	92,1 – 96,3 %

(1) Etude d'enrichissement dans le bouillon Lim et TransVag

Les performances du dosage du SGB Alethia à l'aide des spécimens enrichis dans le bouillon Lim et TransVag ont été évaluées en 2011 par quatre centres d'analyse clinique indépendants situés dans les régions du centre et du sud des Etats-Unis. Au total, 826 échantillons qualifiés de patientes ont été évalués. Les échantillons furent obtenus conformément aux directives établies pour le prélèvement de spécimens cliniques destinés à la culture du *streptocoque* de groupe B, enrichis pendant 18 à 24 heures, soit dans du bouillon Lim, soit dans du bouillon TransVag. Au total, 403 (48,8 %) des spécimens enrichis par culture dans du bouillon Lim furent testés par le Centre clinique 2 (210) et le Centre clinique 4 (193). Au total, 423 (51,2 %) des spécimens enrichis par culture dans du bouillon TransVag furent testés par le Centre clinique 1 (234) et le Centre clinique 3 (189). Les groupes d'âge des patientes soumises aux tests s'étendaient sur une plage allant de l'âge de 15 ans à l'âge de 44 ans, avec un âge inconnu pour trois patientes (0,4 % de la population). Aucune différence dans l'efficacité des tests n'a été observée en fonction du milieu ayant servi à l'enrichissement ou de l'âge des patientes. Le Tableau 2 indique les données sur les performances de l'étude d'enrichissement dans le bouillon Lim et TransVag; le Tableau 3 résume les performances des dosages par Centre clinique.

Tableau 2. Données sur les performances d'enrichissement dans les bouillon Lim et TransVag

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

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

Tableau 3. Caractéristiques des performances de l'enrichissement dans le bouillon Lim et TransVag en fonction du centre clinique

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

(2) Etude d'enrichissement au bouillon Carrot

Les performances du dosage du SGB Alethia avec les spécimens enrichis dans un bouillon Carrot ont été évaluées en 2012 par trois centres d'analyse clinique indépendants situés dans les régions du centre et du sud des Etats-Unis. Au total, 600 échantillons qualifiés de patientes ont été évalués. Les échantillons furent obtenus conformément aux directives établies pour le prélèvement de spécimens cliniques destinés à la culture du *streptocoque* de groupe B, enrichis dans du bouillon Carrot avant les tests de SGB Alethia. Les groupes d'âge des patientes soumises aux tests s'étendaient sur une plage allant de l'âge de 15 ans à l'âge de 48 ans. Aucune différence dans l'efficacité des tests n'a été observée en fonction de l'âge des patientes. Le Tableau 4 indique les données sur les performances de l'étude d'enrichissement par culture dans du bouillon Carrot; le Tableau 5 résume les performances des dosages par centre clinique.

Tableau 4. Caractéristiques des performances de l'enrichissement dans le bouillon Carrot

Culture de <i>streptocoques</i> de groupe B	Alethia- <i>streptocoques</i> de groupe B (SGB)		
	Positif	Négatif	Total
Positif	135	0	135
Négatif	25	435	460
Total	160	435	595
			IC à 95%
Sensibilité	135/135	100,0 %	97,2 – 100,0 %
Spécificité	435/460	94,6 %	92,1 – 96,3 %
Corrélation	570/595	95,8 %	93,9 – 97,1 %

Sur un total de 25, vingt-quatre résultats étaient positifs Alethia: des spécimens négatifs en culture du SGB ont été analysés ultérieurement par un laboratoire indépendant qui a réalisé un dosage moléculaire SGB. Seize des 24 échantillons divergents étaient positifs à l'aide du dosage d'amplification moléculaire. Des résultats non valides furent obtenus pour 5/600 échantillons (0,8 %). Un échantillon sur cinq est demeuré non valide après répétition du test.

Tableau 5. Caractéristiques des performances de l'enrichissement au bouillon Carrot en fonction du centre clinique

Centre	Echantillons positifs			Echantillons négatifs		
	Alethia / culture du SGB	Sensibilité %	95% IC	Alethia / culture du SGB	Spécificité %	95% IC
Total	135/135	100,0 %	97,2 – 100,0 %	435/460	94,6 %	92,1 – 96,3 %
Centre 1	58/58	100,0 %	93,8 – 100,0 %	92/93	98,9 %	94,2 – 99,8 %
Centre 2	36/36	100,0 %	90,4 – 100,0 %	145/149	97,3 %	93,3 – 99,0 %
Centre 3	41/41	100,0 %	91,4 – 100,0 %	198/218	90,8 %	86,3 – 94,0 %

SENSIBILITE ANALYTIQUE

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

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

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

REACTIVITE DU DOSAGE

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

REPRODUCTIBILITE DU TEST

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

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

REACTIONS CROISEES

Des études de réactivité croisée ont été effectuées sur des spécimens enrichis au bouillon Lim positifs et négatifs, inoculés avec des organismes bactériens et fongiques de manière à obtenir une concentration finale de 1,2 x 10⁸ CFU/mL ou virus à la dose médiane d'infection d'une culture de tissus de 1 x 10⁵ TCID₅₀/mL. Il a été observé une réaction croisée avec *Enterococcus dispar* avec un des sept réplicats testés. Aucun des organismes suivants n'a réagi avec l'Alethia streptocoque du groupe B:

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

Des *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis* et *Ureaplasma urealyticum* furent testés à des concentrations finales comprises dans une plage de 1,6 x 10⁵ à 9,9 x 10⁶ CFU/mL sans aucune réaction avec le test Alethia streptocoque du groupe B.

TESTS POUR LES SUBSTANCES INTERFERENTES

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

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

alethia®

Group B Streptococcus

DNA Amplification Assay

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

REF 480350

IVD

Rx Only

USO INDICADO

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

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

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

El ensayo Alethia Group B *Streptococcus* (GBS) es para uso en laboratorios de hospital, de referencia o estatales. El dispositivo no es para uso en punto-de-cuido sin laboratorio.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

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

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

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

PRINCIPIOS BIOLÓGICOS

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

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

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

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

REACTIVOS/MATERIALES PROPORCIONADOS

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

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

MATERIALES PROPORCIONADOS POR SEPARADO

Alethia equipo de Control Externo del EGB, número de catálogo: 479900

MATERIALES NO PROPORCIONADOS

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

EQUIPO NO PROPORCIONADO

1. Baño seco con 12 mm de bloqueo de calor capaz de 95 °C
2. Termómetro digital con memoria de temperatura máx/mín (p. ej., termómetro sumergible y a prueba de golpes Traceable® Lollipop™)
3. Mezclador Vortex
4. Cronómetro de intervalos
5. Micropipeta capaz de administrar 50 µL
6. Micropipeta capaz de administrar 200 µL
7. incubador/lector Alethia, Meridian Bioscience, Inc. Número de catálogo: 610189

PRECAUCIONES

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

DECLARACIONES DE RIESGO Y PRECAUCIÓN
No se conoce ningún riesgo asociado con este producto.

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

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA
Tipo de muestra: Hisopos vaginales/rectales tomados de mujeres anteparto.
Toma de muestras: La toma de muestras vaginales y rectales debe realizarse de conformidad con las directrices publicadas para la toma de muestras clínicas para cultivos de *estreptococo* grupo B.⁴ Las muestras vaginales y rectales deben tomarse usando un mismo hisopo o dos diferentes. *Las muestras cervicales, perianales, perirectales o perineales no son muestras aceptables. No se debe usar un espéculo para la toma de muestras.* Coloque el/los hisopo(s) en un medio de transporte no nutritivo (p. ej., un Stuart o Amies sin carbón) y transportélo(s) al laboratorio. En el caso de que se usen dos hisopos diferentes para la toma de muestras, se puede usar un solo dispositivo de transporte.
Enriquecimiento de las muestras: Saque los hisopos vaginales/rectales del dispositivo de transporte y colóquelos en el caldo de enriquecimiento del cultivo (Caldo Lim, Caldo TransVag o Caldo de zanahoria). Incube la(s) muestra(s) en el caldo de enriquecimiento del cultivo a 37 ± 2 C de 18 a 24 horas. Debe realizar la prueba de las muestras enriquecidas tan pronto como sea posible. Las muestras enriquecidas pueden mantenerse a temperatura ambiente durante un máximo de seis horas antes de hacerles la prueba. Si no se realiza la prueba en este tiempo, la muestra enriquecida puede almacenarse a 2-8 C durante un máximo de siete días. Un almacenamiento a largo plazo de las muestras enriquecidas puede dar resultados no válidos.

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

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS
NOTA: Asegúrese de que el incubador/lector Alethia está encendido y que se hayan completado las verificaciones de rendimiento necesarias antes de iniciar la PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS. Consulte el Manual del operador de incubador/lector Alethia para obtener más información acerca de la instalación y el funcionamiento del instrumento.
1. Marque 1 tubo de tratamiento térmico para cada muestra que se va a someter a prueba.
2. Añada 200 µL del Reactivo de Control de Alethia a cada tubo de tratamiento térmico.
3. Mezcle completamente cada cultivo de caldo enriquecido.
4. Añada 50 µL de caldo enriquecido y mezclado al Reactivo de Control de Alethia. Las muestras diluidas en el Reactivo de Control de Alethia se pueden mantener a temperatura ambiente (21-27 C) durante un máximo de 15 minutos antes de continuar. Se pueden obtener resultados incorrectos si las muestras diluidas se mantienen así más de 15 minutos antes del tratamiento térmico.
5. Mezcle en el Vortex la mezcla de muestra/control durante un mínimo de 10 segundos.
6. Incube cada mezcla de muestra/control en un baño seco/bloque de calor a 95 ± 5 C durante 10 ± 2 minutos. Monitoree el paso de tratamiento térmico con un termómetro digital y un cronómetro de intervalos.
7. Saque cada tubo de tratamiento térmico del baño seco/bloque de calor y póngalo en el Vortex durante 10 segundos aproximadamente. Las muestras tratadas térmicamente se pueden mantener a 19-29 C durante un máximo de 45 minutos antes de la adición del Tampón de Reacción. Las muestras tratadas térmicamente no pueden congelarse.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA
NOTA: Se pueden procesar un máximo de 10 muestras en cada proceso del incubador/lector Alethia.
1. Transfiera 50 µL de la muestra tratada térmicamente a un tubo de Tampón de Reacción de Alethia debidamente marcado.
2. Ponga en el Vortex el tubo con el Tampón de Reacción que contiene la muestra tratada térmicamente durante 10 segundos aproximadamente.
3. Repita los pasos 1 y 2 para todas las muestras que se deban analizar antes de continuar.
4. Saque 1 Dispositivo de Prueba de EGB de Alethia de su bolsa de protección por cada muestra. Abra el dispositivo con cuidado, levantando el cierre y sujetando las cámaras de modo que el reactivo liofilizado no se caiga al abrirlo. Coloque el dispositivo en una superficie plana o en un estante que pueda albergar el dispositivo.
5. 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.
6. Dé unos golpecitos en la parte superior del banco o mezcle para remover las burbujas de aire. Examine cuidadosamente el Dispositivo de Prueba para asegurarse de que no deja burbujas de aire en el tubo y que no queda líquido en la parte superior del dispositivo.
7. Introduzca el Dispositivo de Prueba de Alethia en el incubador/lector Alethia e inicie la reacción de amplificación y detección. Los resultados se mostrarán al final del proceso.

ID de la muestra	Resultado notificado	Interpretación
Muestra de la paciente	POSITIVO	La muestra contiene ADN del <i>Streptococcus agalactiae</i> .
	NEGATIVO	No se ha detectado ADN del <i>Streptococcus agalactiae</i> .
	NO VÁLIDO	Sin resultados notificables. Repita la prueba usando la muestra de caldo enriquecido original. Muestra de la paciente inhibitoria, preparación de la muestra inadecuada, fallo del reactivo, fallo del instrumento o fallo de control interno.
Control positivo	POSITIVO	Resultado de control positivo válido. Reactivos activos en el momento del uso, el incubador/lector Alethia funciona correctamente.
	NEGATIVO	Resultado de control incorrecto. Repita la prueba de control como primer paso para determinar la causa de de la 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	Sin resultados notificables. Repita todo el proceso de ensayo usando las muestras originales. Preparación de la muestra inadecuada, fallo del reactivo, fallo del instrumento o fallo de control interno.
Control negativo	POSITIVO	Resultado de control incorrecto. Repita la prueba de control como primer paso para determinar la causa de de la 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 de control negativo válido. Reactivos activos en el momento del uso, el incubador/lector Alethia funciona correctamente.
	NO VÁLIDO	Sin resultados notificables. Repita todo el proceso de ensayo usando las muestras originales. Preparación de la muestra inadecuada, fallo del reactivo, fallo del instrumento o fallo de control interno.
POCILLO VACIO	NINGUNO	No hay ningún dispositivo de prueba de Alethia en el pocillo del incubador/lector Alethia. O El dispositivo de prueba de Alethia no funciona bien debido a un fallo en la preparación de la muestra o a que el dispositivo está sucio o mal colocado. Repita la prueba usando la muestra original.

CONTROL DE CALIDAD
Este ensayo debe ser realizado siguiendo las regulaciones de acreditación locales, estatales o federales.
1. Cada dispositivo contiene una cámara de control interno que controla la inhibición de la amplificación, la eficacia de los reactivos del ensayo y el procesamiento de la muestra.
2. El paso del tratamiento térmico se monitoriza con un termómetro externo y un cronómetro de intervalos. Use la memoria de temperatura máx/mín del termómetro para asegurarse de que se mantiene una temperatura de 95 ± 5 C.
3. Use el cronómetro de intervalos para asegurarse de que la duración del tratamiento térmico es de 10 ± 2 minutos.
4. Las Buenas Prácticas de Laboratorio recomiendan el uso de materiales de control. Los usuarios deberían seguir las directrices federales, estatales y locales adecuadas relativas a la ejecución de controles de calidad externos.
5. Los reactivos de control externo de Alethia GBS se suministran por separado (Catálogo 479900). Se recomienda que la reactividad de cada nuevo lote y cada nuevo envío de Alethia GBS se verifique a la recepción o antes de su uso. Se deberían realizar pruebas de control externo a partir de ese momento, de conformidad con las directrices federales, estatales y locales adecuadas. El equipo de prueba Alethia GBS no debe usarse en la prueba de pacientes si los controles externos no ofrecen los resultados correctos.
6. Se debe usar un dispositivo aparte para cada reactivo de control externo.
7. No se requiere tratamiento térmico de las muestras de control negativo o positivo externo de EGB.

VALORES ESPERADOS
Aproximadamente el 10-30% de las mujeres anteparto están colonizadas con *estreptococo* grupo B en la vagina o en el recto.⁴ El rendimiento clínico del ensayo Alethia GBS se estableció en el marco de dos estudios clínicos que finalizaron en 2011 (Caldo Lim y Caldo TransVag) y 2012 (Caldo de zanahoria).

La incidencia de colonización de EGB en pruebas de anteparto de mujeres que fueron probadas durante estudio de 2011 fue 24,3% (201 de 826). La incidencia de colonización de EGB con eriquecimiento obtenido usando Caldo Lim se encontro ser 25,1% (101 de 403); mientras que las muestras enriquecidas en Caldo TransVag se encontro ser de 23,6% (100 de 423).

La incidencia global de la colonización de EGB en las mujeres anteparto observada en el estudio de Caldo de zanahoria de 2012 fue del 22,5% (135 de 600).

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO
1. El ensayo de Alethia GBS no distingue entre organismos viables y no viables.
2. El ensayo de Alethia GBS es para uso con hisopos vaginales/rectales tomados de conformidad con las directrices establecidas para la toma de muestras de cultivo de estreptococo grupo B. Las muestras cervicales, perianales, perirectales o perineales no son muestras aceptables. No se debe usar un espéculo para la toma de muestras.
3. El ensayo de Alethia GBS no proporciona resultados de susceptibilidad. Los extractos del cultivo se necesitan para realizar pruebas de susceptibilidad, tal y como se recomienda para las mujeres alérgicas a la penicilina.
4. La colonización de EGB durante el embarazo puede ser intermitente, constante o transitoria. La utilidad clínica de la revisión de EGB disminuye cuando la prueba se realiza más de cinco semanas antes del parto.
5. No se evaluaron colonias no-hemolíticas como parte de las pruebas en el Estudio Clínico.
6. Reacción cruzada con *Enterococcus dispar* fue observada durante las pruebas de características de funcionamiento. Muestra negativa inoculada en Caldo Lim con *Enterococcus dispar* a una concentración de 1,2 x 10⁸ CFU/mL produjo un resultado positivo en una de siete replicas.

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

El ensayo de Alethia GBS se evaluó en el 2011 y 2012 en dos estudios independientes (1) enriquecimiento con Caldo Lim y Caldo TransVag y (2) enriquecimiento con Caldo de zanahoria. Se describe a continuación un resumen del ensayo clínico.

Tabla 1. Características de funcionamiento según el método del enriquecimiento

	Muestras positivas			Muestras negativas		
	Alethia / Cultivo de EGB	Sensitividad %	95% CI	Alethia / Cultivo de EGB	Especificidad %	95% CI
Total	285/289	98,6%	96,5 – 99,5%	1045/1121	93,2%	91,6 – 94,5%
Caldo Lim	82/84	97,6%	91,7 – 99,3%	296/315	94,0%	90,8 – 96,1%
Caldo TransVag	68/70	97,1%	90,2 – 99,2%	314/346	90,8%	87,2 – 93,4%
Caldo de zanahoria	135/135	100%	97,2 – 100,0%	435/460	94,6%	92,1 – 96,3%

(1) Estudio con enriquecimiento con Caldo Lim y Caldo TransVag

El ensayo con Alethia GBS usado con muestras enriquecidas en Caldo Lim y Caldo TransVag se evaluó en el 2011 por parte de cuatro centros de pruebas clínicas independientes localizados en las regiones del medio oeste y sur de los Estados Unidos. Se evaluaron un total de 826 muestras de pacientes aptas para participar. Las muestras se obtuvieron de conformidad con las directrices establecidas para la toma de muestras clínicas para el cultivo de *Streptococcus* de grupo B y enriquecidas de 18 a 24 horas en Caldo Lim o TransVag. Un total de 403 (48,8%) muestras enriquecidas en Caldo Lim se probaron en el centro clínico 2 (210) y centro clínico 4 (193). Un total de 423 (51,2%) muestras enriquecidas en Caldo TransVag se probaron en el centro clínico 1 (234) y centro clínico 3 (189). Los grupos de edad de las pacientes variaban entre 15 y 44 años, con una edad desconocida para tres (0,4%) de la población de pacientes. No se observaron diferencias en el rendimiento de la prueba basado en el medio de enriquecimiento o la edad de la paciente. El rendimiento de la prueba de enriquecimiento en caldo Lim y caldo TransVag se resume en la Tabla 2; La Tabla 3 muestra el rendimiento de la prueba por centro clínico.

Tabla 2. Datos del rendimiento con enriquecimiento en Caldo Lim y Caldo TransVag

Cultivo de <i>Streptococo</i> Grupo B	Alethia GBS		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	150	4	154
Negativo	51	610	661
Total	201	614	815
			95% CI
Sensitividad	150/154	97,4%	91,9 – 99,0%
Especificidad	610/661	92,3%	90,0 – 94,1%
Correlación	760/815	93,3%	91,3 – 94,8%

Cuarenta y ocho de los 51 resultados para los que se obtuvo un falso positivo resultaron positivos por otro método molecular. Se obtuvieron resultados no válidos en 11/826 de las muestras analizadas, o 1,3%. Dos de las 11 muestras siguieron siendo no válidas tras repetir la prueba en las muestras originales.

Tabla 3. Características del rendimiento con enriquecimiento con Caldo Lim y Caldo TransVag por centro clínico

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

(2) Ensayo de enriquecimiento con Caldo de zanahoria

El ensayo de Alethia GBS usado con muestras enriquecidas en Caldo de zanahoria se completó en el 2012 en tres centros clínicos independientes localizados en las regiones del medio oeste y sur de los Estados Unidos. Se evaluaron un total de 600 muestras de pacientes aptas para participar. Las muestras se obtuvieron de conformidad con las directrices establecidas para la toma de muestras clínicas para el cultivo de *Streptococcus* de grupo B y fueron enriquecidas con Caldo de zanahoria antes de realizar las pruebas con Alethia. Los grupos de edad de las pacientes del ensayo variaban entre 15 y 48 años; no se observaron diferencias en el rendimiento de la prueba basado en la edad de la paciente. En la Tabla 4 se resume el rendimiento del estudio con enriquecimiento con Caldo de zanahoria; la Tabla 5 resume los datos del ensayo por centro clínico.

Tabla 4. Características de rendimiento del enriquecimiento con Caldo de zanahoria

Cultivo de <i>Streptococo</i> Grupo B	Alethia GBS		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	135	0	135
Negativo	25	435	460
Total	160	435	595
			95% CI
Sensitividad	135/135	100,0%	97,2 – 100,0%
Especificidad	435/460	94,6%	92,1 – 96,3%
Correlación	570/595	95,8%	93,9 – 97,1%

Veinticuatro de las 25 muestras positivas para Alethia GBS con cultivo negativo se volvieron a analizar con un ensayo molecular para EGB desarrollado por un laboratorio independiente. Dieciséis de las 24 muestras discrepantes fueron positivas con el ensayo alternativo de ampliación molecular. Se obtuvieron resultados no válidos en 5/600 (0,8%) muestras. Una de las cinco muestras siguió siendo no válida tras repetir el ensayo.

Tabla 5. Características de rendimiento del enriquecimiento con Caldo de zanahoria por centro clínico

Centro	Muestras positivas			Muestras negativas		
	Alethia / Cultivo de EGB	Sensitividad %	95% CI	Alethia / Cultivo de EGB	Especificidad %	95% CI
Total	135/135	100,0%	97,2 – 100,0%	435/460	94,6%	92,1 – 96,3%
Centro 1	58/58	100,0%	93,8 – 100,0%	92/93	98,9%	94,2 – 99,8%
Centro 2	36/36	100,0%	90,4 – 100,0%	145/149	97,3%	93,3 – 99,0%
Centro 3	41/41	100,0%	91,4 – 100,0%	198/218	90,8%	86,3 – 94,0%

SENSIBILIDAD ANALÍTICA

Se determinó la sensibilidad analítica o límite de detección para el ensayo con Alethia GBS para todos los serotipos y cepas comunes de *S. agalactiae*.

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

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

REACTIVIDAD DEL ENSAYO

Las siguientes cepas del *S. agalactiae* se probaron y produjeron reacciones positivas en 1.280 CFU/prueba con Alethia GBS: NCTC 11930 (Serotipo IV, hemolítico), NCTC 08188 (Serotipo VIa, no hemolítico), VII/2 (Serotipo VII, hemolítico), VIII/2 (Serotipo VIII, hemolítico), NCTC 11249 (Serotipo X, hemolítico); ATCC 13813 (no hemolítico) y ATCC12386 (hemolítico).

REPRODUCIBILIDAD

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

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

REACTIVIDAD CRUZADA

Se realizaron estudios de reactividad cruzada con muestras de Caldo Lim positivas y negativas inoculadas con organismos micóticos y bacterianos para una concentración final de 1,2 x 10⁶ CFU/mL o virus con un mínimo de 1 x 10⁵ TCID₅₀/mL. Reacción cruzada con *Enterococcus dispar* se observó en una de siete réplicas probadas. Ninguno de los siguientes organismos reaccionó con Alethia GBS:

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

Mycoplasma genitalium, *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* se probaron en concentraciones finales que tenían entre 1,6 x 10⁶ y 9,9 x 10⁶ CFU/mL sin reacción con el ensayo Alethia GBS.

PRUEBAS PARA SUSTANCIAS INTERFERENTES

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

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

alethia®

Group B Streptococcus

DNA Amplification Assay

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

REF 480350

IVD

Rx Only

VERWENDUNGSZWECK

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

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

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

Der Alethia Group B *Streptococcus* Assay ist für den Einsatz im Krankenhaus sowie in Referenz- oder staatlichen Laboreinrichtungen bestimmt. Das Verfahren ist nicht für eine Point-of-Care-Testing außerhalb des Labors vorgesehen.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DES TESTS

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

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

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

TESTPRINZIP

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

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

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

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

REAGENZEN/ENTHALTENE MATERIALIEN

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

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

GETRENNT GELIEFERTE MATERIALIEN

Alethia GBS externe Kontrollen, Katalognummer: 479900

BENÖTIGTE, ABER NICHT ENTHALTENE MATERIALIEN

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

NICHT MITGELIEFERTE AUSTRÜSTUNG

- Trockenbad mit 12 mm Wärmeblock bis zu 95 °C
- Digital-Thermometer mit Max./Min.-Temperaturspeicher (z.B. Traceable® Lollipop™ wasserdichtes/schlagfestes Thermometer)
- Vortex-Mixer
- Intervall-Stoppuhr
- 50 µL-Mikropipette
- 200 µL-Mikropipette
- Alethia Inkubator/-Lesegerät, Meridian Bioscience, Inc. Katalognummer: 610189

VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle Reagenzien sind ausschließlich in der In-vitro-Diagnostik einzusetzen.
- Kontrollreagenzien oder Analysegefäß dürfen zwischen Chargen nicht ausgetauscht werden. Reaktionspuffer und Wärmebehandlungsröhrchen können, sofern sie innerhalb der zugeordneten Ablaufdaten verwendet werden, ausgetauscht werden.
- Befolgen Sie während des Tests die Sicherheitsstufe II und die Geeigneten Laborverfahren.⁶ Behandeln Sie alle Proben und verwendeten Analysegefäß als potentielle Überträger von Infektionserregern. Essen, trinken oder rauchen Sie nicht in Bereichen, in denen Proben oder Kits benutzt werden.
- Bei der Handhabung der Proben sind Einweghandschuhe zu tragen. Nach der Arbeit sind die Hände gründlich zu waschen.
- Qualitätskontrollprogramme für Labors, die Molekultests durchführen, müssen eingesetzt werden.⁵
- Das Alethia GBS Analysegefäß enthält lyophilisierte Reagenzien. Der Schutzbeutel darf erst dann geöffnet werden, wenn der Assay durchgeführt wird.
- Das Alethia GBS Analysegefäß ist mit einer Sperrvorrichtung ausgestattet, um eine Kontamination der Testfläche mit dem Amplifikationsprodukt zu verhindern. Analysegefäß mit defekter Sperrvorrichtung NICHT verwenden.
- Gebrauchte Alethia Analysegefäß sofort nach Gebrauch entsorgen und die Sperrvorrichtung sicher arretieren. Öffnen Sie das Analysegefäß nach der Verwendung NICHT. Öffnen des Geräts nach der Amplifikation kann zur Kontamination des Testbereichs mit dem Amplifikationsprodukt führen.

GEFAHREN UND SICHERHEITSANGABEN
Es gibt keine bekannten Gefahren die mit diesem Produkt verbunden sind.

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

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

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

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

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

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

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

VORBEREITUNG DER PROBEN
HINWEIS: Stellen Sie sicher, dass der Alethia Inkubator/-Lesegerät eingeschaltet ist und die erforderlichen Leistungsüberprüfungen vor Beginn der PROBENVORBEREITUNG abgeschlossen wurden. Weitere Informationen zum Aufbau und Betrieb des Instruments finden Sie in der Alethia Inkubator/-Lesegerät -Bedienungsanleitung.

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

TESTDURCHFÜHRUNG
HINWEIS: Es können maximal 10 Proben in einem einzigen Alethia Inkubator/-Lesegerät bearbeitet werden.

1. Geben Sie 50 µL der wärmebehandelten Probe in ein entsprechend gekennzeichnetes Alethia Reaktionspufferröhrchen.
2. Mischen Sie das Reaktionspufferröhrchen mit der wärmebehandelten Probe etwa 10 Sekunden lang mit dem Vortex-Mixer.
3. Wiederholen Sie die Schritte 1 und 2 für alle zu analysierenden Proben, bevor Sie fortfahren.
4. Entnehmen Sie 1 Alethia GBS Analysegefäß pro Probe einzeln aus seiner Schutzhülle. Öffnen Sie vorsichtig das Gerät, indem Sie die Sperrvorrichtung anheben, und halten Sie die Kammern so, dass das lyophilisierte Reagenz beim Öffnen nicht herausfällt. Stellen Sie das Analysegefäß auf eine ebene Oberfläche oder in ein Gestell.
5. 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. Mischen Sie die Reaktionen nicht mit der Pipette. Achten Sie dabei darauf, dass keine Luft in das Reaktionsgemisch kommt.
6. Mischen Sie jedes Analysegefäß behutsam durch Klopfen oder Schnippen und achten Sie darauf, dass keine Luftblasen entstehen und die Reaktionsmischung nicht in den Deckel des Geräts gelangt.
7. Geben Sie das Alethia Analysegefäß in den Alethia Inkubator/-Lesegerät und starten Sie die Amplifikationsreaktion und den Nachweis. Die Ergebnisse werden am Ende des Laufs angezeigt.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Proben-ID	Ausgegebenes Ergebnis	Interpretation
Patientenprobe	POSITIV	Probe enthält <i>Streptococcus agalactiae</i> -Ziel-DNA.
	NEGATIV	Keine <i>Streptococcus agalactiae</i> -DNA nachgewiesen.
	UNGÜLTIG	Kein angezeigtes Ergebnis. Wiederholen Sie den Test mit der ursprünglichen Anreicherungsprobe. Inhibitorische Patientenprobe, unsachgemäße Probenvorbereitung, Reagenzversagen, Instrumentenversagen oder interner Kontrollfehler.
Positivkontrolle	POSITIV	Gültiges positives Kontrollergebnis. Reagenzien, die zum Zeitpunkt der Verwendung aktiv sind, funktionieren mit dem Alethia Inkubator/Reader korrekt.
	NEGATIV	Falsches Kontrollergebnis. 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	Kein angezeigtes Ergebnis. Wiederholen Sie den gesamten -Testlauf unter Verwendung der ursprünglichen Proben. Falsche Probenvorbereitung, Reagenzversagen, z. Instrumentenversagen oder interner Kontrollfehler.
Negativkontrolle	POSITIV	Falsches Kontrollergebnis. Die Kontrolltests wiederholen. 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	Gültiges negatives Kontrollergebnis. Reagenzien, die zum Zeitpunkt der Verwendung aktiv sind, funktionieren mit dem Alethia Inkubator/-Lesegerät korrekt.
	UNGÜLTIG	Kein angezeigtes Ergebnis. Wiederholen Sie den gesamten -Testlauf unter Verwendung der ursprünglichen Proben. Falsche Probenvorbereitung, Reagenzversagen,, Instrumentenversagen oder interner Kontrollfehler.
LEERER SCHACHT	KEINER	Kein Alethia Analysegefäß in der Alethia Inkubator/-Lesegerät -Vertiefung. ODER Das vorhandene AlethiaAnalysegefäß ist aufgrund fehlerhafter Probenvorbereitung, verunreinigtem Gefäß oder falsch aufgestelltemplatziertem Gefäß beeinträchtigt. Wiederholen Sie den Test unter Verwendung der ursprünglichen Proben.

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

1. Jedes Analysegefäß enthält eine interne Kontroll-Kammer, die die Amplifizierungsinhibition, Analyse-Reagenzien und Wirksamkeit der Probenverarbeitung überprüft.
2. Die Hitzebehandlung wird mit einem externen Thermometer und Intervall-Stoppuhr überwacht. Verwenden Sie den Max./Min.-Temperaturspeicher des Thermometers, um sicherzustellen, dass eine Temperatur von 95 ± 5 C eingehalten wird. Verwenden Sie die Intervall-Stoppuhr, um sicherzustellen, dass die Hitzebehandlungsdauer 10 ± 2 Minuten beträgt.
3. Geeignete Laborverfahren empfiehlt die Verwendung von Kontroll-Materialien. Beachten Sie bitte die entsprechenden Bundes-, Landes- und örtlichen Richtlinien über die Durchführung externer Qualitätskontrollen.
4. Die Alethia-GBS externen Kontrollen sind separat erhältlich (Bestellnummer 479900). Es wird empfohlen, dass die Reaktivität jeder neuen Charge und jeder neuen Sendung von Alethia GBS nach Erhalt oder vor dem Einsatz überprüft wird. Allerdings, ist die Anzahl der zusätzlich durchzuführenden Tests mit externen Kontrollen abhängig von den örtlichen, staatlichen oder bundesstaatlichen Bestimmungen, sowie zulassungsbehördlichen Auflagen. Das Alethia GBS Test-Kit nicht verwenden, wenn die Kontrolltests keine korrekten Ergebnisse erbringen.
5. Für jede Kontrolle muss ein separates Analysegefäß verwendet werden.
6. Die externen positiven und negativen Kontrollen NICHT erhitzen.

ERWARTETE WERTE
Etwa 10-30 % der Frauen vor der Niederkunft sind mit Gruppe-B-*Streptokokken* in der Vagina oder im Rektum infiziert.⁴ Die klinische Leistung der Alethia GBS-Analyse wurde in zwei klinischen Studien nachgewiesen, die 2011 (Lim Broth und TransVag Broth) und 2012 (Carrot Broth) durchgeführt wurden.

Die globale Inzidenz der GBS Kolonisation bei Frauen vor der Niederkunft aus der Studie 2011 betrug 24,3 % (201 von 826). Wenn mit Lim Broth angereicherte Proben verwendet wurden, lag die Inzidenz der GBS Kolonisation bei 25,1 % (101 von 403), während bei mit TransVag Broth angereicherten Proben die Inzidenz der GBS Kolonisation bei 23,6 % (100 von 423) lag.

Die in der Studie 2012 beobachtete Gesamtinzidenz von GBS-Kolonisierung bei Frauen vor der Niederkunft betrug 22,5 % (135 von 600).

EINSCHRÄNKUNGEN

1. Der Alethia GBS Assay unterscheidet nicht zwischen lebensfähigen und nicht lebensfähigen Organismen.
2. Der Alethia GBS Assay ist für den Einsatz mit vaginalen/rektalen Probenabstrichen, die in Übereinstimmung mit den festgelegten Richtlinien für die Sammlung von Gruppe-B-*Streptokokken*-Kulturproben gesammelt wurden. *Zervikale, perianale, perirektale oder perineale* Proben sind keine akzeptablen Probenotypen. Ein Spekulum sollte für die Probenentnahme nicht verwendet werden.
3. Der Alethia GBS Assay liefert keine Suszeptibilitätsergebnisse. Kultur-Isolate sind nötig, um Suszeptibilitätstests durchzuführen, die bei Frauen mit Penicillin-Allergie empfohlen werden.
4. Eine GBS-Infektion während der Schwangerschaft kann periodisch, persistierend oder vorübergehend sein. Der klinische Nutzen des rGBS-Screening wird vermindert, wenn der Test mehr als fünf Wochen vor der Niederkunft durchgeführt wird.
5. Das Auswerten von nicht hämolytischen Kolonien wurde nicht als ein Teil des klinischen Tests ausgeführt.
6. Kreuzreaktivität mit *Enterococcus dispar* wurde während der Testleistungsmerkmale beobachtet. Negative Lim Broth Proben, die mit *Enterococcus dispar* beimpft wurden, ergaben eine Endkonzentration von 1,2 x 10⁸ CFU/mL. Diese Proben ergaben positive Ergebnisse für eine der sieben Wiederholungsteste.

LEISTUNGSMERKMALE

Der Alethia GBS Test wurde im Jahr 2011 und 2012 in zwei separaten Studien evaluiert: (1) mit Lim Broth- und TransVag Broth-Anreicherung und (2) mit Carrot Broth-Anreicherung. Eine Zusammenstellung der klinischen Studiendaten ist unten aufgeführt.

Tabelle 1. Leistungsmerkmale nach Anreicherungs-methode

	Positive Proben			Negative Proben		
	Alethia / GBS-Kultur	Sensitivität %	95 % VI	Alethia / GBS-Kultur	Spezifität %	95 % VI
Total	285/289	98,6 %	96,5 – 99,5 %	1045/1121	93,2 %	91,6 – 94,5 %
Lim Broth	82/84	97,6 %	91,7 – 99,3 %	296/315	94,0 %	90,8 – 96,1 %
TransVag Broth	68/70	97,1 %	90,2 – 99,2 %	314/346	90,8 %	87,2 – 93,4 %
Carrot Broth	135/135	100 %	97,2 – 100,0 %	435/460	94,6 %	92,1 – 96,3 %

(1) Studie mit Lim Broth- und TransVag Broth-Anreicherung

Die Leistung der Alethia GBS-Analyse wurde 2011 an mit Lim Broth- und TransVag Broth angereicherten Proben an vier unabhängigen klinischen Prüfpunkten im Mittleren Westen und Süden der Vereinigten Staaten untersucht. Eine Summe von 826 qualifizierten Patientenproben wurde ausgewertet. Die Proben wurden nach festgelegten Richtlinien für die Sammlung von klinischen Proben für die Kultur von Gruppe B-*Streptokokkus* erhalten und während 18-24 Stunden in Lim Broth oder TransVag Broth angereichert. Eine Summe von 403 (48,8 %) in Lim Broth angereicherten Proben wurde am klinischen Prüfpunkt 2 (210) und am klinischen Prüfpunkt 4 (193) getestet. Eine Summe von 423 (51,2 %) in Lim Broth angereicherten Proben wurde am klinischen Prüfpunkt 1 (234) und am klinischen Prüfpunkt 3 (189) getestet. Die Altersgruppen der getesteten Patienten reichten von 15 Jahren bis 44 Jahren, mit Alter unbekannt für drei (0,4 %) der Patientenpopulation. Es wurden keine Unterschiede in Testleistung aufgrund von Anreicherungsmedium oder Alter der Patienten beobachtet. Die Leistungsdaten der Lim Broth- und TransVag Broth-Anreicherung sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Tabelle 3 fasst die Testleistung nach klinischem Prüfpunkt zusammen.

Tabelle 2. Leistungsmerkmale für Lim Broth- und TransVag Broth-Anreicherung

Gruppe B <i>Streptokokkus</i> Kultur	Alethia Gruppe B <i>Streptokokkus</i> (GBS)		
	Positiv	Negativ	Gesamt
Positiv	150	4	154
Negativ	51	610	661
Gesamt	201	614	815
			95 % VI
Sensitivität	150/154	97,4 %	91,9 – 99,0 %
Spezifität	610/661	92,3 %	90,0 – 94,1 %
Korrelation	760/815	93,3 %	91,3 – 94,8 %

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

Tabelle 3. Leistungsmerkmale der Lim Broth- und TransVag Broth-Anreicherung nach klinischem Prüfpunkt

Zentrum	Positive Proben			Negative Proben		
	Alethia / GBS Culture	Sensitivität %	95 % VI	Alethia / GBS Culture	Spezifität %	95 % VI
Gesamt	150/154	97,4 %	91,9 – 99,0 %	610/661	92,3 %	90,0 – 94,1 %
Zentrum 1	32/33	97,0 %	84,7 – 99,5 %	197/199	99,0 %	96,4 – 99,7 %
Zentrum 2	38/39	97,4 %	86,8 – 99,5 %	162/168	96,4 %	92,4 – 98,4 %
Zentrum 3	36/37	97,3 %	86,2 – 99,5 %	117/147	79,6 %	72,4 – 85,3 %
Zentrum 4	44/45	97,8 %	88,4 – 99,6 %	134/147	97,8 %	85,5 – 94,8 %

(2) Studie mit Carrot Broth-Anreicherung

Die Leistung der Alethia GBS-Analyse wurde 2012 an mit Carrot Broth angereicherten Proben an drei unabhängigen klinischen Prüfpunkten im Mittleren Westen und Süden der Vereinigten Staaten untersucht. Insgesamt wurden 600 geeignete Patientenproben evaluiert. Die Proben wurden gemäß etablierter Gewinnungsrichtlinien für klinische Proben für die Kultur von Gruppe B-*Streptokokkus* gewonnen und vor der Alethia GBS-Analyse in Carrot Broth angereichert. Die untersuchten Patienten waren im Alter von 15 bis 48 Jahren und es wurden keine Unterschiede auf Basis des Patientenalters beobachtet. Die aus der Studie mit Carrot Broth-Anreicherung gewonnenen Leistungsdaten sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Tabelle 5 zeigt die zusammengefasste Analyseleistung nach klinischem Prüfpunkt.

Tabelle 4. Leistungsmerkmale der Carrot Broth-Anreicherung

Gruppe B <i>Streptokokkus</i> Kultur	Alethia Gruppe B <i>Streptokokkus</i> (GBS)		
	Positiv	Negativ	Gesamt
Positiv	135	0	135
Negativ	25	435	460
Gesamt	160	435	595
			95 % VI
Sensitivität	135/135	100,0 %	97,2 – 100,0 %
Spezifität	435/460	94,6 %	92,1 – 96,3 %
Korrelation	570/595	95,8 %	93,9 – 97,1 %

Vierundzwanzig der 25 Alethia-positiven Proben: GBS-Kultur-negative Proben wurden durch eine von einem unabhängigen Labor entwickelte GBS-Molekularanalyse weiter analysiert. Sechzehn der 24 diskrepanten Proben waren positiv bei der alternativen molekularen Amplifikationsanalyse. Ungültige Ergebnisse lagen bei 5/600 (0,8 %) vor. Eine der fünf Proben war nach wiederholter Analyse weiterhin ungültig.

Tabelle 5. Leistungsmerkmale der Carrot Broth-Anreicherung nach klinischem Prüfpunkt

Zentrum	Positive Proben			Negative Proben		
	Alethia / GBS Kultur	Sensitivität %	95 % VI	Alethia / GBS Kultur	Spezifität %	95 % VI
Gesamt	135/135	100,0 %	97,2 – 100,0 %	435/460	94,6 %	92,1 – 96,3 %
Zentrum 1	58/58	100,0 %	93,8 – 100,0 %	92/93	98,9 %	94,2 – 99,8 %
Zentrum 2	36/36	100,0 %	90,4 – 100,0 %	145/149	97,3 %	93,3 – 99,0 %
Zentrum 3	41/41	100,0 %	91,4 – 100,0 %	198/218	90,8 %	86,3 – 94,0 %

ANALYTISCHE EMPFINDLICHKEIT

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

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

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

ANALYSE-REAKTIVITÄT

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

REPRODUZIERBARKEIT

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

	Klinische Prüfstelle 1		Klinische Prüfstelle 2		Klinische Prüfstelle 4		Gesamt	
Probenart	Prozentuale Übereinstimmung		Prozentuale Übereinstimmung		Prozentuale Übereinstimmung		Prozentuale Übereinstimmung	
Negativ	10/10	100 %	10/10	100 %	10/10	100 %	10/10	100 %
Sehr Negativ	30/30	100 %	30/30	100 %	30/30	100 %	30/30	100 %
Schwach Positiv	30/30	100 %	30/30	100 %	30/30	100 %	30/30	100 %
Positiv	30/30	100 %	30/30	100 %	30/30	100 %	30/30	100 %
Negativkontrolle	10/10	100 %	10/10	100 %	10/10	100 %	10/10	100 %
Positivkontrolle	10/10	100 %	10/10	100 %	10/10	100 %	10/10	100 %

KREUZREAKTIVITÄT

Kreuzreaktivitätsstudien wurden mit positiven und negativen Lim Broth-Proben durchgeführt, die mit Bakterien oder Pilzorganismen bis zu einer Endkonzentration von 1,2 x 10⁸ CFU/mL oder Virus bei einem Minimum von 1 x 10⁵ TCID₅₀/mL angeimpft waren. Kreuzreaktivität mit *Enterococcus dispar* wurde bei einem der sieben Wiederholungstests beobachtet. Keiner der folgenden Organismen reagierte mit dem Alethia GBS Test: *Aeromonas hydrophila*, *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacteroides fragilis*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter jejuni*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium bifermentans*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium histolyticum*, *Clostridium novyi*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium septicum*, *Clostridium sordellii*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium genitalium*, *Corynebacterium urealyticum*, *Corynebacterium xerosis*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus avium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii*, *Gardnerella vaginalis*, *Haemophilus ducreyi*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbruekii subspecies lactis*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactococcus lactis*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Moraxella osloensis*, *Morganella morganii*, *Neisseria gonorrhoeae*, *PeptoStreptococcus anaerobius*, *Plesiomonas shigelloides*, *Porphyromonas asaccharolytica*, *Prevotella melaninogenica*, *Propionibacterium acnes*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella* Gruppe B, *Salmonella* Gruppe C, *Salmonella* Gruppe D, *Salmonella* Gruppe E, *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens*, *Shigella boydii*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus dysgalactiae equisimilis*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguinis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, Adenovirus 40, Adenovirus 41, BK virus, Coxsackievirus, Echovirus, Epstein Barr virus, Herpes simplex virus-1, Herpes simplex virus-2, Rotavirus.

Mycoplasma genitalium, *Mycoplasma hominis* und *Ureaplasma urealyticum* wurden in Endkonzentrationen im Bereich zwischen 1,6 x 10⁶ und 9,9 x 10⁶ CFU/mL getestet und ergaben keine Reaktion mit dem Alethia GBS- Test..

STÖRSUBSTANZEN-TESTS

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

Zusätzliche Tests wurden durch Beschichtung von Wattestäbchen mit potenziell störenden Substanzen durchgeführt. Beschichtete Abstriche wurden mit Lim Broth-Probe kombiniert und im Alethia GBS Assay verarbeitet. Die folgenden Substanzen beeinträchtigen die Testergebnisse nicht: Mekonium, Stuhl, Hämorrhoiden-Creme (30,65 mg/100 mg), Miconazol (Fungizid), Mucin (0,5-1,5 %), Spermizid-Gel (Nonoxynol 9) (4 mg/100 mg). Gleitgel produzierte falsch negative Ergebnisse in einer von 11 Wiederholungen. Körperpuder produzierte falsch negative Ergebnisse in einer von 10 Wiederholungen.

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. Van Dyke, M., et al. Evaluation of Universal Antenatal Screening for Group B *Streptococcus*. N Engl J Med 2009;360:2626-36.
4. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease, Revised Guidelines from CDC, 2010. MMWR 2010;59
5. Schrag, S., et al. A Population-Based Comparison of Strategies to Prevent Early-Onset Group B Streptococcal Disease in Neonates. N Engl J Med 2002;347: 233-239.
6. US Department of Health and Human Services PHS/CDC/NIH. Biosafety in microbiology and biomedical laboratories, Washington DC: US Government Printing Office, 2007.
7. CLSI: MM3-A2 Molecular diagnostic methods for infectious disease; approved guideline, 2nd ed. Wayne PA: Clinical Laboratory Standards Institute. 2006



SN11019

REV. 05/23

 Manufactured By	Meridian Bioscience, Inc. 3471 River Hills Drive Cincinnati, OHIO - 45244 USA www.meridianbioscience.com <u>Contacts:</u> Main Telephone (+1) 513.271.3700 Customer Service/Orders 800.543.1980 Technical Support Center 800.343.3858 Information Fax: 513.272.5432 Ordering Fax: 513.271.0124 E-mail: info@meridianbioscience.com
	Meridian Bioscience Europe, SRL Via Dell'Industria 7, 20035 Villa Cortese (Milano) ITALY www.meridianbioscience.com <u>Contacts:</u> Main Telephone (+39) 0331.433636 E-mail: info@meridianbioscience.eu Technical Support: MBE-TechService@meridianbioscience.eu Customer Service/Orders: - For Italian Customers: ordini@meridianbioscience.com - For Distributors / International Customers: Export.CustomerService@meridianbioscience.eu
AUSTRALIAN SPONSOR	Emergo Australia Level 20, Tower II Darling Park 201 Sussex Street Sydney, NSW 2000 Australia
	MedEnvoy Switzerland Gotthardstrasse 28 6302 Zug Switzerland

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	CONTROL +	Positive control / Controllo positivo / Contrôle positif / Control positivo / Positive Kontrolle
LOT	Batch Code / Codice del lotto / Code du lot / Código de lote / Chargenbezeichnung	CONTROL -	Negative control / Controllo negativo / Contrôle négatif / Control negativo / Negative Kontrolle
IVD	In vitro diagnostic medical device / Dispositivo medico-diagnostico in vitro / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / In-Vitro-Diagnostikum	EC REP	Authorized Representative in the European Community / Rappresentante Autorizzato nella Comunità Europea / Mandataire dans la Communauté européenne / Representante autorizado en la Comunidad Europea / Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft
	Meridian products carrying the European Conformity (CE) mark fulfill the requirements of Directive 98/79/EC or the Regulation 2017/746 on in-vitro diagnostic medical devices / I prodotti Meridian recanti il marchio di Conformità Europea (CE) soddisfanno i requisiti della Direttiva 98/79/CE o del Regolamento 2017/746 sui dispositivi medico-diagnostici in vitro / Les produits Meridian portant la marque de Conformité européenne (CE) sont conformes aux exigences de la Directive 98/79/CE ou du Règlement 2017/746 relatifs aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / Los productos de Meridian que llevan la marca de conformidad europea (CE) cumplen los requisitos de la Directiva 98/79/CE o del Reglamento 2017/746 sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Produkte von Meridian mit der CE-Kennzeichnung erfüllen die Anforderungen der EU-Richtlinie 98/79/EG bzw. der Verordnung (EU) 2017/746 über In-Vitro-Diagnostika	SMP PREP DIL SPE	Sample Preparation Apparatus containing Sample Diluent / Dispositivo per la preparazione del campione contenente il diluente del campione / Système pour la préparation de l'échantillon, diluant inclus / Aparato para Preparación de Muestra con Diluyente de Muestra / System zur Probenvorbereitung, in dem sich Probenverdünnungspuffer befindet
		STERILE R	Sterilization by gamma irradiation / Sterilizzazione con raggi gamma / Stérilisation par irradiation aux rayons gamma / Esterilizado por irradiación gamma / Sterilisation durch Gammastrahlen
REF	Catalogue number / Numero di catalogo / Référence de catalogue / Número de catálogo / Bestellnummer		Do not freeze / Non congelare / Ne pas congeler / No congelar / Nicht Einfrieren
	Consult Instructions for Use / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulter les instructions d'utilisation / Consulte las instrucciones de uso / Gebrauchsanweisung beachten	RoHS	Restriction of Hazardous Substances / Restrizione all'uso di sostanze pericolose / Limitation de substances dangereuses / Restricción de Substancias Nocivas / Beschränkung der Verwendung bestimmter gefährlicher Stoffe
	Manufacturer / Fabricante / Fabricant / Fabricante / Hersteller		Caution, consult accompanying documents / Attenzione, vedere le istruzioni per l'uso / Attention voir notice d'instructions / Atención, ver instrucciones de uso / Achtung, Begleitdokumente beachten
SN	Serial number / Numero di serie / Numéro de série / Número de serie / Seriennummer	STERILE EO	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	BUF RXN	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 / Femmine / 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	Test Device / Dispositivo test / Dispositif de test / Dispositivo de Prueba / Testgerät	HT TUBE	Heat Treatment Tube / Provetta per il Trattamento termico / Tube pour le traitement thermique / Tubo de tratamiento de calor / 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: Laserstrahlung	IPX-0	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: Risikogefahr	CONTROL	Assay Control / Controllo del test / Test de contrôle / Control de Ensayo / Kontrolltest
BUF	Buffer / Soluzione tampone / Solution tamponnée / Tampón / Puffer		Warning / Avvertenze / Mise En Garde / Advertencia / Warnhinweise
MIN OIL	Mineral Oil / Olio Minerale / Huile Minérale / Aceite Mineral / Mineralöl	MEDIA	Media / Terreno di trasporto / Milieux / Medio / Medium
ST TUBE	Screw Top Tube / Provetta con tappo a vite / Tube à bouchon vissé / Tubo con tapa de rosca / Röhrchen mit Schnappverschluss	COL	Sample Preparation Column / Colonna di preparazione del campione / Colonne pour la préparation de l'échantillon / Columna de preparación de muestra / Säule zur Probenaufarbeitung
BUF SMP	Sample Buffer / Soluzione tampone per il campione / Tampon de l'échantillon / Tampón de muestra / Probenpuffer	PRE REAG	Pretreatment Reagent / Reagente di Pretrattamento / Réactif de prétraitement / Reactivo de pretratamiento / Reagenz für die Vorbehandlung
Rx Only	Prescription Use Only / Per l'uso su prescrizione medica / Uniquement sur prescription / Solo Para Uso Por Receta / verschreibungspflichtig	SMP PREP	Sample Preparation / Preparazione del campione / Préparation de l'échantillon / Preparación de Muestra / Probenvorbereitung
TUBE	Empty Tube / Provetta vuota / Tube vide / Tubo vacío / Leeres Gefäß	CH REP	Swiss Authorized Representative / Mandatario svizzero / Mandataire Suisse / Representante Autorizado Suizo / Schweizer Bevollmächtigter

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.