

alethia[™]

Pertussis

DNA Amplification Assay

DNA Amplification Assay for the Detection of *Bordetella pertussis* in nasopharyngeal swab samples

REF 480750

IVD

R_x Only

INTENDED USE

The Alethia Pertussis DNA Amplification Assay, performed on the Alethia Reader, is a qualitative in vitro diagnostic test for the direct detection of *Bordetella pertussis* in human nasopharyngeal swab samples taken from patients suspected of having respiratory tract infection attributable to *Bordetella pertussis*.

The Alethia Pertussis assay utilizes loop-mediated isothermal DNA amplification (LAMP) technology to detect *B. pertussis* by targeting the IS481 insertional element of the *B. pertussis* genome. The IS481 insertional element can also be found in *B. holmesii* and some *B. bronchiseptica* strains. Respiratory infections with *B. pertussis*, *B. holmesii* or *B. bronchiseptica* may yield positive test results in IS481 assays. *B. holmesii* infection may cause clinical illness similar to *B. pertussis*, and mixed outbreaks involving both *B. pertussis* and *B. holmesii* infection have been reported. Additional testing should be performed if necessary to differentiate *B. holmesii* and *B. pertussis*. *B. bronchiseptica* is a rare cause of infection in humans. When clinical factors suggest that *B. pertussis* may not be the cause of respiratory infection, other clinically appropriate investigation(s) should be carried out in accordance with published guidelines.

Negative results for the Alethia Pertussis DNA Amplification Assay do not preclude *Bordetella pertussis* infection and positive results do not rule out co-infection with other respiratory pathogens. Results from the Alethia Pertussis assay should be used in conjunction with information obtained during the patient's clinical evaluation as an aid in diagnosis of *B. pertussis* infection and should not be used as the sole basis for treatment or other patient management decisions.

Alethia Pertussis is intended for use in hospital, reference or state laboratory settings. The device is not intended for point-of-care use.

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

The Alethia Pertussis DNA Amplification Assay is based on loop-mediated amplification (LAMP)¹⁻² technology. The assay targets a 198 base pair sequence of the *Bordetella pertussis* genome residing in a region of the IS481 insertional element sequence.

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

The Alethia Pertussis kit includes Alethia Pertussis Assay Control/Negative Control Reagent, Alethia Pertussis Test Devices, Alethia Pertussis Sample Buffer, and Mineral Oil. The Alethia Assay Control/Negative Control, used for specimen dilution and preparation, is a Tris-buffered solution containing formalin-treated *E. coli* harboring *Staphylococcus aureus* DNA. The Alethia Pertussis Test Device contains one lyophilized amplification bead in each of two chambers: a TEST chamber with IS481-specific primers and a CONTROL chamber with *S. aureus*-specific primers. The *S. aureus* DNA in the Assay Control/Negative Control Reagent and the *S. aureus*-specific primers in the CONTROL chamber function as the Internal Control for the assay. During specimen preparation, a patient specimen is added to the Assay Control/Negative Control Reagent. Adding the specimen to the Assay Control/Negative Control reagent combines specimen DNA with the Control *S. aureus* DNA and 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.

The Alethia Reader monitors changes in absorbance characteristics by measuring transmission of light through the Test and Control reaction solutions. Light transmission is checked at the assay Run Start (Signal_{Initial}, S_i) and at the assay Run End (Signal_{Final}, S_f). The Alethia Reader calculates the change in light transmission between Run End and Run Start (S_f:S_i) and compares the ratio to a fixed cut-off value.

Fixed cut-off values for the TEST chamber are used to report sample results. TEST chamber S_f:S_i ratios less than 82% are reported as 'POSITIVE'; TEST chamber S_f:S_i ratios greater than or equal to 82% are reported as 'NEGATIVE'. Numerical values are not reported.

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

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

BIOLOGICAL PRINCIPLES

B. pertussis is a human pathogen exclusively responsible for the endemic respiratory disease whooping cough (pertussis); a publically reportable disease that impacted over 200,000 people worldwide in 2012. Whooping cough is currently the only disease in the US that displays an increasing trend of reportable cases and substantial morbidity despite the availability of a vaccine.³ The US Centers for Disease Control (CDC) reported approximately 48,300 cases of pertussis in 2012, an average of 15.4 cases per 100,000 people in the United States.⁴ Recent pertussis outbreaks have indicated waning immunity in children after receiving the final booster acellular vaccine dose, allowing for susceptibility of pertussis infection in both vaccinated and unvaccinated populations of children ages 7-11.^{5,6}

Pertussis outbreaks are particularly challenging to control as the early stages of disease resemble other respiratory infections and patients can remain highly infectious for up to 5 weeks after onset of symptoms.³ In addition, pertussis is not officially diagnosed until the presence of the characteristic "whooping" cough that is displayed almost 2 weeks post-symptom onset.³ Clinical diagnosis of pertussis can be performed using culture, serology, or nucleic acid amplification tests (NAAT). While culture is highly specific, sensitivity is low, results can take up to 7 days, and the viable cells required for culture decrease with disease progression (after 2 weeks of symptom onset).⁷ Unlike culture, NAAT assays can provide rapid test results and do not require viable bacteria. Nucleic acid amplification testing for *B. pertussis* is most sensitive during the first three weeks of cough as bacterial DNA is present in the nasopharynx. The amount of bacteria present in the nasopharynx dramatically decreases after the fourth week of cough, making the likelihood of obtaining false-negative test results higher during the later stages of infection.⁸ In addition, only symptomatic patients with cough should be tested by NAAT in order to prevent false positive results by asymptomatic close contacts.⁹ Serology can only be used for diagnosis in late stages of disease, approximately 2-8 weeks after cough onset.

REAGENTS/MATERIALS PROVIDED

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

1. **Alethia Pertussis Assay Control/Negative Control Reagent:** Tris-buffered solution containing formalin-treated *E. coli* harboring plasmid containing a segment of the *S. aureus* genome and sodium azide (0.09%) as a preservative. The Assay Control/Negative Control Reagent functions as the Assay Control during patient testing and as the External Negative Control during routine Quality Control testing.

2. **Alethia Pertussis Test Device:** Two-chambered device containing lyophilized amplification reagents (DNA polymerase, deoxynucleotide triphosphates), and either IS481-specific primers (TEST Chamber) or control primers (CONTROL Chamber).
3. **Alethia Pertussis Sample Buffer:** Tris-EDTA solution containing sodium azide (0.09%) as a preservative.
4. **Mineral Oil** (bottle with dropper tip)
5. **Alethia Pretreatment Reagent (for optional sample treatment procedure):** Lyophilized reagent containing neutralizing agent and sodium azide (0.1%) as a preservative. Each vial contains enough reagent to treat 50 specimens.

MATERIALS PROVIDED SEPARATELY

Alethia Pertussis External Control Kit, Catalog Number: 479930

MATERIALS NOT PROVIDED

1. Disposable latex gloves, powder free
2. DNase/RNase-free, aerosol resistant pipette tips
3. Specimen collection and transport system
- Nasopharyngeal Swabs:** Polyester (minimum capacity 18 µL, eg, Puritan Medical Products catalog 25-801D 50); Rayon (minimum capacity 31 µL, eg, Puritan Medical Products catalog 25-801R 50); or Flocked Nylon (Minimum Capacity 69 µL, eg, Copan catalog 503CS01 or the swab of Catalog 482C).
- Nonnutritive Transport Medium:** Liquid Amies without charcoal; or Liquid Stuart (Maximum Volume: 1.2 mL in pledget/sponge)
- Collection System:** Copan Liquid Amies Elution Swab (ESwab[™]) Collection and Transport System (Copan catalog 482C)
4. Deionized water
5. Microcentrifuge tubes

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. Pipette capable of delivering 2.5 mL
7. Cutting equipment (eg, scissors, shears, safety snips)
8. Alethia Reader, Meridian Bioscience, Inc. Catalog Number: 610189

PRECAUTIONS

1. All reagents are for in vitro diagnostic use only.
2. Do not interchange Assay Control/Negative Control Reagent or Test Devices between lots. Sample Buffer, Pretreatment Reagent and Mineral Oil are interchangeable provided they are within assigned expiration dates when used.
3. Follow Biosafety Level 2 and Good Laboratory practices during testing.⁹ 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, including proper use and care of equipment, should be employed.¹⁰
6. The Alethia Pertussis Test Device contains lyophilized reagents. The protective pouch should not be opened until ready to perform the assay.
7. The Alethia Pertussis 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.
9. Invalid test results may result due to improper sample preparation, reagent failure, instrument failure or internal control failure. In these cases, the invalid result can be corrected by repeating the test. The nasopharynx of some patients contains a biological inhibitor that will also cause an invalid result. In these cases, the inhibitor will cause repeated invalid results unless the sample is treated to remove the interference. (See section on OPTIONAL SAMPLE TREATMENT/PRETREATMENT for the treatment method.)
10. Local, state, and federal regulations for notification of reportable disease are continually updated and include a number of organisms for surveillance and outbreak investigations.^{a,b} Additionally, the Centers for Disease Control (CDC) recommends that when pathogens from reportable diseases are detected by a culture independent diagnostic test, the laboratory should facilitate obtaining the isolate or clinical materials for submission to the appropriate public health laboratory to aid in outbreak detection and epidemiological investigations. Laboratories are responsible for following their state and/or local regulations and should consult their local and/or state public health laboratories for isolate and/or clinical sample submission guidelines.
 - a. Summary of Notifiable Diseases. MMWR <http://www.cdc.gov/mmwr/PDF/wk/mm6153.pdf>
 - b. CIFOR Analysis of State Legal Authorities. <http://www.cifor.us/documents/CIFORAnalysisStateLegalAuthorities.pdf>

HAZARD and PRECAUTIONARY STATEMENTS

Refer to the SDS, available at www.meridianbioscience.com for Hazards and Precautionary Statements.

SHELF LIFE and STORAGE

The expiration date is indicated on the kit label. Store the kit at 2-30 C.

REAGENT PREPARATION

Ensure kit reagents are at room temperature (21-30 C) before use. Incorrect results may be obtained if reagents are not brought to room temperature prior to use.

SPECIMEN COLLECTION and PREPARATION

Sample type: Nasopharyngeal swabs

Sample Collection: Nasopharyngeal swab specimen collection should be performed in accordance with institutional procedures for collection of clinical specimens for *B. pertussis* infection. Nasopharyngeal swab samples should be collected with suitable swab types (eg, Polyester, Flocked Nylon or Rayon).

Place swab(s) in nonnutritive transport medium (eg, Liquid Amies, without charcoal, Liquid Stuart or Copan ESwab medium) or store unpreserved in a sterile tube without medium.

Unpreserved samples or samples stored in transport media should be tested as soon as possible, but may be held at room temperature (21–30 C) for up to 5 days or refrigerated (2-8 C) for up to 7 days prior to testing. Do not freeze samples.

SPECIMEN PREPARATION:

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

NOTE: Laboratory equipment used for cutting swabs (eg, scissors, shears, safety snips), should be treated with a molecular grade cleaning agent (eg, 10% bleach), prior to each use. Equipment should be completely dry before cutting swabs.

1. Specimen Preparation
 - a. Swabs (rayon, nylon or flocked):
 - i. Place the swab specimen in a labeled Sample Buffer tube. Cut the swab shaft to ensure sample fits in the tube. Elute the sample by vortexing for 45-60 seconds. **Eluted samples may be held at room temperature (21-30 C) for up to 48 hours or refrigerated (2-8 C) for up to 7 days prior to testing.**
 - ii. Add 50 µL of eluted sample to a labeled Assay Control/Negative Control tube and cap.
 - iii. Repeat SPECIMEN PREPARATION Steps for all swab samples to be processed.

- b. ESwab Medium: The medium within the ESwab System collection tube contains eluted patient sample.
 - i. Vortex the ESwab tube containing the swab sample for a minimum of 10 seconds to elute the sample.
 - ii. Transfer 25 μ L of the medium to a labeled Assay Control/Negative Control tube and cap. (Do not transfer this material to the Sample Buffer tube. It goes directly to the Assay Control/Negative Control Tube)
 - iii. Repeat SPECIMEN PREPARATION steps for all ESwab medium samples to be processed.
2. Vortex each Assay Control/Negative Control tube containing eluted sample for approximately 10 seconds.
3. Heat each Sample/Control tube in a dry-bath at 95 \pm 5 C for 10 \pm 2 minutes. Monitor the heat-treatment step with a digital thermometer and interval timer.
4. Remove each Sample/Control tube from the dry-bath. Heat-treated samples may be held at room temperature (21-30 C) for up to 15 minutes prior to testing.
5. Vortex for approximately 10 seconds.

TEST PROCEDURE

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

1. Remove 1 Alethia Pertussis Test Device from its protective pouch per sample. Carefully open the device, holding the chambers such that the lyophilized reagent will not fall out upon opening. Place device on a flat surface or in a rack that can accommodate the device.
2. Using a micropipette, first transfer 50 μ L of the heat-treated sample to the TEST chamber (left/White Bead) and then transfer 50 μ L 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.
3. Add 1 drop of Mineral Oil to both the TEST chamber and CONTROL chamber. Close the Alethia Test Device and fasten the latch securely.
4. Tap device on the bench top or mix to remove air bubbles. Carefully examine the Test Device for rehydration of the Control/Test Bead, for air bubbles left in the chamber and liquid in the top of the device. If undissolved beads, air bubbles or liquid in the top of the device are noted, tap the device on the bench top and repeat visual inspection. Amplification and detection should be initiated within 15 minutes.
5. Insert the Alethia Test Device into the Alethia Reader and initiate amplification reaction and detection. Results will be displayed at the conclusion of the run.

INTERPRETATION OF RESULTS

Sample ID	Reported Result	Interpretation
Patient Specimen	POSITIVE	Untreated or Pretreated Specimen: Sample contains <i>B. pertussis</i> IS481 target DNA. ^a
	NEGATIVE	Untreated or Pretreated Specimen: No <i>B. pertussis</i> DNA detected.
	INVALID	Untreated Specimen: No reportable result. Repeat the test using a Pretreatment Reagent-treated/eluted sample. Inhibitory patient specimen, improper sample preparation, reagent failure, instrument failure or internal control failure. Pretreated Specimen: No reportable result. DO NOT retreat specimens already treated with Pretreatment Reagent. Pretreated INVALID samples can be retested, if desired, and should be reported as INVALID if retesting generates the same result. Samples that produce INVALID results before and following pretreatment should be reported as INVALID.
Positive Control	POSITIVE	Valid positive control result. Reagents active at time of use, Alethia 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. If the repeated control result is INVALID, please contact Meridian's Technical Services Department at 1-800-343-3858 (US) or your local distributor. 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 Reader performing correctly.
	INVALID	No reportable result. Repeat entire assay run using original samples. If the repeated control result is INVALID, please contact Meridian's Technical Services Department at 1-800-343-3858 (US) or your local distributor. Improper sample preparation, reagent failure, instrument failure or internal control failure.
EMPTY WELL	NONE	No Alethia Test Device in the Alethia 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.

^aIS481 is found in multiple copies in *B. pertussis* (50 to 238 copies/genome), in *B. holmesii* (8 to 10 copies/genome) and less frequently in *B. bronchiseptica*.

OPTIONAL SAMPLE PRETREATMENT/TREATMENT TO ELIMINATE REACTION INHIBITORS

The following method can be used to remove the inhibitory activity of biological substances in a patient's sample.

Preparation of Pretreatment Reagent

1. Reconstitute lyophilized Pretreatment Reagent by adding 2.5 mL deionized water to the vial. Recap the vial.
2. Allow the reconstituted Pretreatment Reagent to stand at 21-30 C for 30 minutes, then mix gently to avoid foaming.
3. Store the reconstituted Pretreatment Reagent in one of two ways:
 - a. Store reconstituted Pretreatment Reagent in its original vial at 2-8 C for up to one month. Label the vial with its new expiration date, or
 - b. Immediately transfer 0.1 mL or larger aliquots of the reconstituted reagent to labeled microcentrifuge tubes, cap securely and freeze the aliquots in a nonfreezing freezer at \leq -20 C. Frozen aliquots are stable to the original expiration of the lyophilized material. Thaw each frozen aliquot no more than once before use. Thawed aliquots can be stored at 2-8 C for up to one week.
4. Warm reconstituted Pretreatment Reagent to 21-30 C before use. Mix gently to avoid foaming. Do not use the Pretreatment Reagent solution if it appears cloudy or turbid.

Treatment of Previously Prepared Samples for Retesting:

- 1a. Swabs (rayon, nylon or flocced):
 - i. Add 50 μ L of reconstituted Pretreatment Reagent to the Sample Buffer tube containing the patient's sample (remaining from SPECIMEN PREPARATION step 1.a.i.) and vortex for 10-15 seconds to mix the contents. The treated sample should not be stored beyond the original eluted specimen hold time described in step 1 of the SPECIMEN PREPARATION section above.
 - ii. Transfer 50 μ L of the medium to a labeled Assay Control/Negative Control tube and cap.
- 1b. ESwab medium:
 - i. Transfer 500 μ L of ESwab medium inoculated with the patient's sample (from the ESwab collection tube) to an empty tube.
 - ii. Add 50 μ L of reconstituted Pretreatment Reagent to the tube and vortex for 10-15 seconds to mix the contents. The treated sample should not be stored beyond the original eluted specimen hold time described in step 1 of the SPECIMEN PREPARATION section above.
 - iii. Transfer 25 μ L of the medium to a labeled Assay Control/Negative Control tube and cap.
2. Complete Steps 2-5 of the SPECIMEN PREPARATION section and proceed to testing.

Pretreatment of Untested Samples:

- 1a. Swabs (rayon, nylon or flocced):
 - i. Add 50 μ L of reconstituted Pretreatment Reagent to a labeled Sample Buffer tube.
 - ii. Place the swab specimen in the Sample Buffer tube. Cut the swab shaft to ensure the sample fits in the tube. Elute the sample by vortexing for 45-60 seconds. The treated, eluted sample may be held at room temperature (21-30 C) for up to 48 hours or refrigerated (2-8 C) for up to 7 days prior to testing.
 - iii. Transfer 50 μ L of the medium to a labeled Assay Control/Negative Control tube and cap.
- 1b. ESwab medium:
 - i. Vortex the ESwab tube containing the swab sample for a minimum of 10 seconds to elute the sample.
 - ii. Transfer 500 μ L of ESwab medium inoculated with the patient's sample to an empty tube.
 - iii. Add 50 μ L of reconstituted Pretreatment Reagent to the tube and vortex for 10-15 seconds to mix the contents. The treated sample should not be stored beyond the original eluted specimen hold time described in step 1 of the SPECIMEN PREPARATION section above.
 - iv. Transfer 25 μ L of the medium to a labeled Assay Control/Negative Control tube and cap.
2. Complete Steps 2-5 of the SPECIMEN PREPARATION section and proceed to testing.

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 \pm 5 C is maintained. Use the interval timer to ensure that heat-treatment duration is 10 \pm 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 Pertussis External Control Reagents are supplied separately (Catalog 479930). It is recommended that reactivity of each new lot and each new shipment of Alethia Pertussis 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 Pertussis 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.

EXPECTED VALUES

Overall incidence of *B. pertussis* as detected by the Alethia Pertussis Assay in prospectively and retrospectively collected, non-selected specimens (all comers) during the period of this study was 8.2% (57/692).

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

1. The Alethia Pertussis assay targets the IS481 insertional element of the Bordetella genome. The IS481 insertional element is present in *B. pertussis*, *B. holmesii* and some strains of *B. bronchiseptica*.
2. This product can be used only with the Alethia instrument.
3. The Alethia Pertussis DNA assay is a qualitative assay and does not provide quantitative values or information about organism load.
4. This device has not been evaluated for monitoring treatment of *B. pertussis* infections.
5. This test has not been evaluated for specimens other than nasopharyngeal swab specimens, for immunocompromised individuals or from patients not suspected of infection with *B. pertussis*.
6. Results from this test must be correlated with the clinical history, epidemiological data, and any other data available to the clinician.
7. Prevalence of *B. pertussis* will affect the positive and negative predictive values for the assay.
8. *B. parapertussis* which causes a pertussis-like illness is not detected by the Alethia Pertussis DNA assay. Illness caused by *B. parapertussis* is generally milder than illness caused by *B. pertussis* because the bacteria do not produce pertussis toxin.
9. Respiratory infections can be caused by *B. pertussis* as well as other pathogens. Positive results do not preclude coinfection with other respiratory pathogens. False-negative *B. pertussis* results are more likely if patients are tested later in the disease course (more than two weeks after symptom onset), due to declining Bordetella DNA. False-negative results may also be increased in patients treated with antibiotic therapy.
10. Environmental contamination of an exam room from a prior patient or a recent pertussis vaccination administration may result in false-positive test results.
11. The detection of nucleic acid is dependent upon proper specimen collection, handling, transportation, storage and preparation. Failure to observe proper procedure in any one of these steps can lead to incorrect results.
12. Organism nucleic acids may persist *in vivo*, independent of organism viability. The Alethia Pertussis assay does not distinguish between viable and nonviable organisms.
13. As with all molecular based diagnostic tests, (A) False negative results may occur from the presence of inhibitors, technical error, sample mix-up or low numbers of organisms in the clinical specimen; (B) False positive results may occur from the presence of cross-contamination by target organisms, their nucleic acids or amplified product, and from non-specific signals.
14. Acetyl salicylic acid, as found in aspirin, produced invalid results when tested at concentrations above 5 mg/mL during *B. pertussis* strain BAA-589 Limit of Detection replicate testing.

SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The Alethia Pertussis DNA Amplification Assay was evaluated from December 2012 to July 2013 by independent clinical test sites representing geographically distinct regions throughout the United States. A total of 729 qualified nasopharyngeal (NP) swab specimens collected from patients suspected of respiratory infections due to *B. pertussis* were evaluated with the test device to establish performance characteristics. Specimens were leftover, de-identified specimens that had previously been submitted for routine *B. pertussis* testing. Specimens included in performance evaluation were prospective (never frozen) and retrospective (frozen prior to Alethia testing). The retrospective population included non-selected (all-comers) and selected specimens.

The performance of Alethia Pertussis was compared to a Composite Reference Method that included two manufacturer validated, IS481-targeted real-time PCR assays (PCR1 and PCR2) followed by bi-directional sequencing of amplicon from PCR positive specimens.

The PCR1 and PCR2 assay protocols included 40 amplification cycles. Bi-directional sequencing was performed for all specimens producing amplicon prior to the end of the 40-cycle amplification. Specimens were considered positive when bi-directional sequencing results from either comparator PCR assay confirmed the presence of *B. pertussis* amplicon. Specimens were considered negative when neither comparator PCR assay produced amplicon at the end of the 40-cycle amplification.

A total of 508 (69.7%) prospective and 221 (30.3%) retrospective specimens were tested. Invalid results were obtained for 13 specimens (1.8%); two specimens remained invalid after repeat testing. Two prospective and two retrospective specimens produced indeterminate comparator PCR results. Table 1 summarizes Alethia performance characteristics.

Table 1. Alethia Assay Performance

Specimen Description	Positive Specimens			Negative Specimens			Invalid Results ^b
	Alethia vs. Comparator	PPA ^a	95% CI	Alethia vs. Comparator	NPA	95% CI	
Composite Method Comparator, All Comers							
Prospective	39/45	86.7%	73.8 – 93.7%	447/459	97.4%	95.5 – 98.5%	2 (13)
Retrospective	4/4	100.0%	51.0 – 100.0%	176/178	98.9%	96.0 – 99.7%	0
Total:	43/49	87.8%	75.8 – 94.3%	623/637	97.8%	96.3 – 98.7%	2 (13)
Composite Method Comparator, Selected Specimens							
Retrospective	19/21	90.5%	71.1 – 97.3%	14/16	87.5%	64.0 – 96.5%	0

^a Eight specimens produced false-negative Alethia results when compared to the Composite Comparator Method. Six of the eight specimens produced detectable levels of DNA between 35 and 40 comparator assay amplification cycles and were confirmed positive by bi-directional sequencing. Three of these six specimens gave positive results in only one of the two comparator PCR/Sequencing assays.

^b 11/13 initial invalid specimens produced valid results upon repeat testing.

False-negative Alethia results were individually evaluated at the conclusion of clinical testing. The Cycle threshold (Ct) values produced during comparator assay testing were above 35 for one or both PCR/Bi-directional sequencing assays for six of the eight specimens evaluated. High Ct values in PCR assays may indicate that low levels of DNA are present.⁵ False-negative Alethia results and corresponding Composite Comparator data are shown in Table 2.

Table 2. False-Negative Alethia Specimens, Comparator Assay Results

Specimen Designation	Specimen Status	PCR1		PCR2	
		Ct Value	Bi-Directional Sequencing Result	Ct Value	Bi-Directional Sequencing Result
1-19	Prospective	34.90	+	33.85	+
1-29	Prospective	Negative	N/A	37.69	+
1-259	Prospective	34.07	+	35.09	+
1-269	Prospective	35.72	+	Negative	N/A
1-275	Prospective	Negative	N/A	39.13	+
3-33	Prospective	39.28	+	35.80	+
4-710	Retrospective	36.87	+	36.06	+
4-712	Retrospective	37.44	+	38.41	+

Performance characteristics for the Alethia assay were evaluated according to Clinical Test Site. Table 3 shows performance characteristics by Clinical Test Site.

Table 3. Alethia Assay Performance by Clinical Test Site

Specimen Description	Positive Specimens			Negative Specimens			Invalid Results ^b
	Alethia vs. Comparator	PPA	95% CI	Alethia vs. Comparator	NPA	95% CI	
Composite Method Comparator, All Comers							
Site 1	35/40	87.5%	73.9 – 94.5%	440/450	97.8%	96.0 – 98.8%	2 (13)
Site 2	4/4	100.0%	51.0 – 100.0%	67/69	97.1%	90.0 – 99.2%	0 (2)
Site 3	0/1	0.0%	0.0 – 79.3%	7/7	100.0%	64.6 – 100.0%	0 (0)
Site 4	4/4	100.0%	51.0 – 100.0%	109/111	98.2%	93.7 – 99.5%	0 (0)
Composite Method Comparator, Selected Specimens							
Site 1	15/15	100.0%	79.6% - 100.0%	6/8	75.0%	40.9 – 92.9%	0 (0)
Site 4	4/6	66.7%	30.0 – 90.3%	8/8	100.0%	67.6 – 100.0%	0 (0)

Clinical studies were conducted with multiple nasopharyngeal swab and sample elution buffer types. Sample buffers tested during clinical studies included 0.85% Saline (n=30 or 4.1%), Tris EDTA (n=8 or 1.1%) and Molecular Grade Water (n= 687 or 94.2%). All sample buffers were used in 0.5 mL volumes. Analytical studies were performed with 0.85% Saline, Tris EDTA, Phosphate Buffered Saline (PBS) and Molecular Grade Water. Analytical studies established equivalence between all sample elution buffer types.

Age information was known for 723 (99.2%) of the patients from whom samples were tested. Patient age ranged from 1 month to 88 years. Thirty-eight (5.2%) patients were less than 1 year of age; 13 (1.8%) were between 1 and 2 years old; 296 (40.6%) were between 2 and up to 12 years, 157 (21.5%) were between 12 and up to 21 years, 190 (26.0%) were above 21 but below 65 years, and the remaining 29 (4.0%) patients were above 65 years of age.

The study population included 413 (56.7%) female and 308 (42.2%) male patients. Gender was unknown for 8 (1.1%) patients included in the study. There is no expectation that the Alethia Pertussis assay performance characteristics are influenced by patient gender.

Studies using Pretreatment Reagent

Use of the Pretreatment Reagent was evaluated in external studies conducted from April to June 2015 at four selected test sites with prospectively collected specimens from symptomatic patients. Of the 164 samples collected for this study, 145 met study criteria. The majority of samples submitted to the test sites were collected with rayon tipped swabs; one sample was collected with a flocced nylon swab and three samples with a polyester swab. The majority of the samples were tested on the same day of collection. Collected specimens were tested immediately after collection, first using the predicate testing swab method, with retesting of all invalid results. Following testing with the predicate method the same specimens were then treated with the Pretreatment Reagent and tested after pretreatment with any invalid result retested. All predicate, invalid and pretreatment testing was completed within a 24 hour period. Of the 19 samples producing invalid test results by the predicate method, 15 were repeatedly invalid on retesting; three were negative and one positive on retesting. Following addition of Pretreatment Reagent the 19 samples that initially gave invalid results produced 17 negative and two positive results. Six samples gave a result with the predicate method, but produced an invalid result upon treatment with the Pre-treatment Reagent. The data is presented in Table 4 below.

Table 4. Method Comparison: Pretreatment Reagent versus Predicate Method (without Pretreatment Reagent)

	Test Sites Percent Agreement (Samples in Agreement/Total Tested)				
	Site 1	Site 2*	Site 3	Site 4	Total
PPA	87.5% (6/7) (CI: 48.7-97.4%)	0% (0/0)	100% (2/2) (CI: 34.2-100%)	100% (6/6) (CI: 61.8-100%)	93.3% (14/15) (CI: 70.2-98.8%)
NPA	94.3% (60/53) (CI: 84.6-98.1%)	93.3% (14/15) (CI: 70.2-98.8%)	100% (15/15) (CI: 79.6-100%)	100% (26/26) (CI: 87.1-100%)	96.3% (105/109) (CI: 90.9-98.6%)
Initial Invalid Rate without Pretreatment Reagent	1.6% (1/63)	0% (0/16)	37.0% (10/27)	20.5% (8/39)	13.1% (19/145)
Initial invalid rate with Pretreatment Reagent	4.8% (3/63)	6.25% (1/16)	3.7% (1/27)	2.6% (1/39)	4.1% (6/145)

* Site 2 data represents first pass data only as this site did not retest INVALID untreated samples, as required by the package insert, and before treating INVALID samples with Pretreatment Reagent. All other sites repeated INVALID test samples before pretreating samples.

ANALYTICAL SENSITIVITY

The analytical sensitivity or Limit of Detect for the Alethia Pertussis assay was determined for *B. pertussis* strain ATCC BAA-589, Tahoma 1.

Limit of Detection was determined using 60 replicates *B. pertussis* strain ATCC BAA-589 and a stated probability (eg. 95%, where 57/60 replicates are positive) of obtaining positive responses. Analytical sensitivity testing is summarized below.

<i>B. pertussis</i> Strain Description	CFU/mL	CFU/Test
ATCC BAA-589 (Tahoma 1)	3265	1.48

ASSAY REACTIVITY

The following *B. pertussis* strains were tested and produced positive reactions at 3265 CFU/mL or 1.48 CFU/Test with Alethia Pertussis: ATCC 12743; ATCC 8478; ATCC 8467; ATCC 9797; ATCC 53894; ATCC 10380; ATCC 12742; and A639. The following *B. pertussis* strains were tested and produced positive reactions at 3500 CFU/mL or 1.59 CFU/test with Alethia Pertussis: ATCC 51445 and ATCC BAA-1335.

REPRODUCIBILITY

Reproducibility studies were carried out by three of the four participating Clinical Sites. Blind-coded panels of 10 samples were supplied to participating laboratories. Samples were randomly sorted within each panel to mask sample identities. The panels included contrived samples manufactured as moderate positive samples (1.31 x 10⁴ CFU/mL or 6 CFU/test), low positive samples (4.89 x 10³ CFU/mL or 2 CFU/test), and high negative samples (8.2 CFU/mL or 0.004 CFU/test). The panel also included one negative sample, positive control and negative control. 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 Pertussis and six Alethia instruments were used in this study. Positive and Negative Controls were tested each day of testing. The results are provided in the table below:

Sample Type	Site 1		Site 2		Site 4		Total	
	Percent Agreement	Percent Agreement	Percent Agreement	Percent Agreement	Percent Agreement	Percent Agreement	Percent Agreement	
Moderate Positive	30/30	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90	100.0%
Low Positive	27/30	90.0%	29/30	96.7%	30/30	100.0%	86/90	95.6%
High Negative	26/30	86.7%	23/30	76.7%	29/30	96.7%	78/90	86.7%
Negative	10/10	100.0%	9/10	90.0%	10/10	100.0%	29/30	96.7%
Negative Control	10/10	100.0%	10/10	100.0%	10/10	100.0%	30/30	100.0%
Positive Control	10/10	100.0%	10/10	100.0%	10/10	100.0%	30/30	100.0%

CROSSREACTIVITY

Crossreactivity studies were performed with positive and negative nasal wash specimens inoculated with bacterial or fungal organisms to a final concentration of 1.0 x 10⁶ CFU/mL or virus at a minimum of 1.0 x 10⁶ TCID₅₀/mL. None of the following organisms reacted with Alethia Pertussis: *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter lwoffii*, *Actinomyces odontolyticus*, *Arcanobacterium haemolyticum*, *Bacillus subtilis*, *Bacteroides fragilis*, *Bordetella avium*, *Bordetella hinzii*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella pertussis*, *Bordetella trematum*, *Burkholderia cepacia*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium difficile*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* (ESBL), *Fusobacterium nucleatum*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae* (KPC), *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Legionella jordanis*, *Legionella longbeachae*, *Legionella micdadei*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Moraxella catarrhalis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria cinerea*, *Neisseria elongata*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Nocardia asteroides*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia liquefaciens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptococcus anginosus* (Group F), *Streptococcus bovis* (Group D), *Streptococcus canis* (Group G), *Streptococcus dysgalactiae* ssp. *dysgalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* ssp. *equisimilis* *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus suis*, *Ureaplasma urealyticum*, Adenovirus, Coronavirus, Coxsackievirus, Cytomegalovirus, Epstein Barr Virus, Herpes Simplex Virus 1, Herpes Simplex Virus 2, Human Metapneumovirus, Influenza A, Influenza B, Measles virus, Mumps virus, Parainfluenza virus 1, Parainfluenza virus 2, Parainfluenza virus 3, Respiratory syncytial virus A, Respiratory syncytial virus B, Rhinovirus.

B. bronchiseptica Strain 4617 and *B. holmesii* were tested at 1.0 x 10⁶ CFU/mL and were found to react with the Alethia Pertussis assay.

Unexpected results were observed during original testing of specimens containing *B. hinzii*, *H. parainfluenzae* and *M. genitalium*. One of three negative sample replicates containing *B. hinzii* produced a false-positive result that was not confirmed with further testing (20/20 replicates). Three of three negative sample replicates containing *H. parainfluenzae* produced false-positive results that were not confirmed with further testing (20/20 replicates). Three of three *B. pertussis* positive sample replicates produced invalid results that were not confirmed with further testing (10/10 replicates). Three of three negative sample replicates containing *M. genitalium* produced invalid results that were not confirmed with further testing (10/10 replicates). As repeat testing using a heightened number of replicates did not confirm original results, *B. hinzii*, *H. parainfluenzae* and *M. genitalium* are not considered cross-reactive or interferents in Alethia Pertussis testing.

TESTS FOR INTERFERING SUBSTANCES

The following chemical substances, at the specified saturated solvent/diluent concentrations, do not interfere with test results: Acetaminophen (10 mg/mL), Advil® [ibuprofen (10 mg/mL)], Afrin® Decongestant Nasal Spray [Oxymetazoline hydrochloride (0.0005% w/v)], Albuterol Sulfate [salbutamol sulfate (1% w/v)], Aspirin (5 mg/mL), Coricidin® HBP Cold/Flu Tablets [Acetaminophen (3.26 mg/mL), Chlorpheniramine maleate (0.02 mg/mL), Diphenhydramine HCl (0.25 mg/mL), Erythromycin (2% w/v), Mupirocin (2% w/v), Petroleum Jelly [white petrolatum (1% w/v)], Robitussin® Cough+Chest Congestion DM Cough Syrup [dextromethorphan HBr (0.1 mg/mL), Guaifenesin (1.0 mg/mL)], Sudhrine PE [phenylephrine HCl (0.3 mg/mL)], Saline Nasal Spray [sodium chloride (0.0065% w/v)], Smokeless Tobacco (snuff) (1% w/v), Tobramycin (0.6 mg/mL), Vicks® VaporRub® [camphor (0.48% w/v), eucalyptus oil (0.12% w/v), menthol (0.26% w/v)].

Ibuprofen (10 mg/mL) produced invalid results (3/6 replicates) during original testing of contrived *B. pertussis* specimens. All repeat testing produced positive results (10/10 replicates). As the original results were not confirmed, Ibuprofen (10 mg/mL) is not considered an interfering substance.

Aspirin was found to interfere with Alethia Pertussis testing at concentrations greater than 5 mg/mL.

The following biological substances, at the specified saturated solvent/diluent concentrations, do not interfere with test results: Human DNA (200 ng/μL), Mucin [bovine submaxillary gland type I-S (1% w/v)], Whole blood (1% v/v).

ITALIANO

alethia™

Pertussis

DNA Amplification Assay

Test di amplificazione del DNA per il rilevamento di *Bordetella pertussis* in campioni prelevati con tamponi nasofaringei

REF 480750

IVD

Rx Only

FINALITÀ USO

Il test di amplificazione del DNA Alethia Pertussis, eseguito sul lettore Alethia, è un esame diagnostico in vitro qualitativo per il rilevamento diretto di *Bordetella pertussis* in campioni umani prelevati con tamponi nasofaringei ottenuti da pazienti con sospetta infezione del tratto respiratorio da *Bordetella pertussis*.

Il test Alethia Pertussis utilizza la tecnologia LAMP (loop-mediated isothermal DNA amplification, amplificazione isoterma del DNA loop-mediata) per il rilevamento di *B. pertussis* identificando la sequenza di inserzione IS481 del genoma di *B. pertussis*. La sequenza di inserzione IS481 può essere individuata anche in *B. holmesii* e in alcuni ceppi di *B. bronchiseptica*. L'infezione respiratoria da *B. pertussis*, *B. holmesii* o *B. bronchiseptica* può produrre risultati positivi nei test di rilevazione di IS481. L'infezione da *B. holmesii* può causare un quadro clinico simile a quello da *B. pertussis* e sono state segnalate epidemie miste che coinvolgono entrambe le infezioni da *B. pertussis* e *B. holmesii*. Qualora si rendesse necessario differenziare *B. holmesii* e *B. pertussis*, andrebbero effettuati ulteriori test. Nell'uomo, la *B. bronchiseptica* è una causa di infezione rara. Quando i fattori clinici suggeriscono che la *B. pertussis* potrebbe non essere la causa dell'infezione respiratoria, dovrebbero essere eseguite indagini cliniche appropriate in base alle linee guida pubblicate.

Risultati negativi al test di amplificazione del DNA Alethia Pertussis non escludono l'infezione da *Bordetella pertussis* e risultati positivi non escludono una co-infezione con altri agenti patogeni del tratto respiratorio. I risultati del test Alethia Pertussis devono essere utilizzati congiuntamente alle informazioni ottenute durante la valutazione clinica del paziente come ausilio nella diagnosi di infezione respiratoria da *B. pertussis* e non devono essere usati quale unica base per il trattamento o per altre decisioni relative alla gestione del paziente.

Il test Alethia Pertussis è inteso per l'utilizzo in ospedale, laboratori statali o centri di riferimento. Il dispositivo non è inteso per l'uso come "point-of-care".

SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

Il test di amplificazione del DNA Alethia Pertussis si basa sulla tecnologia LAMP.^{1,2} Il test ha come bersaglio una sequenza di 198 paia di basi (bp) del genoma di *Bordetella pertussis* che si trova in una regione della sequenza di inserzione IS481.

L'amplificazione loop-mediata utilizza primer specificamente disegnati per fornire l'amplificazione isoterma specifica e continua del DNA. Un sottoprodotto di questa amplificazione è il magnesio pirofosfato, che forma un precipitato bianco che rende torbida la soluzione di reazione. Le caratteristiche di assorbanza della soluzione di reazione vengono monitorate dall'incubatore/lettore Alethia Meridian. Le variazioni nelle caratteristiche di assorbanza della soluzione di reazione creata dalla precipitazione del magnesio pirofosfato indicano la presenza del DNA bersaglio. L'assenza del DNA bersaglio non determina un cambiamento significativo nell'assorbanza del campione.

Il kit Alethia Pertussis include il Reagente di Controllo/Controllo Negativo Alethia Pertussis, i Dispositivi Test Alethia Pertussis, il Tampone di Reazione Alethia Pertussis e l'olio minerale. Il Reagente di Controllo/Controllo Negativo del test Alethia utilizzato per la diluizione e la preparazione del campione, è una soluzione tampone contenente *E. coli* trattato con formalina che ospita il DNA di *Staphylococcus aureus*. Il Dispositivo Test Alethia Pertussis contiene un granulo liofilizzato in ognuna delle due camere: una camera TEST con primer specifici per IS481 e una camera CONTROLLO con primer specifici per *S. aureus*. Il DNA di *S. aureus* nel Reagente di Controllo/Controllo Negativo dei test e i primer specifici per *S. aureus* nella camera di CONTROLLO funzionano come controllo interno per il test. Nella preparazione del campione, il campione del paziente viene aggiunto al Reagente di Controllo/Controllo Negativo del test. L'aggiunta del campione alla provetta del Reagente di Controllo/Controllo Negativo del test combina il campione di DNA con il DNA di controllo di *S. aureus* e consente l'elaborazione parallela del DNA bersaglio e del DNA di Controllo attraverso la sua amplificazione e rilevamento. Il controllo interno monitora l'inibizione dell'amplificazione, la prestazione del reagente analitico e l'efficacia dell'elaborazione del campione. La sequenza bersaglio di *S. aureus* deve essere amplificata e rilevata nella reazione finale, altrimenti il test è considerato invalido e i risultati del paziente non vengono referati.

Il lettore Alethia monitora le variazioni nelle caratteristiche di assorbanza misurando la trasmissione della luce attraverso le soluzioni di reazione contenute nelle camere Test e Controllo. La trasmissione della luce viene controllata all'inizio dell'esecuzione dell'analisi (Signal_{initial}, S) nonché alla fine (Signal_{final}, Sf). Il lettore Alethia calcola la variazione nella trasmissione della luce fra la fine e l'inizio dell'analisi (Sf:S) e confronta il rapporto con un valore stabilito di cut-off.

I valori stabiliti di cut-off per la camera TEST sono utilizzati per referare i risultati del campione. I rapporti Sf:S della camera TEST inferiori all'82% sono referati come "POSITIVI"; i rapporti Sf:S della camera TEST superiori o pari all'82% sono referati come "NEGATIVI". I valori numerici non sono riportati.

I valori stabiliti di cut-off per la camera CONTROLLO sono utilizzati per determinare la validità. I rapporti Sf:S della camera CONTROLLO inferiori al 90% sono considerati validi e consentono di referare i risultati della camera TEST (POSITIVO, NEGATIVO). I rapporti Sf:S della camera CONTROLLO superiori o pari al 90% sono considerati non validi e impediscono di referare i risultati della camera TEST. Le reazioni della camera CONTROLLO non valide sono riportate come "NON VALIDE". I valori numerici non sono riportati.

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

PRINCIPI BIOLOGICI

Bordetella pertussis è un agente patogeno umano responsabile esclusivamente per la malattia respiratoria endemica della tosse convulsa (pertosse); una malattia notificata pubblicamente che ha colpito più di 200.000 persone al mondo nel 2012. La tosse convulsa è attualmente la sola malattia negli Stati Uniti che mostra una tendenza all'incremento di casi riportati e morbilità sostanziale nonostante la disponibilità di un vaccino.³ I centri per la prevenzione e il controllo delle malattie (CDC) degli Stati Uniti hanno riportato circa 48.300 casi di pertosse nel 2012, una media di 15,4 casi per 100.000 persone negli Stati Uniti.⁴ I recenti focolai hanno indicato un calo di immunità nei bambini dopo aver ricevuto l'ultima dose di richiamo del vaccino acellulare, tenendo conto della sensibilità all'infezione da pertosse nella popolazione sia vaccinata che non vaccinata di bambini di età compresa tra 7 e 11 anni.^{5,6}

I focolai di pertosse sono particolarmente difficili da controllare in quanto le prime fasi della malattia sono simili ad altre infezioni respiratorie e i pazienti possono rimanere altamente infettivi fino a 5 settimane dall'inizio dei sintomi.³ La pertosse, inoltre, non viene ufficialmente diagnosticata fino alla presenza della caratteristica tosse convulsa, che si manifesta almeno 2 settimane dalla comparsa dei sintomi.³ La diagnosi clinica della pertosse può essere eseguita usando test in coltura, test sierologici o test di amplificazione di acido nucleico (NAAT). I test in coltura sono altamente specifici ma la sensibilità è bassa, per ottenere i risultati possono essere necessari fino a 7 giorni e le cellule vitali richieste per la coltura diminuiscono con il progredire della malattia (dopo 2 settimane dalla comparsa dei sintomi).⁷ I test NAAT invece possono fornire rapidamente i risultati dei test e non richiedono batteri vitali. Il test di amplificazione degli acidi nucleici per *B. pertussis* è più sensibile durante le prime tre settimane di tosse poiché il DNA batterico è presente nel rinofaringe. La quantità di batteri presenti nel rinofaringe diminuisce drasticamente dopo la quarta settimana di tosse, aumentando la possibilità di ottenere falsi-negativi durante le fasi avanzate dell'infezione.⁸ Inoltre, solo i pazienti sintomatici con tosse dovrebbero essere testati con i test NAAT per prevenire risultati falsi positivi da contatti diretti asintomatici.⁸ I test sierologici possono essere usati solo per diagnosticare la malattia nelle ultime fasi, circa 2-8 settimane dopo l'inizio della tosse.

REAGENTI/MATERIALI FORNITI

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

- Reagente di Controllo/Controllo Negativo Alethia Pertussis:** soluzione tampone Tris contenente *E. coli* trattato con formalina che ospita all'interno un plasmide contenente un segmento del genoma di *S. aureus* e sodio azide (0,09%) come conservante. Il Reagente di Controllo/Controllo Negativo del test svolge il ruolo di controllo interno durante i test su pazienti e di controllo negativo esterno durante i test routinari di controllo qualità.
- Dispositivo Test Alethia Pertussis:** dispositivo a due camere contenente i reagenti di amplificazione liofilizzati (DNA polimerasi, deossinucleotidi trifosfato) e i primer specifici per IS481 (camera TEST) o i primer di controllo (camera CONTROLLO).
- Tampone di Reazione Alethia Pertussis:** soluzione tampone Tris-EDTA contenente sodio azide (0,09%) come conservante.
- Olio minerale (bottiglia con tappo contagocce)**
- Reagente di Pretrattamento Alethia (per procedura di trattamento facoltativo del campione):** reagente liofilizzato contenente agente neutralizzante e sodio azide (0,1%) come conservante. Ogni fiala contiene reagente sufficiente per il trattamento di 50 campioni.

MATERIALI FORNITI SEPARATAMENTE

Kit di controllo esterno Alethia Pertussis, numero di catalogo: 479930

MATERIALI NON FORNITI

- Guanti in lattice monouso, senza talco
- Puntali per pipetta privi di DNasi/RNasi e resistenti alla contaminazione da aerosol
- Sistema di prelievo e trasporto dei campioni
Tamponi nasofaringei: poliestere (capacità minima 18 μL, ad es. Puritan Medical Products, n. di catalogo 25-801D 50); Rayon (capacità minima 31 μL, ad es. Puritan Medical Products, n. di catalogo 25-801R 50); oppure Nylon Floccato (capacità minima 69 μL, ad es. Copan, n. di catalogo 503CS01 o il tampone n. di catalogo 482C).
Terrone di trasporto non nutritivo: liquido Amies, senza carbone; oppure liquido Stuart (volume massimo: 1,2 mL in tampone/spugna)
Sistema di raccolta: Copan Liquido Amies Elution Swab (Eswab™) Sistema di Raccolta e Trasporto (Copan n. di catalogo 482C)
- Acqua deionizzata
- Provette per microcentrifuga

STRUMENTI NON FORNITI

- Blocco termostatico a secco di 12 mm in grado di arrivare a 95 C
- Termometro digitale con registrazione della temperatura max/min (es., termometro impermeabile a prova d'urto Traceable® Lollipop™)
- Vortex
- Timer
- Micropipetta in grado di dispensare 50 μL
- Pipetta in grado di dispensare 2,5 mL
- Attrezzatura da taglio (per es., forbici, cesole, forbici di sicurezza)
- Lettore Alethia, Meridian Bioscience, Inc. Numero di catalogo: 610189

PRECAUZIONI

- Tutti i reagenti sono esclusivamente per uso diagnostico in vitro.
- Non scambiare il Reagente di Controllo/Controllo Negativo del test o i Dispositivi Test tra i lotti. Il Tampone di Reazione, il Reagente di Pretrattamento e l'olio minerale sono intercambiabili, a patto che non siano ancora scaduti quando vengono utilizzati.
- Seguire il livello di biosicurezza 2 e le buone pratiche di laboratorio durante l'esecuzione dei test.⁹ Trattare tutti i campioni e i dispositivi di analisi usati come capaci di trasmettere agenti infettivi. Non mangiare, bere o fumare in aree in cui vengono manipolati i campioni o i reagenti del kit.
- Indossare guanti monouso per la manipolazione dei campioni e subito dopo lavarsi a fondo le mani.
- Applicare i programmi di controllo qualità per i laboratori di analisi molecolari che comprendano impiego e manutenzione adeguati dell'apparecchiatura.¹⁰
- Il Dispositivo Test Alethia Pertussis contiene reagenti liofilizzati. La busta protettiva non deve essere aperta fino a quando non si è pronti a eseguire l'analisi.
- Il Dispositivo Test Alethia Pertussis 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.
- Smaltire i Dispositivi Test Alethia subito dopo l'uso, lasciando chiusa la linguetta del dispositivo. 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.
- Una preparazione impropria del campione, un reagente deteriorato, un guasto dello strumento o un errore del controllo interno potrebbero invalidare i risultati dei test. In questi casi, il risultato non valido può essere corretto ripetendo il test. La nasofaringe di alcuni pazienti contiene un inibitore biologico che può causare anche un risultato non valido. In questi casi, l'inibitore causerà il ripetersi di risultati non validi a meno che il campione non venga trattato per rimuovere l'agente interferente. (Vedere la sezione su TRATTAMENTO/PRETRATTAMENTO FACOLTATIVO DEL CAMPIONE per la modalità di trattamento).
- Le regolamentazioni locali, statali, e regionali per la notifica di malattie soggette a notifica obbligatoria sono continuamente aggiornati e includono un certo numero di organismi al fine di garantire la sorveglianza ed il controllo delle epidemie.^{8,9} Inoltre, il CDC (Centri per il Controllo delle Malattie USA) raccomanda che quando un patogeno reponsabile di una malattia soggetta a notifica, viene rilevato mediante un metodo diagnostico non basato sulla coltura, il laboratorio deve facilitare l'ottenimento e l'isolamento del materiale clinico per il successivo invio agli appropriati laboratori di sanità pubblica, a quindi facilitare la rilevazione dell'epidemia e le investigazioni epidemiologiche. I laboratori hanno la responsabilità di seguire le loro normative statali e/o locali e dovrebbero consultare i propri laboratori di sanità pubblica e/o le linee guida per l'isolamento e la presentazione di campioni clinici.
 - Sintesi delle Malattie soggette a Notifica. Negli USA MMWR <http://www.cdc.gov/mmwr/PDF/wk/mm6153.pdf>; In Italia <http://www.simi.iss.it/normativa.htm>
 - Analisi CIFOR dell'Autorità Giudiziaria di Stato. <http://www.cifor.us/documents/CIFORAnalysisStateEqualAuthorities.pdf>

DICHIARAZIONI DI PERICOLO E PRUDENZA

Per i rischi e i consigli di prudenza fare riferimento alla SDS, disponibile sui siti www.meridianbioscience.com (versione USA) / www.meridianbioscience.eu (versione EU).

STABILITÀ E CONSERVAZIONE

La data di scadenza è riportata sull'etichetta del kit. Conservare il kit a 2-30 C.

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Assicurarsi che i reagenti del kit siano a temperatura ambiente (21-30 C) prima dell'uso. Si potrebbero ottenere risultati non corretti se i reagenti non vengono portati a temperatura ambiente prima dell'uso.

RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Tipo di campione: tamponi nasofaringei

Raccolta del campione: il prelievo dei campioni nasofaringei deve essere eseguito in conformità con le procedure della struttura sanitaria per la raccolta di campioni clinici per l'infezione da *Bordetella pertussis*. I campioni nasofaringei devono essere prelevati con i tipi di tamponi adatti (ad es. poliestere, nylon floccato o rayon).

Mettere i tamponi nel terreno di trasporto non nutritivo (ad es. liquido di Amies, senza carbone, oppure liquido di Stuart o terreno Copan eSwab) oppure conservarli senza conservante in una provetta sterile senza terreno.

I campioni senza conservante o i campioni conservati in un terreno di trasporto dovrebbero essere analizzati il prima possibile, ma possono rimanere a temperatura ambiente (21-30 C) per un massimo di 5 giorni o refrigerati (2-8 C) per un massimo di 7 giorni prima dell'analisi. Non congelare i campioni.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI:

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

NOTA: La strumentazione di laboratorio utilizzata per la manipolazione dei tamponi (es. forbici, cesoie, forbici di sicurezza, pinze, pinzette), deve essere trattata con un detergente che distrugga gli acidi nucleici (es. candeggina al 10%) prima di ogni utilizzo. La strumentazione deve essere completamente asciutta prima di manipolare i tamponi.

- Preparazione del campione
 - Tamponi (rayon, nylon o floccato):
 - Inserire il tampone con il campione in una provetta del Tampone di Reazione etichettata. Rompere l'asta del tampone per far sì che il campione entri nella provetta. Eluire il campione miscelando su vortex per 45-60 secondi. **I campioni eluiti possono essere conservati a temperatura ambiente (21-30 C) per un massimo di 48 ore oppure refrigerati (2-8 C) per un massimo di 7 giorni prima dell'analisi.**
 - Aggiungere 50 µL di campione eluito alla provetta di Reagente di Controllo/Controllo Negativo etichettata e richiuderla.
 - Ripetere i passaggi della PREPARAZIONE DEL CAMPIONE per tutti i campioni da esaminare.
 - Terreno ESwab: il terreno all'interno del tubo di raccolta del Sistema ESwab contiene il campione eluito del paziente.
 - Agitare la provetta ESwab contenente il tampone del campione per almeno dieci secondi per eluire il campione.
 - Trasferire 25 µL del terreno in una provetta di Reagente di Controllo/Controllo Negativo etichettata e richiuderla. (Non trasferire questo materiale nella provetta del Tampone di Reazione. Va direttamente nella provetta di Reagente di Controllo/Controllo Negativo)
 - Ripetere i passaggi di PREPARAZIONE DEL CAMPIONE per tutti i campioni di terreno ESwab da esaminare
- Miscelare su vortex ciascuna provetta di Reagente di Controllo/Controllo Negativo contenente il campione eluito per circa 10 secondi.
- Riscaldare ciascuna provetta con la miscela di campione/controllo in un blocco termostatico a secco a 95 ± 5 C per 10 ± 2 minuti. Monitorare la fase del trattamento termico con il termometro digitale e il timer.
- Rimuovere ciascuna provetta di campione/controllo dal blocco termostatico a secco. I campioni sottoposti a trattamento termico possono essere tenuti a temperatura ambiente (21-30 C) fino a 15 minuti prima dell'analisi.
- Miscelare su vortex per circa 10 secondi.

PROCEDURA DEL TEST

NOTA: È possibile analizzare un massimo di 10 campioni in un singolo ciclo del lettore Alethia.

- Per ciascun campione estrarre 1 Dispositivo Test Alethia Pertussis dalla busta protettiva. Aprire con attenzione il dispositivo, tenendo le camere in maniera tale che il reagente liofilizzato non fuoriesca all'apertura. Porre il dispositivo su di una superficie piana o in un portaprovette idoneo.
- Usando una micropipetta, trasferire prima 50 µL del campione trattato termicamente nella camera del TEST (Sinistra/microsfera bianca), poi trasferire 50 µL del campione trattato termicamente nella camera del CONTROLLO (Destra/microsfera gialla) del Dispositivo Test Alethia. Fare attenzione a non introdurre aria nella miscela di reazione. Non miscelare la soluzione di reazione con la pipetta.
- Aggiungere 1 goccia di olio minerale alla camera TEST e alla camera CONTROLLO. Chiudere il Dispositivo Test Alethia assicurando bene la linguetta di chiusura.
- Picchiare il dispositivo sul bancone o agitarlo per rimuovere le bolle d'aria. Esaminare attentamente il Dispositivo Test per verificare la dissoluzione del granulo di controllo/test e per escludere la presenza di bolle d'aria residue nella provetta e di liquido nella parte superiore del dispositivo. Se si nota la presenza di granuli non disciolti, bolle d'aria o liquido nella parte superiore del dispositivo, picchiare il dispositivo sul bancone e ripetere l'ispezione visiva. L'amplificazione e il rilevamento devono iniziare entro 15 minuti.
- Inserire il Dispositivo Test Alethia nello strumento Alethia e iniziare la reazione di amplificazione e il rilevamento. I risultati saranno visualizzati alla conclusione del ciclo.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

ID campione	Risultato riportato	Interpretazione
Campione del paziente	POSITIVO	Campione non trattato o pretrattato: Il campione contiene il DNA bersaglio IS481 di <i>B. pertussis</i> *
	NEGATIVO	Campione non trattato o pretrattato: Nessun DNA di <i>B. pertussis</i> rilevato.
	NON VALIDO	Campione non trattato: Nessun risultato refertabile. Ripetere il test utilizzando un campione trattato/eluito con il Reagente di Pretrattamento. Campione del paziente con effetto inibitorio, preparazione del campione non corretta, deterioramento del reagente, guasto dello strumento o fallimento del controllo interno. Campione pretrattato: Nessun risultato riportabile. Non ritrattare campioni già trattati con il Reagente di Pretrattamento. I campioni INVALIDI pretrattati possono essere ritestati, se desiderato, e devono essere riportati come INVALIDI se il re-test genera lo stesso risultato. I campioni che producono risultati INVALIDI prima e dopo il pretrattamento devono essere riportati come INVALIDI.
Controllo positivo	POSITIVO	Risultato di controllo positivo valido. Reagenti attivi al momento dell'uso, corretto funzionamento del lettore Alethia.
	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, (in Italia +390331433636).
	NON VALIDO	Nessun risultato refertabile. Ripetere l'intero ciclo di analisi usando i campioni originali. Se il controllo ripetuto risulta essere INVALIDO, contattare il Servizio di Assistenza tecnica Meridian (negli USA 001-800-343-3858) o il Distributore Locale, (in Italia +390331433636). Preparazione del campione non corretta, deterioramento del reagente, guasto dello strumento o fallimento del controllo interno.
Controllo negativo	POSITIVO	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, (in Italia +390331433636).
	NEGATIVO	Risultato del controllo negativo valido. Reagenti reattivi al momento dell'uso, corretto funzionamento del lettore Alethia.
	NON VALIDO	Nessun risultato refertabile. Ripetere l'intero ciclo di analisi usando i campioni originali. Se il controllo ripetuto risulta essere INVALIDO, contattare il Servizio di Assistenza tecnica Meridian (negli USA 001-800-343-3858) o il Distributore Locale, (in Italia +390331433636). Preparazione del campione non corretta, deterioramento del reagente, guasto dello strumento o fallimento del controllo interno.
POZZETTO VUOTO	NESSUNO	OPPURE Il Dispositivo Test Alethia presente è compromesso a causa di un errore nella preparazione del campione, dispositivo sporco o non correttamente posizionato. Ripetere il test utilizzando il campione originale.

*IS481 si trova in molteplici copie in *B. pertussis* (da 50 a 238 copie/genoma), in *B. holmesii* (da 8 a 10 copie/genoma) e meno frequentemente in *B. bronchiseptica*.

Pretrattamento/Trattamento opzionale del campione per eliminare gli inibitori della reazione.

Il seguente metodo può essere utilizzato per rimuovere l'attività inibitoria delle sostanze biologiche nel campione di un paziente.

Preparazione del Reagente di Pretrattamento

- Ricostituire il Reagente di Pretrattamento liofilizzato aggiungendo 2,5 mL di acqua deionizzata al flacone. Richiudere il flacone.
- Lasciar riposare il Reagente di Pretrattamento ricostituito a 21-30 C per 30 minuti, quindi mescolare delicatamente per evitare la formazione di schiuma.
- Conservare il Reagente di Pretrattamento ricostituito in uno dei due modi:
 - Conservare il Reagente di Pretrattamento ricostituito nel suo flacone originale a 2-8 C per un massimo di un mese. Etichettare il flacone con la sua nuova data di scadenza, oppure
 - Trasferire immediatamente 0,1 mL o aliquote maggiori del reagente ricostituito in provette per microcentrifuga etichettate, richiudere saldamente e congelare in congelatore a ≤ -20 C. Le aliquote congelate sono stabili alla scadenza originale del materiale liofilizzato. Scongela ciascuna aliquote congelata non più di una volta prima dell'uso. Le aliquote scongelate possono essere conservate a 2-8 C per una settimana al massimo.
- Riscaldare il Reagente di Pretrattamento ricostituito a 21-30 C prima dell'uso. Agitare delicatamente per evitare la formazione di schiuma. Non utilizzare la soluzione del Reagente di Pretrattamento se appare torbida.

Trattamento dei campioni preparati precedentemente per essere riesaminati:

- Tamponi (rayon, nylon o floccati):
 - Aggiungere 50 µL di Reagente di Pretrattamento ricostituito alla provetta del Tampone di Reazione contenente il campione del paziente (residuo della PREPARAZIONE DEL CAMPIONE passo 1.a.i.) e miscelare il contenuto su vortex per 10-15 secondi. Il campione trattato non deve essere conservato oltre il periodo di tempo stabilito per il campione eluito descritto al punto 1 della sezione PREPARAZIONE DEL CAMPIONE di cui sopra.
 - Trasferire 50 µL del terreno in una provetta del Reagente di Controllo/Controllo Negativo del test e tapparla.
- Terreno ESwab:
 - Trasferire 500 µL di terreno ESwab inoculato con il campione del paziente (dalla provetta di raccolta ESwab) in una provetta vuota.
 - Aggiungere 50 µL di Reagente di Pretrattamento ricostituito alla provetta e miscelare il contenuto su vortex per 10-15 secondi. Il campione trattato non deve essere conservato oltre il periodo di tempo stabilito per il campione eluito descritto al punto 1 della sezione PREPARAZIONE DEL CAMPIONE di cui sopra.
 - Trasferire 25 µL del terreno in una provetta del Reagente di Controllo/Controllo Negativo del test etichettata e tapparla.
- Terminare i passaggi 2-5 della sezione PREPARAZIONE DEL CAMPIONE e procedere con il test.

Pretrattamento dei campioni non testati:

- Tamponi (rayon, nylon o floccati):
 - Aggiungere 50 µL di Reagente di Pretrattamento ricostituito a una provetta del Tampone di Reazione etichettata.
 - Inserire il tampone con il campione nella provetta del Tampone di Reazione. Rompere l'asta del tampone per far sì che il campione entri nella provetta. Eluire il campione miscelando su vortex per 45-60 secondi. Il campione trattato ed eluito può essere conservato a temperatura ambiente (21-30 C) per un massimo di 48 ore o in frigorifero (2-8 C) per un massimo di 7 giorni prima del test.
 - Trasferire 50 µL del terreno in una provetta del Reagente di Controllo/Controllo Negativo del test etichettata e tapparla.
- Terreno ESwab:
 - Miscelare su vortex la provetta ESwab contenente il tampone con il campione per un minimo di 10 secondi per eluire il campione.
 - Trasferire 500 µL di terreno ESwab inoculato con il campione del paziente in una provetta vuota.
 - Aggiungere 50 µL di Reagente di Pretrattamento ricostituito alla provetta e miscelare il contenuto su vortex per 10-15 secondi. Il campione trattato non deve essere conservato oltre il periodo di tempo stabilito per il campione eluito descritto al punto 1 della sezione PREPARAZIONE DEL CAMPIONE di cui sopra.
 - Trasferire 25 µL del terreno in una provetta del Reagente di Controllo/Controllo Negativo del test etichettata e tapparla.
- Terminare i passaggi 2-5 della sezione PREPARAZIONE DEL CAMPIONE e procedere con il test.

CONTROLLO QUALITÀ

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

- Ogni dispositivo contiene una camera di controllo interno che verifica l'eventuale inibizione dell'amplificazione e l'efficacia dei reagenti e dell'analisi del campione.
- La fase di trattamento termico viene monitorata con un termometro esterno e con un timer. Utilizzare la registrazione della temperatura max/min del termometro per garantire il mantenimento di una temperatura di 95 ± 5 C. Usare il timer per garantire che la durata del trattamento termico sia di 10 ± 2 minuti.
- Una buona pratica di laboratorio raccomanda l'uso di materiali di controllo. Gli operatori devono attenersi alle appropriate linee guida federali, statali e locali riguardanti l'analisi dei controlli di qualità esterni.
- I reagenti di controllo esterni Alethia Pertussis sono forniti separatamente (n. di catalogo 479930). Si raccomanda di verificare la reattività di ciascun nuovo lotto e di ogni nuova spedizione di Alethia Pertussis al momento della ricezione o prima dell'uso. I test di controllo esterni vanno eseguiti successivamente, in conformità con le appropriate linee guida federali, statali e locali. Il kit del test Alethia Pertussis non va utilizzato per l'analisi dei pazienti se i controlli esterni non producono i risultati corretti.
- È necessario utilizzare un dispositivo differente per ciascun reagente di controllo esterno.

VALORI ATTESI

L'incidenza complessiva di *B. pertussis* come rilevata dal test Alethia Pertussis in esemplari non selezionati raccolti prospetticamente e retrospettivamente (tutti quelli pervenuti) durante il periodo di questo studio è stata dell'8,2% (57/692).

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

- Il test Alethia Pertussis ha come bersaglio la sequenza di inserzione IS481 del genoma di *Bordetella*. La sequenza di inserzione IS481 è presente in *B. pertussis*, *B. holmesii* e in alcuni ceppi di *B. bronchiseptica*.
- Questo prodotto può essere usato solo con lo strumento Alethia.
- Il test per il rilevamento del DNA di Alethia Pertussis è un test qualitativo e non fornisce valori quantitativi o informazioni relative alla carica dell'organismo.
- Questo dispositivo non è stato valutato per il monitoraggio del trattamento delle infezioni da *B. pertussis*.
- Questo test non è stato valutato per campioni diversi da quelli prelevati con tamponi nasofaringei, per soggetti immunocompromessi o per pazienti non sospetti di infezione da *B. pertussis*.
- I risultati di questo test devono essere correlati con l'anamnesi, i dati epidemiologici e qualsiasi altro dato a disposizione del medico.
- La prevalenza di *B. pertussis* influenzerà i valori predittivi positivi e negativi per il test.
- La *B. parapertussis*, che causa una malattia simile alla pertosse, non viene rilevata dal test del DNA Alethia Pertussis. La malattia causata da *B. parapertussis* è generalmente più lieve della malattia causata da *B. pertussis* perché i batteri non producono la tossina della pertosse.
- Le infezioni del tratto respiratorio possono essere causate da *B. pertussis* come pure da altri patogeni. I risultati positivi non escludono co-infezioni da parte di altri patogeni del tratto respiratorio. I risultati positivi non escludono co-infezioni da parte di altri patogeni del tratto respiratorio. Risultati falsi-negativi per *B. pertussis* sono più probabili se i pazienti vengono testati tardivamente nel corso della malattia (più di due settimane dopo l'insorgenza della sintomatologia), a causa della riduzione del DNA della *Bordetella*. Risultati falsi-negativi possono aumentare anche nei pazienti trattati con terapia antibiotica.
- La contaminazione ambientale di una stanza d'esame da parte di un paziente precedente o una recente somministrazione di vaccinazione di pertosse può causare falsi-positivi.
- Il rilevamento dell'acido nucleico dipende dall'adeguatezza delle procedure di prelievo, manipolazione, trasporto, conservazione e preparazione dei campioni. Il mancato rispetto della procedura appropriata per ciascuna di queste fasi può portare a risultati errati.
- Gli acidi nucleici degli organismi possono persistere *in vivo* indipendentemente dalla vitalità degli organismi stessi. Il test Alethia Pertussis non distingue tra organismi vitali e non vitali.

Nel corso dell'analisi originale di campioni contenenti *B. hinzii*, *H. parainfluenzae* e *M. genitalium* si sono osservati risultati non attesi. Una replica di campione negativo su tre contenenti *B. hinzii* ha prodotto un falso-positivo che non è stato confermato con ulteriori test (20/20 repliche). Tre repliche di campione negativo su tre contenenti *H. parainfluenzae* hanno prodotto risultati falsi-positivi che non sono stati confermati con ulteriori test (20/20 repliche). Tre repliche di campione positivo su tre di *B. pertussis* hanno prodotto risultati invalidi che non sono stati confermati con ulteriori test (10/10 repliche). Tre repliche di campione positivo su tre contenenti *M. genitalium* hanno prodotto risultati invalidi che non sono stati confermati con ulteriori test (10/10 repliche). Poiché ripetute analisi utilizzando un aumentato numero di repliche non hanno confermato i risultati originali, *B. hinzii*, *H. parainfluenzae* e *M. genitalium* non sono considerati cross reattivi o interferenti con il test Alethia Pertussis.

ANALISI DI SOSTANZE INTERFERENTI

Le seguenti sostanze chimiche, alle specifiche concentrazioni saturate di solvente/diluente, non interferiscono con i risultati dei test: acetaminofene (10 mg/mL), Advil® [ibuprofene (10 mg/mL)], spray nasale decongestionante Afrin® [ossimetazolina cloridrato (0,0005% w/v)], albuterolo solfato [salbutamololo solfato (1% w/v)], aspirina (5mg/mL), compresse per sintomi influenzali/raffreddore Coricidin® HBP [acetaminofene (3,26 mg/mL), clorfeniramina maleato (0,02 mg/mL)], difenidramina HCl (0,25 mg/mL), eritromicina (2% w/v), mupirocina (2% w/v), gel petrolio [petrolo bianco (1% w/v)], sciroppo per congestione toracica/tosse DM Robitussin® [dexometrofanolo HBr (0,1 mg/mL), guaifenesina (1,0 mg/mL)], sudedrina PE [fenilefrina HCl (0,3 mg/mL)], spray nasale salino [cloruro di sodio (0,0065% w/v)], tabacco senza fumo (da fiuto) (1% w/v), tobramicina (0,6 mg/mL), Vicks® VapoRub® [canfora (0,48% w/v), olio di eucalipto (0,12% w/v), mentolo (0,26% w/v)].

Nel corso dell'analisi originale di campioni artificiali di *B. pertussis* l'ibuprofene (10 mg/mL) ha prodotto risultati invalidi (3/6 repliche). Tutte le analisi ripetute hanno prodotto risultati positivi (10/10 repliche). Poiché i risultati originali non sono stati confermati, l'ibuprofene (10 mg/mL) non è considerato una sostanza interferente.

L'aspirina ha interferito con il test Alethia Pertussis a concentrazioni superiori a 5 mg/mL.

Le seguenti sostanze biologiche, alle specifiche concentrazioni saturate di solvente/diluente, non interferiscono con i risultati dei test: DNA umano (200 ng/µL), mucina [ghianola sottomucellare bovina tipo I-S (1% w/v)], sangue intero (1% v/v).

FRANCAIS

alethia™

Pertussis

DNA Amplification Assay

Test d'amplification de l'ADN pour la détection du *Bordetella pertussis* sur les écouvillons nasopharyngés

REF 480750

IVD

Rx Only

BUT DE LA METHODE

Le test d'amplification ADN Alethia Pertussis, réalisé sur l'Incubateur/Lecteur Alethia est un test qualitatif de diagnostic in vitro pour la détection directe de *Bordetella pertussis* chez l'Homme sur des écouvillonnages nasopharyngés, recueillis chez des patients suspectés d'infection des voies respiratoires due à *Bordetella pertussis*.

Le test Alethia Pertussis utilise la technologie d'amplification génique isotherme de l'ADN (LAMP) pour détecter *B. pertussis* en ciblant la séquence d'insertion IS481 du génome de *B. pertussis*. La séquence d'insertion IS481 peut également être retrouvée dans *B. holmesii* et certaines souches de *B. bronchiseptica*. Les infections respiratoires à *B. pertussis*, *B. holmesii* ou *B. bronchiseptica* peuvent donner des résultats positifs vis-à-vis de la IS481. L'infection à *B. holmesii* peut causer une maladie clinique similaire à celle à *B. pertussis*, et des épidémies mixtes impliquant à la fois des infections à *B. pertussis* et à *B. holmesii* ont été rapportées. Des tests supplémentaires doivent être effectués si nécessaire pour différencier *B. holmesii* et *B. pertussis*. *B. bronchiseptica* est une rare cause d'infection chez l'homme. Quand des facteurs cliniques suggèrent que l'infection respiratoire n'est pas provoquée par *B. pertussis*, d'autres investigations cliniquement pertinentes peuvent être réalisées conformément aux recommandations publiées.

Des résultats négatifs aux tests d'amplification ADN par la technique Alethia Pertussis n'empêchent pas l'infection à *B. pertussis* et des résultats positifs n'excluent pas une co-infection à d'autres pathogènes respiratoires. Les résultats du test Alethia Pertussis doivent être utilisés conjointement avec les informations obtenues lors de l'évaluation clinique du patient, pour appuyer le diagnostic d'une infection à *B. pertussis*, et ne doivent pas être utilisés comme seule base du traitement ou pour d'autres décisions relatives à la prise en charge du patient.

Le test Alethia Pertussis est uniquement prévu pour être utilisé dans les laboratoires hospitaliers, de référence, régionaux, privés ou publics. Le dispositif n'est pas destiné à une utilisation dans les unités de soins ou les lieux d'intervention.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION DU TEST

Le test d'amplification de l'ADN Alethia Pertussis est basé sur la technologie d'amplification génique isotherme (LAMP).^{1,2} Le test cible une séquence de 198 paires de bases (pb) du génome de *Bordetella pertussis* qui se trouvent dans une région de la séquence d'insertion IS481.

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

Le kit Alethia Pertussis inclut le réactif de Contrôle de dosage/Contrôle Négatif Alethia Pertussis, les dispositifs de test Alethia Pertussis, le tampon d'échantillon Alethia Pertussis et de l'huile minérale. Le Contrôle de dosage/Contrôle Négatif Alethia, utilisé pour la dilution et la préparation de l'échantillon, est une solution tamponnée Tris contenant des *E. coli* traités au formol, et porteurs d'ADN de *Staphylococcus aureus*. Le dispositif de test Alethia Pertussis contient une bille de réactif d'amplification lyophilisé dans chacun des deux puits: un puits TEST comprenant des amorces spécifiques à IS481 et un puits CONTRÔLE comprenant des amorces spécifiques à *S. aureus*. L'ADN de *S. aureus* du Contrôle de dosage/Contrôle Négatif et les amorces spécifiques à *S. aureus* dans les puits CONTRÔLE jouent le rôle de contrôle interne du test. Lors de la préparation des échantillons, un échantillon du patient est ajouté au réactif de Contrôle de dosage/Contrôle Négatif. L'ajout de l'échantillon au réactif de Contrôle de dosage/Contrôle Négatif combine l'ADN de l'échantillon avec *S. aureus* et permet de traiter en parallèle l'ADN cible et l'ADN de contrôle amplification et détection. Le contrôle interne permet de détecter un problème d'inhibition de l'amplification et l'efficacité des réactifs du test ou du traitement des échantillons. La séquence du contrôle *S. aureus* doit être amplifiée et détectée dans la réaction finale; dans le cas contraire, le test est considéré comme étant non valide et les résultats du patient ne peuvent pas être rapportés.

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

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

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

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

PRINCIPE DU TEST

B. pertussis est un agent pathogène humain exclusif, responsable d'une maladie respiratoire endémique, la coqueluche; il s'agit d'une maladie à déclaration obligatoire dans certains pays qui a touché plus de 200,000 personnes dans le monde en 2012. Aux Etats-Unis, la coqueluche est actuellement la seule maladie qui affiche une tendance à l'augmentation des cas déclarés et une morbidité substantielle en dépit de la disponibilité d'un vaccin.³ Les Centers for Disease Control (CDC) des Etats-Unis ont enregistré environ 48,300 cas de coqueluche en 2012, soit une moyenne de 15,4 cas pour 100,000 habitants.⁴ Des épidémies récentes de coqueluche ont indiqué que l'immunité des enfants diminuait progressivement après avoir reçu la dernière dose de rappel du vaccin acellulaire, rendant les populations pédiatriques âgées de 7 à 11 ans, vaccinées comme non vaccinées, sensibles à une infection par la coqueluche.^{5,6}

Les épidémies de coqueluche sont particulièrement difficiles à contrôler, car les stades précoces de la maladie ressemblent à ceux d'autres maladies respiratoires alors que les patients restent hautement infectieux jusqu'à 5 semaines après l'apparition des symptômes.³ De plus, le diagnostic de coqueluche ne peut être retenu définitivement qu'en présence de la toux coquelucheuse caractéristique (« chant du coq ») qui apparaît environ 2 semaines après le début des symptômes.³ Le diagnostic clinique de la coqueluche peut s'appuyer sur des cultures, une sérologie ou des tests d'amplification de l'acide nucléique. Bien que la culture soit hautement spécifique, sa sensibilité est faible, l'obtention des résultats peut demander jusqu'à 7 jours, et le nombre de cellules viables nécessaires pour une culture diminue au fur et à mesure de l'évolution de la maladie (à partir de 2 semaines après l'apparition des symptômes).⁷ Contrairement aux cultures, les tests d'amplification de l'acide nucléique peuvent fournir des résultats rapides et ne nécessitent pas de bactéries viables. Le test d'amplification de l'acide nucléique pour *B. pertussis* est plus sensible au cours des trois premières semaines de toux, car l'ADN bactérien est présent dans le nasopharynx. La quantité de bactéries présentes dans le nasopharynx diminue spectaculairement après la quatrième semaine de toux, ce qui rend la probabilité d'obtenir des résultats faussement négatifs plus élevée au cours des derniers stades de l'infection.⁸ De plus, seuls les patients symptomatiques ayant une toux devraient être testés par amplification de l'acide nucléique afin d'éviter des résultats faux-positifs liés à des contacts de proches asymptomatiques.⁸ La sérologie ne peut être utilisée pour le diagnostic qu'aux stades tardifs de la maladie, environ 2 à 8 semaines après l'apparition de la toux.

MATERIEL FOURNI

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

- Contrôle de dosage/Contrôle Négatif Alethia Pertussis:** Solution tampon Tris contenant des cellules d'*E. coli* traitées au formol, abritant un plasmide contenant un segment du génome de *S. aureus* et de l'azide de sodium (0,09 %) en tant que conservateur. Le réactif de Contrôle de dosage/Contrôle Négatif fonctionne en tant que test de contrôle lors du test du patient et comme contrôle négatif externe lors des tests de contrôle de la qualité de routine.
- Dispositif de test Alethia Pertussis:** dispositif à deux puits contenant les réactifs d'amplification lyophilisés (ADN polymérase, désoxynucléotide triphosphates), soit des amorces spécifiques de l'IS481 (puits TEST), soit des amorces de contrôle (puits CONTRÔLE).
- Tampon pour échantillon d'Alethia Pertussis:** solution tampon Tris-EDTA contenant de l'azide de sodium (0,09 %) en tant que conservateur.
- Huile minérale** (flacon avec embout compte-gouttes).
- Réactif de prétraitement Alethia (pour la procédure facultative de traitement d'échantillons):** Réactif lyophilisé contenant un agent neutralisant et de l'azide de sodium (0,1 %) comme agent conservateur. Chaque flacon contient assez de réactif pour traiter 50 échantillons.

MATERIEL FOURNI SEPARÉMENT

Kit de contrôle externe Alethia Pertussis, numéro de catalogue: 479930

MATERIEL NON FOURNI

- Gants jetables en latex, non poudrés
- Embouts de pipettes résistant aux aérosols, sans ADNase/ARNase
- Système de prélèvement et de transport des échantillons
- Écouvillons nasopharyngés:** Polyester (capacité minimale 18 µL, par exemple le produit Puritan Medical, référence catalogue 25-801D 50); Rayonne (capacité minimale 31 µL, par exemple le produit Puritan Medical, référence catalogue 25-801R 50); ou Nylon Floqué (capacité minimale 69 µL, par exemple, Copan 503CS01 ou l'écouvillon du catalogue 482C).
- Milieu de transport non nutritif:** Liquide Amies, sans charbon; ou Liquide Stuart (volume maximum: 1,2 mL dans le tampon/l'éponge)
- Système de collecte:** écouvillon avec liquide de transport Amies (ESwab™) de Copan (catalogue Copan 482C)
- Eau désionisée
- Tubes de microcentrifugation

EQUIPEMENT NON FOURNI

- Bain sec, pouvant atteindre 95 C, et accueillir des tubes de 12 mm de diamètre
- Thermomètre numérique avec mémoire de température maximale/minimale (par ex., thermomètre étanche/antichoc Traceable® Lollipop™)
- Agitateur-mélangeur Vortex
- Minuteur
- Micropipette pouvant distribuer 50 µL
- Pipette de contenance 2,5 mL
- Équipements de coupe (par exemple, ciseaux, cisailles à main, pinces coupantes de sécurité)
- Incubateur/Lecteur Alethia, Meridian Bioscience, Inc. Numéro de référence: 610189

PRECAUTIONS D'EMPLOI

- Tous les réactifs sont pour un usage diagnostique in vitro.
- Ne pas mélanger Contrôle de dosage/Contrôle Négatif ou les dispositifs de test appartenant à des lots différents. Le tampon de réaction, le réactif de prétraitement et l'huile minérale sont interchangeables à condition de se trouver dans les limites de la date de péremption au moment de leur utilisation.
- Suivre les consignes de sécurité biologique de niveau 2 et les bonnes pratiques de laboratoire pendant les tests.⁹ Traiter tous les spécimens 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.
- Porter des gants jetables lors de la manipulation des échantillons. Se laver minutieusement les mains après la manipulation.
- Les programmes de contrôle de la qualité pour les laboratoires d'analyses moléculaires, y compris la bonne utilisation et l'entretien de l'équipement, doivent être suivis.¹⁰
- Le dispositif de test Alethia Pertussis contient des réactifs lyophilisés. Ne pas retirer la pochette de protection avant d'être prêt à effectuer le test.
- Le dispositif de test Alethia Pertussis 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.
- Jeter les dispositifs de test Alethia 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 les produits d'amplification.

9. Des résultats de test non valides peuvent être dus à une mauvaise préparation des échantillons, à la défaillance du réactif, à la défaillance des instruments ou à la défaillance du contrôle interne. Dans ces cas, le résultat non valide peut être corrigé en répétant le test. Le nasopharynx de certains patients contient un inhibiteur biologique qui sera également à l'origine d'un résultat non valide. Dans ces cas, l'inhibiteur induira à plusieurs reprises des résultats non valides, à moins que l'échantillon ne soit traité pour éliminer l'interférence. (Voir la section sur le TRAITEMENT/PRÉTRAITEMENT FACULTATIF DES ÉCHANTILLONS pour la méthode de traitement.)
10. Le dispositif local, national et/ou fédéral de notifications des maladies à déclaration obligatoire est continuellement mis à jour et comprend un certain nombre de mesures de surveillance et de contrôle des épidémies. De plus, le centre pour le contrôle et la prévention des maladies (Centers for Disease Control, CDC) recommande que lorsque des agents pathogènes de maladies à déclaration obligatoire sont détectés par un test de diagnostic indépendant de la culture, le laboratoire devrait soumettre soit des isolats et/ou les échantillons cliniques au laboratoire de santé publique assigné afin d'aider à la détection des épidémies et aux enquêtes épidémiologiques. Les laboratoires sont responsables de suivre les réglementations nationales et/ou locales et devraient consulter leurs laboratoires de référence et/ou de santé publique de l'Etat pour connaître la marche à suivre quant à la soumission des cultures et/ou échantillons cliniques.
- Résumé des maladies notifiables aux Etats-Unis. MMWR <http://www.cdc.gov/mmwr/PDF/wk/mm6153.pdf>
 - Les infections alimentaires aux Etats Unis; CIFOR Analysis of State Legal Authorities. <http://www.cifor.us/documents/CIFORAnalysisStateLegalAuthorities.pdf>

DANGER ET MISES EN GARDE

Pour les dangers et les précautions à prendre, se référer à la fiche de sécurité, disponible sur le site web de Meridian Bioscience. (www.meridianbioscience.com (US version) / www.meridianbioscienc.eu (EU version))

DUREE DE CONSERVATION ET STOCKAGE

La date d'expiration figure sur l'étiquette du kit. Conserver le kit à une température comprise entre 2 C et 30 C.

PREPARATION DES REACTIFS

S'assurer que les réactifs du kit sont à la température ambiante (21 C à 30 C) avant leur emploi. On pourrait obtenir des résultats incorrects si les réactifs ne sont pas amenés à la température ambiante avant l'emploi.

PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Type d'échantillon: Ecouillons nasopharyngés

Prélèvement des échantillons: Le prélèvement des échantillons nasopharyngés sur écouillon doit être effectué selon les procédures de l'établissement concernant le recueil des spécimens en cas d'infection par *Bordetella pertussis*. Les échantillons nasopharyngés sur écouillon doivent être recueillis avec les écouillons de types appropriés (par ex., en coton, mousse, nylon floqué, polyester ou rayonné).

Placer les écouillons dans un milieu de transport non nutritif (par exemple Liquide Amies, sans charbon, Liquide Stuart ou le milieu ESwab de Copan) ou conserver les échantillons sans conservateurs dans un tube stérile ne contenant aucun milieu.

Les échantillons sans conservateur ou les échantillons conservés dans un milieu de transport doivent être traités le plus rapidement possible, mais ils peuvent être maintenus à température ambiante (21 C à 30 C) pendant une période pouvant atteindre 5 jours ou réfrigérés (2 C à 8 C) pendant une période pouvant atteindre 7 jours avant d'être testés. Ne pas congeler les échantillons.

PREPARATION DES ECHANTILLONS:

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

REMARQUE: l'équipement de laboratoire utilisé pour couper les écouillons (par ex., ciseaux, cisailles, pinces coupantes de sécurité) doit être traité avec un agent de nettoyage de grade moléculaire (par ex., 10 % d'une solution javellisée) avant chaque utilisation. L'équipement doit être entièrement sec avant de couper les écouillons.

- Préparation des échantillons
 - Écouillons (rayonné, nylon ou floqués):
 - Placer l'écouillon dans un tube étiqueté contenant un tampon pour échantillon. Couper la tige de l'écouillon pour permettre à l'échantillon de tenir dans le tube. Eluer l'échantillon en le passant au vortex pendant 45 à 60 secondes. **Les échantillons élués peuvent être maintenus à température ambiante (21 C à 30 C) pendant une période pouvant atteindre 48 heures ou réfrigérés (2 C à 8 C) pendant une période pouvant atteindre 7 jours avant d'être testés.**
 - Ajouter 50 µL d'échantillon élué à un tube étiqueté de Contrôle de dosage/Contrôle Négatif et boucher le tube.
 - Répéter les étapes de PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS pour tous les échantillons sur écouillon à traiter.
 - Produit ESwab: le milieu à l'intérieur du tube du système de collecte ESwab contient l'échantillon élué du patient.
 - Mélanger au vortex le tube ESwab contenant l'écouillage pendant 10 secondes au moins pour optimiser l'élué de l'échantillon.
 - Transférer 25 µL du milieu dans un tube de Contrôle de dosage/Contrôle Négatif étiqueté et fermer (ne pas transférer ce milieu au tube de tampon pour échantillon. Il va directement au tube de Contrôle de dosage/Contrôle Négatif).
 - Répéter les étapes de PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS pour tous les échantillons ESwab qui doivent être traités.
- Mélanger au vortex chaque tube de Contrôle de dosage/Contrôle Négatif contenant un échantillon élué pendant approximativement 10 secondes.
- Chauffer chaque mélange échantillon/contrôle dans un bain sec/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'un minuteur.
- Retirer chaque tube d'échantillon/de contrôle du bain sec/ bloc chauffant. Les échantillons ayant été traités thermiquement peuvent être conservés à température ambiante (entre 21 C et 30 C) pendant un maximum de 15 minutes avant d'être analysés.
- Mélanger vortex pendant environ 10 secondes.

PROCEDURE DE TEST

REMARQUE: L'Incubateur/Lecteur Alethia peut traiter un maximum de 10 dispositifs de test par série.

- Retirer un (1) dispositif de test Alethia Pertussis de sa pochette de protection pour chaque échantillon. Ouvrir le dispositif avec précaution en tenant les compartiments de sorte que le réactif lyophilisé ne tombe pas au moment de l'ouverture. Placer le dispositif sur une surface plane ou dans un portoir pouvant accueillir le dispositif.
- 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. Veiller à ne pas introduire d'air dans le mélange réactionnel. Ne pas mélanger les mélanges réactionnels à la pipette.
- Ajouter 1 goutte d'huile minérale dans, à la fois, le puits TEST et le puits CONTRÔLE. Fermer le dispositif de test Alethia et verrouiller en rabattant le loquet.
- Tapoter le dispositif sur la paillasse ou mélanger pour éliminer les bulles d'air. Observer soigneusement la réhydratation de la bille de contrôle/test du dispositif et vérifier l'absence de bulles d'air dans le puits et de liquide dans les bouchons du dispositif. En cas de billes non dissoutes, de bulles d'air ou de liquide dans les bouchons, tapoter le dispositif sur la paillasse et répéter l'examen visuel. L'amplification et la détection doivent commencer dans les 15 minutes.
- Insérer chaque dispositif de test Alethia dans le lecteur Alethia et lancer la réaction d'amplification et la détection. Les résultats seront affichés à la fin de l'exécution du test.

INTERPRETATION DES RESULTATS

ID échantillon	Résultats indiqués	Interprétation
Échantillon de patient	POSITIF	Échantillon pré-traité ou non-traité: L'échantillon contient la séquence cible IS481 de l'ADN de <i>B. pertussis</i> . ^a
	NEGATIF	Échantillon pré-traité ou non-traité: Aucun ADN de <i>B. pertussis</i> détecté.
	NON VALIDE	Échantillon non-traité: Résultat non exploitable. Répéter le test en utilisant un échantillon traité/élué avec le réactif de prétraitement. Spécimen de patient inhibiteur, mauvaise préparation des échantillons, échec du réactif, panne de l'instrument ou échec du contrôle interne. Échantillon pré-traité: pas de rendu du résultat: NE PAS re-traiter des échantillons déjà traités avec le réactif de pré-traitement. Les échantillons pré-traités non valides ne sont pas re-testés. Ils peuvent toutefois être re-testés si souhaité et doivent être reportés comme non valide si le résultat du test répété est non valide. Les échantillons qui produisent des résultats non valides avant ET après pré-traitement doivent être reportés comme non valide.
Contrôle positif	POSITIF	Résultat de contrôle positif valide. Réactifs actifs au moment de l'utilisation, fonctionnement correct de du 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	Résultat non exploitable. Recommander l'intégralité de l'analyse à l'aide des échantillons d'origine. Lorsque le test répété est toujours non valide, 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. Mauvaise préparation des échantillons, échec du réactif, panne 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 du lecteur Alethia.
	NON VALIDE	Résultat non exploitable. Recommander l'intégralité de l'analyse à l'aide des échantillons d'origine. Lorsque le test répété est toujours non valide, 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. Mauvaise préparation des échantillons, échec du réactif, panne de l'instrument ou échec du contrôle interne.
PUITS VIDE	AUCUN	Aucun dispositif de test Alethia dans le puits du lecteur Alethia. OU Le dispositif de test Alethia présent ne répond pas en raison d'une mauvaise préparation des échantillons, de saleté ou d'un mauvais positionnement du dispositif. Recommander le test à l'aide des échantillons d'origine.

^a La séquence IS481 est présente en plusieurs copies dans *B. pertussis* (50 à 238 copies/génome), dans *B. holmesii* (8 à 10 copies/génome) et moins fréquemment dans *B. bronchiseptica*.

PRETRAITEMENT/TRAITEMENT OPTIONNEL DE L'ECHANTILLON POUR ELIMINER LES INHIBITEURS REACTIONNELS

La méthode suivante peut être utilisée pour supprimer l'activité inhibitrice des substances biologiques dans l'échantillon d'un patient.

Préparation du réactif de prétraitement

- Reconstituer le réactif de prétraitement lyophilisé en ajoutant 2,5 mL d'eau désionisée dans le flacon. Refermer le flacon.
- Laisser reposer le réactif de prétraitement reconstitué à une température de 21 à 30 C pendant 30 minutes, puis mélanger délicatement pour éviter la formation de mousse.
- Conserver le réactif de prétraitement reconstitué de l'une des deux manières suivantes :
 - Conserver le réactif de prétraitement reconstitué dans son flacon original, à une température de 2 à 8 C pendant un mois au maximum. Apposer une étiquette sur le flacon avec sa nouvelle date de péremption; **ou**
 - Transférer immédiatement 0,1 mL ou de plus grands volumes du réactif reconstitué dans des tubes de microcentrifugation étiquetés, fermer hermétiquement et congeler les aliquotes dans un congélateur sans dégivrage à une température de ≤ -20 C. Les aliquotes congelées sont stables jusqu'à l'expiration du matériel lyophilisé original. Décongeler chaque aliquote congelée une seule fois seulement avant utilisation. Les aliquotes décongelées peuvent être conservées à une température de 2 à 8 C pendant une semaine au maximum.
- Réchauffer le réactif de prétraitement reconstitué jusqu'à une température de 21 à 30 C avant utilisation. Mélanger doucement afin d'éviter la formation de mousse. Ne pas utiliser la solution du réactif de prétraitement si elle présente un brouillard ou est trouble.

Traitement des échantillons, précédemment préparés, pour de nouveaux tests:

- Écouillons (rayonné, nylon ou floqués):
 - Ajouter 50 µL du réactif de prétraitement reconstitué au tube du tampon de dosage contenant l'échantillon du patient (reste de la PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS de l'étape 1.a.i.) et agiter au vortex pendant 10 à 15 secondes pour mélanger le contenu. L'échantillon traité ne doit pas être conservé plus longtemps que l'échantillon élué original décrit à l'étape 1 de la section PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS ci-dessus.
 - Transférer 50 µL du produit dans un tube de Contrôle de dosage/Contrôle Négatif étiqueté et fermer.
- Milieu ESwab:
 - Transférer 500 µL du milieu ESwab inoculé avec l'échantillon du patient (à partir du tube collecteur ESwab) dans un tube vide.
 - Ajouter 50 µL du réactif de prétraitement reconstitué au tube et passer au vortex pendant 10 à 15 secondes pour mélanger le contenu. L'échantillon traité ne doit pas être conservé plus longtemps que l'échantillon élué original décrit à l'étape 1 de la section PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS ci-dessus.
 - Transférer 25 µL du mélange dans un tube de Contrôle de dosage/Contrôle Négatif étiqueté et fermer.
- Procéder aux étapes 2 à 5 de la section PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS et procéder aux tests.

Prétraitement d'échantillons non testés:

- 1a. Écouvillons (rayonne, nylon ou floqués):
 - i. Ajouter 50 µL du réactif de prétraitement reconstitué à un tube de tampon pour échantillon dûment étiqueté.
 - ii. Mettre l'écouvillon dans le tube du tampon de dosage. Couper la tige de l'écouvillon pour s'assurer que l'échantillon entre parfaitement dans le tube. Éluer l'échantillon en passant au vortex pendant 45 à 60 secondes. L'échantillon traité et élué peut être conservé à la température ambiante (de 21 à 30 C) pendant 48 heures au maximum ou réfrigéré (de 2 à 8 C) pendant 7 jours au maximum avant les tests.
 - iii. Transférer 50 µL du produit dans un tube de Contrôle de dosage/Contrôle Négatif étiqueté et fermer.
- 1b. Produit ESwab:
 - i. Mélanger au vortex le tube ESwab contenant l'écouvillonnage pendant 10 secondes au moins pour optimiser l'éluion de l'échantillon.
 - ii. Transférer 500 µL du milieu ESwab inoculé avec l'échantillon du patient dans un tube vide.
 - iii. Ajouter 50 µL de réactif de prétraitement reconstitué au tube et passer au vortex pendant 10 à 15 secondes pour mélanger le contenu. L'échantillon traité ne doit pas être conservé plus longtemps que le temps décrit à l'étape 1 de la section PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS ci-dessus pour l'échantillon élué original.
 - iv. Transférer 25 µL du mélange dans un tube de Contrôle de dosage/Contrôle Négatif étiqueté et fermer.
2. Procéder aux étapes 2 à 5 de la section PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS et procéder aux tests.

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 contrôle interne qui vérifie l'absence d'inhibition de l'amplification, l'efficacité des réactifs de test et du traitement des échantillons.
2. L'étape du traitement thermique est surveillée avec un thermomètre et un minuteur externes. Utiliser la mémoire des températures maximum/minimum du thermomètre pour vérifier qu'une température de 95 ± 5 C est maintenue. Utiliser le minuteur pour vérifier que la durée du traitement thermique est de 10 ± 2 minutes. Les bonnes pratiques de laboratoire recommandent l'emploi de matériels de contrôle. Les utilisateurs doivent suivre les directives locales, nationales ou fédérales appropriées relatives à l'exécution de contrôles de qualité externes.
4. Les réactifs de contrôle externes Alethia Pertussis sont vendus séparément (Réf.: 479930). Il est recommandé de vérifier la réactivité de chaque nouveau lot et chaque nouvel envoi d'Alethia Pertussis dès leur réception ou avant l'emploi. Les tests de contrôle externe doivent être exécutés par la suite conformément aux directives locales, nationales et/ou fédérales. Le kit de test d'Alethia Pertussis ne doit pas être utilisé pour tester les patients si les contrôles externes ne fournissent pas de résultats corrects.
5. Utiliser un dispositif séparé pour chaque réactif de contrôle externe.

VALEURS ATTENDUES

L'incidence globale de *B. pertussis*, détectée par le test Alethia Pertussis sur des échantillons non sélectionnés (tout-venant) recueillis prospectivement et rétrospectivement au cours de la période de l'étude était de 8,2 % (57/692).

LIMITES DU TEST

1. Le test Alethia Pertussis est dirigé contre la séquence d'insertion IS481 du génome de *Bordetella*. La séquence d'insertion IS481 est présente dans *B. pertussis*, *B. holmesii* et certaines souches de *B. bronchiseptica*.
2. Ce produit peut uniquement être utilisé avec l'instrument Alethia.
3. Le test d'ADN Alethia Pertussis est un test qualitatif qui ne fournit pas de valeurs quantitatives ou d'informations sur la charge en organismes.
4. Ce dispositif n'a pas été évalué pour la surveillance du traitement des infections à *B. pertussis*.
5. La performance du test n'a pas été établie dans l'analyse d'échantillons autres que des prélèvements nasopharyngés sur écouvillon, ni dans l'analyse d'échantillons prélevés chez les personnes immunodéprimées ou chez des patients n'étant pas suspects de présenter une infection à *B. pertussis*.
6. Les résultats de ce test doivent être corrélés avec les antécédents cliniques, les données épidémiologiques et toute autre donnée disponible pour le clinicien.
7. La prévalence de *B. pertussis* influence les valeurs prédictives positives et négatives de la méthode.
8. *B. parapertussis*, qui provoque une maladie similaire à la coqueluche (pertussis), n'est pas détecté par le test d'amplification ADN Alethia Pertussis. La maladie causée par *B. parapertussis* est généralement moins légère que la maladie causée par *B. pertussis*, car la bactérie ne produit pas de toxine pertussique.
9. Les infections respiratoires peuvent être provoquées par *B. pertussis* ainsi que par d'autres pathogènes. Des résultats positifs n'excluent pas une co-infection par d'autres pathogènes respiratoires. Des résultats faussement négatifs pour *B. pertussis* sont plus probables si les patients sont testés plus tard au cours de la maladie (plus de deux semaines après l'apparition des symptômes) en raison du déclin de l'ADN de *Bordetella*. Les résultats faussement négatifs peuvent également augmenter chez les patients traités par des antibiotiques.
10. La contamination environnementale d'une salle d'examen par un précédent patient ou l'administration récente d'un vaccin contre la coqueluche (pertussis) peuvent entraîner des résultats faussement positifs.
11. La détection de l'acide nucléique dépend de la réalisation correcte du recueil, de la manipulation, du transport, de la conservation et de la préparation de l'échantillon. Le non-respect de la procédure appropriée lors de l'une de ces étapes peut entraîner des résultats incorrects.
12. Les acides nucléiques de l'organisme peuvent persister *in vivo* de manière indépendante de la viabilité de l'organisme. Le test Alethia Pertussis ne fait pas de distinction entre les organismes vivants et non vivants.
13. Comme avec tous les tests de diagnostic moléculaire, (A) des résultats faux-négatifs peuvent se produire en raison de la présence d'inhibiteurs, d'une erreur technique, d'un mélange d'échantillons ou de quantités faibles d'organismes dans l'échantillon clinique, (B) des résultats faux-positifs peuvent se produire en raison de la présence d'une contamination croisée par des organismes cibles, leurs acides nucléiques ou du produit amplifié, et en raison de signaux non spécifiques.
14. L'acide acétyl salicylique, quel qu'on trouve dans l'aspirine, a entraîné des résultats non valides sur des tests à des concentrations supérieures à 5 mg/mL au cours de tests de reproduction de la limite de détection sur des souches de *B. pertussis* BAA-589.

PERFORMANCES DU TEST

Le test d'amplification de l'ADN Alethia Pertussis a été évalué de décembre 2012 à juillet 2013 par des centres de tests cliniques indépendants représentant des régions géographiquement distinctes à travers les Etats-Unis. Au total, 729 échantillons nasopharyngés (NP) sur écouvillon qualifiés, recueillis auprès de patients suspects d'une infection à *B. pertussis* ont été évalués avec le dispositif de test pour établir les caractéristiques des performances. Les échantillons étaient des restes, des spécimens dé-identifiés qui avaient été envoyés antérieurement pour des tests de routine à la recherche de *B. pertussis*. Les échantillons inclus dans l'évaluation de la performance étaient prospectifs (jamais congelés) et rétrospectifs (congelés avant l'analyse Alethia). Les échantillons rétrospectifs incluent des échantillons 'tout-venant' et des échantillons sélectionnés.

La performance du test Alethia Pertussis a été comparée à une méthode composite de référence qui incluait deux tests par PCR en temps réel, ciblant IS481 et validés par le fabricant, (PCR1 and PCR2) suivis de séquençage bidirectionnel des amplicons issus des échantillons positifs par PCR.

Les protocoles de test PCR1 et PCR2 comprenaient 40 cycles d'amplification. Un séquençage bidirectionnel a été effectué pour tous les amplicons issus des échantillons avant la fin des 40 cycles d'amplification. Les échantillons ont été considérés comme positifs lorsque les résultats du séquençage bidirectionnel du PCR de l'un des tests comparateurs ont confirmé la présence d'amplicons de *B. pertussis*. Les échantillons ont été considérés comme négatifs lorsqu'aucun des tests PCR comparateurs n'a produit d'amplicons à la fin des 40 cycles d'amplification.

Au total, 508 (69,7 %) échantillons prospectifs et 221 (30,3 %) échantillons rétrospectifs ont été testés. Des résultats non valides ont été obtenus pour 13 échantillons (1,8 %); deux étaient encore non valides après la répétition du test. Deux spécimens prospectifs et deux spécimens rétrospectifs ont donné des résultats non déterminés avec les tests PCR comparateurs. Le Tableau 1 résume les caractéristiques de performance du test Alethia.

Tableau 1. Caractéristiques de performance du test Alethia

Description de l'échantillon	Echantillons positifs			Echantillons négatifs			Résultats non valides ^b
	Alethia par rapport au comparateur	Pourcentage de concordance positive ^a	IC à 95 %	Alethia par rapport au comparateur	Pourcentage de concordance négative	IC à 95 %	
Comparaison à la méthode composite: échantillons tout-venant							
Prospectif	39/45	86,7 %	73,8 – 93,7 %	447/459	97,4 %	95,5 – 98,5 %	2 (13)
Rétrospectif	4/4	100,0 %	51,0 – 100,0 %	176/178	98,9 %	96,0 – 99,7 %	0
Total:	43/49	87,8 %	75,8 – 94,3 %	623/637	97,8 %	96,3 – 98,7 %	2 (13)
Comparaison à la méthode composite: échantillons sélectionnés							
Rétrospectif	19/21	90,5 %	71,1 – 97,3 %	14/16	87,5 %	64,0 – 96,5 %	0

^a Huit échantillons ont produit des résultats faussement négatifs au test Alethia comparativement à la méthode composite de référence. Six des huit échantillons ont produit des taux d'ADN décelables entre 35 et 40 cycles d'amplification du test comparateur et ont été confirmés comme étant positifs par séquençage bidirectionnel. Trois de ces six échantillons ont donné des résultats positifs chez seulement un des deux tests PCR/de séquençage comparateurs.

^b 11 spécimens sur 13, initialement non valides, ont fourni des résultats valides après répétition du test.

Les résultats faussement négatifs au test Alethia ont été individuellement évalués à la fin des tests cliniques. Les valeurs de cycle seuil (Cycle threshold, Ct) produites lors du test comparateur étaient supérieures à 35 pour un ou les deux tests PCR/de séquençage bidirectionnel pour six des huit échantillons évalués. Des valeurs Ct élevées pour les tests PCR peuvent indiquer que de faibles taux d'ADN sont présents.⁸ Les résultats faussement négatifs au test Alethia et les données correspondantes du comparateur, la méthode composite, sont indiqués dans le Tableau 2.

Tableau 2. Echantillons faussement négatifs par Alethia, résultats du test comparateur

Désignation de l'échantillon	Statut de l'échantillon	PCR1		PCR2	
		Valeur Ct	Résultat du séquençage bidirectionnel	Valeur Ct	Résultat du séquençage bidirectionnel
1-19	Prospectif	34,90	+	33,85	+
1-29	Prospectif	Negatif	N/A	37,69	+
1-259	Prospectif	34,07	+	35,09	+
1-269	Prospectif	35,72	+	Negatif	N/A
1-275	Prospectif	Negatif	N/A	39,13	+
3-33	Prospectif	39,28	+	35,80	+
4-710	Rétrospectif	36,87	+	36,06	+
4-712	Rétrospectif	37,44	+	38,41	+

Les caractéristiques de la performance du test Alethia ont été évaluées conformément au centre de test clinique. Le Tableau 3 illustre les caractéristiques de la performance par centre de test clinique.

Tableau 3. Performance du test Alethia par centre de test clinique

Description de l'échantillon	Echantillons positifs			Echantillons négatifs			Résultats non valides ^a
	Alethia par rapport au comparateur	Pourcentage de concordance positive	IC à 95 %	Alethia par rapport au comparateur	Pourcentage de concordance négative	IC à 95 %	
Comparaison à la méthode composite: échantillons tout-venant							
Centre 1	35/40	87,5 %	73,9 – 94,5 %	440/450	97,8 %	96,0 – 98,8 %	2 (13)
Centre 2	4/4	100,0 %	51,0 – 100,0 %	67/69	97,1 %	90,0 – 99,2 %	0 (2)
Centre 3	0/1	0,0 %	0,0 – 79,3 %	7/7	100,0 %	64,6 – 100,0 %	0 (0)
Centre 4	4/4	100,0 %	51,0 – 100,0 %	109/111	98,2 %	93,7 – 99,5 %	0 (0)
Comparaison à la méthode composite: échantillons sélectionnés							
Centre 1	15/15	100,0 %	79,6% - 100,0 %	6/8	75,0 %	40,9 – 92,9 %	0 (0)
Centre 4	4/6	66,7 %	30,0 – 90,3 %	8/8	100,0 %	67,6 – 100,0 %	0 (0)

Des études cliniques ont été effectuées avec de nombreux types d'écouvillons nasopharyngés et de tampons d'éluion. Les tampons d'échantillons testés au cours des études cliniques ont inclus le sérum physiologique 0,85 % (n=30 ou 4,1 %), le Tris-EDTA (n=8 ou 1,1 %) et l'eau de qualité biologie moléculaire (n=687 ou 94,2 %). Tous les tampons d'échantillons ont été utilisés à un volume de 0,5 mL. Des études analytiques ont été effectuées avec du Sérum physiologique 0,85 %, du Tris-EDTA, du tampon phosphate (PBS) et de l'eau de qualité biologie moléculaire. Des études analytiques ont établi l'équivalence de tous les types de tampons d'échantillon utilisés.

Des renseignements sur l'âge des patients étaient disponibles pour 723 (99,2 %) patients dont les échantillons ont été testés. L'âge des patients était compris entre 1 mois et 88 ans. Trente-huit (5,2 %) patients étaient âgés de moins de 1 an; 13 (1,8 %) avaient entre 1 et 2 ans; 296 (40,6 %) avaient entre 2 et moins de 12 ans, 157 (21,5 %) avaient entre 12 et 21 ans, 190 (26,0 %) avaient plus de 21 ans mais moins de 65 ans, et les 29 patients restants (4,0 %) avaient plus de 65 ans.

La population de l'étude a inclus 413 (56,7 %) patients de sexe féminin et 308 (42,2 %) patients de sexe masculin. Le sexe était inconnu pour 8 (1,1 %) patients inclus dans l'étude. On ne s'attend pas à ce que les caractéristiques de performance du test Alethia Pertussis soient influencées par le sexe du patient.

Études à l'aide du réactif de prétraitement

Pour évaluer l'efficacité du réactif de prétraitement, des études externes ont été effectuées entre avril et juin 2015 dans quatre centres de tests sélectionnés pour des échantillons prospectifs pour des patients présentant des symptômes. Sur les 164 échantillons recueillis dans le cadre de cette étude, 145 ont répondu aux critères de l'étude. La majorité des échantillons soumis aux centres d'étude ont été prélevés à l'aide d'écouvillons à embout en rayonne; un échantillon a été prélevé avec un écouvillon en nylon floqué et trois échantillons avec un écouvillon en polyester. La majorité des échantillons ont été testés le même jour que le prélèvement. Les échantillons collectés ont été testés immédiatement après prélèvement appliquant la méthode originale de référence telle que recommandée pour les écouvillons, répétant le test en cas de résultat non valide. Ensuite, les mêmes échantillons ont été traités avec le réactif de prétraitement et testés après un prétraitement pour tout échantillon dont le résultat était non valide initialement. Tous les tests, originaux, répétitions non valides, et tests après prétraitement ont été effectués dans un délai de 24 heures. Sur les 19 échantillons ayant d'abord produit des résultats non valides, 15 ont redonné des résultats non valides quand ils étaient testés par la méthode originale de référence; 3 échantillons se sont révélés négatifs et un s'est révélé positif lors de la répétition du test. Après l'utilisation du réactif de prétraitement, 17 échantillons sur 19 à résultat non valide étaient obtenus négatif et 2 étaient obtenus positif. Six échantillons ont donné un résultat avec la méthode originale de référence, mais ont produit un résultat non valide après traitement avec le réactif de prétraitement. Les données sont présentées dans le Tableau 4.

Tableau 4. Comparaison des méthodes: Réactif de prétraitement vs méthode de référence (sans réactif de prétraitement)

	Centres de test, pourcentage de concordance (échantillons concordants/tous les échantillons testés)				
	Centre 1	Centre 2*	Centre 3	Centre 4	Total
Pourcentage de concordance (positifs)	87,5 % (6/7) (IC : 48,7-97,4 %)	0 % (0/0)	100 % (2/2) (IC : 34,2-100 %)	100 % (6/6) (IC : 61,8-100 %)	93,3 % (14/15) (IC : 70,2-98,8 %)
Pourcentage de concordance (négatifs)	94,3 % (50/53) (IC : 84,9-98,1 %)	93,3 % (14/15) (IC : 70,2-98,8 %)	100 % (15/15) (IC : 78,6-100 %)	100 % (28/28) (IC : 87,1-100 %)	96,3 % (105/109) (IC : 90,9-98,6 %)
Taux initial de résultats non valides sans réactif de prétraitement	1,6 % (1/63)	0 % (0/16)	37,0 % (10/27)	20,5 % (8/39)	13,1 % (19/145)
Taux initial de résultats non valides avec réactif de prétraitement	4,8 % (3/63)	6,25 % (1/16)	3,7 % (1/27)	2,6 % (1/39)	4,1 % (6/145)

Les données générées par le Site 2 rassemblent les résultats des tests originaux sans répétition car ce site n'a pas re-testé les échantillons non traités non valides, comme recommandé dans la notice, avant le traitement des non valides à l'aide du réactif de pré-traitement. Tous les autres sites ont répétés les tests non valides avant de pré-traiter les échantillons.

SENSIBILITE ANALYTIQUE

La sensibilité analytique ou la limite de détection du test Alethia Pertussis a été établie pour la souche de *B. pertussis* ATCC BAA-589, Tahoma I.

La limite de détection a été déterminée en utilisant 60 répliqués de la souche de *B. pertussis* ATCC BAA-589 et une probabilité théorique (par exemple 95 % soit 57 répliqués sur 60 sont positifs) de réponses positives à obtenir. La sensibilité analytique observée est résumée ci-dessous:

Description de la souche de <i>B. pertussis</i>	UFC/mL	UFC/Test
ATCC BAA-589 (Tahoma I)	3265	1,48

REACTIVITE DU TEST

Les souches de *B. pertussis* suivantes ont été testées et ont fourni des réactions positives à 3265 UFC/mL ou 1,48 UFC/test avec la technique Alethia Pertussis: ATCC 12743; ATCC 8478; ATCC 8467; ATCC 9797; ATCC 53894; ATCC 10380; ATCC 12742; et A639. Les souches de *B. pertussis* suivantes ont été testées et ont fourni des réactions positives à 3500 UFC/mL ou 1,59 UFC/test avec la technique Alethia Pertussis: ATCC 51445 et ATCC BAA-1335.

REPRODUCTIBILITE DU TEST

Des études de reproductibilité ont été réalisées par trois des quatre sites cliniques participants. Des panels codés, en aveugle, comportant 10 échantillons ont été fournis aux laboratoires participants. Les échantillons furent codifiés au hasard pour chaque panel afin de masquer les identités. Les panels incluaient des échantillons préparés artificiellement, des modérément positifs ($1,31 \times 10^4$ UFC/mL ou 6 UFC/test), des faiblement positifs (4,89 $\times 10^3$ UFC/mL ou 2 UFC/test) et des échantillons hautement négatifs (8,2 UFC/mL ou 0,004 UFC/test). Le panel incluait également un échantillon négatif, un contrôle positif et un contrôle négatif. Les tests furent exécutés par des techniciens différents dans chaque centre, le même jour (variabilité intra-test), pendant cinq jours (variabilité inter-tests). Trois lots de tests Alethia Pertussis et six instruments Alethia furent utilisés dans cette étude. Les contrôles positifs et négatifs furent testés chaque jour et test. Les résultats sont indiqués dans le tableau ci-dessous:

Type d'échantillon	Centre 1		Centre 2		Centre 4		Total	
	Concordance en pourcentage		Concordance en pourcentage		Concordance en pourcentage		Concordance en pourcentage	
Modérément positif	30/30	100,0 %	30/30	100,0 %	30/30	100,0 %	90/90	100,0 %
Faiblement positif	27/30	90,0 %	29/30	96,7 %	30/30	100,0 %	86/90	95,6 %
Fortement négatif	26/30	86,7 %	23/30	76,7 %	29/30	96,7 %	78/90	86,7 %
Négatif	10/10	100,0 %	9/10	90,0 %	10/10	100,0 %	29/30	96,7 %
Contrôle négatif	10/10	100,0 %	10/10	100,0 %	10/10	100,0 %	30/30	100,0 %
Contrôle positif	10/10	100,0 %	10/10	100,0 %	10/10	100,0 %	30/30	100,0 %

REACTIONS CROISEES

Des études de réactivité croisée ont été effectuées sur des échantillons obtenus par lavage nasal, positifs et négatifs, inoculés avec des organismes bactériens et fongiques de manière à obtenir une concentration finale de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL ou virus à la dose infectieuse médiane de culture tissulaire de $1,0 \times 10^7$ DICT₅₀/mL. Aucun des organismes suivants n'a réagi avec le test Alethia Pertussis: *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter Iwoffii*, *Actinomyces odontolyticus*, *Arcanobacterium haemolyticum*, *Bacillus subtilis*, *Bacteroides fragilis*, *Bordetella avium*, *Bordetella hinzii*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella petrii*, *Bordetella treamatum*, *Burkholderia cepacia*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium difficile*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* (ESBL), *Fusobacterium nucleatum*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae* (KPC), *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Legionella jordanis*, *Legionella longbeachae*, *Legionella micdadei*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Moraxella catarrhalis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria cinerea*, *Neisseria elongata*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Nocardia asteroides*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia liquefaciens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptococcus anginosus* (Groupe F), *Streptococcus bovis* (Groupe D), *Streptococcus canis* (Groupe G), espèces dysgalactiae de *Streptococcus dysgalactiae*, espèces equismilis de *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus suis*, *Ureaplasma urealyticum*, adénovirus, coronavirus, coxsackievirus, cytomegalovirus, virus d'Epstein Barr, virus Herpes Simplex 1, Herpes virus Herpes simplex 2, métrapneumovirus humain, influenza A, influenza B, virus de la rougeole, virus des oreillons, virus parainfluenza 1, virus parainfluenza 2, virus parainfluenza 3, virus syncytial respiratoire A, virus respiratoire syncytial B, rhinovirus.

B. bronchiseptica (souche 4617) et *B. holmesii* ont été testées à des concentrations de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL; elles ont réagi avec le test Alethia Pertussis.

Des résultats inattendus ont été observés au cours des tests originaux d'échantillons contenant *B. hinzii*, *H. parainfluenzae* et *M. genitalium*. Un répliqué sur les trois répliqués d'échantillons négatifs contenant *B. hinzii* a produit un résultat faussement positif qui n'a pas été confirmé par un test ultérieur (20/20 répliqués). Trois répliqués sur les trois répliqués d'échantillons négatifs contenant *H. parainfluenzae* ont produit des résultats faussement positifs qui n'ont pas été confirmés par un test ultérieur (20/20 répliqués). Trois répliqués sur les trois répliqués d'échantillons positifs contenant *B. pertussis* ont produit des résultats non valides qui n'ont pas été confirmés par un test ultérieur (10/10 répliqués). Trois répliqués sur les trois répliqués d'échantillons négatifs contenant *M. genitalium* ont produit des résultats non valides qui n'ont pas été confirmés par un test ultérieur (10/10 répliqués). Comme la répétition du test utilisant un plus grand nombre de répliqués n'a pas confirmé les résultats originaux, *B. hinzii*, *H. parainfluenzae* et *M. genitalium* ne sont pas considérés comme réagissant de manière croisée ou interférente dans le test Alethia Pertussis.

TESTS POUR LES SUBSTANCES INTERFERENTES

Les substances chimiques suivantes, aux concentrations de saturation solvant/diluant spécifiées, n'influencent pas les résultats de test: Acétaminophène (paracétamol) (10 mg/mL), Advil® [ibuprofène (10 mg/mL)], spray nasal décongestionnant Afrin® [chlorhydrate d'oxymétazoline (0,005 % v/v)], sulfate d'albutérol [sulfate de salbutamol (1 % v/v)], Asprine (5 mg/mL), comprimés de Coricidin® HBP Cold/Flu (rhume/grippe) [Acétaminophène (paracétamol) (3,26 mg/mL), maléate de chlorphéniramine (0,02 mg/mL)], chlorhydrate de dipiphédramine (0,25 mg/mL), érythromycine (2 % v/v), (mupiropine) (2 % v/v), gelée de pétrole [vaseline blanche (1 % v/v)], sirop contre la toux Robitussin® Cough+ Chest Congestion DM (toux + encombrement bronchique) [dextrométhorphan HBr (0,1 mg/mL), guaifénésine (1,0 mg/mL)], suphédrine PE [chlorhydrate de phényléphrine (0,3 mg/mL)], spray nasal de sérum physiologique [chlorure de sodium (0,065 % v/v)], tabac sans fumée (1 % v/v), tobromycine (0,6 mg/mL), Vicks® VaporRub® [chlorure (0,48 % v/v), huile d'eucalyptus (0,12 % v/v), menthol (0,26 % v/v)].

L'ibuprofène (10 mg/mL) a produit des résultats non valides (3/6 répliqués) lors du test original d'échantillons artificiels de *B. pertussis*. Toutes les répétitions du test ont produit des résultats positifs (10/10 répliqués). Comme les résultats originaux n'ont pas été confirmés, l'ibuprofène (10 mg/mL) n'est pas considéré comme une substance interférente.

L'asprine perturbe le test Alethia Pertussis à des concentrations supérieures à 5 mg/mL.

Les substances biologiques suivantes, aux concentrations de saturation solvant/diluant spécifiées, n'influencent pas les résultats de test: ADN humain (200 ng/μL), mucine [Mucine de type I-S de glande sous maxillaire bovine (1 % v/v)], sang total (1 % v/v).

ESPAÑOL

alethia™ Pertussis DNA Amplification Assay

Ensayo de amplificación de ADN para la detección de *Bordetella pertussis* en muestras de hisops nasofaríngeo

REF 480750

IVD

R_x Only

USO INDICADO

El ensayo de amplificación de ADN Alethia Pertussis, realizado en el Alethia Lector, es una prueba de diagnóstico in vitro cualitativa para la detección directa de *Bordetella pertussis* en las muestras de hisops nasofaríngeo humano tomadas de los pacientes de los que se sospecha que tienen una infección de las vías respiratorias que se puede atribuir al *Bordetella pertussis*.

El ensayo para la tos ferina Alethia utiliza la tecnología de amplificación de ADN isotérmica (LAMP) mediada por bucle para detectar *B. pertussis* dirigiéndose al elemento insercional IS481 del genoma de *B. pertussis*. El elemento insercional IS481 también se puede encontrar en *B. holmesii* y en algunas cepas de *B. bronchiseptica*. Las infecciones de las vías respiratorias por *B. pertussis*, *B. holmesii* o *B. bronchiseptica* pueden dar resultados positivos en los ensayos de IS481. La infección por *B. holmesii* puede provocar una enfermedad clínica parecida a la provocada por *B. pertussis*. Asimismo, se han comunicado brotes mixtos de infección por *B. pertussis* y *B. holmesii*. En caso necesario deberán realizarse pruebas complementarias para diferenciar *B. holmesii* y *B. pertussis*. La infección por *B. bronchiseptica* es una causa poco frecuente en los seres humanos. Cuando los factores clínicos sugieren que es posible que *B. pertussis* no sea la causa de la infección respiratoria, se debe/n realizar otra/s investigación/es clínicamente adecuadas de acuerdo con las directrices publicadas.

Los resultados negativos con el ensayo de amplificación de ADN Alethia Pertussis no excluyen una infección por *B. pertussis* y los resultados positivos no descartan la coinfección con otros microorganismos patógenos de las vías respiratorias. Los resultados del ensayo Alethia Pertussis deben utilizarse en combinación con la información obtenida durante la evaluación clínica del paciente como ayuda en el diagnóstico de la infección por *B. pertussis*, no deben utilizarse como la única base para el tratamiento ni para otro tipo de decisiones relacionadas con el tratamiento del paciente.

Alethia Pertussis es para uso en laboratorios de hospital, de referencia o estatales. El dispositivo no es para uso en punto-de-cuido.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

El ensayo de amplificación de ADN Alethia Pertussis se basa en la tecnología de amplificación mediada por bucle (LAMP).^{1,2} El ensayo se dirige a una secuencia de 198 pares de base (pb) del genoma de *B. pertussis* que reside en una región de la secuencia del elemento insercional IS481.

La amplificación mediada por bucle utiliza cebadores especialmente diseñados para proporcionar amplificación de ADN isotérmica específica y continua. Un subproducto de esta amplificación es la formación de pirofosfato de magnesio, que crea un precipitado blanco que provoca turbidez en la solución de reacción. Las características de absorbancia de la solución de reacción se vigilan mediante el Lector/Incubadora Meridian Alethia. Los cambios en las características de absorbancia de la solución de reacción que se generan a partir de la precipitación del pirofosfato de magnesio indican la presencia del ADN objetivo. La ausencia del ADN objetivo no tiene como resultado un cambio significativo en la absorbancia de la muestra.

El equipo Alethia Pertussis incluye el reactivo de control/control negativo del ensayo, dispositivos de prueba Alethia Pertussis, también de muestra Alethia Pertussis y aceite mineral. El control/control negativo del ensayo de Alethia, utilizado para la dilución y preparación de muestras, es una solución tamponada con Tris que contiene *E. coli* tratada con formol que alberga ADN de *Staphylococcus aureus*. El dispositivo de prueba Alethia Pertussis contiene una microesfera de amplificación liofilizada en cada una de las dos cámaras: una cámara de PRUEBA con cebadores específicos para IS481 y una cámara de CONTROL con cebadores específicos para *S. aureus*. El ADN de *S. aureus* del reactivo de control/control negativo del ensayo y los cebadores específicos para *S. aureus* de la cámara de CONTROL funcionan como control interno para el ensayo. Durante la preparación de las muestras, se agrega una muestra del paciente al Control del ensayo/Reactivo de control negativo. Al agregar la muestra al Control del ensayo/Reactivo de control negativo, se combina el ADN de la muestra con el ADN de control *S. aureus* y se posibilita el procesamiento paralelo del ADN meta y el ADN de control mediante 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 del paciente.

El Alethia Lector monitoriza los cambios en las características de absorbancia a través de la medición de la transmisión de luz por las soluciones de reacción de Prueba y Control. La transmisión de luz se comprueba al inicio del proceso (Señal_{inicial}, Si) y al Final del proceso (Señal_{final}, Sf) del ensayo. El Alethia Lector calcula el cambio producido en la transmisión de luz entre el Final del proceso y el Inicio del proceso (Sr:Si) y compara el porcentaje con un valor de corte fijo.

Los valores de corte fijos de la cámara de PRUEBA se utilizan para informar resultados de muestras. Los porcentajes de la cámara de PRUEBA Sr:Si inferiores al 82 % se muestran como «POSITIVO»; los porcentajes de la cámara de PRUEBA Sr:Si superiores o iguales al 82 % se muestran como «NEGATIVO». Los valores numéricos no se informan.

Los valores de corte fijos de la cámara de CONTROL se utilizan para determinar la validez. Los porcentajes Sr:Si de la cámara de CONTROL inferiores al 90 % se consideran válidos y permiten mostrar los resultados de la cámara de PRUEBA (POSITIVO, NEGATIVO). Los porcentajes Sr:Si de la cámara de CONTROL superiores o iguales al 90 % se consideran no válidos e impiden notificar los resultados de la cámara de PRUEBA. Las reacciones no válidas de la cámara de CONTROL se informan como «NO VÁLIDAS». Los valores numéricos no se informan.

Los criterios de corte más rigurosos se aplican a la reacción de la cámara de CONTROL para garantizar que no se inhiba la amplificación, que los reactivos tengan el rendimiento esperado y que el procesamiento de muestras se haya realizado adecuadamente.

PRINCIPIOS BIOLÓGICOS

B. pertussis es un patógeno humano responsable exclusivamente de la tos convulsiva (tos ferina) de la enfermedad respiratoria endémica; una enfermedad de declaración obligatoria públicamente que ha tenido un impacto sobre más de 200.000 personas en todo el mundo en 2012. La tos ferina actualmente es la única enfermedad en los EE.UU. que muestra una tendencia creciente de casos de declaración obligatoria e importante morbilidad a pesar de la disponibilidad de una vacuna.³ Los Centros para el Control de Enfermedades de EE.UU. (CDC) informaron de aproximadamente 48.300 casos de tos ferina en 2012, un promedio de 15,4 casos por 100.000 personas en los Estados Unidos.⁴ Los brotes epidémicos de tos ferina recientes han indicado una inmunidad decreciente en los niños después de recibir la última dosis de vacuna acelular de refuerzo, permitiendo la propensión a la infección de tos ferina en poblaciones tanto vacunadas como sin vacunar de niños con edades comprendidas entre 7 y 11.^{5,6}

Los brotes de tos ferina son especialmente difíciles de controlar ya que los estadios tempranos de la enfermedad se asemejan a otras infecciones respiratorias y los pacientes pueden seguir siendo altamente infecciosos durante un máximo de 5 semanas después de la aparición de los síntomas.³ Además, la tos ferina no se diagnostica oficialmente hasta que se muestra la presencia de la tos «convulsiva» característica casi 2 semanas después de la aparición de los síntomas.³ El diagnóstico clínico de la tos ferina se puede realizar utilizando cultivos, serología o las pruebas de amplificación del ácido nucleico (NAAT). Mientras que el cultivo es sumamente específico, la sensibilidad es baja, los resultados pueden tardar hasta 7 días y las células viables necesarias para el cultivo disminuyen con la evolución de la enfermedad (después de 2 semanas de la aparición de los síntomas).⁷ A diferencia del cultivo, los ensayos NAAT pueden aportar los resultados de la prueba rápidamente y no necesitan bacterias viables. La prueba de amplificación de ácidos nucleicos de *B. pertussis* es más sensible durante las tres primeras semanas de tos, ya que el ADN bacteriano está presente en la nasofaringe. La cantidad de bacterias presentes en la nasofaringe se reduce significativamente tras la cuarta semana de tos, lo que aumenta la probabilidad de obtener resultados falsos negativos durante las etapas tardías de la infección.⁸ Además, solo se debe probar a los pacientes sintomáticos con tos mediante NAAT para evitar resultados falsamente positivos por contactos estrechos asintomáticos.⁸ La serología sólo se puede usar para el diagnóstico en las últimas etapas de la enfermedad, aproximadamente 2 a 8 semanas después de la aparición de la tos.

REACTIVOS/MATERIALES PROPORCIONADOS

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

- Reactivo de control/control negativo del ensayo Alethia Pertussis:** Solución tamponada con Tris que contiene células de *E. coli* tratadas con formol que albergan plásmido que contiene un segmento del genoma de *S. aureus* y azida sódica (0,09 %) como conservante. El reactivo de control negativo/control del ensayo funciona como control del ensayo durante la realización de pruebas del paciente, y como control negativo externo durante la realización de pruebas rutinarias de control de calidad.
- Dispositivo de prueba Alethia Pertussis:** Dispositivo de dos cámaras que contiene reactivos de amplificación liofilizados (ADN polimerasa, trifosfatos de desoxirribonucleótidos) y, o bien cebadores específicos de IS481 (cámara de PRUEBA) o cebadores de control (cámara de CONTROL).
- Tampón de muestra Alethia Pertussis:** Solución tamponada con Tris-EDTA que contiene azida sódica (0,09 %) como conservante.
- Aceite mineral** (frasco con punta de gotero)
- Reactivo para Pre-tratamiento (procedimiento opcional para tratamiento de muestras) Alethia:** Reactivo liofilizado con agente neutralizante y azida sódica (0,1 %) como conservante. Cada vial contiene suficiente reactivo para tratar 50 muestras.

MATERIALES PROPORCIONADOS POR SEPARADO

Equipo de Control Externo Alethia Pertussis, número de catálogo: 479930

MATERIALES NO PROPORCIONADOS

- Guantes desechables de látex, sin polvo
- Puntas de pipeta resistentes al aerosol, libres de ribonucleasa/desoxirribonucleasa
- Sistema de recogida y transporte de muestras
Exudados nasofaríngeos: Poliéster (capacidad mínima 18 µL, p. ej. catálogo de Puritan Medical Products 25-801D 50); Rayón (capacidad mínima 31 µL, p. ej. catálogo Puritan Medical Products 25-801R 50); o Nailon Flocado (capacidad mínima 69 µL, p. ej. Copan 503CS01 o el hisopo del Catálogo 482C).
Medios de transporte no nutritivos: Amies líquido, sin carbón; o líquido Stuart (volumen máximo: 1,2 mL en compresión/esponja)
Sistema de recolección: Sistema de recolección y transporte Copan Liquid Amies Elution Swab (ESwab™), (catálogo Copan 482C)
- Agua desionizada
- Tubos microcentrifugos

EQUIPO NO PROPORCIONADO

- Baño seco con bloque de calor de 12 mm capaz de 95 C
- Termómetro digital con memoria de temperatura máx/min (p. ej., termómetro sumergible y a prueba de golpes Traceable® Lollipop™)
- Mezclador Vortex
- Cronómetro de intervalos
- Micropipeta capaz de administrar 50 µL
- Pipeta con capacidad para 2,5 mL
- Herramientas para cortar (ej.: tijeras, cizallas, tijeras de seguridad)
- Alethia Lector, Meridian Bioscience, Inc. Número de catálogo: 610189

PRECAUCIONES:

- Todos los reactivos son sólo para uso de diagnóstico in vitro.
- No intercambiar reactivos de control/control negativo de ensayo o dispositivos de prueba entre lotes. El tampón de muestra, Reactivo para Pre-tratamiento y el aceite mineral son intercambiables siempre y cuando se usen dentro de la fecha de caducidad asignada.
- Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio y Bioseguridad de Nivel 2 durante la prueba.⁹ Trate todas las muestras y los dispositivos de prueba usados como capaces de transmitir agentes infecciosos. No coma, beba ni fume en las zonas donde se manejan los reactivos del equipo o las muestras.
- Use guantes desechables cuando maneje las muestras y lávese bien las manos después.
- Se deben emplear programas de Control de Calidad para Laboratorios de Prueba Molecular, incluyendo el uso y cuidado correctos del equipo.¹⁰
- El dispositivo de prueba Alethia Pertussis contiene reactivos liofilizados. La bolsa de protección no debería abrirse hasta que esté listo para realizar el ensayo.
- El dispositivo de prueba Alethia Pertussis 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.
- Deseche los dispositivos de prueba usados de Alethia 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.
- Resultados inválidos pueden resultar debido a una preparación incorrecta de las muestras, falla del reactivo, falla del instrumento o falla del control interno. En estos casos se puede corregir el resultado inválido repitiendo la prueba. La nasofaringe de algunos pacientes contiene un inhibidor biológico que también provocará resultados inválidos. En estos casos, el inhibidor siempre provocará resultados inválidos a menos que se trate la muestra para que elimine la interferencia. (Consulte la sección sobre TRATAMIENTO/PRE-TRATAMIENTO OPCIONAL DE LAS MUESTRAS para conocer el método de tratamiento).
- Regulaciones locales, estatales o federales para enfermedades reportables están continuamente siendo revisadas las cuales incluye un número de organismos para monitoreo e investigación de brotes. Adicionalmente, el Centro de Control de Enfermedad (CDC en Inglés) recomienda que cuando patógenos reportables son detectados por métodos diagnósticos independientes de cultivo, el laboratorio debe facilitar la manera de obtener el aislamiento o la materia clínica para someterla al laboratorio de salud pública apropiado para la ayuda de detección de brotes e investigación epidemiológica. Los laboratorios son responsables de seguir las regulaciones estatales y/o locales y deben consultar con sus laboratorios estatales y/o locales de salud pública para la guía de suministro del aislado y/o muestra clínica.
 - Summary of Notifiable Diseases. MMWR <http://www.cdc.gov/mmwr/PDF/wk/mm6153.pdf>
 - CIFOR Analysis of State Legal Authorities. <http://www.cifor.us/documents/CIFORAnalysisStateLegalAuthorities.pdf>

DECLARACIONES DE RIESGO Y PRECAUCIÓN

Se debe referir a los SDS, disponibles en www.meridianbioscience.com (US version) / www.meridianbioscience.eu (EU version) para las Frases de Peligro y Precaución.

VIDA UTIL Y ALMACENAMIENTO

La fecha de caducidad se indica en la etiqueta del equipo. Almacene el equipo a una temperatura entre 2 y 30 C.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Asegúrese de que los reactivos del equipo están a temperatura ambiente (21 - 30 C) antes de su uso. Se pueden obtener resultados incorrectos si los reactivos no están a temperatura ambiente antes del uso.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Tipo de muestra: Exudados nasofaríngeos

Toma de muestras: Las recogida de muestras de exudados nasofaríngeos se debe realizar de acuerdo con los procedimientos institucionales para la recogida de muestras clínicas para la infección por *B. pertussis*. Las muestras de exudados nasofaríngeos deben obtenerse empleando hisopos adecuados (p. ej., de poliéster, nailon flocado o rayón).

Coloque los hisopos en un medio de transporte no nutritivo (p. ej. líquido Amies, sin carbón o líquido Stuart o Copan ESwab medio) o almacene sin conservantes en un tubo estéril sin medio.

Las muestras sin conservantes o muestras almacenadas en medios de transporte se deben analizar en cuanto sea posible, pero se pueden mantener a una temperatura ambiente (21 - 30 C) durante un máximo de 5 días o refrigeradas (2 - 8 C) durante un máximo de 7 días antes del análisis. No congele las muestras.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA:

NOTA: Asegúrese de que el Alethia lettore está encendido y que se hayan completado las verificaciones de rendimiento necesarias antes de iniciar la PREPARACIÓN DE LA MUESTRA. Consulte el Manual del operador de Alethia lettore para obtener más información acerca de la instalación y el funcionamiento del instrumento.

NOTA: Los equipos de laboratorio utilizados para el corte de los hisopos (tijeras, cizallas, tijeras de seguridad) debe tratarse con un agente limpiador de grado molecular (p. ej., lejía al 10 %) antes de cada uso. Los equipos deben secarse por completo antes de manejar los hisopos.

- Preparación de las muestras
 - Hisopos (rayón, nailon o flocado):
 - Coloque la muestra del hisopo en un tubo de tampón de muestra etiquetado. Corte el mango del hisopo para asegurarse de que la muestra cabe en el tubo. Eluya la muestra mezclándola con vórtex durante 45 a 60 segundos. **Las muestras eluidas se pueden mantener a temperatura ambiente (21 - 30 C) durante un máximo de 48 horas o refrigeradas (2 - 8 C) durante un máximo de 7 días antes del análisis.**
 - Añada 50 µL de la muestra eluida a un tubo de control/control negativo del ensayo etiquetado y tápelo.
 - Repetir los pasos de PREPARACIÓN DE LA MUESTRA para todas las muestras de hisopos que se procesarán.
 - ESwab Medio: El medio dentro del tubo de recolección de ESwab System contiene la muestra eluida del paciente.
 - Vórtex el tubo ESwab que contiene la muestra del hisopo durante al menos 10 segundos para eluir la muestra.
 - Transfiera 25 µL del medio a un tubo con etiqueta de Control del ensayo/Control negativo y tápelo. (No transfiera este material al tubo del Tampón de muestra. Va directamente al tubo de Control del ensayo/Control negativo).
 - Repetir los pasos de PREPARACIÓN DE LA MUESTRA para todas las muestras de ESwab medio que se procesarán.
- Vórtex cada tubo de control/control negativo del ensayo que contiene la muestra eluida durante aproximadamente 10 segundos.
- Caliente 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.
- Saque cada tubo de muestra/control del baño seco. Las muestras tratadas térmicamente pueden mantenerse a una temperatura ambiente entre 21 y 30 C durante un máximo de 15 minutos antes de la prueba.
- Vórtex durante unos 10 segundos.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

NOTA: Se pueden procesar un máximo de 10 muestras en cada corrida del Alethia Lector.

- Saque 1 dispositivo de prueba Alethia Pertussis de su bolsa de protección por cada muestra. Abra el dispositivo cuidadosamente, sujetando las cámaras de tal modo que el reactivo liofilizado no se caiga al abrir el dispositivo. Coloque el dispositivo en una superficie plana o en una gradilla que acomode el dispositivo.
- 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. Cierre el Dispositivo de Prueba Alethia y asegure que el cierre queda seguro. No mezcle las reacciones con pipeta.
- Añada 1 gota de aceite mineral a las dos cámaras de la PRUEBA y la de CONTROL. Cierre el dispositivo de prueba Alethia y asegure el cierre con firmeza.
- Dé unos golpecitos en la parte superior del banco o mezcle para remover las burbujas de aire. Examine con cuidado el dispositivo de prueba para la rehidratación de la microesfera de control/prueba, para las burbujas de aire que quedan en la cámara y el líquido en la parte superior del dispositivo. Si se advierten microesferas sin disolver, burbujas de aire o líquido en la parte superior del dispositivo, golpee el dispositivo sobre la parte superior del banco y repita la inspección visual. La amplificación y la detección deben comenzar en un plazo de 15 minutos.
- Introduzca el dispositivo de prueba de Alethia en el Alethia Lector e inicie la reacción de amplificación y detección. Los resultados se mostrarán al final del proceso.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

ID de la muestra	Resultado notificado	Interpretación
Muestra de la paciente	POSITIVO	Muestras Tratadas o no tratadas: La muestra contiene el ADN objetivo IS481 de <i>Bordetella pertussis</i> . ^a
	NEGATIVO	Muestras Tratadas o no tratadas: No se ha detectado ADN de <i>B. pertussis</i> .
	NO VÁLIDO	Muestras No Tratadas: Sin resultados notificables. Repita la prueba mediante una muestra eluida o tratada con Reactivo para Pre-tratamiento. Muestra de la paciente inhibitoria, preparación de la muestra inadecuada, fallo del reactivo, fallo del instrumento o fallo de control interno. Muestras Tratadas: Sin resultados notificables. NO repita muestras ya tratadas con Reactivo de Pre-tratamiento. Muestras INVALIDAS pre-tratadas pueden ser repetidas, si desea, y deben ser reportadas como INVALIDAS si el resultado luego de repetir la prueba es el mismo, Muestras que producen resultados INVALIDOS antes y luego de ser tratadas deben ser reportadas como INVALIDAS.
Control positivo	POSITIVO	Resultado de control positivo válido. Reactivos activos en el momento del uso, el Alethia Lector funciona correctamente.
	NEGATIVO	Resultado de control incorrecto. Repita la prueba de control como primer paso para determinar la causa de la falla. Si los 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. Si el resultado de control repetido es INVALIDO, contacte el Departamento de Servicios Técnicos de Meridian al 1-800-343-3858 (USA) o su distribuidor local. 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 la falla. Si los 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 Alethia Lector funciona correctamente.
	NO VÁLIDO	Sin resultados notificables. Repita todo el proceso de ensayo usando las muestras originales. Si el resultado de control repetido es INVALIDO, contacte el Departamento de Servicios Técnicos de Meridian al 1-800-343-3858 (USA) o su distribuidor local. Preparación de la muestra inadecuada, fallo del reactivo, fallo del instrumento o fallo de control interno.
Pocillo Vacío	NINGUNO	No hay ningún dispositivo de prueba de Alethia en el pocillo del Alethia Lector. 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.

^a IS481 se encuentra en copias múltiples en *B. pertussis* (de 50 a 238 copias/genoma), en *B. holmesii* (de 8 a 10 copias/genoma) y de manera menos frecuente en *B. bronchiseptica*.

PRE-TRATAMIENTO OPCIONAL DE MUESTRAS /TRATAMIENTO PARA ELIMINAR INHIBIDORES DE REACCION

Se puede utilizar el siguiente método para eliminar la actividad inhibidora de las sustancias biológicas de la muestra de un paciente.

Preparación del Reactivo para Pre-tratamiento

- Reconstituya el Reactivo para Pre-tratamiento liofilizado agregando 2,5 mL de agua desionizada al vial. Vuelva a tapar el vial.
- Permita que el Reactivo para Pre-tratamiento reconstituido descanse a una temperatura de 21 a 30 C durante 30 minutos y mezcle con suavidad para evitar que se forme espuma.
- Almacene el Reactivo para Pre-tratamiento reconstituido en una de estas dos formas:
 - Almacene el Reactivo para Pre-tratamiento reconstituido en su vial original a una temperatura de 2 a 8 C hasta un período de un mes. Etiquete el vial con su nueva fecha de vencimiento; o
 - Transfiera de inmediato 0,1 mL o alícuotas mayores del reactivo reconstituido a tubos microcentrífugos etiquetados, tape en forma segura y congele las alícuotas a ≤ -20 C en un congelador sin ciclos de descongelamiento. Las alícuotas congeladas se mantendrán estables hasta el vencimiento original del material liofilizado. Descongele cada alícuota una sola vez antes de cada uso. Las alícuotas descongeladas se pueden almacenar a una temperatura de 2 a 8 C hasta una semana.
- Caliente el Reactivo para Pre-tratamiento reconstituido a una temperatura de 21 a 30 C antes de usarlo. Mezcle suavemente para evitar que se forme espuma No use la solución reactiva para Pre-tratamiento si tiene una apariencia turbia u opaca.

Tratamiento de muestras preparadas con anterioridad para la realización de pruebas nuevas:

- Hisopos (rayón, nailon o flocados):
 - Añada 50 μ L de Reactivo para Pre-tratamiento reconstituido al tubo del Tampón de muestra que contiene la muestra del paciente (que quedó del paso 1.a) de la PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS) y vértex durante 10 a 15 segundos para mezclar el contenido. La muestra tratada no deberá almacenarse más allá del tiempo de validez de la muestra eluida original según se describe en el paso 1 de la sección PREPARACIÓN DE LA MUESTRA más arriba.
 - Transfiera 50 μ L del medio a un tubo con etiqueta de Control del ensayo/Control negativo y tápelo.
 - ESwab Medio:
 - Transfiera 500 μ L de ESwab medio inoculado con la muestra del paciente (del tubo de recolección ESwab) a un tubo vacío.
 - Añada 50 μ L de Reactivo para Pre-tratamiento reconstituido al tubo y vértex durante 10 a 15 segundos para mezclar el contenido. La muestra tratada no deberá almacenarse más allá del tiempo de validez de la muestra eluida original según se describe en el paso 1 de la sección PREPARACIÓN DE LA MUESTRA más arriba.
 - Transfiera 25 μ L del medio a un tubo con etiqueta de Control del ensayo/Control negativo y tápelo.
2. Complete los pasos 2 a 5 de la sección PREPARACIÓN DE LA MUESTRA y continúe con la evaluación.

Pre-Tratamiento de muestras no evaluadas:

- Hisopos (rayón, nailon o flocados):
 - Añada 50 μ L de Reactivo para Pre-tratamiento reconstituido a un tubo de Tampón de muestra etiquetado.
 - Coloque la muestra del hisopo en el tubo para Tampón de muestra. Corte el mango del hisopo para asegurar que la muestra entre en el tubo. Elyu la muestra por vértex durante 45 a 60 segundos. La muestra tratada y eluida se puede almacenar a temperatura ambiente (entre 21 y 30 C) hasta 48 horas o refrigerada (entre 2 y 8 C) hasta 7 días antes de correr la prueba.
 - Transfiera 50 μ L del medio a un tubo con etiqueta de Control del ensayo/Control negativo y tápelo.
- ESwab Medio:
 - Vórtex el tubo ESwab que contiene la muestra del hisopo durante al menos 10 segundos para eluir la muestra.
 - Transfiera 500 μ L de ESwab medio inoculado con la muestra del paciente a un tubo vacío.
 - Añada 50 μ L de Reactivo para Pre-tratamiento reconstituido al tubo y vértex durante 10 a 15 segundos para mezclar el contenido. La muestra tratada no deberá almacenarse más allá del tiempo de validez de la muestra eluida original según se describe en el paso 1 de la sección PREPARACIÓN DE LA MUESTRA más arriba.

- Transfiera 25 μ L del medio a un tubo con etiqueta de Control del ensayo/Control negativo y tápelo.
- Complete los pasos 2 a 5 de la sección PREPARACIÓN DE LA MUESTRA y continúe con la evaluación.

CONTROL DE CALIDAD

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

- Cada dispositivo contiene una cámara de control interno que controla la inhibición de la amplificación, la eficacia de los reactivos del ensayo y el procesamiento de la muestra.
- El paso del tratamiento térmico se monitoriza con un termómetro externo y un cronómetro de intervalos. Use la memoria de temperatura máx/mín del termómetro para asegurarse de que se mantiene una temperatura de 95 ± 5 C. Use el cronómetro de intervalos para asegurarse de que la duración del tratamiento térmico es de 10 ± 2 minutos.
- Las Buenas Prácticas de Laboratorio recomiendan el uso de materiales de control. Los usuarios deben seguir las directrices federales, estatales y locales adecuadas relativas a la ejecución de controles de calidad externos.
- Los reactivos de control externo Alethia Pertussis se suministran por separado (Catálogo 479930). Se recomienda que la reactividad de cada nuevo lote y cada nuevo envío de Alethia Pertussis se verifique a la recepción o antes de su uso. Se deberán 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 Pertussis no debería usarse en la prueba de pacientes si los controles externos no ofrecen los resultados correctos.
- Se debe usar un dispositivo aparte para cada reactivo de control externo.

VALORES ESPERADOS

El porcentaje total de casos de *B. pertussis* según lo detectado por el ensayo Alethia Pertussis en muestras no seleccionadas (todas las llegadas) recogidas de manera prospectiva y retrospectiva durante el periodo de este estudio fue del 8,2 % (57/692).

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- El ensayo Alethia Pertussis está dirigido al elemento insercional IS481 del genoma de *Bordetella*. El elemento insercional IS481 está presente en *B. pertussis*, *B. holmesii* y en algunas cepas de *B. bronchiseptica*.
- Este producto solo se puede utilizar con el instrumento Alethia.
- El ensayo para ADN de Alethia Pertussis es un ensayo cualitativo y no proporciona valores cuantitativos ni información sobre la carga del microorganismo.
- Este dispositivo no está evaluado para vigilar el tratamiento de las infecciones por *B. pertussis*.
- Esta prueba no se ha evaluado en muestras que no correspondan a exudados humanos nasofaríngeos de individuos inmunodeprimidos o de pacientes de los que no se sospeche que estén infectados con *B. pertussis*.
- Los resultados de esta prueba deben tener una relación con el historial clínico, los datos epidemiológicos y otra información que pueda estar disponible para el médico.
- La prevalencia de *B. pertussis* afectará al valor predictivo positivo y negativo del ensayo.
- El ensayo de ADN Alethia Pertussis no detecta *B. paraptussis*, que causa una enfermedad parecida a la tos ferina. La enfermedad provocada por *B. paraptussis* suele ser más leve que la provocada por *B. pertussis*, ya que la bacteria no produce la toxina pertussis.
- Los resultados positivos no significan que no exista coinfección con otros microorganismos patógenos de las vías respiratorias. Los resultados falsos negativos de *B. pertussis* son más probables si los pacientes se hacen la prueba en el curso más tardío de la enfermedad (más de dos semanas después de la aparición de los síntomas), debido a la disminución del ADN de *Bordetella*. Los resultados falsos negativos también pueden aumentar en pacientes que estén recibiendo tratamiento con antibióticos.
- La contaminación ambiental de la sala de exploraciones por parte de un paciente anterior o la administración reciente de una vacuna antitosoférica pueden dar resultados falsos positivos.
- La detección de ácido nucleico dependerá de la recogida, de la manipulación, del transporte, del almacenamiento y de la preparación de las muestras adecuadas. El no seguir el procedimiento adecuado en cualquiera de estos pasos puede dar lugar a resultados incorrectos.
- Los ácidos nucleicos de los microorganismos pueden persistir *in vivo* independientemente de la viabilidad del microorganismo. El ensayo de Alethia Pertussis no distingue entre organismos viables y no viables.
- Al igual que sucede con todas las pruebas de diagnóstico moleculares: (A) pueden producirse resultados falsos negativos debido a la presencia de inhibidores, a errores técnicos, a la mezcla de muestras o al escaso número de microorganismos presentes en la muestra clínica, y (B) pueden producirse falsos resultados positivos debido a la presencia de contaminación cruzada por microorganismos objetivo, por sus ácidos nucleicos o por producto amplificado, así como por señales no específicas.
- El ácido acetil salicílico, como se encuentra en la aspirina, produce resultados no válidos cuando se prueba a concentraciones por encima de 5 mg/mL durante la prueba repetida del límite de detección de *B. pertussis* cepa BAA-589.

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

El ensayo de amplificación del ADN Alethia Pertussis fue evaluado desde diciembre 2012 a julio 2013 por centros de pruebas clínicas independientes que geográficamente representan distintas regiones por todos los Estados Unidos. Se evaluó un total de 729 muestras correctas de exudados nasofaríngeos (NF) tomados a pacientes con sospecha de infección respiratoria por *B. pertussis* con el dispositivo de prueba para conocer las características de funcionamiento. Las muestras fueron restos, muestras sin identificación que habían sido enviadas previamente para las pruebas habituales de *B. pertussis*. Las muestras incluidas en la evaluación del funcionamiento fueron prospectivas (nunca congeladas) y retrospectivas (congeladas antes de someterlas a la prueba Alethia). La población retrospectiva incluye muestras no-seleccionadas (todas sometidas) y seleccionadas.

El funcionamiento de Alethia Pertussis se comparó con un método de referencia combinado que incluía dos ensayos PCR en tiempo real dirigidos a IS481 validados por el fabricante (PCR1 and PCR2) seguido por secuencia bidireccional de amplión de muestras positivas de PCR.

Los protocolos de los ensayos PCR1 y PCR2 incluían 40 ciclos de amplificación. Se realizó secuenciación bidireccional en todas las muestras que produjeron amplicones antes del fin de los 40 ciclos de amplificación. Las muestras se consideraban positivas cuando los resultados de secuenciación bidireccional de alguno de los ensayos PCR comparadores confirmaban la presencia de amplicones de *B. pertussis*. Las muestras se consideraban negativas cuando ninguno de los ensayos PCR comparadores producía amplicones al final de los 40 ciclos de amplificación.

Se examinó un total de 508 (69,7 %) muestras prospectivas y 221 (30,3 %) retrospectivas. Se obtuvieron resultados no válidos de 13 muestras (1,8 %); dos muestras siguieron siendo no válidas después de repetir la prueba. Dos muestras prospectivas y dos muestras retrospectivas produjeron resultados de PCR comparadores indeterminados. La tabla 1 resume las características de funcionamiento de Alethia.

Tabla 1. Funcionamiento del ensayo Alethia

Descripción de las muestras	Muestras positivas			Muestras negativas			Resultados no válidos ^b
	Alethia frente al comparador	PPA ^a	IC 95 %	Alethia frente al comparador	NPA	IC 95 %	
Comparador del método combinado: Todas las sometidas							
Prospectivo	39/45	86,7 %	73,8 – 93,7 %	447/459	97,4 %	95,5 – 98,5 %	2 (13)
Retrospectivo	4/4	100,0 %	51,0 – 100,0 %	176/178	98,9 %	96,0 – 99,7 %	0
Total:	43/49	87,8 %	75,8 – 94,3 %	623/637	97,8 %	96,3 – 98,7 %	2 (13)
Comparador del método combinado: Muestras seleccionadas							
Retrospectivo	19/21	90,5 %	71,1 – 97,3 %	14/16	87,5 %	64,0 – 96,5 %	0

^a Ocho muestras produjeron resultados falsos negativos de Alethia cuando se compararon con el método comparador combinado. Seis de las ocho muestras produjeron niveles de ADN detectables entre los 35 y 40 ciclos de amplificación del ensayo comparador y se confirmaron como positivos mediante secuenciación bidireccional. Tres de estas seis muestras dieron resultados positivos solo en uno de los dos ensayos de PCR/secuenciación comparadores.

^b 11/13 muestras no válidas al inicio produjeron resultados válidos al repetir la prueba.

Los resultados falsos negativos de Alethia se evaluaron de manera individual al término de la realización de las pruebas clínicas. Los valores de ciclo umbral (cycle threshold, Ct) producidos durante la realización de pruebas con el ensayo comparador estuvieron por encima de 35 en uno e en ambos ensayos de PCR/secuenciación bidireccional en seis de las ocho muestras evaluadas. Los valores elevados de Ct pueden indicar la presencia de niveles bajos de ADN. Los datos de los 8 resultados falsos negativos de Alethia y sus datos comparadores combinados correspondientes se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Muestras con resultado falso negativo de Alethia y resultados de los ensayos comparadores

Denominación de la muestra	Estado de la muestra	PCR1		PCR2	
		Valor Ct	Resultado de la secuenciación bidireccional	Valor Ct	Resultado de la secuenciación bidireccional
1-19	Prospectivo	34,90	+	33,85	+
1-29	Prospectivo	Negativo	N/A	37,69	+
1-259	Prospectivo	34,07	+	35,09	+
1-269	Prospectivo	35,72	+	Negativo	N/A
1-275	Prospectivo	Negativo	N/A	39,13	+
3-33	Prospectivo	39,28	+	35,80	+
4-710	Retrospectivo	36,87	+	36,06	+
4-712	Retrospectivo	37,44	+	38,41	+

Las características del funcionamiento del ensayo de Alethia se evaluaron conforme al centro de pruebas clínicas. La tabla 3 muestra las características del funcionamiento según el centro de pruebas clínicas.

Tabla 3. Funcionamiento del ensayo de Alethia según el centro de pruebas clínicas

Descripción de las muestras	Muestras positivas			Muestras negativas			Resultados no válidos ¹
	Alethia frente al comparador	PPA	IC 95 %	Alethia frente al comparador	NPA	IC 95 %	
Comparador del método combinado: Todas las sometidas							
Centro 1	35/40	87,5 %	73,9 – 94,5 %	440/450	97,8 %	96,0 – 98,8 %	2 (13)
Centro 2	4/4	100,0 %	51,0 – 100,0 %	67/69	97,1 %	90,0 – 99,2 %	0 (2)
Centro 3	0/1	0,0 %	0,0 – 79,3 %	7/7	100,0 %	64,6 – 100,0 %	0 (0)
Centro 4	4/4	100,0 %	51,0 – 100,0 %	109/111	98,2 %	93,7 – 99,5 %	0 (0)
Comparador del método combinado: Muestras seleccionadas							
Centro 1	15/15	100,0 %	79,6% - 100,0 %	6/8	75,0 %	40,9 – 92,9 %	0 (0)
Centro 4	4/6	66,7 %	30,0 – 90,3 %	8/8	100,0 %	67,6 – 100,0 %	0 (0)

Los estudios clínicos fueron realizados con múltiples exudados nasofaríngeos y tipos de tampón de elución de muestra. Los tampones de la muestra probados durante los estudios clínicos incluyeron 0,85 % solución salina (n=30 o 4,1 %), Tris EDTA (n=8 o 1,1 %) y agua de calidad molecular (n=687 o 94,2 %). Todos los tampones de muestra fueron usados en volúmenes de 0,5 mL. Los estudios analíticos se realizaron con 0,85 % solución salina, Tris EDTA, solución salina tamponada con fosfato (PBS) y agua de calidad molecular. Los estudios analíticos establecieron la equivalencia entre todos los tipos de tampón de elución de muestra.

La información de la edad era conocida para 723 (99,2 %) de los pacientes cuyas muestras fueron probadas. La edad de los pacientes oscilaba entre 1 mes y 88 años. Treinta y ocho (5,2 %) de los pacientes tenían menos de 1 año; 13 (1,8 %) tenían entre 1 y 2 años; 296 (40,6 %) tenían entre 2 y 12 años, 157 (21,5 %) entre 12 y 21 años, 190 (26,0 %) eran mayores de 21 pero menores de 65, y los restantes 29 (4,0 %) pacientes eran mayores de 65 años.

La población en estudio incluía 413 (56,7 %) mujeres y 308 (42,2 %) varones. No se conocía el sexo de 8 (1,1 %) pacientes incluidos en el estudio. No se espera que el sexo del paciente influya en las características de funcionamiento del ensayo para la tos ferina Alethia.

Estudios con reactivo de pre-tratamiento

Para demostrar la eficacia del Reactivo de Pre-tratamiento, se llevaron a cabo estudios externos desde abril hasta junio de 2015 en cuatro centros de estudio seleccionados con muestras prospectivas de pacientes sintomáticos. De las 164 muestras obtenidas para este estudio, 145 cumplieron los criterios del estudio. La mayoría de las muestras enviadas a los centros del estudio se obtuvieron con hisopos con punta de rayón, una muestra se obtuvo con un hisopo de nailon floccado, y tres muestras, con un hisopo de poliéster. Las muestras se analizaron el mismo día de su obtención, primero usando el método comparativo para hisopo, y luego repitiendo resultados inválidos. Después de correr el método comparativo las mismas muestras fueron tratadas con el Reactivo de Pre-tratamiento y corridas luego del pre-tratamiento e incluso se re-prubaron los inválidos. Todos las pruebas del método comparativo, inválidos, y pre-tratamiento se completaron en un período de 24 horas. De las diecinueve muestras que inicialmente produjeron resultados inválidos con el método comparativo, 15 volvieron a dar resultados inválidos; tres dieron negativo y uno dio positivo en la repetición. Tras el reactivo de pre-tratamiento, 17 de las 19 muestras que dieron resultados inválidos originalmente dieron resultados negativo y dos positivo. Seis muestras dieron resultado con el método comparativo, pero produjeron resultados inválidos luego de ser tratado con el Reactivo de Pre-tratamiento. Los datos se muestran en la Tabla 4 a continuación.

Tabla 4. Comparación de métodos: Reactivo de Pre-tratamiento frente a método comparativo (sin Reactivo de Pre-tratamiento o RPT)

	Porcentaje de concordancia de los centros del estudio (muestras en concordancia/total analizado)				
	Centro 1	Centro 2 ^a	Centro 3	Centro 4	Total
Porcentaje concordancia pos.	87,5 % (6/7) (IC: 48,7-97,4 %)	0 % (0/0)	100 % (2/2) (IC: 34,2-100 %)	100 % (6/6) (IC: 61,8-100 %)	93,3 % (14/15) (IC: 70,2-98,8 %)
Porcentaje concordancia neg.	94,3 % (50/53) (IC: 84,6-98,1 %)	93,3 % (14/15) (IC: 70,2-98,8 %)	100 % (15/15) (IC: 79,6-100 %)	100 % (26/26) (IC: 87,1-100 %)	96,3 % (105/109) (IC: 90,9-98,6 %)
Tasa inicial de resultados inválidos sin RPT	1,6 % (1/63)	0 % (0/16)	37,0 % (10/27)	20,5 % (8/39)	13,1 % (19/145)
Tasa inicial de resultados inválidos con RPT	4,8 % (3/63)	6,25 % (1/16)	3,7 % (1/27)	2,6 % (1/39)	4,1 % (6/145)

^a Datos del Centro 2 representan primer pase solamente ya que este centro no repitió las muestras INVALIDAS sin tratamiento según requiere las instrucciones de uso, y antes de tratar muestras INVALIDAS con Reactivo de Pre-tratamiento. Todos los demás centros repitieron las muestras INVALIDAS antes del pre-tratamiento.

SENSIBILIDAD ANALÍTICA

La sensibilidad analítica o límite de detección para el ensayo Alethia Pertussis fue determinado para *B. pertussis* cepa ATCC BAA-589, Tahoma I.

El límite de detección fue determinado usando 60 réplicas de *B. pertussis* cepa ATCC BAA-589 y una probabilidad indicada (p. ej. 95 %, donde 57/60 réplicas son positivas) de obtener respuestas positivas. La prueba de sensibilidad analítica se resume a continuación:

Descripción cepa <i>B. pertussis</i>	CFU/mL	CFU/Prueba
ATCC BAA-589 (Tahoma I)	3265	1,48

REACTIVIDAD DEL ENSAYO

Se probaron las siguientes cepas del *B. pertussis* y produjeron reacciones positivas en 3265 CFU/mL o 1,48 CFU/prueba con Alethia Pertussis: ATCC 12743; ATCC 8478; ATCC 8467; ATCC 9797; ATCC 53894; ATCC 10380; ATCC 12742 y A639. Se probaron las siguientes cepas del *B. pertussis* y produjeron reacciones positivas en 3500 CFU/mL o 1,59 CFU/prueba con Alethia Pertussis: ATCC 51445 y ATCC BAA-1335.

REPRODUCIBILIDAD

Los estudios de reproducibilidad se realizaron en tres de los cuatro centros clínicos participantes. Se suministraron paneles codificados a ciegas de 10 muestras a los laboratorios participantes. Las muestras se eligieron aleatoriamente dentro de cada panel para enmascarar las identidades de las muestras. Los paneles incluían muestras artificiales fabricadas como muestras positivas moderadas (1,31 x 10⁵ CFU/mL o 6 CFU/prueba), muestras positivas bajas (4,89 x 10³ CFU/mL o 2 CFU/prueba); y muestras negativas altas (8,2 CFU/mL o 0,004 CFU/prueba). El panel también incluía una muestra negativa, control positivo y control negativo. 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 Pertussis y seis instrumentos Alethia. Se probaron los controles negativos y positivos cada día de pruebas. Los resultados aparecen en la tabla que sigue:

Tipo de muestra	Centro 1		Centro 2		Centro 4		Total	
	Acuerdo en porcentaje	Acuerdo en porcentaje	Acuerdo en porcentaje	Acuerdo en porcentaje	Acuerdo en porcentaje	Acuerdo en porcentaje	Acuerdo en porcentaje	
Positivo moderado	30/30	100,0 %	30/30	100,0 %	30/30	100,0 %	90/90	100,0 %
Positivo bajo	27/30	90,0 %	29/30	96,7 %	30/30	100,0 %	86/90	95,6 %
Negativo alto	26/30	86,7 %	23/30	76,7 %	29/30	96,7 %	78/90	86,7 %
Negativo	10/10	100,0 %	9/10	90,0 %	10/10	100,0 %	29/30	96,7 %
Control negativo	10/10	100,0 %	10/10	100,0 %	10/10	100,0 %	30/30	100,0 %
Control positivo	10/10	100,0 %	10/10	100,0 %	10/10	100,0 %	30/30	100,0 %

REACTIVIDAD CRUZADA

Se realizaron estudios de reactividad cruzada con muestras de enjuague nasal positivo y negativo inoculadas con microorganismos micóticos y bacterianos para una concentración final de 1,0 x 10⁵ CFU/mL o virus con un mínimo de 1,0 x 10³ TCID₅₀/mL. Ninguno de los siguientes microorganismos reaccionó con Alethia Pertussis: *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter lwoffii*, *Actinomyces odontolyticus*, *Arcanobacterium haemolyticum*, *Bacillus subtilis*, *Bacteroides fragilis*, *Bordetella avium*, *Bordetella hinzii*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella petrii*, *Bordetella trematum*, *Burkholderia cepacia*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium difficile*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* (ESBL), *Fusobacterium nucleatum*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae* (KPC), *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Legionella jordanis*, *Legionella longbeachae*, *Legionella micdadei*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Moraxella catarrhalis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria cinerea*, *Neisseria elongata*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Nocardia asteroides*, *Pepstococcus anaerobius*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia liquefaciens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptococcus anginosus* (Grupo F), *Streptococcus bovis* (Grupo D), *Streptococcus canis* (Grupo G), *Streptococcus dysgalactiae* ssp. *dysgalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* ssp. *equisimilis*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus suis*, *Ureaplasma urealyticum*, Adenovirus, Coronavirus, Cocksackievirus, Cytomegalovirus, Epstein Barr Virus, Herpes Simplex Virus 1, Herpes Simplex Virus 2, Human Metapneumovirus, Influenza A, Influenza B, virus del sarampión, virus de las papeiras, Parainfluenza virus 1, Parainfluenza virus 2, Parainfluenza virus 3, virus sincitial respiratorio A, virus sincitial respiratorio B, Rhinovirus.

Se probaron *B. bronchiseptica* cepa 4617 y *B. holmesii* a 1,0 x 10⁶ CFU/mL y se encontró que reaccionaban con el ensayo Alethia Pertussis.

Se observaron resultados imprevistos durante la realización de pruebas originales de muestras que contenían *B. hinzii*, *H. parainfluenzae* y *M. genitalium*. Una de las tres réplicas de muestra con resultado negativo que contenía *B. hinzii* produjo un resultado falso positivo que no se confirmó con pruebas adicionales (20/20 réplicas). Tres de las tres réplicas de muestra con resultado negativo que contenían *H. parainfluenzae* produjeron resultados falsos positivos que no se confirmaron con pruebas adicionales (20/20 réplicas). Tres de las tres réplicas de muestra con resultado positivo de *B. pertussis* produjeron resultados no válidos que no se confirmaron con pruebas adicionales (10/10 réplicas). Tres de las tres réplicas de muestra con resultado negativo que contenían *M. genitalium* produjeron resultados no válidos que no se confirmaron con pruebas adicionales (10/10 réplicas). Como la repetición de las pruebas con un número más alto de réplicas no confirmó los resultados originales, *B. hinzii*, *H. parainfluenzae* y *M. genitalium* no se consideran reacciones cruzadas ni interferencias de la prueba Alethia Pertussis.

PRUEBAS PARA SUSTANCIAS INTERFERENTES

Las siguientes sustancias químicas, en las concentraciones de solvente/diluyente saturadas que se especificaron, no interfirieron en los resultados de la prueba: Acetaminofeno (10 mg/mL), Advil® [ibuprofeno (10 mg/mL)], Afrin® spray nasal descongestionante [hidrocloruro de oximetazolina (0,0005 % w/v)], sulfato de albuterol [sulfato de salbutamol (1 % w/v)], aspirina (5 mg/mL), Coricidin® HBP comprimidos para resfriado/gripe [Acetaminofeno (3,26 mg/mL), maleato de clorfeniramina (0,02 mg/mL)], Difenhidramina HCl (0,25 mg/mL), Eritromicina (2 % w/v), Mupirocina (2 % w/v), vaselina [petrolato blanco (1 % w/v)], Robitussin® jarabe para la tos Cough+Chest Congestion DM [dextrometofan HBr (0,1 mg/mL), Guafenesina (1,0 mg/mL)], Sudafed PE [fenilefrina HCl (0,3 mg/mL)], spray nasal salino [cloruro sódico (0,0065 % w/v)], tabaco sin humo (rapé) (1 % w/v), Tobramicina (0,6 mg/mL), Vicks® VaporRub® [alcanfor (0,48 % w/v), aceite de eucalipto (0,12 % w/v), mentol (0,26 % w/v)].

El ibuprofeno (10 mg/mL) produjo resultados no válidos (3/6 réplicas) durante la realización de pruebas originales de muestras ingeniadas de *B. pertussis*. Todas las pruebas repetidas produjeron resultados positivos (10/10 réplicas). Como no se confirmaron los resultados originales, el ibuprofeno (10 mg/mL) no se considera una sustancia interferente.

Se encontró que la aspirina interfería con la prueba de Alethia Pertussis a concentraciones mayores de 5 mg/mL.

Las siguientes sustancias biológicas, en las concentraciones de solvente/diluyente saturadas que se especificaron, no interfirieron en los resultados de la prueba: ADN humano (200 ng/μL), Mucina [tipo de glándula submaxilar bovina I-S (1 % w/v)], sangre entera (1 % v/v).

alethia™

Pertussis

DNA Amplification Assay

DNA-Amplifikationsassay zum Nachweis von *Bordetella pertussis* in Nasopharynx-Abstrichproben

REF 480750

IVD₁

Rx Only

VERWENDUNGSZWECK

Der Alethia Pertussis-DNA-Amplifikationsassay, durchgeführt auf dem Alethia Lesegerät, ist ein qualitativer diagnostischer in-vitro-Test zum direkten Nachweis von *Bordetella pertussis* in humanen Nasopharynx-Abstrichproben von Patienten mit Verdacht auf eine durch *Bordetella pertussis* hervorgerufene Respirationstraktinfektion.

Der Alethia Pertussis-Assay benutzt die „Loop-Mediated“ isothermale DNA-Amplifizierung (LAMP)-Technologie zum Nachweis von *B. pertussis* durch den gezielten Nachweis des Insertionselementes IS481 des *B. pertussis*-Genoms. Das Insertionselement IS481 kann auch in *B. holmesii* und einigen *B. bronchiseptica*-Stämmen gefunden werden. Atemwegsinfektionen mit *B. pertussis*, *B. holmesii* oder *B. bronchiseptica* können bei IS481-Assays zu positiven Testergebnissen führen. Eine Infektion mit *B. holmesii* kann eine ähnliche klinische Erkrankung wie *B. pertussis* verursachen, und es gibt Berichte über gemischte Ausbrüche sowohl mit Infektionen mit *B. pertussis* als auch mit *B. holmesii*. Falls erforderlich sollten zusätzliche Tests durchgeführt werden, um *B. holmesii* von *B. pertussis* zu unterscheiden. *B. bronchiseptica* verursacht selten Infektionen beim Menschen. Wenn klinische Faktoren darauf hinweisen, dass *B. pertussis* nicht unbedingt die Ursache der Atemwegsinfektion ist, sollten andere klinisch angemessene Untersuchungen entsprechend den publizierten Leitlinien durchgeführt werden.

Negative Ergebnisse des Alethia Pertussis-DNA-Amplifikationsassays schließen eine Infektion mit *B. pertussis* nicht aus und positive Ergebnisse schließen eine Koinfektion mit anderen Pathogenen der Atemwege nicht aus. Die Ergebnisse des Alethia Pertussis-Assays dienen als Unterstützung bei der Diagnose einer Infektion mit *B. pertussis* und sollten immer zusammen mit den während der klinischen Beurteilung des Patienten gewonnenen Informationen betrachtet werden und nicht als alleinige Grundlage für Therapieentscheidungen beim Patienten eingesetzt werden.

Alethia Pertussis soll nur in Krankenhauslaboren, staatlichen Laboren oder Referenz-Laboren verwendet werden. Der Test ist nicht für die „Point-of-Care-Diagnostik“ vorgesehen. (am Krankenbett, in der Arztpraxis).

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DES TESTS

Der Alethia Pertussis-DNA-Amplifikationsassay basiert auf der „Loop-Mediated isothermal Amplification“ (LAMP)-Technologie.^{1,2} Der Assay weist gezielt eine Sequenz von 198 Basenpaaren (bp) des *B. pertussis*-Genoms nach, die sich in einer Region der IS481-Insertionselement-Sequenz befindet.

Bei der Loop vermittelten Amplifizierung werden spezielle Primer verwendet, um eine spezifische und kontinuierliche isotherme DNA-Amplifizierung zu erzielen. Als Nebenprodukt der Amplifizierung wird Magnesiumpyrophosphat gebildet, welches einen weißen Niederschlag ergibt, wodurch eine trübe Reaktionslösung entsteht. Die Absorptionsmerkmale der Reaktionslösung werden von dem Meridian Alethia Inkubator-/Lesegerät überwacht. Die durch den Niederschlag von Magnesiumpyrophosphat erzeugten Trübung der Reaktionslösung deutet auf die Anwesenheit der Ziel-DNA hin. Die Abwesenheit von Ziel-DNA bewirkt keine signifikante Änderung der Absorption der Proben.

Das Alethia Pertussis-Kit enthält das Alethia Pertussis-Assay-Kontrollreagenz/Negativkontrollreagenz, die Alethia Pertussis-Testsysteme, den Alethia Pertussis-Probenpuffer und Mineralöl. Bei der Alethia Assay-Kontrolle/Negativkontrolle, welche für die Verdünnung und Präparation des Probenmaterials verwendet wird, handelt es sich um eine Tris-gepufferte Lösung, die mit Formalin behandelte *E. Coli* enthält, die *Staphylococcus aureus*-DNA beherbergt. Das Alethia Pertussis-Analysegefäß enthält ein lyophilisiertes Amplifizierungskügelchen in jeder der zwei Kammern: einer TEST-Kammer mit IS481-spezifischen Primern und einer KONTROLL-Kammer mit *S. aureus*-spezifischen Primern. Zusammen funktionieren die *S. aureus*-DNA im Assay-Kontrollreagenz/Negativkontrollreagenz und die *S. aureus*-spezifischen Primer in der KONTROLL-Kammer als interne Kontrolle für den Assay. Während der Probenvorbereitung wird eine Patientenprobe dem Alethia Pertussis-Assay-Kontrollreagenz/Negativkontrollreagenz hinzugefügt. Das Hinzufügen der Probe zum Alethia Pertussis-Assay-Kontrollreagenz/Negativkontrollreagenz bringt die Proben-DNA mit der Kontroll-*S. aureus* DNA zusammen und ermöglicht die gleichzeitige Verarbeitung der Ziel-DNA und der Kontroll-DNA durch Amplifikation und Detektion. Die Amplifikationsinhibition, Assayreagenzleistung und Effizienz der Probenverarbeitung werden von der internen Kontrolle überwacht. Das Kontroll-*S. aureus*-Ziel muss amplifiziert und in der endgültigen Reaktion detektiert werden, oder der Test wird als ungültig erachtet und die Patientenergebnisse werden nicht weitergegeben.

Zur Überwachung der Änderungen der Absorptionsmerkmale misst das Alethia Lesegerät den Lichtdurchlass durch die Test- und Kontroll-Reaktionslösungen. Der Lichtdurchlass wird zu Beginn des Testdurchlaufs (Signal_{initial}, S_i) und am Ende des Testdurchlaufs (Signal_{final}, S_f) des Assays kontrolliert. Die Änderung des Lichtdurchlasses zwischen Ende und Beginn des Durchlaufs (S_r:S_f) wird von dem Alethia Lesegerät gemessen, und das Verhältnis wird mit einem festgelegten Cutoff-Wert verglichen.

Die Probenergebnisse werden anhand festgelegter Cutoff-Werte für die TEST-Kammer gemeldet. S_r:S_f-Verhältnisse der TEST-Kammer von weniger als 82% werden als „POSITIV“, S_r:S_f-Verhältnisse der TEST-Kammer, größer als oder gleich 82% werden als „NEGATIV“ gemeldet. *Es werden keine numerischen Werte ausgegeben.*

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

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

BIOLOGISCHE PRINZIPIEN

B. pertussis ist ein humanes Pathogen, das ausschließlich Keuchhusten (Pertussis), eine endemische Atemwegserkrankung verursacht. Pertussis ist eine meldepflichtige Erkrankung, von der 2012 weltweit 200.000 Personen betroffen waren. In den USA ist Keuchhusten derzeit die einzige Erkrankung mit einem ansteigenden Trend meldepflichtiger Fälle und erheblicher Morbidität trotz der Verfügbarkeit eines Impfstoffes.³ Die amerikanische Seuchenkontrolbehörde (Centers for Disease Control, CDC) meldete 2012 ca. 48.300 Pertussis-Fälle, das entspricht einem Durchschnitt von 15,4 Fällen pro 100.000 Personen in den USA.⁴ Pertussis-Ausbrüche in der jüngsten Vergangenheit zeigten eine abnehmende Immunität bei Kindern nach Erhalt der letzten Booster-Dosis des zellulären Impfstoffes, was zu einer Infektionsanfälligkeit sowohl in geimpften als auch in ungeimpften Populationen von Kindern im Alter zwischen 7 und 11 Jahren führte.^{5,6}

Pertussisausbrüche zu beherrschen, ist eine besondere Herausforderung, da die Frühstadien der Krankheit anderen Atemwegserkrankungen ähneln und die Patienten bis zu 5 Wochen nach Auftreten der Symptome hochinfektios bleiben.³ Außerdem wird Pertussis erst offiziell diagnostiziert, wenn beinahe zwei Wochen nach Krankheitsbeginn die charakteristischen Symptome des Keuchhustens auftreten.³ Die klinische Diagnose von Pertussis kann mittels Kultur, Serologie oder Nukleinsäure-Amplifikationstests (NAAT) gestellt werden. Die Kultur ist zwar hochspezifisch, die Sensitivität jedoch gering. Bis zum Erhalt von Ergebnissen kann es 7 Tage dauern, und die Anzahl lebensfähiger Zellen, die für eine Kultur erforderlich sind, nimmt mit Fortschreiten der Erkrankung (2 Wochen nach Auftreten der Symptome) ab.⁷ Im Gegensatz zur Kultur können NAAT-Assays schnelle Testergebnisse liefern und benötigen keine lebensfähigen Bakterien. Der Nukleinsäure-Amplifikationstest auf *B. pertussis* ist am empfindlichsten während der ersten drei Wochen des Hustens, wenn bakterielle DNA im Nasenrachenraum vorhanden ist. Die Bakterienmenge im Nasenrachenraum sinkt nach der vierten Woche des Hustens erheblich, wodurch die Wahrscheinlichkeit falsch negativer Testergebnisse während späterer Infektionsstadien steigt.⁹ Außerdem sollte der NAAT ausschließlich bei symptomatischen Patienten mit Husten durchgeführt werden, um falsch positive Ergebnisse bei asymptomatischen Personen mit engem Kontakt mit Erkrankten zu vermeiden.⁹ Die Serologie kann ausschließlich in späten Stadien der Erkrankung (ca. 2-8 Wochen nach Auftreten des Hustens) zur Diagnose benutzt werden.

REAGENZIEN/ENTHALTENE MATERIALIEN

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

- Alethia Pertussis-Assay-Kontrollreagenz/Negativkontrollreagenz:** Tris-gepufferte Lösung mit Formalin behandelten *E. coli*, die Plasmide mit einem Segment des *S. aureus*-Genoms enthalten, mit Natriumazid (0,09%) als Konservierungsmittel. Das Assay-Kontroll-/Negativ-Kontrollreagenz dient als Assaykontrolle für die Patiententests und als externe Negativkontrolle für die routinemäßigen Qualitätskontrolltests.
- Alethia Pertussis-Analysegefäß:** Ein Analysegefäß mit zwei Kammern, das lyophilisierte Amplifikationsreagenzien (DNA-Polymerase, Desoxynucleotridiphosphate) und entweder IS481-spezifische Primer (TEST-Kammer) oder Kontroll-Primer (KONTROLL-Kammer) enthält.
- Alethia Pertussis-Probenpuffer:** Tris-EDTA-Lösung mit Natriumazid (0,09%) als Konservierungsmittel.
- Mineralöl** (Flasche mit Tropfpipette)
- Alethia Vorbehandlungsreagenz (für eine optionale Stichprobenbehandlung):** Lyophilisiertes Reagenz, das einen neutralisierenden Wirkstoff und Sodiumazid (0,1%) als Konservierungsmittel enthält. Jede Ampulle enthält ausreichend Reagenz zur Behandlung von 50 Proben.

SEPARAT GELIEFERTE MATERIALIEN

Alethia Externes Pertussis-Kontrollkit, Bestellnummer: 479930

BENÖTIGTE, ABER NICHT ENTHALTENE MATERIALIEN

- Einweg-Latexhandschuhe, ungepudert
- DNase/RNase-freie, aerosolbeständige Pipettenspitzen
- Probenentnahme und Transportsystem
- Nasopharyngeale Abstriche:** Polyester (minimale Kapazität 18 µL, z.B. Puritan Medical Products, Bestellnummer 25-801D 50); Rayon (minimale Kapazität 31 µL, z.B. Puritan Medical Products, Bestellnummer 25-801R 50); oder befocktes Nylon (minimale Kapazität 69 µL, z.B. Copan 503CS01 oder den Tufter aus Katalog 482C).
- Nicht-nutritives Transportmedium:** Liquid Amies, ohne Kohle oder Liquid Stuart (Maximalvolumen: 1,2 mL Wattebausch/Schaumstoff)
- Aufnahmesystem:** Copan Liquid Amies Elution Tufter (Eswab™) Entsorgungssystem und transportsystem (Copan Katalog 482C)
- Deionisiertes Wasser
- Mikrozentrifugenröhrchen

NICHT MITGELIEFERTE AUSTRÜSTUNG

- Heizblock zur Erhitzung auf 95 °C
- Digitalthermometer mit Max-/Min-Temperaturspeicher (z.B. wasserdichtes/stoßfestes Thermometer, wie-Traceable® Lollipop™)
- Vortex-Mixer
- Intervall-Stoppuhr
- 50 µL-Mikropipette
- Pipette für 2,5 mL Fassungsvermögen
- Schneidewerkzeug (z.B.: Scheren, Zangen, Sicherheitsknipser)
- Alethia Lesegerät, Artikelnummer von Meridian Bioscience, Inc.: 610189

VORSICHTSMASSNAHMEN

- Sämtliche Reagenzien sind ausschließlich für die in-vitro-Diagnostik bestimmt.
- Das Assay-Kontrollreagenz/Negativkontrollreagenz und die Analysegefäße nicht zwischen Chargen austauschen. Der Probenpuffer und das Vorbereitungsreagenz und das Mineralöl können ausgetauscht werden, solange zum Zeitpunkt des Gebrauchs das angegebene Haltbarkeitsdatum noch nicht abgelaufen ist.
- Befolgen Sie bei den Untersuchungen die Biosicherheitsstufe 2 und eine gute Laborpraxis.⁹ Behandeln Sie alle Proben und gebrauchte Analysegefäße so als könnten sie infektiöse Erreger übertragen. In den Bereichen, in denen die Proben und Reagenzien der Kits bearbeitet werden, darf weder gegessen, noch getrunken oder geraucht werden.
- Bei der Handhabung der Proben sind Einweghandschuhe zu tragen. Nach der Arbeit sind die Hände gründlich zu waschen.
- Qualitätskontrollprogramme für Laboratorien, die molekulare Tests durchführen, einschließlich richtiger Gebrauch und Pflege der Ausrüstung, sollten angewendet werden.¹⁰
- Das Alethia Pertussis-Analysegefäß enthält lyophilisierte Reagenzien. Der Schutzbeutel darf erst dann geöffnet werden, wenn der Assay durchgeführt wird.
- Das Alethia Pertussis-Analysegefäß ist mit einer Sperrvorrichtung ausgestattet, um eine Kontamination des Testbereichs mit dem Amplifikationsprodukt zu verhindern. Analysegefäße mit defekter Sperrvorrichtung NICHT verwenden.
- Die Sperrvorrichtung gebrauchter Alethia Analysegefäße sicher arretieren und sofort nach Gebrauch entsorgen. Das Analysegefäß nach der Verarbeitung NICHT öffnen. Öffnen des Analysegefäßes nach der Amplifikation kann zur Kontamination des Testbereichs mit dem Amplifikationsprodukt führen.
- Ungültige Testergebnisse können von unzureichender Vorbereitung der Stichproben, Fehler des Reagenz, Instrumentenfehler oder internen Steuerungsfehlern herrühren. In diesen Fällen kann das ungültige Testergebnis durch Wiederholung des Tests korrigiert werden. Der Nasopharynx einiger Patienten enthält einen biologischen Hemmstoff, der gleichfalls ein ungültiges Ergebnis verursacht. In diesen Fällen wird der Hemmstoff wiederholt ungültige Ergebnisse verursachen, auch wenn die Stichprobe behandelt wird, um die Störung zu beseitigen (Vergleiche auch den Abschnitt über OPTIONALE STICHPROBENBEHANDLUNG/VORBEHANDLUNG für die Behandlungsmethode.) Die örtlichen, bundesstaatlichen und staatlichen Richtlinien für die Meldung von anzeigepflichtigen Krankheiten werden kontinuierlich aktualisiert und beinhalten eine Reihe von Organismen, die überwacht und bei denen Ausbrüche untersucht werden.^{a, b} Zusätzlich empfehlen die Centers of Disease Control (CDC), dass wenn Pathogene von meldepflichtigen Krankheiten durch einen von der Kultur unabhängigen Test entdeckt werden, das Labor ermöglichen soll, dass das Isolat oder das klinische Material erhalten wird. Dieses ist zur Überendung an ein zuständiges Laboratorium der Gesundheitsbehörden vorgesehen, um bei der Entdeckung eines Ausbruchs und bei der epidemiologischen Untersuchung zu helfen. Laboratorien sind verpflichtet ihren staatlichen oder örtlichen Richtlinien zu folgen und sollten ihre örtlichen und/oder staatlichen Laboratorien der Gesundheitsbehörden bezüglich Leitlinien zur Versendung von Isolaten und/oder klinischen Proben kontaktieren.
 - Zusammenfassung meldepflichtiger Krankheiten MMWR <http://www.cdc.gov/mmwr/PDF/wk/mm6153.pdf>
 - CIFOR Analyse der staatlichen Justizbehörden <http://www.cifor.us/documents/CIFORAnalysisStatalLegalAuthorities.pdf>

GEFAHREN UND SICHERHEITSHINWEISE

Für weitere Informationen zu den Gefahren- und Sicherheitshinweisen, beziehen Sie sich auf die SDS, die unter folgendem Link verfügbar sind www.meridianbioscience.com (US Version) / www.meridianbioscience.eu (EU Version).

HALTBARKEIT UND LAGERUNG

Das Verfallsdatum ist auf dem Etikett des Kits angegeben. Kit bei 2-30 °C aufbewahren.

VORBEREITUNG DER REAGENZEN

Stellen Sie sicher, dass Kitreagenzien vor Gebrauch Raumtemperatur (21-30 C) erreicht haben. Werden die Reagenzien vor Gebrauch nicht auf Raumtemperatur gebracht, kann dies zu falschen Ergebnissen führen.

PROBENNAHME UND -VORBEREITUNG

Probentyp: Nasopharyngeale Abstriche

Probennahme: Nasopharyngeale Abstrichproben sollten in Übereinstimmung mit den Verfahren der jeweiligen Einrichtung zur Entnahme klinischer Proben bei einer *B. pertussis*-Infektion entnommen werden. Die nasopharyngealen Abstrichproben sollten mit geeigneten Tupfern (z.B. Polyester, beflochtetes Nylon oder Rayon) entnommen werden.

Die Tupfer in ein nicht-nutritives Transportmedium (z.B. Liquid Amies ohne Kohle oder Liquid Stuart oder Copan ESwab) einlegen oder ohne Konservierungsmittel in einem sterilen Röhrchen ohne Medium aufbewahren.

Proben ohne Konservierungsmittel und in Transportmedien aufbewahrte Proben sollten so schnell wie möglich getestet werden, können jedoch bei Raumtemperatur (21-30 C) bis zu 5 Tage oder gekühlt (2-8 C) bis zu 7 Tage vor dem Test aufbewahrt werden. Die Proben nicht einfrieren.

PROBENVORBEREITUNG:

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

HINWEIS: Die zum Abschneiden der Abstrichtupfer verwendete Laborausstattung (z.B. Scheren, Zangen, Sicherheitsknipser) müssen vor jeder Verwendung mit einem hochreinen Reinigungsmittel (z.B. 10% Bleichlösung) behandelt werden. Die Ausrüstung muss vor dem Abschneiden der Tupfer absolut trocken sein.

1. Probenvorbereitung
 - a. Tupfer (Viskose, Nylon oder gemischt):
 - i. Die Abstrichprobe in ein beschriftetes Probenpufferröhrchen geben. Den Tupferschaft abschneiden, damit die Probe sicher in das Röhrchen passt. Die Probe durch 45-60 Sekunden langes Vortexen eluieren. **Eluierte Proben können bei Raumtemperatur (21-30 C) bis zu 48 Stunden und gekühlt (2-8 C) bis zu 7 Tage vor dem Test aufbewahrt werden.**
 - ii. 50 µL der eluierten Probe in ein Röhrchen mit der Beschriftung Assay-Kontrolle/Negativkontrolle geben und verschließen.
 - iii. Wiederholen Sie die Stufen der PROBENVORBEREITUNG für alle zu behandelnden Abstrichproben.
 - b. ESwab Medium: Das Medium innerhalb des ESwab System Entnahmeröhrchens enthält die eluierte Patientenprobe
 - i. Schütteln des ESwab Röhrchens mit der Abstrichprobe für mindestens 10 Sekunden, um die Probe zu eluieren.
 - ii. Geben Sie 25 µL des Mediums in ein beschriftetes Assay Kontroll/Negativ Kontroll-Röhrchen und verschließen Sie es. (Geben Sie dieses Material nicht in den Probenpuffer. Es geht direkt in das Assay Kontroll/Negativ Kontroll-Röhrchen)
 - iii. Wiederholen Sie die Schritte der PROBENVORBEREITUNG für alle zu behandelnden Abstrichproben.
2. Alle Röhrchen mit Assay-Kontrolle/Negativkontrolle, die eine eluierte Probe enthalten, ca. 10 Sekunden vortexen.
3. Alle Proben/Kontrollgemische in einem Heizblock bei 95 ± 5 C 10 ± 2 Minuten erhitzen. Überwachen Sie den Hitzebehandlungsschritt mit dem Digitalthermometer und der Intervall-Stoppuhr.
4. Alle Proben-/Kontrollröhrchen aus dem Heizblock entfernen. Wärmebehandelte Proben können bis zu 15 Minuten vor dem Test bei Raumtemperatur (21-30 C) aufbewahrt werden.
5. Vortexen Sie ca. 10 Sekunden.

TESTDURCHFÜHRUNG

HINWEIS: In einem Lauf auf dem Alethia Lesegerät können maximal 10 Proben verarbeitet werden.

1. Nehmen Sie für jede Probe ein Alethia Pertussis- Analysegefäß aus dem Schutzbeutel. Öffnen Sie vorsichtig das Analysegefäß und halten Sie die Kammern so, dass das lyophilisierte Reagenz beim Öffnen nicht herausfällt. Platzieren Sie das Analysegefäß auf einer ebenen Oberfläche oder in einem für das System passenden Ständer.
2. Überführen Sie mit einer Mikropipette zunächst 50 µL der hitzebehandelten Probe in die TEST-Kammer (Links/weißes Kügelchen) und anschließend 50 µL der hitzebehandelten Probe in die KONTROLL-Kammer (Rechts/gelbes Kügelchen) des Alethia Analysegefäßes. Achten Sie darauf, dass keine Luft in die Reaktionsmischung gelangt. Mischen Sie die Reaktionen nicht mit der Pipette.
3. Geben Sie jeweils einen Tropfen Mineralöl in die TEST-Kammer und in die KONTROLL-Kammer. Schließen Sie das Alethia Analysegefäß und verschließen Sie die Sperrvorrichtung sicher.
4. Klopfen Sie das Analysegefäß leicht auf die Arbeitsfläche auf oder schwenken Sie es, um Luftblasen zu entfernen. Überprüfen Sie das Analysegefäß sorgfältig auf die Rehydratation des Kontroll-/Test-Kügelchen sowie auf Luftblasen in der Kammer und Flüssigkeit im oberen Teil des Analysegefäßes. Falls nicht gelöste Kügelchen, Luftblasen oder Flüssigkeit im oberen Teil des Analysegefäßes zu erkennen sind, klopfen Sie diese auf die Arbeitsfläche und wiederholen Sie die Sichtkontrolle. Die Amplifikation und Detektion sollten innerhalb von 15 Minuten initiiert werden.
5. Geben Sie das Alethia Analysegefäß in das Alethia Lesegerät und starten Sie die Amplifikationsreaktion und -detektion. Die Ergebnisse werden am Ende des Laufs angezeigt.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Proben-ID	Ausgewiesenes Ergebnis	Auswertung
Patientenprobe	POSITIV	Unbehandelte oder vorbehandelte Proben: Die Probe enthält <i>B. pertussis</i> IS481-Ziel-DNA.*
	NEGATIV	Unbehandelte oder vorbehandelte Proben: <i>B. pertussis</i> -DNA wurde nicht nachgewiesen.
	UNGÜLTIG	Unbehandelte Proben: Kein meldefähiges Ergebnis. Wiederholen Sie den Test unter Verwendung einer mit einem Vorbehandlungs Reagenz, behandelten/eluierten Probe. Hemmende Patientenprobe, falsche Probenvorbereitung, fehlerhaftes Reagenz, Instrumentenversagen oder interner Kontrollfehler. Vorbehandelte Proben: Kein meldefähiges Ergebnis. Behandeln Sie Proben, die bereits behandelt wurden NICHT erneut mit dem Vorbehandlungs-Reagenz. Vorbehandelte UNGÜLTIGE Proben können, wenn gewünscht erneut getestet werden und sollten als UNGÜLTIG gemeldet werden, wenn die erneute Testung das gleiche Ergebnis erzeugt. Proben die UNGÜLTIGE Ergebnisse vor und nach Behandlung mit dem Vorbehandlungs-Reagenz erzeugen sollten als UNGÜLTIG gemeldet werden.
Positivkontrolle	POSITIV	Gültiges positives Kontrollergebnis. Reagenzien sind zum Zeitpunkt der Verwendung aktiv, Alethia Lesegerät funktioniert 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 meldefähiges Ergebnis. Wiederholen Sie den gesamten Assay-Lauf unter Verwendung von Originalproben. Wenn nach der Wiederholung das Ergebnis der Kontrolle UNGÜLTIG ist, rufen Sie bitte den Technischen Support von Meridian Bioscience an (USA): (001) 800-343-3858 oder wenden Sie sich an Ihren zuständigen Distributor. Falsche Probenvorbereitung, fehlerhaftes Reagenz, Instrumentenversagen oder interner Kontrollfehler.
Negativkontrolle	POSITIV	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.
	NEGATIV	Gültiges negatives Kontrollergebnis. Reagenzien sind zum Zeitpunkt der Verwendung aktiv, Alethia Lesegerät funktioniert korrekt.
	UNGÜLTIG	Kein meldefähiges Ergebnis. Wiederholen Sie den gesamten Assay-Lauf unter Verwendung von Originalproben. Wenn nach der Wiederholung das Ergebnis der Kontrolle UNGÜLTIG ist, rufen Sie bitte den Technischen Support von Meridian Bioscience an (USA): (001) 800-343-3858 oder wenden Sie sich an Ihren zuständigen Distributor. Falsche Probenvorbereitung, fehlerhaftes Reagenz, Instrumentenversagen oder interner Kontrollfehler.
LEERER SCHACHT	KEINE/R	Kein Alethia Analysegefäß in der Alethia Lesegerät-Vertiefung. ODER Das vorhandene Alethia Analysegefäß ist aufgrund fehlerhafter Probenvorbereitung, verunreinigter Reaktionsgefäße oder falsch platzierter Analysegefäße beeinträchtigt. Wiederholen Sie den Test unter Verwendung der Originalprobe.

* IS481 ist in mehreren Kopien in *B. pertussis* (50 bis 238 Kopien/Genom), in *B. holmesii* (8 bis 10 Kopien/Genom) und weniger häufig in *B. bronchiseptica* vorhanden.

OPTIONALE VORBEHANDLUNG/BEHANDLUNG ZUR ELIMINIERUNG VON REAKTIONINHIBITOREN

Folgende Methoden sind geeignet, die hemmenden Aktivitäten biologischer Substanzen einer Patientenprobe zu beseitigen.

Vorbereitung des Vorbehandlungs-Reagenz

1. Wiederherstellen von lyophilisiertem Vorbehandlungs-Reagenz durch Hinzufügen von 2,5 mL deionisiertem Wasser in die Ampulle. Verschließen Sie die Ampulle.
2. Lassen Sie das wiederhergestellte Vorbehandlungs-Reagenz bei 21-30 C für 30 Minuten ruhen, mischen Sie es dann vorsichtig, um Schäumen zu verhindern.
3. Bewahren Sie das wiederhergestellte Vorbehandlungs-Reagenz auf eine der beiden Arten auf:
 - a. Bewahren Sie das wiederhergestellte Vorbehandlungs-Reagenz in seiner originalen Ampulle bei 2-8 C bis zu einem Monat auf. Beschriften Sie die Ampulle mit ihrem neuen Ablaufdatum, oder
 - b. Geben Sie sofort 0,1 mL oder ein größeres Aliquot des wiederhergestellten Reagenz in etikettierte Mikrozentrifugenröhrchen, verschließen Sie sie fest und frieren Sie das Aliquot in einem nicht selbstabtauenden Gefrierschrank bei ≤ -20 C. Gefrorene Aliquots sind bis zum ursprünglichen Ablaufdatum des lyophilisierten Materials stabil. Tauen Sie jedes Aliquot nur einmal vor der Verwendung auf. Aufgetaute Aliquots können bei 2-8 C bis zu einer Woche aufbewahrt werden.
4. Erwärmen Sie das Vorbehandlungs-Reagenz vor der Verwendung auf 21-30 C. Mischen Sie vorsichtig, um Schäumen zu verhindern. Verwenden Sie das Vorbehandlungs-Reagenz nicht, wenn es flockig oder trübe aussieht.

Behandlung der zuvor vorbereiteten Proben für die Nachprüfung:

- 1a. Tupfer (Viskose, Nylon oder gemischt):
 - i. Fügen Sie 50 µL des wiederhergestellten Vorbehandlungs-Reagenz in das Probenröhrchen mit der Probe des Patienten (die von der PROBENVORBEREITUNG aus Schritt 1. a. i. übrig ist) und schütteln Sie es 10-15 Sekunden lang, um den Inhalt zu mischen. Die behandelte Probe darf nicht länger aufbewahrt werden als in Schritt 1 des vorigen Abschnitts zur PROBENVORBEREITUNG beschrieben wurde.
 - ii. Geben Sie 50 µL des Mediums in ein beschriftetes Assay Kontroll/Negativ Kontroll Röhrchen und verschließen Sie es.
- 1b. ESwab Medium:
 - i. Geben Sie 500 µL des ESwab Mediums, das mit der Patientenprobe geimpft wurde (aus dem ESwab Aufnahmeröhrchen) in ein leeres Röhrchen.

- ii. Fügen Sie 50 µL des wiederhergestellten Vorbehandlungs-Reagenz hinzu und schütteln Sie das Röhrchen 10-15 Sekunden lang, um den Inhalt zu mischen. Die behandelte Probe darf nicht länger aufbewahrt werden als in Schritt 1 des vorigen Abschnitts zur PROBENVORBEREITUNG beschrieben wurde.
 - iii. Übertragen Sie 25 µL des Mediums in ein beschriftetes Assay Kontroll/Negativ Kontroll Röhrchen und verschließen Sie es.
2. Vervollständigen Sie Schritte 2-5 des Abschnitts zur PROBENVORBEREITUNG und fahren Sie mit dem Testen fort.

Vorbereitung ungetesteter Proben:

- 1a. Tupfer (Viskose, Nylon oder gemischt):
 - i. Geben Sie 50 µL des wiederhergestellten Vorbehandlungs-Reagenz in ein beschriftetes Röhrchen mit dem Probenpuffer.
 - ii. Geben Sie die Abstrichprobe in das Röhrchen mit dem Probenpuffer Kürzen Sie den Stiel des Abstrichs, um zu gewährleisten dass die Probe in das Röhrchen passt. Eluieren Sie die Probe, indem Sie sie 45-60 Sekunden lang schütteln. Die behandelte, eluierte Probe kann bei Zimmertemperatur (21-30 C) bis zu 48 Stunden oder gekühlt (2-8 C) bis zu 7 Tage vor dem Testen aufbewahrt werden.
 - iii. Geben Sie 50 µL des Mediums in ein beschriftetes Assay Kontroll/Negativ Kontroll Röhrchen und verschließen Sie es.
 - 1b. ESwab Medium:
 - i. Schütteln Sie das ESwab Röhrchen, das die Abstrichprobe enthält, mindestens 10 Sekunden lang, um die Probe zu eluieren.
 - ii. Übertragen Sie 500 µL des ESwab Mediums, das mit der Patientenprobe geimpft wurde, in ein leeres Röhrchen.
 - iii. Fügen Sie 50 µL des wiederhergestellten Vorbehandlungs-Reagenz hinzu und schütteln Sie das Röhrchen 10-15 Sekunden lang, um den Inhalt zu mischen. Die behandelte Probe darf nicht länger aufbewahrt werden als in Schritt 1 des vorigen Abschnitts zur PROBENVORBEREITUNG beschrieben wurde.
 - iv. Übertragen Sie 25 µL des Mediums in ein beschriftetes Assay Kontroll/Negativ Kontroll Röhrchen und verschließen Sie es.
2. Vervollständigen Sie Schritte 2-5 des Abschnitts zur PROBENVORBEREITUNG und fahren Sie mit dem Testen fort.

QUALITÄTSKONTROLLE

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

1. Jedes Analysegefäß enthält eine interne Kontrollkammer, die die Amplifikationsinhibition, Assay-Reagenzien und die Effizienz der Probenverarbeitung überwacht.
2. Der Hitzebehandlungsschritt wird mit einem externen Thermometer und einer Intervall-Stoppuhr überwacht. Verwenden Sie den Max-/Min-Temperaturspeicher des Thermometers, um sicherzustellen, dass eine Temperatur von 95 ± 5 C aufrecht erhalten bleibt. Verwenden Sie die Intervall-Stoppuhr, um sicherzustellen, dass die Dauer der Hitzebehandlung 10 ± 2 Minuten beträgt.
3. Gemäß guter Laborpraxis ist die Anwendung von Kontrollmaterialien empfohlen. Anwender sollten die entsprechenden bundesstaatlichen, staatlichen und kommunalen Richtlinien zur Mitführung von externen Qualitätskontrollen befolgen.
4. Externe Kontrollreagenzien für den Alethia Pertussis Test werden separat geliefert (Bestellnr. 479930). Es wird empfohlen, die Reaktivität jeder neuen Charge und jeder neuen Lieferung von Alethia Pertussis beim Empfang oder vor Gebrauch zu überprüfen. Externe Kontrolltests sind danach gemäß bundesstaatlichen, staatlichen und kommunalen Richtlinien durchzuführen. Das Alethia Pertussis-Testkit sollte nicht für Tests an Patientenproben verwendet werden, wenn die externen Kontrollen nicht die richtigen Ergebnisse erzeugen.
5. Für jedes externe Kontrollreagenz muss ein separates Analysegefäß verwendet werden.

ERWARTETE WERTE

Die Gesamtinzidenz von *B. pertussis*, die durch den Alethia Pertussis-Assay bei prospektiven und retrospektiven, nicht ausgewählten Proben (alle hereinkommenden) während des Zeitraums dieser Studie nachgewiesen wurde, betrug 8,2% (57/692).

EINSCHRÄNKUNGEN

1. Der Alethia Pertussis-Assay weist das Insertionselement IS481 des Bordetellagenoms nach. Das IS481 ist in *B. pertussis*, *B. holmesii* und einigen Stämmen von *B. bronchiseptica* vorhanden.
2. Dieses Produkt kann nur mit dem Alethia-Instrument verwendet werden.
3. Beim Alethia Pertussis-DNA-Assay handelt es sich um einen qualitativen Assay, der keine quantitativen Ergebnisse oder Informationen zur Keimlast liefert.
4. Dieses Testsystem wurde nicht für die Überwachung der Behandlung von Infektionen mit *B. pertussis* geprüft.
5. Dieser Test wurde nicht für andere Proben als Nasenrachen-Abstrichproben, nicht für Proben immungeschwächter Personen und nicht für Proben von Patienten, bei denen nicht von einer Infektion mit *B. pertussis* ausgegangen wird, evaluiert.
6. Die Ergebnisse dieses Tests müssen stets zusammen mit der klinischen Vorgeschichte, den epidemiologischen Daten sowie anderen dem Arzt zur Verfügung stehenden Daten beurteilt werden.
7. Die Prävalenz von *B. pertussis* beeinflusst die positiven und negativen prädiktiven Werte des Assays.
8. *B. parapertussis*, das eine keuchhustenähnliche Erkrankung hervorruft, wird vom Alethia Keuchhusten-DNA-Assay nicht erkannt. Die von *B. parapertussis* hervorgerufene Erkrankung verläuft in der Regel leichter als die durch *B. pertussis* hervorgerufene Erkrankung, da diese Bakterien kein Pertussis-Toxin produzieren.
9. Positive Ergebnisse schließen eine Koinfektion mit anderen Pathogenen der Atemwege nicht aus. Falsch negative Ergebnisse für *B. pertussis* sind aufgrund der abnehmenden Menge an Bordetella-DNA bei Patienten wahrscheinlicher, die später im Krankheitsverlauf getestet werden (mehr als zwei Wochen nach Symptombeginn). Falsch negative Ergebnisse können vermehrt auch bei mit Antibiotika behandelten Patienten auftreten.
10. Eine Umgebungskontamination eines Untersuchungszimmers durch einen früheren Patienten oder eine kürzlich verabreichte Keuchhustenimpfung kann zu einem falsch positiven Testergebnis führen.
11. Die Detektion von Nukleinsäuren hängt von der korrekten Probenentnahme sowie Handhabung, Transport, Lagerung und Vorbereitung ab. Wird das ordnungsgemäße Verfahren bei einem dieser Schritte nicht eingehalten, kann dies zu falschen Ergebnissen führen.
12. Die Nukleinsäuren des Organismus können unabhängig von der Lebensfähigkeit des Organismus *in vivo* erhalten bleiben. Der Alethia Pertussis-Assay unterscheidet nicht zwischen lebensfähigen und nicht lebensfähigen Organismen.
13. Wie bei allen diagnostischen Tests auf molekularer Grundlage können (A) falsch negative Ergebnisse infolge der Präsenz von Inhibitoren, technischen Fehlern, Vertauschen der Proben und geringer Organismenzahl in der klinischen Probe entstehen; (B) falsch positive Ergebnisse können infolge der Präsenz einer Kreuzkontamination mit Zielorganismen, deren Nukleinsäuren oder dem amplifizierten Produkt sowie von nicht-spezifischen Signalen entstehen.
14. Acetylsalicylsäure (in Aspirin) produzierte ungültige Ergebnisse bei Tests mit Konzentrationen über 5 mg/mL im Rahmen der Replikattests mit dem *B. pertussis*-Stamm BAA-589 zur Nachweisgrenze.

LEISTUNGSMERKMALE

Der Alethia Pertussis-DNA-Amplifikationsassay wurde von Dezember 2012 bis Juli 2013 durch unabhängige klinische Untersuchungsstellen in geographisch unterschiedlichen Regionen der USA bewertet. Insgesamt 729 qualifizierte Nasopharyngeal-(NP)-Abstrichproben von Patienten mit vermuteter *B. pertussis*-Respirationsinfektion wurden mit dem Testsystem geprüft, um Leistungsmerkmale zu bestimmen. Es handelte sich um übrigelebene und deidentifizierte und anonymisierte Proben, die früher für routinemäßige *B. pertussis* Tests eingeschickt wurden. Die bei der Leistungsbeurteilung untersuchten Proben waren prospektiv (nie eingefroren) und retrospektiv (vor dem Alethia Test eingefroren). Die Population der retrospektiven Proben schloss unselektierte (jede/jeden) und selektierte Proben ein.

Die Leistung des Alethia Pertussis-Tests wurde mit einer kombinierten Referenzmethode verglichen, die zwei vom Hersteller validierte Echtzeit-PCR-Assays zum gezielten Nachweis von IS481, (PCR1 und PCR2) gefolgt von bidirektionaler Sequenzierung des Amplikons von PCR-positiven Proben, umfasste.

Die PCR1- und PCR2-Assay-Protokolle umfassten 40 Amplifikationszyklen. Eine bidirektionale Sequenzierung wurde für alle die Proben durchgeführt, die Amplikons vor Ende der 40-Zyklus-Amplifikation produzierten. Die Proben wurden als positiv erachtet, wenn die Ergebnisse der bidirektionalen Sequenzierung eines der Vergleichs-PCR-Assays das Vorhandensein von *Bordetella-pertussis*-Amplikon bestätigten. Proben wurden als negativ erachtet, wenn keiner der Vergleichs-PCR-Assays am Ende der 40-Zyklus-Amplifikation das Amplikon produzierte.

Insgesamt 508 (69,7%) prospektive und 221 retrospektive Proben (30,3%) wurden getestet. Ungültige Ergebnisse wurden von 13 Proben (1,8%) erhalten; zwei Proben blieben ungültig nach wiederholten Tests. Zwei prospektive und zwei retrospektive Proben produzierten unbestimmte Ergebnisse mit dem Vergleichs-PCR-Assay. Tabelle 1 zeigt die Alethia Leistungscharakteristika.

Tabelle 1. Alethia Assay-Leistung

Beschreibung der Probe	Positive Proben			Negative Proben			Ungültige Ergebnisse ^a
	Alethia vs. Vergleichsmethode	PPA ^a	95% CI	Alethia vs. Vergleichsmethode	NPA	95% CI	
Kompositmethode-Vergleichspräparat: Alle hereinkommenden Proben							
Prospektiv	39/45	86,7%	73,8 – 93,7%	447/459	97,4%	95,5 – 98,5%	2 (13)
Retrospektiv	4/4	100,0%	51,0 – 100,0%	176/178	98,9%	96,0 – 99,7%	0
GESAMT:	43/49	87,8%	75,8 – 94,3%	623/637	97,8%	96,3 – 98,7%	2 (13)
Kompositmethode-Vergleichspräparat: Gewählte Proben							
Retrospektiv	19/21	90,5%	71,1 – 97,3%	14/16	87,5%	64,0 – 96,5%	0

^a Acht Proben hatten im Vergleich mit der Komposit-Vergleichspräparat-Methode falsch negative Alethia-Ergebnisse. Sechs der acht Proben lieferten nachweisbare DNA-Level zwischen 35 und 40 Vergleichs-Assay-Amplifikationszyklen und wurden durch die bidirektionale Sequenzierung als positiv bestätigt. Drei dieser sechs Proben lieferten nur bei einem der beiden Vergleichs-PCR/Sequenzierungs-Assays positive Ergebnisse.
^b 11/13 initial invalide Proben zeigen gültige Ergebnisse nach wiederholtem Testen.

Falsch negative Alethia-Ergebnisse wurden am Ende der klinischen Untersuchung einzeln beurteilt. Die während der Vergleichs-Assay-Untersuchungen gewonnenen Zyklusgrenzwerte (cycle threshold, Ct) lagen bei sechs der acht beurteilten Proben über 35 für einen oder beide PCR- bzw. bidirektionale Sequenzierungs-Assays. Hohe Ct-Werte bei den PCR-Assays könnten darauf hinweisen, dass niedrige DNA-Level vorhanden sind.³ Die falsch negativen Alethia-Ergebnisse und die entsprechenden Komposit-Vergleichspräparat-Daten sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2. Falsch negative Alethia-Proben, Vergleichs-Assay-Ergebnisse

Probenkennzeichnung	Probenstatus	PCR1		PCR2	
		Ct-Wert	Ergebnis der bidirektionalen Sequenzierung	Ct-Wert	Ergebnis der bidirektionalen Sequenzierung
1-19	Prospektiv	34,90	+	33,85	+
1-29	Prospektiv	Negativ	N/A	37,69	+
1-259	Prospektiv	34,07	+	35,09	+
1-269	Prospektiv	35,72	+	Negativ	N/A
1-275	Prospektiv	Negativ	N/A	39,13	+
3-33	Prospektiv	39,28	+	35,80	+
4-710	Retrospektiv	36,87	+	36,06	+
4-712	Retrospektiv	37,44	+	38,41	+

Die Leistungsmerkmale des Alethia-Assays wurden gemäß der klinischen Untersuchungsstelle beurteilt. Tabelle 3 zeigt die Leistungsmerkmale der klinischen Untersuchungsstelle.

Tabelle 3. Alethia-Assay-Leistung der klinischen Untersuchungsstelle

Beschreibung der Probe	Positive Proben			Negative Proben			Ungültige Ergebnisse ^b
	Alethia vs. Vergleichsmethode	PPA	95% CI	Alethia vs. Vergleichsmethode	NPA	95% CI	
Kompositmethode-Vergleichspräparat: Alle hereinkommenden Proben							
Einrichtung 1	35/40	87,5%	73,9 – 94,5%	440/450	97,8%	96,0 – 98,8%	2 (13)
Einrichtung 2	4/4	100,0%	51,0 – 100,0%	67/69	97,1%	90,0 – 99,2%	0 (2)
Einrichtung 3	0/1	0,0%	0,0 – 79,3%	7/7	100,0%	64,6 – 100,0%	0 (0)
Einrichtung 4	4/4	100,0%	51,0 – 100,0%	109/111	98,2%	93,7 – 99,5%	0 (0)
Kompositmethode-Vergleichspräparat: gewählte Proben							
Einrichtung 1	15/15	100,0%	79,6% - 100,0%	6/8	75,0%	40,9 – 92,9%	0 (0)
Einrichtung 4	4/6	66,7%	30,0 – 90,3%	8/8	100,0%	67,6 – 100,0%	0 (0)

Klinische Studien wurden mit mehreren Nasopharynx-Abstrichen und Probenelutions-Pufferarten durchgeführt. Probenpuffer, die im Rahmen der klinischen Studien geprüft wurden, umfassten 0,85%ige Kochsalzlösung (n=30 bzw. 4,1%), Tris-EDTA (n=8 bzw. 1,1%) und für die Molekularbiologie geeignetes Wasser (n=687 bzw. 94,2%). Alle Probenpuffer hatten ein Volumen von 0,5 mL. Analytische Studien wurden mit 0,85%iger Kochsalzlösung, Tris-EDTA, phosphatpufferter Kochsalzlösung (PBS) und für die Molekularbiologie geeignetes Wasser durchgeführt. Analytische Studien wiesen eine Äquivalenz aller Probenelutions-Pufferarten nach.

Von 723 Patienten (99,2%), deren Proben getestet wurden, war das Alter bekannt. Das Alter der Patienten lag zwischen 1 Monat und 88 Jahren. 38 Patienten (5,2%) waren jünger als 1 Jahr, 13 (1,8%) waren 1 bis 2 Jahre alt, 296 (40,6%) waren 2 bis 12 Jahre alt, 157 (21,5%) waren 12 bis 21 Jahre alt, 190 (26,0%) waren über 21 und unter 65 Jahre alt und die übrigen 29 Patienten (4,0%) waren über 65 Jahre alt.

Die Studienpopulation umfasste 413 Frauen (56,7%) und 308 Männer (42,2%). Bei 8 Patienten (1,1%) in der Studie war das Geschlecht unbekannt. Es wird nicht erwartet, dass die Leistungscharakteristika des Alethia Pertussis-Assays vom Geschlecht der Patienten beeinflusst werden.

Studien unter Verwendung eines Vorbehandlungs-Reagenz

Die Verwendung des Vorbehandlungsreagenzes wurde von April bis Juni 2015 in vier ausgewählten Testeinrichtungen im Rahmen externer Studien evaluiert. Dafür wurden prospektiv gesammelte Proben verwendet. Von den 164 für diese Studie genommenen Proben erfüllten 145 die Studienkriterien. Der größte Teil der Proben, die bei den Testeinrichtungen abgeliefert wurden, wurde mit Tupfern mit Rayonspitze entnommen; für eine Probe wurde ein Flockfaser-Nylon-Tupfer und für drei Proben ein Polyesterupfer verwendet. Der größte Teil der Proben wurde noch am Tag der Entnahme getestet. Die entnommenen Proben wurden unmittelbar nach der Entnahme bearbeitet, wobei die Testung der Proben zuerst mit der Vergleichsmethode des Tupfertests mit anschließender Wiederholung ungültiger Ergebnisse durchgeführt wurde. Nach dieser Testung wurden dieselben Proben mit dem Vorbehandlungsreagenz behandelt und danach getestet; ungültige Ergebnisse wurden wiederholt. Sowohl die Vergleichsmethode als auch die nicht vorbehandelten Proben und die vorbehandelten Proben wurden innerhalb von 24 Stunden getestet. Von den 19 Proben, die mit der Vergleichsmethode ungültige Ergebnisse ergaben, waren 15 bei der Wiederholung ungültig; drei waren bei der Wiederholung negativ und eine positiv. Nach Verwendung des Vorbehandlungsreagenzes waren 17 negativ und zwei positiv. Bei sechs Proben der Vergleichsmethode erhielt man ein Ergebnis, aber erzeugte ungültige Ergebnisse nach Behandlung mit dem Vorbehandlungsreagenz. Die Daten sind in Tabelle 4 unten angegeben. Sie machen deutlich, dass die Behandlung mit einem Vorbehandlungsreagenz ein effektives Mittel zur Beseitigung von Störungen durch einen biologischen Inhibitor darstellt.

Tabelle 4. Methodenvergleich: Vorbehandlungsreagens versus Vergleichsmethode (ohne Vorbehandlungsreagens [Pre-treatment Reagent, PTR])

	Übereinstimmung Testeinrichtungen in % (übereinstimmende Proben/getestete Gesamtmenge)				
	Einrichtung 1	Einrichtung 2*	Einrichtung 3	Einrichtung 4	Gesamt
Positive Übereinstimmung in Prozent	87,5% (6/7) (CI: 48,7-97,4%)	0% (0/0)	100% (2/2) (CI: 34,2-100%)	100% (6/6) (CI: 61,8-100%)	93,3% (14/15) (CI: 70,2-98,8%)
Negative Übereinstimmung in Prozent	94,3% (50/53) (CI: 84,6-98,1%)	93,3% (14/15) (CI: 70,2-98,8%)	100% (15/15) (CI: 79,6-100%)	100% (26/26) (CI: 87,1-100%)	96,3% (105/109) (CI: 90,9-98,6%)
Anfängliche Ungültigkeitsrate ohne Vorbehandlung	1,6% (1/63)	0% (0/16)	37,0% (10/27)	20,5% (8/39)	13,1% (19/145)
Anfängliche Ungültigkeitsrate mit Vorbehandlung	4,8% (3/63)	6,25% (1/16)	3,7% (1/27)	2,8% (1/39)	4,1% (6/145)

* Die Daten der Einrichtung 2 stellen nur die Daten der ersten Durchführung dar, da diese Einrichtung UNGÜLTIGE unbehandelte Proben nicht erneut getestet hat, wie es vom Beipackzettel vorgeschrieben wird und vor der Behandlung der UNGÜLTIGEN Proben mit dem Vorbehandlungs-Reagenz. Alle anderen Einrichtungen haben UNGÜLTIGE Testproben wiederholt, bevor sie die Proben vorbehandelt haben.

ANALYTISCHE SENSITIVITÄT

Die analytische Sensitivität bzw. Nachweisgrenze für den Alethia Pertussis-Assay wurde für den *B. pertussis*-Stamm ATCC BAA-589 Tahoma I ermittelt.

Die Nachweisgrenze wurde mit 60 Replikaten des *B. pertussis*-Stamms ATCC BAA-589 bestimmt und eine Wahrscheinlichkeit, positive Ergebnisse zu erhalten, angegeben (z.B. 95%, wenn 57/60 Replikate positiv sind). Die Tests zur analytischen Sensitivität sind nachstehend zusammengefasst.

Beschreibung des <i>B. pertussis</i> -Stamms	KBE/mL	KBE/Test
ATCC BAA-589 (Tahoma I)	3265	1,48

ASSAY-REAKTIVITÄT

Folgende *B. pertussis*-Stämme wurden getestet und produzierten positive Reaktionen mit dem Alethia Pertussis-Assay bei 3265 KBE/mL oder 1,48 KBE/Test: ATCC 12743; ATCC 8478; ATCC 8467; ATCC 9797; ATCC 53894; ATCC 10380; ATCC 12742 und A639. Folgende *B. pertussis*-Stämme wurden getestet und produzierten positive Reaktionen mit dem Alethia Pertussis Test bei 3500 KBE/mL oder 1,59 KBE/Test: ATCC 51445 und ATCC BAA-1335.

REPRODUZIERBARKEIT

Reproduzierbarkeitsstudien wurden in drei der vier teilnehmenden klinischen Einrichtungen durchgeführt. Blindkodierte Panels von 10 Proben wurden an die teilnehmenden Labore gesendet. Die Proben waren innerhalb jedes Panels nach dem Zufallsprinzip gereiht, um die Probenidentität zu maskieren. Die Panels enthielten künstlich hergestellte Proben, die mäßig positiv ($1,31 \times 10^6$ KBE/mL oder 6 KBE/Test), leicht positiv ($4,89 \times 10^5$ KBE/mL oder 2 KBE/Test) und hoch negativ (8,2 KBE/mL oder 0,004 KBE/Test) waren. Das Panel enthielt außerdem eine negative Probe sowie eine positive und negative Kontrolle. Die Tests wurden am selben Tag von verschiedenen Bedienern in jeder Einrichtung (Intra-Assay-Variabilität) fünf Tage lang (Inter-Assay-Variabilität) durchgeführt. In dieser Studie wurden drei Chargen des Alethia Pertussis Tests und sechs Alethia-Instrumente eingesetzt. An jedem Testtag wurden die Positiv- und Negativkontrollen getestet. Die Ergebnisse sind in der Tabelle unten aufgeführt:

Probenotyp	Einrichtung 1		Einrichtung 2		Einrichtung 4		Gesamt	
	Übereinstimmung in Prozent	Übereinstimmung in Prozent	Übereinstimmung in Prozent	Übereinstimmung in Prozent	Übereinstimmung in Prozent	Übereinstimmung in Prozent	Übereinstimmung in Prozent	
Mäßig positiv	30/30	100,0%	30/30	100,0%	30/30	100,0%	90/90	100,0%
Schwach positiv	27/30	90,0%	29/30	96,7%	30/30	100,0%	86/90	95,6%
Stark negativ	26/30	86,7%	23/30	76,7%	29/30	96,7%	78/90	86,7%
Negativ	10/10	100,0%	9/10	90,0%	10/10	100,0%	29/30	96,7%
Negativkontrolle	10/10	100,0%	10/10	100,0%	10/10	100,0%	30/30	100,0%
Positivkontrolle	10/10	100,0%	10/10	100,0%	10/10	100,0%	30/30	100,0%

KREUZREAKTIVITÄT

Kreuzreaktivitätsstudien wurden mit positiven und negativen nasalen Waschproben, die mit bakteriellen oder mykologischen Organismen (Endkonzentration $1,0 \times 10^6$ KBE/mL) oder Viren (mindestens $1,0 \times 10^5$ TCID₅₀/mL), inkuliert waren, durchgeführt. Keiner der folgenden Organismen zeigten im Alethia Pertussis eine Reaktion: *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter lwoffii*, *Actinomyces odontolyticus*, *Arcanobacterium haemolyticum*, *Bacillus subtilis*, *Bacteroides fragilis*, *Bordetella avium*, *Bordetella hinzii*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella petrii*, *Bordetella trematum*, *Burkholderia cepacia*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium difficile*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* (ESBL), *Fusobacterium nucleatum*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae* (KPC), *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Legionella jordanis*, *Legionella longbeachae*, *Legionella micdadei*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Moraxella catarrhalis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria cinerea*, *Neisseria elongata*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Nocardia asteroides*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia liquefaciens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptococcus anginosus* (Gruppe F), *Streptococcus bovis* (Gruppe D), *Streptococcus canis* (Gruppe G), *Streptococcus dysgalactiae* ssp. *dysgalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* ssp. *equisimilis*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus suis*, *Ureaplasma urealyticum*, Adenovirus, Coronavirus, Coxsackievirus, Cytomegalovirus, Epstein Barr Virus, Herpes Simplex Virus 1, Herpes Simplex Virus 2, humanes Metapneumovirus, Influenza A, Influenza B, Masernvirus, Mumpsvirus, Parainfluenzavirus 1, Parainfluenzavirus 2, Parainfluenzavirus 3, Respiratorische-Synzytial-Viren A, Respiratorische-Synzytial-Viren B, Rhinovirus.

B.-bronchiseptica-Stamm 4617 und *B. holmesii* wurden bei $1,0 \times 10^6$ KBE/mL getestet und reagierten mit dem Alethia Pertussis-Assay.

Unerwartete Ergebnisse wurden beobachtet während der ursprünglichen Tests von Proben, die *B. hinzii*, *H. parainfluenzae* und *M. genitalium* enthielten. Eines der drei negativen Probenreplikate, die *B. hinzii* enthielten, lieferte ein falsch positives Ergebnis, das nicht durch weitere Untersuchungen bestätigt wurde (20/20 Replikate). Drei der drei negativen Probenreplikate, die *H. parainfluenzae* enthielten, lieferten falsch positive Ergebnisse, die nicht durch weitere Untersuchungen bestätigt wurden (20/20 Replikate). Drei der drei *B. pertussis*-positiven Probenreplikate lieferten ungültige Ergebnisse, die nicht durch weitere Untersuchungen bestätigt wurden (10/10 Replikate). Drei der drei negativen Probenreplikate, die *M. genitalium* enthielten, lieferten ungültige Ergebnisse, die nicht durch weitere Untersuchungen bestätigt wurden (10/10 Replikate). Da wiederholte Untersuchungen mit einer erhöhten Anzahl von Replikaten die ursprünglichen Ergebnisse nicht bestätigten, werden *B. hinzii*, *H. parainfluenzae* und *M. genitalium* nicht als kreuzreaktive oder Störsubstanzen für den Alethia-Pertussis-Test erachtet.

STÖRSUBSTANZEN-TESTS

Die folgenden chemischen Substanzen stören in den angegebenen gesättigten Lösungsmittel-/Verdünnungsmittelkonzentrationen die Testergebnisse nicht: Paracetamol (10 mg/mL), Advil® [Ibuprofen (10 mg/mL)], Afrin® Abschwellender Nasenspray [Oxymetazolinhydrochlorid (0,005% w/v)], Albuterolsulfate [Salbutamolsulfate (1% w/v)], Aspirin (5 mg/mL), Coricidin® HBP Tabletten gegen Erkältung und Grippe [Paracetamol (3,26 mg/mL), Chlorpheniraminmaleat (0,02 mg/mL)], Diphenhydramin-HCl (0,25 mg/mL), Erythromycin (2% w/v), Mupirocin (2% w/v), Petroleum Jelly [weißes Petrolat (1% w/v)], Robitussin® gegen Husten+Stauungsgefühl in der Brust Robitussin-DM Hustensirup [Dextromethorphan HBr (0,1 mg/mL), Guaifenesin (1,0 mg/mL)], Suphedrin PE [Phenylephrin-HCl (0,3 mg/mL)], Kochsalzlösung-Nasenspray [Natriumchlorid (0,0065% w/v)], Schnupftabak (1% w/v), Tobramycin (0,6 mg/mL), Vicks® VaporRub® [Camphor (0,48% w/v), Eucalyptusöl (0,12% w/v), Menthol (0,26% w/v)].

Ibuprofen (10 mg/mL) lieferte ungültige Ergebnisse (3/6 Replikate) während der ursprünglichen Untersuchung von künstlichen *B.-pertussis*-Proben. Alle wiederholten Untersuchungen lieferten positive Ergebnisse (10/10 Replikate). Da die ursprünglichen Ergebnisse nicht bestätigt wurden, wird Ibuprofen (10 mg/mL) nicht als Störsubstanz erachtet.

Aspirin störte die Ergebnisse des Alethia Pertussis-Tests bei Konzentrationen über 5 mg/mL.

Die folgenden biologischen Substanzen stören die Testergebnisse in den angegebenen gesättigten Lösungsmittel-/Verdünnungsmittelkonzentrationen nicht: Humane DNA (200 ng/µL), Mucin [Rinder-Submaxillardrüse Typ I-S (1% w/v)], Vollblut (1% v/v).

REFERENCES

- Nagamine K, Hase T, Notoni T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplifications using loop primers. *Mol Cell Probes* 2002; 16:223-29.
- Mori Y, Kitao M, Tomita N, Notoni T. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantitating template DNA. *J Biochem Biophys* 2004; 59:145-47.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2005 CDC Guidelines: Recommended Antimicrobial Agents for the Treatment and Postexposure Prophylaxis of Pertussis. 2005; 54(RR14); 1-16.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2012 Final Pertussis Surveillance Report. 2013; 61(52).
- Klein NP, et al. Waning Protection after Fifth Dose of Acellular Pertussis Vaccine in Children. *N Engl J Med* 2012; 367: 1012-1019.
- Misegades LK, et al. Association of Childhood Pertussis with Receipt of 5 Doses of Pertussis Vaccine by Time Since Last Vaccine Dose, California, 2010. *JAMA* 2012; 308(20): 2126-2132.
- Andre P, et al. Comparison of Serological and Real-Time PCR Assays to Diagnose *Bordetella pertussis* Infection in 2007. *J Clin Micro* 2008; 46(5): 1672-1677.
- Centers for Disease Control and Prevention. Best Practices for Health Care Professionals on the use of Polymerase Chain Reaction (PCR) for Diagnosing Pertussis.
- US Department of Health and Human Services PHS/CDC/NIH. Biosafety in microbiology and biomedical laboratories, Washington DC: US Government Printing Office, 2007.
- CLSI: MM3-A2 Molecular diagnostic methods for infectious disease; approved guideline, 2nd ed. Wayne PA: Clinical Laboratory Standards Institute, 2006.
- Tatti, K., Sparks, K., Boney, K., Tondella, M. Novel Multitarget Real-Time PCR Assay for Rapid Detection of *Bordetella* Species in Clinical Specimens. *J Clin Micro* 2011; 49:4059-4066.



SN11025

REV. 10/18



Manufactured By

Meridian Bioscience, Inc.
Corporate Office
3471 River Hills Drive
Cincinnati, Ohio 45244 USA
Telephone: 513.271.3700
Orders/Customer Service:
800.543.1980
Technical Support Center:
800.343.3858
Information Fax: 513.272.5432
Ordering Fax: 513.271.0124



Authorized Representative

Meridian Bioscience Europe S. r. l.
Via dell'Industria, 7
20020 Villa Cortese, Milano
ITALY
Tel: +39 0331 43 36 36
Fax: +39 0331 43 36 16
Email: info@meridianbioscience.eu
WEB: www.meridianbioscience.com/eur

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




















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

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

INTERNATIONAL SYMBOL USAGE

You may see one or more of these symbols on the labeling/packaging of this product.

Key guide to symbols (Guida ai simboli, Guide des symboles, Guía de símbolos, Zeichenerklärung)

	Use By / Utilizzare entro / Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis	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
	This product fulfills the requirements of Directive 90/79/EEC on in vitro diagnostic medical devices / Questo prodotto soddisfa i requisiti della Direttiva 90/79/CE sui dispositivi medico-diagnostici in vitro / Ce produit répond aux exigences de la Directive 90/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / Este producto cumple con las exigencias de la Directiva 90/79/CE sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Dieses Produkt entspricht den Anforderungen der Richtlinie über In Vitro Diagnostika 90/79/EEG.	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 Probenverdüpfungspuffer befindet
		STERILE R	Sterilization by gamma irradiation / Sterilizzazione con raggi gamma / Sterilisation par irradiation aux rayons gamma / Esterilizado por irradiación gamma / Sterilisation durch Gammastrahlen
REF	Catalogue number / Numero di catalogo / Référence du catalogue / Número de catálogo / Bestellnummer		Do not freeze / Non congelare / Ne pas congeler / No congelar / Nicht Einfrieren
	Consult Instructions for Use / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulter les instructions d'utilisation / Consulte las instrucciones de uso / Gebrauchsanweisung beachten	RoHS	Restriction of Hazardous Substances / Restrizione all'uso di sostanze pericolose / Limitation de substances dangereuses / Restricción de Substancias Nocivas / Beschränkung der Verwendung bestimmter gefährlicher Stoffe
	Manufacturer / Fabricante / Fabricant / Fabricante / Hersteller		Caution, consult accompanying documents / Attention, 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 / Sterilisation par oxyde d'éthylène / Esterilizado por oxidido 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 / Límite 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 / Femminile / 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 / Recycle - no deshecho 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		Heat Treatment Tube / Provetta per il Trattamento Termico / Tube pour le traitement thermique / Tubo de tratamiento de calor / Röhren zur Hitzebearbeitung
TEST	Test Device / Dispositivo test / Dispositif de test / Dispositivo de Prueba / Testgerät		For IVD Performance Evaluation Only / Solamente per valutazione delle prestazioni / Réactif IVD réservé à l'évaluation des performances / Sólo para evaluación del funcionamiento / Nur zur IVD Leistungsbewertung
	Date of manufacture / Data di fabbricazione / Date de fabrication / Fecha de fabricación / Herstellungsdatum		HOT SURFACE: Keep hands away from Hot Surfaces / Superficie calda: tenere le mani lontane dalla superficie calda / 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	Mediu / 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 / Röhren 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 / Tampón de échantillon / Tampón de muestra / Probenpuffer	PRE REAG	Pretreatment Reagent / Reagente di Pretattamento / Réactif de prétraitement / Reactivo de pretreatment / 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		

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.