FOR EXPORT USE ONLY. NOT FOR SALE IN THE USA.

alethia®
Malaria
DNA Amplification Assay

DNA Amplification Assays for the Detection of *Plasmodium sp.*

REF **480925** IVD **Rx Only**

INTENDED USE
The Alethia Malaria DNA amplification assays, performed on the Alethia Incubator/Reader, are qualitative in vitro diagnostic tests for the direct detection of *Plasmodium sp*. DNA in human venous EDTA whole blood specimens from individuals with signs and symptoms of malarial infection. Results from Alethia Malaria assays are intended to be used as an aid in the diagnosis of human malaria infection.

Alethia Malaria assays utilize loop-mediated isothermal DNA amplification (LAMP) technology to detect *Plasmodium sp*. DNA by targeting segments of the *Plasmodium* genome. Alethia Malaria assays do not distinguish between *Plasmodium* species.

Alethia Malaria is intended for use in hospital, reference or state laboratory settings. The devices are not intended for nonlaboratory point-of-care use.

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST
The Alethia Malaria molecular assays are based on loop-mediated amplification (LAMP)[1, 2] technology. The assays target a region of the *Plasmodium* genome that is conserved across *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, and *Plasmodium knowlesi*. The Alethia Malaria assays target a 214 base pair (bp) sequence of a *Plasmodium sp*. mitochondrial DNA noncoding region.

Loop-mediated amplification uses specially designed primers to provide for specific and continuous isothermal DNA amplification. A by-product of amplification is 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 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 Malaria kit includes Alethia Malaria Test Devices, Sample Preparation Apparatus IV (SMP PREP IV), Alethia Buffer I, and tubes. Whole blood specimens are first treated with Buffer I; cells are disrupted and nucleic acids are released. The lysate is added to SMP PREP IV and filtered into a clean Tube I by gently squeezing. Sample effluent collected after filtration contains nucleic acids for use with the Alethia Malaria Test Device.

The Alethia Malaria Test Device contains one lyophilized amplification reagent bead in each of two chambers: a TEST chamber with *Plasmodium sp*.-specific primers and a CONTROL chamber with human mitochondrial DNA-specific primers. Human mitochondrial DNA in whole blood samples and the human mitochondrial DNA-specific primers in the Test Device CONTROL chambers function as the Internal Control for the assay. During specimen preparation, human mitochondrial DNA is extracted with the *Plasmodium sp.* mitochondrial DNA to allow for parallel processing of target DNA and Control DNA through amplification and detection. The Internal Control monitors DNA extraction, amplification inhibition, assay reagent performance and sample processing effectiveness. The Control target must be amplified and detected in the final reaction or the test is considered invalid and results are not reported.

The Alethia Incubator/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 Incubator/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 70% are reported as 'POSITIVE'; TEST chamber S_f:S_i ratios greater than or equal to 70% 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 85% 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 85% 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
Malaria is a public health challenge world-wide, with an estimated 3.2 billion people at risk for infection in 97 countries.[3] The World Health Organization (WHO) estimates 198 million cases occurred in 2013 that led to approximately 584,000 deaths.[3] Malaria is caused by the intracellular parasite *Plasmodium* and is transmitted to humans by female *Anopheles* mosquitoes.[3] Once humans are infected, *Plasmodium* exhibit multiple life stage morphologies for initial growth in liver cells, followed by invasion of red blood cells.[4] *Plasmodium* replicate within red blood cells, causing cell rupture and clinical symptoms of the disease.[4]

There are five *Plasmodium* species known to cause malaria in humans (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, and *Plasmodium knowlesi*), with the majority of infections caused by *P. falciparum* and *P. vivax*. Malaria treatment is dependent on the *Plasmodium* species, clinical status of the patient, and antimicrobial susceptibility.[5] Infections caused by *P. falciparum* and *P. knowlesi* are typically more severe and require rapid treatment.[5]

The WHO recommends diagnostic testing for all individuals with suspected malaria.[3] Thin and thick smear microscopy is currently the gold standard diagnostic method. However, accuracy and precision of microscopy is highly dependent on the technician skill (limit of detection ranging from 4-100 parasites/µL or higher), with false negative and false positive rates between 10-25% and approximately 2-3 fold variability in quantitation.[6, 7, 8] In addition, errors in the *Plasmodium* species identification are common in routine microscopy examination.[8] Immunoassay-based rapid diagnostic tests (RDTs) are also an available diagnostic method. Quality assessment testing performed by the WHO demonstrated that at low parasite densities (200 parasites/µL), only 76% and 42% of available RDTs could detect *P. falciparum* and *P. vivax*, respectively.[3]

The Alethia Malaria assays provide rapid results with higher sensitivity than microscopy and RDTs.

REAGENTS/MATERIALS PROVIDED
The maximum number of tests obtained from this test kit is listed on the outer box.
1. **Alethia Malaria Test Device (item #2875):** Two-chambered device containing lyophilized amplification reagents (DNA polymerase, deoxynucleotide triphosphates) and either *Plasmodium sp.*-specific primers (TEST Chamber) or human mitochondrial DNA-specific primers (CONTROL Chamber)**.**
2. **Alethia Buffer I (item #2932-02)**: Lysis solution containing 0.2N sodium hydroxide.
3. **Alethia Sample Preparation Apparatus IV (SMP PREP IV) (item # 2824-02):** Tris-buffer solution containing 0.09% azide as a preservative.
4. **Alethia Tube I (item # 2337):** 1.5 mL tubes

MATERIALS PROVIDED SEPARATELY
1. Alethia Malaria External Control Kit, Meridian Bioscience, Inc. Catalog Number: 479970

MATERIALS NOT PROVIDED
1. Disposable latex gloves, powder free
2. DNase/RNase-free, aerosol resistant pipette tips
3. Blood collection tubes with EDTA anticoagulant

EQUIPMENT NOT PROVIDED
1. Interval Timer
2. Vortex mixer (optional)
3. Micropipette capable of dispensing 50 µL
4. Alethia Incubator/Reader, Meridian Bioscience, Inc. Catalog Number: 610189

PRECAUTIONS
1. All reagents are for in vitro diagnostic use only.
2. Do not interchange kit reagents and Test Devices between lots. Individual lots of Tube I and ST Tubes are interchangeable within each kit type provided they are within the assigned expiration date when used.
3. The Alethia Incubator/Reader may produce incorrect results if the Malaria assay program is not used for testing.
4. 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.
5. Wear disposable gloves while handling specimens and thoroughly wash hands afterwards.
6. Quality Control Programs for Molecular Testing Laboratories, including proper use and care of equipment, should be employed.[10]
7. The Alethia Malaria Test Devices contain lyophilized reagents. The protective pouches should not be opened until ready to perform the assay.
8. The Alethia Malaria Test Devices include a latch feature that is designed to prevent contamination of the test area with amplification product. Do NOT use Test Devices with broken latches.
9. Dispose of used Alethia Malaria Test Devices and tubes immediately after processing. Leave the Test 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.
10. Any serious incident that has occurred in relation to the device should be reported to Meridian Bioscience, Inc., 3471 River Hills Drive, Cincinnati, Ohio 45244 USA or Technical Support Center 800.343.3858 and competent authority of the EU Member State in which the clinician and/or patient is established.
11. IMPORTANT: See SDS for additional safety and hazard information.

HAZARD AND PRECAUTIONARY STATEMENTS

Buffer I	**Signal Word** Warning **Hazard Statements** H315 – Causes skin irritation H319 – Causes serious eye irritation **Precautionary Statements - EU (§28, 1272/2008)** P280 – Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection

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 (19-30 C) before use. Ensure Buffer I has been warmed to room temperature completely prior to use and no precipitate is visible. Incorrect results may be obtained if reagents are not brought to room temperature prior to use.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION
Sample type: Human venous whole blood samples with EDTA as a preservative.

Sample Collection: Venous whole blood samples should be collected into a specimen tube containing EDTA according with institutional guidelines for collection of clinical specimens for malaria infection. Ensure the blood collection tube is inverted immediately after collection at least 8 times, or according to the manufacturer's instructions.

EDTA venous whole blood samples may be stored at 2-30 C after collection and during transportation to the laboratory. Samples should be tested as soon as possible, but may be stored for up to 7 days at room temperature (19-30 C) or up to 14 days refrigerated (2-8 C) prior to testing. Samples that will not be tested within this time frame should be frozen immediately at -20 C for up to 30 days until tested. Samples may be frozen and thawed 2 times after storage at -20 C prior to testing with the Alethia Malaria assays.

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

NOTE: Ensure specimens are at room temperature (19-30 C) before specimen preparation.

1. **Alethia Malaria Specimen Preparation**
   a. Invert EDTA whole blood specimen 2-3 times to mix.
   b. Add 50 µL of the collected venous whole blood sample (with EDTA) to one tube of Buffer I. Mix by inversion 5 times or by vortexing for approximately 10 seconds. Hold the sample for 2 minutes.
   c. Mix by inversion 5 times or by vortexing for approximately 10 seconds and immediately transfer 50 µL of lysate into SMP PREP IV. Mix by inversion 5 times or by vortexing for 10 seconds.
   d. Gently squeeze the SMP PREP IV and slowly collect 5 to 10 drops into a clean Tube I. Visually verify that the eluate is tinted red to reddish brown. Label the tube with the specimen identification and proceed to the Test Procedure.

TEST PROCEDURE
NOTE: A maximum of 10 samples can be processed in a single Alethia Incubator/Reader run.
1. Remove 1 Alethia Malaria Test Device from its protective pouch per sample. Carefully open the device by lifting the latch, holding the chambers such that the lyophilized reagents will not fall out upon opening. Place the device on a flat surface or in a rack that can accommodate the device.
2. Using a micropipette, transfer 50 µL of the sample to both the TEST (Left/White Bead) and CONTROL (Right/Yellow Bead) chambers of the Alethia Malaria Test. Take care to not introduce air to the reaction mixture. Do not mix reactions with pipette.
3. Close the Alethia Test Device and fasten the latches securely.
4. Tap device(s) on the bench top or mix to remove air bubbles. Carefully examine the Test Device(s) 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. Repeat Test Procedure Steps for all samples to be tested.
6. Insert the Alethia Test Devices into the Alethia Incubator/Reader and initiate run **using the Malaria Program.** Results will be displayed at the conclusion of the run.

INTERPRETATION OF RESULTS

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

QUALITY CONTROL

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

1. Each device contains an internal control that controls for amplification inhibition, assay reagents, DNA preparation, and sample processing effectiveness. Human mitochondrial DNA, which serves as the internal control DNA, is isolated from the whole blood sample and processed through all steps of the procedure. Primers for amplification of internal control DNA are present in the Control Chamber of the Alethia Test Device.
2. 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.
3. Alethia Malaria External Positive Control Reagent is supplied separately (Catalog 479970). Alternatively, previously characterized clinical or contrived *Plasmodium sp*. positive blood samples can be used as an external positive control. A qualified negative human whole blood sample with EDTA may be used as an external negative control. It is recommended that the reactivity of each new lot and each new shipment of Alethia Malaria be verified on receipt and before use. External control tests should be performed thereafter in accordance with appropriate federal, state and local guidelines. The Alethia Malaria test kit should not be used in patient testing if the external controls do not produce the correct results.
4. A separate Test Device must be used for each external control reagent.

EXPECTED VALUES

The incidence of *Plasmodium sp.* as detected by the Alethia Malaria assay during the 2015 clinical study was 68.1% (147/216) using the Alethia Malaria sample preparation method. The overall incidence of each *Plasmodium* species is provided below.

Prevalence by *Plasmodium* species		
	Alethia Malaria (n=216)	
Species	**Total Positive**	**Prevalence**
P. falciparum	137	63.4%
P. vivax	0	0%
P. ovale	1	0.5%
P. malariae	1	0.5%
P. knowlesi	0	0%
Unknown*	8	3.7%

*Samples were negative by microscopy and therefore species could not be determined.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

1. This product can only be used with the Alethia Incubator/Reader instrument.
2. Alethia Malaria do not distinguish between *Plasmodium* species.
3. Hematocrit (> 57.5%) and hemoglobin (> 30 g/dL) above normal physiological levels may produce invalid results with the Alethia Malaria assays.
4. Performance of the Alethia Malaria assays has not been established for packed red blood cell specimens.
5. Performance of *Plasmodium knowlesi* with the Alethia Malaria assay was established using purified genomic DNA only; whole organism testing was not performed.
6. Alethia Malaria are qualitative assays and do not provide quantitative values or information about organism load.
7. The detection of nucleic acids 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.
8. Organism nucleic acid may persist in vivo, independent of organism viability. Alethia Malaria do not distinguish between viable and nonviable organisms.
9. 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.

SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The performance characteristics of the Alethia Malaria DNA Amplification Assays were established in clinical studies conducted in November 2015 in Senegal, Africa. Performance characteristics of the assay were compared to the reference method, thin and thick film microscopy. *Plasmodium* species identification for all positive samples was determined by microscopy.

Samples included prospective and retrospective venous whole blood specimens with EDTA from patients with signs and symptoms of *Plasmodium* infection. A total of 216 eligible, de-identified whole blood specimens were evaluated. 66 specimens were tested prospectively and 150 specimens were prospectively-collected and stored frozen prior to testing by the Alethia Malaria assay (retrospective). Each specimen was prepared by Alethia Malaria sample preparation methods. All samples were tested prospectively by microscopy.

Analysis of assay performance with prospective and retrospective specimens indicated there is no difference in performance for fresh and frozen specimens with the Alethia Malaria assays. The tables below summarize the performance of the Alethia Malaria DNA Amplification Assays for both prospective and retrospective samples combined.

Alethia Malaria Performance Compared to Microscopy

		Microscopy			Alethia	Performance			
		Pos	Neg	Total	INV[a]				95% CI
Alethia Malaria	Pos	139	8	147	0(1)	Sensitivity	100.0%	139/139	97.3-100.0%
	Neg	0	67	67	2(2)	Specificity	89.3%	67/75	80.3-94.5%
	Total	139	75	214	2				

[a]Initial invalid results are reported within the parentheses. The final number of invalid samples remaining after repeat testing is shown before the parenthesis.

Samples were collected from patients ranging in age from 4 to 77 years. 15 were between 1 – 12 years of age; 75 were between 13 – 21 years of age; 125 were ≥ 22 years old; the age of one patient was not defined. There was no noted performance difference based on age. The study population included 84 (38.9%) female and 131 (60.6%) male patients; the gender of one patient was not defined. There is no expectation that assay performance is influenced by gender.

ANALYTICAL SENSITIVITY

Limit of Detection (LoD) was determined using *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. The LoD was confirmed using 20 replicates and a stated probability (eg, 95%, where 19/20 replicates are positive) of obtaining positive responses.

	Alethia Malaria
***Plasmodium* Species**	**Parasites/µL**
P. falciparum (3D7)	2
P. vivax (India VII)	0.125

ASSAY REACTIVITY

Quantified stocks of *P. malariae*, *P. ovale*, and *P. knowlesi* DNA were diluted in negative whole blood to approximately three times the limit of detect for Alethia Malaria sample preparation method (approximately 72 copies/µL or 6 parasites/µL). All species reacted at the concentrations tested.

REPRODUCIBILITY

Reproducibility studies were carried out by three internal laboratories. Blind-coded panels of 10 samples were supplied to participating laboratories. The panels included contrived *Plasmodium falciparum* (strain 3D7) samples manufactured as moderate positive samples, low positive samples, or high negative samples. The panel also included one negative whole blood sample. Testing was performed by at least 2 different operators at each laboratory on the same day (intra-assay variability) for five days (inter-assay variability). Three lots each of Alethia Malaria and 8 Alethia Incubator/Reader instruments were used in this study. External Positive and Negative Controls were tested with each panel; a qualified negative blood sample was used as the Negative Control.

Reproducibility Study Summary: Alethia Malaria Sample Preparation Method								
Sample Type	**Site 1**		**Site 2**		**Site 3**		**Total**	
	Percent Agreement		**Percent Agreement**		**Percent Agreement**		**Percent Agreement**	
Moderate Positive (8 parasites/µL)	30/30	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90	100.0%
Low Positive (2 parasites/µL)	30/30	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90	100.0%
High Negative (0.458 parasites/µL)	30/30	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90	100.0%
Negative	10/10	100.0%	10/10	100.0%	10/10	100.0%	30/30	100.0%
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 STUDIES

Crossreactivity studies employed positive (*P. falciparum* 3D7) and negative whole blood specimens inoculated with bacterial or fungal organisms to a minimum concentration of 1.0×10^6 CFU/mL, virus at a minimum of 1.0×10^5 $TCID_{50}$/mL, or protozoans to a minimum concentration of 1.0×10^5 organims/mL. Where whole organisms were not available, 1.0×10^6 copies/mL for genomic DNA was tested. None of the following organisms or their genetic material reacted with the Alethia Malaria assays:
Babesia microtei, Borrelia burgdorferi, Haemophilus influenza, Klebsiella pneumoniae, Leishmania donovani, Leishmania infantum, Leptospira interrogans, Mycobacterium smegmatis, Salmonella typhi, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus pneumoniae, Treponema pallidum, Trypanosoma cruzi, Trypanosoma rangeli, Vibrio parahaemolyticus, Cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr virus (EBV), Hepatitis B virus, Hepatitis C virus, Herpes simplex virus 1 (HSV 1), HIV-1, Human Papilloma Virus (HPV), and Rubella virus.

The following organisms or their DNA could not be obtained for testing and were evaluated through in silico analysis. None of the following organisms are expected to react with the Alethia Malaria assays based on this analysis:
Anaplasma phagocytophilium, Clostridium botulinum, Orientia tsutsugamushi, Rickettsia conorii, Rickettsia rickettsii, Rickettsia typhi, Chikungunya virus, Dengue virus (types 1-4), West Nile virus, and Yellow Fever virus.

Human genomic DNA was nonreactive at 1.0×10^6 copies/mL.

TESTS FOR INTERFERING SUBSTANCES

Interference testing was performed in the presence of worst-case concentrations of chemical and biological substances introduced directly into contrived low positive (*P. falciparum* 3D7) and negative whole blood samples. No interference was observed with the following substances for either Alethia Malaria sample preparation methods:
Acetaminophen (1 mg/mL), Amoxicillin (0.1 mg/mL), Artesunate (1 mg/mL), Aspirin (1 mg/mL), Atovaquone (0.1 mg/mL), Cephalexin (0.1 mg/mL), Chloroquine (1 mg/mL), Ciprofloxacin (0.1 mg/mL), Clindamycin (1 mg/mL), Doxycycline hydrochloride (1 mg/mL), Erythromycin (0.1 mg/mL), Hydroxychloroquine sulfate (1 mg/mL), Ibuprofen (1 mg/mL), Lumefantrine (1 mg/mL), Mefloquine (1 mg/mL), Primaquine phosphate (1 mg/mL), Proguanil hydrochloride (1 mg/mL), Pyrimethamine (1 mg/mL), Quinine sulfate (1 mg/mL), Sodium Citrate (0.11 M), elevated Bilirubin (> 0.15 mg/mL), elevated leukocytes (buffy coat) > 10% v/v), serum albumin (> 0.03 g/mL), and triglycerides (> 9.9 mg/mL).

Hematocrit (> 57.5%) and hemoglobin (> 30 g/dL) above normal physiological levels may produce invalid results with the Alethia Malaria assays.

ITALIANO

alethia®
Malaria
DNA Amplification Assay

Test di amplificazione del DNA per il rilevamento di *Plasmodium spp.*

REF **480925** IVD **Rx Only**

FINALITÀ D'USO
I test di amplificazione del DNA Alethia Malaria condotti sullo strumento Alethia Incubatore/Lettore, sono test diagnostici in vitro di tipo qualitativo per il rilevamento diretto di DNA di *Plasmodium spp.* in campioni ematici di sangue intero venoso in EDTA provenienti da individui con segni e sintomi di infezione malarica. I risultati ottenuti con i test Alethia Malaria sono destinati ad essere usati come ausilio nella diagnosi di infezione da malaria nell'uomo.

I test Alethia Malaria utilizzano la tecnologia LAMP (amplificazione isotermica del DNA loop-mediata) per rilevare il DNA di *Plasmodium spp.* attraverso l'identificazione di segmenti del genoma del *Plasmodium*. I test Alethia Malaria non distinguono tra le diverse specie di *Plasmodium*.

I test Alethia Malaria sono destinati all'uso in ambito ospedaliero o in laboratori statali o di riferimento. Questi dispositivi non sono destinati all'uso ambulatoriale, al di fuori del laboratorio.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST
I test molecolari Alethia Malaria si basano sulla tecnologia LAMP (amplificazione isotermica del DNA loop-mediata).[1, 2] Il test identifica una regione del genoma di *Plasmodium* comune a *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium knowlesi*. La sequenza bersaglio del test Alethia Malaria è una sequenza di 214 paia di basi (bp) di una regione non codificante del DNA mitocondriale di *Plasmodium spp*.

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

Il kit Alethia Malaria include i Dispositivi Test Alethia Malaria, l'Apparato di Preparazione dei Campioni IV (SMP PREP IV), il Tampone I Alethia e le provette. I campioni di sangue intero vengono innanzitutto trattati con il Tampone I; questo causa la lisi delle cellule e il rilascio degli acidi nucleici. Il lisato viene aggiunto all'apparato SMP PREP IV e filtrato in una Provetta I pulita tramite una leggera compressione. L'eluato del campione ottenuto dopo la filtrazione contiene gli acidi nucleici da usare con il Dispositivo Test Alethia Malaria.

Il Dispositivo Test Alethia Malaria contiene un granulo liofilizzato di reagente di amplificazione in ognuna delle due camere: una camera del TEST con primer specifici per *Plasmodium spp.* e una camera del CONTROLLO con primer specifici per DNA mitocondriale umano. Il DNA mitocondriale umano nei campioni di sangue intero e i relativi primer specifici presenti nelle camere CONTROLLO dei dispositivi test fungono da controllo interno del test. Nel corso della preparazione del campione, il DNA mitocondriale umano è estratto con il DNA mitocondriale di *Plasmodium spp.* per consentire il trattamento parallelo del DNA bersaglio e del DNA di controllo nell'ambito dell'amplificazione e del rilevamento. Il controllo interno esegue un monitoraggio sull'estrazione del DNA, sull'inibizione dell'amplificazione, sulle prestazioni del reagente analitico e sull'efficacia del trattamento del campione. Il target del controllo deve essere amplificato e rilevato nella reazione finale, altrimenti il test è considerato non valido e i risultati non vengono refertati.

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

I valori stabiliti di cut-off per la provetta TEST sono utilizzati per refertare i risultati del campione. I rapporti S_f:S_i della provetta TEST inferiori all'70% sono refertati come "POSITIVI"; i rapporti S_f:S_i della provetta TEST superiori o pari all'70% sono refertati come "NEGATIVI". *I valori numerici non sono riportati.*

I valori stabiliti di cut-off per la provetta CONTROLLO sono utilizzati per determinare la validità. I rapporti S_f:S_i della provetta CONTROLLO inferiori al 85% sono considerati validi e consentono di refertare i risultati della provetta TEST (POSITIVO, NEGATIVO). I rapporti S_f:S_i della provetta CONTROLLO superiori o pari al 85% sono considerati non validi e impediscono di refertare i risultati della provetta TEST. Le reazioni della provetta CONTROLLO non valide sono riportate come "NON VALIDE". *I valori numerici non sono riportati.*

Per la reazione della provetta 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
Con 3,2 miliardi di persone stimate a rischio di contrarre l'infezione in 97 paesi, la malaria pone un serio rischio per la salute pubblica in tutto il mondo.[3] Secondo la stima dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) sono stati 198 milioni i casi nel 2013, con circa 584.000 decessi.[3] La malaria è causata da un parassita intracellulare chiamato *Plasmodium* che viene trasmesso all'uomo dalla zanzara femmina del genere *Anopheles*.[3] Una volta infettato l'organismo, il parassita *Plasmodium* presenta un ciclo vitale con varie morfologie, con una fase iniziale in cui invade gli epatociti e una fase successiva in cui infetta i globuli rossi.[4] Nei globuli rossi, il *Plasmodium* si moltiplica, portando alla rottura dei globuli stessi e all'insorgenza dei sintomi clinici della malattia.[4]

Esistono 5 specie di *Plasmodium* che possono infettare l'uomo (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi*), con la maggior parte delle infezioni attribuibili a *P. falciparum* e *P. vivax*. Il trattamento della malaria dipende dalla specie di *Plasmodium* che ha causato l'infezione, dallo stato clinico del paziente e dalla sua suscettibilità antimicrobica.[5] Le infezioni da *P. falciparum* e *P. knowlesi* sono di solito più gravi e richiedono un intervento tempestivo.[5]

L'OMS raccomanda di effettuare un test diagnostico laddove si sospetti un caso di malaria.[3] La diagnosi microscopica con striscio ematico sottile e con goccia spessa rappresenta attualmente il metodo diagnostico di riferimento. Tuttavia, la precisione e l'accuratezza della tecnica microscopica dipendono in larga misura dalle competenze tecniche di chi effettua il test (con il limite di rilevabilità che va da un minimo di 4 a 100 parassiti/µL o più), con tassi di falsi negativi e falsi positivi tra il 10 e il 25% e una variabilità nella quantificazione di circa 2-3 volte.[6, 7, 8] In aggiunta, gli errori nell'identificazione della specie di *Plasmodium* sono comuni negli esami microscopici di routine.[8] I test immunologici rapidi (RDT) rappresentano un metodo di diagnosi alternativo. I test di valutazione qualitativa eseguiti dall'OMS hanno dimostrato che a basse densità parassitarie (200 parassiti/µ), solo il 76% e il 42% dei test RDT disponibili erano in grado di rilevare, rispettivamente, *P. falciparum* e *P. vivax*.[3]

I test Alethia Malaria forniscono risultati rapidi con una sensibilità superiore rispetto alla microscopia e ai test RDT.

REAGENTI/ MATERIALI FORNITI
Il numero massimo di analisi eseguibili con questo kit è indicato sulla confezione esterna.
1. **Dispositivo Test Alethia Malaria (articolo # 2875):** dispositivo a due camere contenente i reagenti di amplificazione liofilizzati (DNA polimerasi, deossinucleotidi trifosfato) e i primer specifici per *Plasmodium spp.* (camera del TEST) o i primer specifici per il DNA mitocondriale umano (camera del CONTROLLO).
2. **Tampone I Alethia (articolo #2932-02):** soluzione di lisi contenente idrossido di sodio 0,2 N.
3. **Apparato di Preparazione dei Campioni IV Alethia (SMP PREP IV) (articolo #2824-02):** soluzione tampone Tris contenente azide (0,09%) come conservante.
4. **Provetta I Alethia (articolo #2337):** provette da 1,5 mL

MATERIALI FORNITI SEPARATAMENTE
1. Kit di controllo esterno Alethia Malaria, Meridian Bioscience, Inc., Numero di Catalogo: 479970

MATERIALI NON FORNITI
1. Guanti in lattice monouso, senza talco
2. Puntali con filtro per pipetta di precisione privi di DNase/RNase e resistenti alla contaminazione da aerosol
3. Provette per la raccolta di sangue con EDTA come anticoagulante

STRUMENTI NON FORNITI
1. Timer
2. Vortex (opzionale)
3. Micropipetta in grado di erogare 50 µL
4. Incubatore/Lettore Alethia, Meridian Bioscience, Inc. Numero di catalogo: 610189

PRECAUZIONI
1. Tutti i reagenti sono esclusivamente per uso diagnostico in vitro.
2. Non mischiare i reagenti di controllo e i dispositivi di test di lotti diversi. I singoli lotti di Provette I e Provette ST sono intercambiabili nell'ambito di ciascun tipo di kit purché non vengano usati oltre la data di scadenza indicata.
3. Se non viene utilizzato il programma per il test Malaria, l'Incubatore/Lettore Alethia produce un risultato non corretto.
4. Adottare 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
5. Indossare guanti monouso per la manipolazione dei campioni e subito dopo lavarsi a fondo le mani.
6. Applicare i programmi di controllo qualità per i laboratori di analisi molecolari che comprendano impiego e manutenzione adeguati dell'apparecchiatura.[10]
7. Il Dispositivo Test Alethia Malaria contiene reagenti liofilizzati. Le buste protettive non devono essere aperte fino a quando non si è pronti a eseguire il test.
8. I Dispositivi Test Alethia Malaria sono dotati di un sistema di chiusura ideato per prevenire la contaminazione dell'area di analisi con il prodotto di amplificazione. NON utilizzare Dispositivi Test con linguette di chiusura rotte.
9. Smaltire ed i Dispositivi Test Alethia Malaria immediatamente dopo l'utilizzo. Lasciare in posizione la linguetta di chiusura del dispositivo di test. NON aprire il Dispositivo Test dopo l'elaborazione. L'apertura del dispositivo dopo l'amplificazione può comportare la contaminazione dell'area di analisi con il prodotto di amplificazione.
10. Qualsiasi incidente grave verificatosi in relazione al dispositivo deve essere segnalato a Meridian Bioscience, Inc., 3471 River Hills Drive, Cincinnati, Ohio 45244 USA o al Centro di assistenza tecnica al numero 1-800-343-3858 e all'autorità competente dello Stato membro dell'UE in cui si trovano il medico e/o il paziente.
11. IMPORTANTE: per ulteriori informazioni sulla sicurezza e sui pericoli, consultare la SDS.

DICHIARAZIONI DI PERICOLO E PRUDENZA

 Buffer I	**Segnalazione** Avvertenze **Indicazioni di Pericolo** H315 – Provoca irritazione cutanea H319 – Provoca grave irritazione oculare **Consigli di Prudenza – UE (§28, 1272/2008)** P280 – Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso

STABILITÁ 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 (19-30 C) prima dell'uso. Assicurarsi che il Tampone I sia a temperatura ambiente prima dell'uso e che non vi siano precipitati visibili. 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: campioni di sangue intero venoso umano con EDTA come conservante.

Prelievo del campione: i campioni di sangue intero venoso vanno prelevati usando le provette per campione contenenti EDTA, conformemente a quanto stabilito dai protocolli istituzionali in merito al prelievo di campioni clinici ai fini del rilevamento di un'infezione malarica. Capovolgere la provetta di sangue immediatamente dopo il prelievo almeno 8 volte o secondo le istruzioni del fabbricante.

In seguito al prelievo e durante il trasporto in laboratorio, è opportuno conservare i campioni di sangue intero venoso in EDTA a una temperatura compresa tra 2 e 30 C. I campioni devono essere analizzati tempestivamente, ma prima dell'analisi possono essere conservati per un massimo di 7 giorni a temperatura ambiente (19-30 C) o fino a 14 giorni in frigorifero (2-8 C). I campioni che non vengono analizzati nell'arco di tale periodo vanno congelati immediatamente a -20 C per un massimo di 30 giorni fino al momento dell'analisi. Dopo averli conservati a -20 C, i campioni possono essere congelati e scongelati al massimo 2 volte prima dell'analisi con il test Alethia Malaria.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI
NOTA: assicurarsi che l'Incubatore/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 d'Uso di Alethia Incubator/Reader per ulteriori informazioni sulla configurazione e sul funzionamento dello strumento.

NOTA: accertarsi che i campioni siano a temperatura ambiente (19-30 C) prima della preparazione.

1. **Preparazione dei campioni per il test Alethia Malaria**
   a. Capovolgere 2-3 volte il campione di sangue intero con EDTA per miscelarlo.
   b. Aggiungere 50 µL di sangue intero venoso con EDTA del paziente a una provetta di Tampone I. Miscelare capovolgendo 5 volte oppure su vortex per circa 10 secondi. Lasciare incubare il campione per 2 minuti.
   c. Miscelare capovolgendo 5 volte oppure su vortex per circa 10 secondi e trasferire immediatamente 50 µL di lisato nell'Apparato di Preparazione dei Campioni SMP PREP IV. Miscelare capovolgendo 5 volte oppure su vortex per circa 10 secondi.
   d. Premere delicatamente l'apparato SMP PREP IV e trasferire lentamente 5-10 gocce in una Provetta I pulita. Verificare in modo visivo che l'eluato abbia un colore da rosso a rossiccio-marrone. Etichettare la provetta con le informazioni identificative del campione e proseguire con la procedura di test.

PROCEDURA DEL TEST
NOTA: Con l'Incubatore/Lettore Alethia è possibile analizzare un massimo di dieci campioni per singola seduta.
1. Rimuovere dalla relativa busta protettiva un Dispositivo Test Alethia Malaria per ogni campione. Aprire con attenzione il dispositivo sollevando il fermo, tenendo le camere in maniera tale che i reagenti liofilizzati non fuoriescano dall'apertura. Collocare il dispositivo su una superficie piatta o su un supporto in grado di contenerlo.
2. Con una micropipetta, trasferire 50 µL di campione nelle due camere del TEST (Sinistra/microsfera bianca) e del CONTROLLO (Destra/microsfera gialla) del Dispositivo Test Alethia Malaria. Fare attenzione a non introdurre aria nella miscela di reazione. Non miscelare la soluzione di reazione con la pipetta.
3. Chiudere il Dispositivo Test Alethia e chiudere saldamente la linguetta di chiusura.
4. Picchiettare il Dispositivo o i Dispositivi sul bancone o agitarli per rimuovere le bolle d'aria. Esaminare attentamente il Dispositivo o i Dispositivi Test per verificare la dissoluzione della microsfera di controllo/test e per escludere la presenza di bolle d'aria residue nella camera così come di liquido nella parte superiore del dispositivo. Se si notano microsfere non disciolte, bolle d'aria o liquido nella parte superiore del dispositivo, picchiettare il dispositivo sul bancone e ripetere l'ispezione visiva. L'amplificazione e il rilevamento devono iniziare entro 15 minuti.
5. Ripetere i passaggi della procedura di test per tutti i campioni da analizzare.
6. Inserire i Dispositivi Test Alethia nell' Incubatore/Lettore Alethia e avviarlo impostando il **programma per la malaria**. I risultati saranno visualizzati al completamento della seduta.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

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

CONTROLLO QUALITÀ

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

1. Ogni dispositivo contiene un controllo interno che verifica l'inibizione dell'amplificazione, i reagenti di analisi, la preparazione del DNA e l'efficacia del trattamento del campione. Il DNA mitocondriale umano, che funge da DNA di controllo interno, è isolato a partire dal campione di sangue intero e viene processato facendolo passare per tutte le fasi della procedura. I primer per l'amplificazione del DNA di controllo interno sono presenti nella Camera di Controllo del Dispositivo Test Alethia.
2. La buona pratica di laboratorio raccomanda l'uso di materiali di controllo. Gli operatori devono attenersi alle pertinenti linee guida federali, statali e locali relative all'utilizzo di controlli di qualità esterni.
3. Il Reagente di Controllo Positivo Esterno Alethia Malaria è disponibile separatamente (Numero di Catalogo 479970). In alternativa, campioni di sangue clinici caratterizzati come positivi a *Plasmodium spp.* o preparati artificialmente possono essere utilizzati come controlli esterni positivi. Come controllo esterno negativo è possibile utilizzare un campione di sangue umano intero con EDTA, precedentemente caratterizzato come negativo. Al momento della ricezione e prima dell'utilizzo, si raccomanda di verificare la reattività di ogni nuovo lotto e di ogni nuova spedizione del test Alethia Malaria. I test di controllo esterni vanno eseguiti successivamente, in conformità con le linee guida statali e locali vigenti in materia. Il kit del test Alethia Malaria non va utilizzato per l'analisi dei pazienti se i controlli esterni non producono risultati corretti.
4. Occorre utilizzare un Dispositivo Test separato per ciascun reagente di controllo esterno.

VALORI ATTESI

L'incidenza di *Plasmodium spp.* secondo quanto rilevato con il test Alethia Malaria nel corso della sperimentazione clinica condotta nel 2015 è stata del 68.1% (147/216) usando il metodo di preparazione del campione Alethia Malaria. L'incidenza complessiva di ciascuna specie di *Plasmodium* è riportata di seguito.

Prevalenza per specie di *Plasmodium*		
	Alethia Malaria (n=216)	
Specie	**Totale positivo**	**Prevalenza**
P. falciparum	137	63.4%
P. vivax	0	0%
P. ovale	1	0.5%
P. malariae	1	0.5%
P. knowlesi	0	0%
Sconosciuto*	8	3.7%

*I campioni sono risultati negativi al microscopio a di conseguenza la speciazione non può essere effettuata.

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

1. Questo prodotto può essere usato esclusivamente con lo strumento Alethia.
2. I test Alethia Malaria non distinguono le diverse specie di *Plasmodium*.
3. Livelli di ematocrito (> 57.5%) e di emoglobina (> 30 g/dL) superiori ai normali livelli fisiologici possono produrre risultati non validi con i test Alethia Malaria.
4. Le prestazioni dei test Alethia Malaria non sono state determinate per i campioni di eritrociti concentrati.
5. Le performance di *Plasmodium knowlesi* con i test Alethia Malaria sono state valutate usando solo DNA genomico purificato; non sono stati effettuati test sull'intero organismo.
6. I test Alethia Malaria sono test qualitativi che non forniscono valori quantitativi né informazioni sul carico dell'organismo.
7. Il rilevamento dell'acido nucleico bersaglio 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.
8. È possibile che gli acidi nucleici degli organismi persistano in vivo indipendentemente dalla vitalità degli organismi stessi. I test Alethia Malaria non distinguono tra organismi vitali e non vitali.
9. Come per tutti i test diagnostici molecolari vale quanto segue: (A) i risultati Falsi negativi possono verificarsi in presenza di inibitori, errori tecnici, scambio di campioni o basso numero di organismi nel campione clinico; (B) i risultati Falsi positivi possono verificarsi in presenza di contaminazione crociata da parte degli organismi bersaglio, dei rispettivi acidi nucleici o del prodotto di amplificazione, nonché di segnali aspecifici.

PRESTAZIONI SPECIFICHE

Le caratteristiche prestazionali dei test di amplificazione del DNA Alethia Malaria sono state determinate nel corso di sperimentazioni cliniche condotte nel novembre 2015 in Senegal, Africa. Le caratteristiche prestazionali del test sono state confrontate con il metodo di riferimento, cioè la microscopia a striscio sottile e a goccia spessa. L'identificazione della specie di *Plasmodium* per tutti i campioni positivi è stata effettuata mediante microscopia.

I campioni comprendevano campioni di sangue intero venoso con EDTA prospettici e retrospettivi provenienti da pazienti che manifestavano segni e sintomi di infezione da *Plasmodium*. Sono stati valutati complessivamente 216 campioni idonei di sangue intero resi anonimi. 66 campioni sono stati valutati in maniera prospettica mentre 150 campioni sono stati prelevati in modo prospettico e congelati prima di essere analizzati con il test Alethia Malaria (retrospettivo). Ciascun campione è stato analizzato con entrambi i metodi di preparazione del campione Alethia Malaria. Tutti i campioni sono stati analizzati prospettivamente al microscopio.

L'analisi della prestazioni dei test con i campioni prospettici e retrospettici ha indicato che non esiste alcuna differenza in termini di prestazione tra l'uso di campioni freschi e campioni congelati con i test Alethia Malaria. Le tabelle che seguono riepilogano le prestazioni dei test di amplificazione del DNA Alethia Malaria per i campioni prospettivi e retrospettivi combinati.

Prestazioni del test Alethia Malaria a confronto con la microscopia

		Microscopia			Alethia	Prestazioni			
		Pos	Neg	Totale	INV[a]				95% CI
Alethia Malaria	Pos	139	8	147	0(1)	Sensibilità	100.0%	139/139	97.3-100.0%
	Neg	0	67	67	2(2)	Specificità	89.3%	67/75	80.3-94.5%
	Totale	139	75	214	2				

[a]I risultati inizialmente invalidi sono riportati nelle parentesi. Il numero finale di campioni risultati invalidi dopo la ripetizione del test è mostrato prima della parentesi.

I campioni sono stati raccolti da pazienti di età compresa tra 4 e 77 anni. 15 avevano un'età di 1 – 12 anni; 13 un'età di 13 – 21 anni; 125 un'età di ≥ 22 anni L'età di un paziente non è stata definita. Non è stata notata alcuna differenza nelle prestazioni in base all'età. La popolazione dello studio includeva 84 (38.9%) pazienti di sesso femminile e 131 (60.6%) pazienti di sesso maschile; il sesso di un paziente è rimasto incognito. Non si prevedono differenze nelle prestazioni del test in base al sesso.

SENSIBILITÀ ANALITICA
Il limite di rilevabilità (LoD) è stato determinato usando *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax*. Tale limite è stato determinato utilizzando 20 repliche e una probabilità dichiarata (ad es., 95%, dove 19 repliche su 20 sono positive) di ottenere risposte positive.

	Alethia Malaria
Specie di *Plasmodium*	**Parassiti/µL**
P. falciparum (3D7)	2
P. vivax (India VII)	0.125

REATTIVITÀ ANALISI
Quantità determinate di *P. malariae*, *P. ovale* e di DNA di *P. knowlesi* sono state diluite in sangue intero negativo fino a circa tre volte il limite di rilevabilità per ciascun metodo di preparazione del campione del test Alethia Malaria (approssimativamente 72 copie/µL o 6 parassiti/µL). Alle concentrazioni analizzate, tutte le specie hanno dato segnale positivo.

RIPRODUCIBILITÀ
Tre laboratori interni hanno eseguito studi di riproducibilità. A questi laboratori partecipanti sono stati forniti pannelli di 10 campioni codificati in cieco. I pannelli includevano campioni artificiali di *Plasmodium falciparum* (ceppo 3D7) creati come campioni moderatamente positivi, campioni debolmente positivi o campioni fortemente negativi. Il pannello includeva altresì un campione di sangue intero negativo. L'analisi è stata condotta da almeno 2 diversi operatori in ciascun laboratorio lo stesso giorno (variabilità intra-analisi) per cinque giorni (variabilità inter-analisi). Per lo studio sono stati utilizzati tre lotti ciascuno di test Alethia Malaria e 8 Incubatore/Lettore Alethia. I controlli esterni positivi e negativi sono stati testati con ogni pannello e un campione di sangue negativo qualificato è stato usato come controllo negativo.

Riepilogo dello studio di riproducibilità: metodo di preparazione del campione Alethia Malaria								
Tipo di campione	**Laboratorio 1**		**Laboratorio 2**		**Laboratorio 3**		**Totale**	
	Percentuale di concordanza		**Percentuale di concordanza**		**Percentuale di concordanza**		**Percentuale di concordanza**	
Positivo moderato (8 Parassiti/µL)	30/30	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90	100.0%
Positivo basso (2 Parassiti/µL)	30/30	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90	100.0%
Negativo alto (0.458 Parassiti/µL)	30/30	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90	100.0%
Negativo	10/10	100.0%	10/10	100.0%	10/10	100.0%	30/30	100.0%
Controllo negativo	10/10	100.0%	10/10	100.0%	10/10	100.0%	30/30	100.0%
Controllo positivo	10/10	100.0%	10/10	100.0%	10/10	100.0%	30/30	100.0%

CROSS-REATTIVITÀ
Gli studi sulla reattività crociata hanno fatto uso di campioni di sangue positivi (*P. falciparum* 3D7) e negativi inoculati con organismi batterici o fungini a una concentrazione minima di 1,0 x 10^6 UFC/mL, virus a un minimo di 1,0 x 10^5 $TCID_{50}$/mL o protozoi a una concentrazione minima di 1,0 x 10^5 organismi/mL. Laddove non fossero disponibili organismi interi, si è analizzato il DNA genomico alla concentrazione di 1,0 x 10^6 copie/mL. Nessuno dei seguenti organismi o dei relativi materiali genetici ha reagito con i test Alethia Malaria:
Babesia microtei, Borrelia burgdorferi, Hemophilus influenza, Klebsiella pneumoniae, Leishmania donovani, Leishmania infantum, Leptospira interrogans, Mycobacterium smegmatis, Salmonella typhi, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus pneumoniae, Treponema pallidum, Trypanosoma cruzi, Trypanosoma rangeli, Vibrio parahaemolyticus, citomegalovirus (CMV), virus di Epstein-Barr (EBV), virus dell'epatite B, virus dell'epatite C, virus Herpes simplex 1 (HSV 1), HIV-1, papillomavirus umano (HPV) e virus della rosolia.

Non è stato possibile ottenere gli organismi seguenti, o il relativo DNA, a scopo di analisi e pertanto essi sono stati valutati tramite analisi *in silico*. Sulla base di tale analisi, non si prevede alcuna reazione dei seguenti organismi con il test Alethia Malaria:
Anaplasma phagocytophilium, Clostridium botulinum, Orientia tsutsugamushi, Rickettsia conorii, Rickettsia rickettsii, Rickettsia typhi, virus della malattia di Chikungunya, virus Dengue (tipi 1-4), il virus del Nilo occidentale e il virus della febbre gialla.

Il DNA genomico umano non ha reagito alla concentrazione di 1,0 x 10^6 copie/mL.

ANALISI DI SOSTANZE INTERFERENTI
Il test sull'interferenza è stato condotto in presenza delle concentrazioni peggiori di sostanze chimiche e biologiche introdotte direttamente nei campioni debolmente positivi (*P. falciparum* 3D7) prodotti artificialmente e nei campioni negativi di sangue intero. Per nessuno dei metodi di preparazione del campione Alethia Malaria sono state osservate interferenze con le sostanze seguenti:
acetaminofene (1 mg/mL), amoxicillina (0,1 mg/mL), artesunato (1 mg/mL), aspirina (1 mg/mL), atovaquone (0,1 mg/mL), cefalexina (0,1 mg/mL), clorochina (1 mg/mL), ciprofloxacina (0,1 mg/mL), clindamicina (1 mg/mL), doxiciclina cloridrato (1 mg/mL), eritromicina (0,1 mg/mL), idrossiclorochina solfato (1 mg/mL), ibuprofene (1 mg/mL), lumefantrina (1 mg/mL), meflochina (1 mg/mL), primachina fosfato (1 mg/mL), proguanil cloridrato (1 mg/mL), pirimetamina (1 mg/mL), chinina solfato (1 mg/mL), citrato di sodio (0.11 M), bilirubina elevata (> 0,15 mg/mL), leucociti elevati (buffy coat) > 10% v/v), sieroalbumina (> 0,03 g/mL) e trigliceridi (> 9,9 mg/mL).

Livelli di ematocrito (> 57.5%) e di emoglobina (> 30 g/dL) superiori ai normali livelli fisiologici possono produrre risultati non validi con i test Alethia Malaria.

FRANÇAIS

alethia®
Malaria
DNA Amplification Assay

Tests d'amplification de l'ADN pour la détection d'espèces du genre *Plasmodium*.

REF **480925** IVD **Rx Only**

BUT DE LE METHODE
Les tests d'amplification de l'ADN Alethia Malaria réalisés sur le système Incubateur/Lecteur Alethia sont des tests qualitatifs de diagnostic *in vitro* pour la détection directe d'ADN d'espèces du genre *Plasmodium* dans des échantillons de sang total veineux humain EDTA provenant de personnes présentant des signes et symptômes d'une infection paludéenne. Les résultats des tests Alethia Malaria sont destinés à être utilisés comme aide au diagnostic d'une infection paludéenne chez l'humain.

Les tests Alethia Malaria utilisent la technique d'amplification isotherme de l'ADN facilitée par boucle (LAMP, *loop-mediated isothermal DNA amplification*) pour détecter l'ADN d'espèces du genre *Plasmodium* en ciblant des segments du génome de *Plasmodium*. Les tests Alethia Malaria ne font pas de distinction entre les différentes espèces de *Plasmodium*.

Les tests Alethia Malaria sont destinés à une utilisation dans des laboratoires en milieu hospitalier, de référence, régionaux, privés ou plublics. Les dispositifs ne sont pas prévus pour une utilisation dans une unité de soins hors laboratoire.

RESUME ET EXPLICATION DU TEST
Les tests moléculaires Alethia Malaria reposent sur la technique d'amplification facilitée par boucle (LAMP).[1, 2] Les tests ciblent une région du génome de *Plasmodium* présent chez les espèces suivantes: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* et *Plasmodium knowlesi*. Les tests Alethia Malaria ciblent une séquence de 214 paires de bases (pb) de la région non codante de l'ADN mitochondrial d'espèces du genre *Plasmodium*.

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

Le kit Alethia Malaria inclut des dispositifs de test Alethia Malaria, le système de préparation des échantillons IV (SMP PREP IV), le tampon I Alethia et des tubes. Les échantillons de sang total sont d'abord traités avec le tampon I; les cellules sont lysées libérant des acides nucléiques. Le lysat est alors ajouté au système SMP PREP IV et filtré dans un tube I propre par pression douce. L'effluent de l'échantillon recueilli après la filtration contient les acides nucléiques à utiliser dans le test Alethia Malaria.

Le dispositif de test Alethia Malaria contient une bille de réactif d'amplification lyophilisé dans chacun des deux puits: un puits TEST comprenant des amorces spécifiques des espèces du genre *Plasmodium* et un puits de CONTRÔLE comprenant des amorces spécifiques de l'ADN mitochondrial humain. L'ADN mitochondrial humain dans les échantillons de sang total et les amorces spécifiques de l'ADN mitochondrial humain dans le puits CONTRÔLE du dispositif de test jouent le rôle de contrôle interne du test. Pendant la préparation des échantillons, l'ADN mitochondrial humain est extrait simultanément avec l'ADN mitochondrial des espèces de *Plasmodium* afin de permettre un traitement en parallèle de l'ADN cible et de l'ADN de contrôle lors des étapes d'amplification et de détection. Le contrôle interne permet de surveiller l'extraction de l'ADN, l'inhibition de l'amplification, la performance des réactifs du test et l'efficacité du traitement des échantillons. La séquence cible du contrôle doit être amplifiée et détectée dans la réaction finale. Dans le cas contraire, le test est considéré comme étant non valide et les résultats ne sont pas rendus.

L'instrument incubateur/lecteur 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_i) et à la fin ($Signal_{final}$, S_f) de l'exécution du test. L'instrument incubateur/lecteur Alethia calcule la variation de la transmission de la lumière entre le début et la fin de l'exécution du test (S_f:S_i) 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_f:S_i inférieurs à 70% dans le TEST sont présentés en résultat «POSITIF»; les rapports S_f:S_i supérieurs ou égaux à 70% 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_f:S_i inférieurs à 85% dans le puits CONTRÔLE sont considérés comme valides et conduisent au rendu des résultats du puits TEST (POSITIF, NEGATIF). Les rapports S_f:S_i supérieurs ou égaux à 85% 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
En matière de santé publique, le paludisme (ou malaria) représente un problème à l'échelle mondiale, la population à risque d'infection étant estimée à 3,2 milliards de personnes dans 97 pays.[3] L'Organisation mondiale de la Santé (OMS) estime à 198 millions le nombre de cas en 2013, dont environ 584 000 décès.[3] Le paludisme est provoqué par un parasite intracellulaire du genre *Plasmodium* transmis aux humains par la femelle du moustique du genre *Anopheles*.[3] Après avoir infecté l'humain, le parasite *Plasmodium* passe par de nombreux stades morphologiques, comportant une phase initiale de croissance dans les cellules hépatiques, suivie d'une invasion des globules rouges.[4] *Plasmodium* se réplique ensuite dans les globules rouges, causant leur rupture et les symptômes cliniques de la maladie.[4]

On dénombre cinq espèces du genre *Plasmodium* connues pour provoquer le paludisme chez l'humain (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* et *Plasmodium knowlesi*), la majorité des infections étant causées par *P. falciparum* et *P. vivax*. Le traitement du paludisme dépend de l'espèce *Plasmodium*, de l'état clinique du patient et de sa sensibilité aux antimicrobiens.[5] Les infections causées par *P. falciparum* et *P. knowlesi* sont généralement plus graves et nécessitent un traitement rapide.[5]

L'OMS recommande d'effectuer des tests diagnostiques dès qu'un cas de paludisme est soupçonné[3]. Habituellement, l' examen microscopique d'un frottis mince et d'une goutte épaisse sont la méthode de référence pour le diagnostic de la malaria. Toutefois, l'exactitude et la précision de cet examen microscopique dépendent beaucoup de la compétence du technicien (la limite de détection se situant entre 4 à 100 parasites/µL, voire davantage), avec des taux de faux négatifs et de faux positifs variant entre 10 et 25% et une variabilité de l'analyse quantitative de 2 à 3 fois supérieure.[6, 7, 8]. De plus, les erreurs dans l'identification de l'espèce du genre *Plasmodium* en jeu sont fréquentes lors de l'examen microscopique de routine.[8] Les tests diagnostiques rapides (TDR) par immuno-essai peuvent aussi être utilisés pour le diagnostic. Des analyses de qualité effectuées par l'OMS ont montré qu'à de faibles densités parasitaires (200 parasites/µL), seulement 76% et 42% des TDR disponibles pouvaient respectivement détecter *P. falciparum* et *P. vivax*.[3]

Les tests Alethia Malaria permettent d'obtenir rapidement des résultats d'une plus grande sensibilité que celle des examens de microscopie et des TDR.

MATERIEL FOURNI

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

1. **Dispositif de test Alethia Malaria (article #2875):** dispositif à deux puits contenant des réactifs d'amplification lyophilisés (ADN polymérase, désoxynucléotides triphosphates) et des amorces spécifiques d'espèces de *Plasmodium* (chambre de TEST) ou de l'ADN mitochondrial humain (puits CONTRÔLE).
2. **Tampon I Alethia (article #2932-02):** solution de lyse contenant de l'hydroxyde de sodium à 0,2 N
3. **Système de préparation des échantillons Alethia IV (SMP PREP IV) (article #2824-02):** solution tamponnée au Tris contenant une solution d'azide à 0,09% en tant que conservateur.
4. **Tube I Alethia (article #2337):** tubes de 1,5 mL

MATERIEL FOURNI SEPAREMENT

1. Kit de contrôle externe Alethia Malaria, Meridian Bioscience, référence: 479970

MATERIEL NON FOURNI

1. Gants jetables en latex, non poudrés
2. Embouts de pipettes résistant aux aérosols, sans ADNase/ARNase
3. Tubes de collecte de sang avec anticoagulant EDTA

EQUIPEMENT NON FOURNI

1. Minuteur
2. Agitateur-mélangeur vortex (facultatif)
3. Micropipette pouvant distribuer 50 µL
4. Alethia Incubateur/Lecteur, Meridian Bioscience, Inc. Numéro de référence: 610189

PRECAUTIONS D'EMPLOI

1. Tous les réactifs sont pour un usage diagnostique in vitro.
2. Ne pas mélanger les réactifs et les dispositifs de test appartenant à des lots différents. Les lots individuels de tubes I et de tubes ST sont interchangeables pour chacun des types de kit, à condition de les utiliser avant la date de péremption indiquée.
3. L' Incubateur/Lecteur Alethia peut donner des résultats incorrects si le programme de test Malaria n'est pas utilisé.
4. 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.
5. Porter des gants jetables lors de la manipulation des échantillons. Se laver minutieusement les mains après la manipulation.
6. 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]
7. Les dispositifs de test Alethia Malaria contiennent des réactifs lyophilisés. Ne pas ouvrir les pochettes de protection avant d'être prêt à effectuer le test.
8. Les dispositifs de test Alethia Malaria sont munis 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.
9. Jeter les dispositifs de test Alethia Malaria, les colonnes *M-prep* et les tubes immédiatement après utilisation. Laisser le loquet du dispositif bien en place. NE PAS ouvrir le dispositif de test après le traitement. L'ouverture du dispositif après l'amplification risque de contaminer la zone de test avec le produit d'amplification.
10. Tout incident grave lié au dispositif doit être signalé à Meridian Bioscience, Inc., 3471 River Hills Drive, Cincinnati, Ohio 45244, États-Unis, ou au Centre de service clientèle au 1-800-343-3858 ainsi qu'à l'autorité compétente de l'État membre de l'UE où le du clinicien et/ou le patient sont établis.
11. IMPORTANT: Voir la fiche de sécurité pour des informations supplémentaires concernant la sécurité et les dangers.

DANGER ET MISES EN GARDE

Buffer I	**Mention d'avertissement** Attention **Mentions de danger** H315 – Provoque une irritation cutanée H319 – Provoque une sévère irritation des yeux **Conseils de prudence – UE (§28, 1272/2008)** P280 – Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage

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 (19 C à 30 C) avant leur emploi. S'assurer que le tampon I est à température ambiante avant utilisation et qu'aucun précipité n'est présent. Si les réactifs ne sont pas amenés à la température ambiante avant l'emploi, des résultats incorrects pourraient être observés.

PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Type d'échantillon: Echantillons de sang veineux humain total avec EDTA comme conservateur.

Prélèvement des échantillons: les échantillons de sang veineux total doivent être prélevés dans des tubes pour échantillon contenant de l'EDTA, conformément aux directives de l'établissement relatives à la collecte d'échantillons pour la détection d'infections paludéennes. Veiller à retourner le tube de collecte de sang au moins 8 fois après le prélèvement ou conformément aux instructions du fabricant.

Après leur prélèvement et pendant leur transport vers le laboratoire, les échantillons de sang veineux total EDTA peuvent être conservés entre 2 et 30 C. Les échantillons doivent être analysés dès que possible, mais peuvent être conservés à température ambiante (19 à 30 C) pendant 7 jours maximum ou au réfrigérateur (entre 2 et 8 C) pendant 14 jours maximum avant d'être analysés. Les échantillons non analysés dans ce délai doivent être congelés immédiatement à une température à -20 C jusqu'à 30 jours maximum avant d'être analysés. Avant d'être soumis aux tests Alethia Malaria, les échantillons peuvent être congelés et décongelés 2 fois après avoir été conservés à -20 C.

PREPARATION DES ECHANTILLONS

REMARQUE: S'assurer que l'instrument Incubateur/Lecteur Alethia est sous tension et que les vérifications de performances ont été effectuées avant le début de la PREPARATION DES ECHANTILLONS. Consulter le manuel de l'utilisateur de l' Incubateur/Lecteur Alethia pour obtenir de plus amples renseignements sur l'installation et le fonctionnement de l'appareil.

REMARQUE: S'assurer que les échantillons sont à température ambiante (19-30 C) avant la préparation des échantillons.

1. **Préparation des échantillons Alethia Malaria**
   a. Mélanger l'échantillon de sang total veineux EDTA par 2 à 3 inversions du tube de prélèvement.
   b. Ajouter 50 µL de sang total EDTA de patient à un tube de tampon I. Mélanger en inversant le tube 5 fois ou passer au vortex pendant environ 10 secondes. Laisser reposer l'échantillon pendant 2 minutes.
   c. Mélanger en inversant le tube 5 fois ou passer au vortex pendant 10 secondes, puis transférer immédiatement 50 µL du lysat vers le système SMP PREP IV. Mélanger en inversant 5 fois ou passer au vortex pendant 10 secondes.
   d. Presser doucement le système SMP PREP IV et recueillir lentement 5 à 10 gouttes dans un tube I propre. Vérifier visuellement que l'éluat est d'une couleur rouge à brun rougeâtre. Étiqueter le tube en indiquant les informations sur l'échantillon et procéder au test.

PROCEDURE DE TEST

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

1. Retirer 1 dispositif de test Alethia Malaria de sa pochette de protection par échantillon. Ouvrir le dispositif avec précaution en soulevant le loquet et en tenant les puits de sorte que le réactif lyophilisé ne tombe pas au moment de l'ouverture. Placer le dispositif sur une surface plane ou dans un support adapté pour le recevoir.
2. A l'aide d'une micropipette, transférer 50 µL de l'échantillon à la fois vers le puits TEST (gauche/bille blanche) et le puits CONTRÔLE (droite/bille jaune) du dispositif de test Alethia Malaria. Veiller à ne pas faire entrer de bulles d'air dans le mélange réactionnel. Ne pas mélanger les mélanges réactionnels à la pipette.
3. Fermer le dispositif de test Alethia et verrouiller en rabattant le loquet.
4. Tapoter le ou les dispositifs sur la paillasse ou mélanger pour éliminer les bulles d'air. Examiner soigneusement le ou les dispositifs de test pour vérifier la réhydratation de la bille de contrôle/de test, l'absence de bulles d'air dans la chambre et de liquide au sommet 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.
5. Répéter ces étapes pour tous les échantillons à tester.
6. Insérer chaque dispositif de test Alethia dans l'instrument Incubateur/Lecteur Alethia et lancer la réaction d'amplification **en utilisant le programme Malaria**. Les résultats seront affichés à la fin de l'exécution du test.

INTERPRETATION DES RESULTATS

ID échantillon	Résultats indiqués	Interprétation
Echantillon de patient	POSITIF	Échantillon contenant l'ADN cible d'espèces du genre *Plasmodium*
	NEGATIF	Pas d'ADN *Plasmodium* détecté.
	NON VALIDE	**Aucun rendu de résultat possible. Recommencer le test à l'aide de l'échantillon de patient d'origine.** Spécimen de patient inhibiteur, mauvaise préparation de l'échantillon, échec du réactif, erreur de l'instrument ou échec du contrôle interne.
Contrôle positif	POSITIF	Résultat de contrôle positif valide. Réactifs actifs au moment de l'utilisation, fonctionnement correct de l'Incubateur/Lecteur Alethia.
	NEGATIF	**Résultat de contrôle non valide.** La première étape pour déterminer la cause de l'échec est de répéter les tests de contrôle. Contacter le Service Technique de Meridian Bioscience ou votre distributeur local pour assistance si les résultats de contrôle escomptés ne sont pas observés de façon répétée.
	NON VALIDE	**Aucun rendu de résultat possible. Recommencer l'intégralité de l'analyse à l'aide des échantillons d'origine.** Mauvaise préparation de l'échantillon, échec du réactif, erreur de l'instrument ou échec du contrôle interne.
Contrôle négatif	POSITIF	**Résultat de contrôle non valide.** La première étape pour déterminer la cause de l'échec est de répéter les tests de contrôle. Contacter le Service Technique de Meridian Bioscience ou votre distributeur local pour assistance si les résultats de contrôle escomptés ne sont pas observés de facon répétée.
	NEGATIF	Résultat de contrôle négatif valide. Réactifs actifs au moment de l'utilisation, fonctionnement correct de l'Alethia Incubateur/Lecteur.
	NON VALIDE	**Aucun rendu de résultat possible. Recommencer l'intégralité de l'analyse à l'aide des échantillons d'origine.** Mauvaise préparation de l'échantillon, échec du réactif, erreur de l'instrument ou échec du contrôle interne.
PUITS VIDE	AUCUN	Aucun dispositif de test Alethia dans le puits de l'Incubateur/Lecteur Alethia. **OU** le dispositif de test Alethia présent ne répond pas en raison d'une mauvaise préparation de l'échantillon, de saleté ou d'un mauvais positionnement du dispositif. **Recommencer le test à partir des échantillons d'origine.**

CONTROLE DE QUALITE

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

1. Chaque dispositif contient un contrôle interne qui vérifie l'absence d'inhibition de l'amplification, les réactifs de test, la préparation de l'ADN et l'efficacité du traitement des échantillons. L'ADN mitochondrial humain, qui sert de contrôle d'ADN interne, est isolé de l'échantillon de sang total et passe par toutes les étapes de la procédure. Les amorces d'amplification de l'ADN du contrôle interne sont présentes dans le puits contrôle du dispositif de test Alethia.
2. 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.
3. Le réactif de contrôle externe positif Alethia Malaria est fourni séparément (référence 479970). Alternativement, un échantillon sanguin précédemment positif pour l'espèce *Plasmodium,* qu'il soit clinique ou artificiel, peut être utilisé comme contrôle positif externe. Un échantillon qualifié négatif de sang veineux total humain à l' EDTA peut être utilisé en tant que contrôle externe négatif. Il est recommandé de vérifier la réactivité de chaque nouveau lot et de chaque nouvel envoi de test Alethia Malaria dès leur réception et avant l'emploi. Les tests de contrôle externe doivent être effectués par la suite conformément aux directives locales, nationales et/ou fédérales. Les kits de test Alethia Malaria ne doivent pas être utilisés pour tester les patients si les contrôles externes ne fournissent pas de résultats escomptés.
4. Utiliser un dispositif de test séparé pour chaque réactif de contrôle externe.

VALEURS ATTENDUES

L'incidence des espèces de *Plasmodium* telle qu'elle a été détectée par le test Alethia Malaria au cours de l'étude clinique de 2015 a été de 68.1% (147/216) avec la méthode de préparation d'échantillons Alethia Malaria. L'incidence globale de chaque espèce de *Plasmodium* est indiquée ci-dessous.

Prévalence des espèces de *Plasmodium*		
	Alethia Malaria (n=216)	
Espèces	**Total positifs**	**Prévalence**
P. falciparum	137	63.4%
P. vivax	0	0%
P. ovale	1	0.5%
P. malariae	1	0.5%
P. knowlesi	0	0%
Inconnu*	8	3.7%

*Les échantillons étaient négatifs par microscopie, par conséquent l'espèce n'a pu être identifiée.

LIMITES DU TEST

1. Ce produit ne peut être utilisé qu'avec l'instrument Incubateur/Lecteur Alethia.
2. Les tests Alethia Malaria ne font pas de distinction entre les différentes espèces du genre *Plasmodium.*
3. Des taux d'hématocrite (> 57.5%) et d'hémoglobine (> 30 g/dL) supérieurs aux niveaux physiologiques normaux peuvent produire des résultats non valides avec les tests Alethia Malaria.
4. La performance des tests Alethia Malaria n'a pas été définie pour les échantillons de globules rouges concentrés.
5. Les performances des tests Alethia Malaria sur *Plasmodium knowlesi* ont été établie à partir de l'ADN génomique purifié; les tests sur organisme entier n'ont pas été réalisés.
6. Les tests Alethia Malaria sont des tests qualitatifs et ne fournissent pas de valeurs ou d'informations quantitatives sur la charge en organismes.
7. La détection des acides nucléiques dépend du prélèvement, de la manipulation, du transport, du stockage et/ou de la préparation. Le non-respect de la procédure décrite lors de l'une de ces étapes peut entraîner des résultats incorrects.
8. L'acide nucléique de l'organisme peut persister in vivo, indépendamment de la viabilité de l'organisme. Les tests Alethia Malaria ne font pas de distinction entre les organismes viables et non viables.
9. Comme avec tous les tests de diagnostic moléculaire, (A) des résultats faussement négatifs peuvent se produire en raison de la présence d'inhibiteurs, d'erreurs techniques, de mélanges d'échantillons ou de faibles quantités d'organismes dans l'échantillon clinique; (B) des résultats faussement positifs peuvent se produire en raison de la présence d'une contamination croisée par des organismes cibles, leurs acides nucléiques ou leur produit amplifié, et en raison de signaux non spécifiques.

PERFORMANCES DU TEST
Les caractéristiques de performance des tests d'amplification de l'ADN Alethia Malaria ont été définies au cours d'études cliniques en novembre 2015 au Sénégal, en Afrique. Les caractéristiques de performance du test ont été comparées à celles de la méthode de référence, de l'examen microscopique d'un frottis mince et d'une goutte épaisse. L'identification des espèces de *Plasmodium* pour tous les échantillons positifs a été déterminée par microscopie.

Les échantillons incluaient des échantillons prospectifs et rétrospectifs de sang total veineux à l'EDTA provenant de patients présentant des signes et symptômes d'une infection par *Plasmodium*. Au total, 216 échantillons de sang total désidentifiés et éligibles ont été évalués. 66 échantillons ont été testés prospectivement et 150 échantillons ont été prospectivement recueillis et stockés congelés avant analyse (rétrospective) avec le test Alethia Malaria. Chaque spécimen a été préparé selon les deux méthodes de préparation d'échantillons Alethia Malaria. Tous les échantillons ont été testés prospectivement par microscopie.

L'analyse de la performance du test avec des échantillons prospectifs et rétrospectifs a indiqué qu'il n'y avait aucune différence de performance entre les spécimens frais et congelés avec les tests Alethia Malaria. Les tableaux ci-dessous récapitulent la performance des tests d'amplification d'ADN Alethia Malaria pour les deux échantillons prospectifs et rétrospectifs combinés.

Performance du test Alethia Malaria comparée à celle de la microscopie

		Microscopie			Alethia	Performance			
		Pos	Nég	Total	INV[a]				IC à 95%
Alethia Malaria	Pos	139	8	147	0(1)	Sensibilité	100.0%	139/139	97.3-100.0%
	Nég	0	67	67	2(2)	Spécificité	89.3%	67/75	80.3-94.5%
	Total	139	75	214	2				

[a]Les résultats initiaux non valides sont reportés entre parenthèses. Le nombre total d'échantillons non valides restant après répétition des tests sont présentés avant la parenthèse.

Les échantillons ont été prélevés sur des patients âgés de 4 à 77 ans. 15 d'entre eux étaient âgés de 1 à 12 ans, 75 de 13 à 21 ans, 125 de ≥ 22 ans. L'âge d'un patient n'était pas connu. Aucune différence en raison de l'âge n'a été observée. La population de l'étude comprenait 84 (38.9%) patientes (femmes) et 131 (60.6%) patients (hommes). Le sexe d'un patient n'était pas connu. Aucune influence sur les performances du test n'était attendue du fait du sexe des patients.

SENSIBILITE ANALYTIQUE
La limite de détection (LoD) a été déterminée avec le *Plasmodium falciparum* et le *Plasmodium vivax*. La LoD a été confirmée à l'aide de 20 réplicats et d'une probabilité théorique d'obtenir des réponses positives (par ex., 95%, où 19/20 réplicats étaient positifs).

	Alethia Malaria
Espèces de *Plasmodium*	**Parasites/µL**
P. falciparum (3D7)	2
P. vivax (India VII)	0.125

REACTIVITE DU TEST
Des proportions quantifiées de l' ADN de *P. malariae*, *P. ovale* et *P. knowlesi* ont été diluées dans du sang total négatif jusqu'à atteindre environ trois fois la limite de détection de chaque méthode de préparation d'échantillons de test Alethia Malaria (environ 72 copies/µL ou 6 parasites/µL). Toutes les espèces ont réagi aux concentrations testées.

REPRODUCTIBILITE DU TEST
Des études de reproductibilité ont été menées par trois laboratoires internes. Les laboratoires participants ont reçu des panels codés en aveugle de 10 échantillons. Ces panels incluaient des échantillons préparés artificiellement de *Plasmodium falciparum* (souche 3D7) en tant qu'échantillons modérément positifs, faiblement positifs ou fortement négatifs. Ces panels incluaient aussi un échantillon de sang total négatif. Les tests ont été exécutés par 2 techniciens différents au moins dans chaque laboratoire, le même jour (variabilité intra-test), pendant cinq jours (variabilité inter-test). Trois lots de chacun des tests Alethia Malaria et 8 appareils Incubateur/Lecteur Alethia ont été utilisés dans cette étude. Des contrôles externes positifs et négatifs ont été testés pour chaque panel, et un échantillon de sang qualifié négatif a été utilisé en tant que contrôle négatif.

Récapitulatif de l'étude de reproductibilité: Méthode de préparation des échantillons du test Alethia Malaria								
Type d'échantillon	**Centre 1**		**Centre 2**		**Centre 3**		**Total**	
	Concordance en pourcentage		**Concordance en pourcentage**		**Concordance en pourcentage**		**Concordance en pourcentage**	
Modérément positif (8 parasites/µL)	30/30	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90	100.0%
Faiblement positif (2 parasites/µL)	30/30	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90	100.0%
Fortement négatif (0.458 parasites/ µL)	30/30	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90	100.0%
Négatif	10/10	100.0%	10/10	100.0%	10/10	100.0%	30/30	100.0%
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 utilisé des échantillons de sang total positifs (*P. falciparum* 3D7) et négatifs dans lesquels ont été inoculés des organismes bactériens ou fongiques à une concentration minimum de 1,0 x 10^6 UFC/mL, des virus à une concentration minimum de 1,0 x 10^5 $DICT_{50}$/mL ou des protozoaires à une concentration minimum de 1,0 x 10^5 organismes/mL. En l'absence d'organismes entiers, 1,0 x 10^6 copies/mL d'ADN génomique ont été testées. Aucun des organismes suivants (ou leur matériel génétique) n'a réagi avec les tests Alethia Malaria:
Babesia microtei, Borrelia burgdorferi, Hemophilus influenza, Klebsiella pneumoniae, Leishmania donovani, Leishmania infantum, Leptospira interrogans, Mycobacterium smegmatis, Salmonella typhi, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus pneumoniae, Treponema pallidum, Trypanosoma cruzi, Trypanosoma rangeli, Vibrio parahaemolyticus, cytomégalovirus (CMV), virus d'Epstein Barr, virus de l'hépatite B, virus de l'hépatite C, virus Herpès simplex 1 (HSV 1), VIH-1, papillomavirus et virus de la rubéole.

Les organismes suivants (ou leur ADN) n'ont pas pu être obtenus en vue de leur test et ont été évalués à l'aide d'une analyse *in silico*. D'après cette analyse, aucun des organismes suivants ne devrait réagir avec les tests Alethia Malaria:
Anaplasma phagocytophilium, Clostridium botulinum, Orientia tsutsugamushi, Rickettsia conorii, Rickettsia rickettsii, Rickettsia typhi, virus du Chikungunya, virus de la Dengue (types1 à 4), virus du Nil occidental et virus de la fièvre jaune.

L'ADN génomique humain était non réactif à 1,0 x 10^6 copies/mL.

TESTS POUR LES SUBSTANCES INTERFERENTES

Un test d'interférence a été mené en présence de concentrations des pires cas de substances chimiques et biologiques introduites directement dans des échantillons positifs préparés artificiellement (*P. falciparum* 3D7) et des échantillons de sang total négatifs. Aucune interférence n'a été observée avec les substances suivantes, quelle que soit la méthode de préparation des échantillons Alethia Malaria.

paracétamol (1 mg/mL), amoxicilline (0,1 mg/mL), artésunate (1 mg/mL), aspirine (1 mg/mL), atovaquone (0,1 mg/mL), céfalexine (0,1 mg/mL), chloroquine (1 mg/mL), ciprofloxacine (0,1 mg/mL), clindamycine (1 mg/mL), chlorhydrate de doxycycline (1 mg/mL), érythromycine (0,1 mg/mL), sulfate d'hydroxychloroquine (1 mg/mL), ibuprofène (1 mg/mL), luméfantrine (1 mg/mL), méfloquine (1 mg/mL), phosphate de primaquine (1 mg/mL), chlorhydrate de proguanil (1 mg/mL), pyriméthamine (1 mg/mL), sulfate de quinine (1 mg/mL), citrate de sodium (0.11 M), bilirubine élevée (> 0,15 mg/mL), taux élevés de leucocytes (couche leuco-plaquettaire) (> 10% v/v), sérumalbumine (> 0,03 g/mL) et triglycérides (> 9,9 mg/mL).

Des taux d'hématocrite (> 57.5%) et d'hémoglobine (> 30 g/dL) supérieurs aux niveaux physiologiques normaux peuvent produire des résultats non valides avec les tests Alethia Malaria.

ESPAÑOL

alethia®
Malaria
DNA Amplification Assay

Ensayos de amplificación de ADN para la detección de *Plasmodium sp*.

REF **480925** IVD **Rx Only**

USO INDICADO
Los ensayos de amplificación de ADN Alethia Malaria, que se realizan en el Alethia Incubator/Reader, son ensayos cualitativos de diagnóstico in vitro para la detección directa de ADN de *Plasmodium sp*. en muestras de sangre venosa humana completa con EDTA de individuos con signos y síntomas de infección palúdica. Los resultados de los ensayos Alethia Malaria se emplean como complemento para el diagnóstico de infección palúdica en humanos.

Los ensayos Alethia Malaria utilizan la tecnología de amplificación isotérmica de ADN mediante tallo-bucle (LAMP) para detectar ADN de *Plasmodium sp*. tomando como diana segmentos del genoma de *Plasmodium*. Los ensayos Alethia Malaria no distinguen entre las distintas especies de *Plasmodium*.

Alethia Malaria están concebidos para uso en laboratorios de hospital, de referencia o estatales. Estos productos no están pensados para usarse en centros de atención fuera de un laboratorio.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA
Los ensayos moleculares Alethia Malaria se basan en la tecnología de amplificación mediante tallo-bucle (LAMP).[1, 2] La diana de los ensayos es una región del genoma de *Plasmodium* conservada en *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* y *Plasmodium knowlesi*. La diana de los ensayos Alethia Malaria es una secuencia de 214 pares de bases (pb) de una región no codificante del ADN mitocondrial de *Plasmodium sp*.

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

El kit Alethia Malaria incluye dispositivos de prueba Alethia Malaria, un aparato para la preparación de muestras IV (SMP PREP IV), tampón I Alethia y tubos. Primero se tratan las muestras de sangre completa con el tampón I; las células se rompen y se liberan los ácidos nucleicos. El lisado se añade al SMP PREP IV y se filtra y dispensa en un tubo I limpio apretando con suavidad. El efluente de la muestra recogido después de la filtración contiene ácidos nucleicos que se pueden usar en el dispositivo de prueba Alethia Malaria.

El dispositivo de prueba Alethia Malaria contiene una microesfera de reactivo de amplificación liofilizado en cada una de sus dos cámaras: una cámara de PRUEBA con cebadores específicos para *Plasmodium sp*. y una cámara de CONTROL con cebadores específicos para ADN mitocondrial humano. El ADN mitocondrial humano de las muestras de sangre completa y los cebadores específicos para ADN mitocondrial humano de las cámaras de CONTROL de los dispositivos de prueba funcionan como control interno del ensayo. Durante la preparación de las muestras, se extrae ADN mitocondrial humano y el ADN mitocondrial de *Plasmodium sp*. para procesar en paralelo el ADN diana y el ADN de control durante la amplificación y la detección. El control interno sirve para verificar la extracción del ADN, la inhibición de la amplificación, el rendimiento de los reactivos del ensayo y la eficacia del procesamiento de la muestra. La diana de control debe amplificarse y detectarse en la reacción final; si no es así, la prueba se considera no válida y no se notifican los resultados.

El incubador/lector Alethia monitoriza los cambios en las características de absorbencia 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 ($Señal_{inicial}$, S_i) y al Final del proceso ($Señal_{final}$, S_f) del ensayo. El incubador/lector Alethia calcula el cambio producido en la transmisión de luz entre el Final del proceso y el Inicio del proceso (S_f:S_i) 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 S_f:S_i inferiores al 70% se muestran como «POSITIVO»; los porcentajes de la cámara de PRUEBA S_f:S_i superiores o iguales al 70% 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 S_f:S_i de la cámara de CONTROL inferiores al 85% se consideran válidos y permiten mostrar los resultados de la cámara de PRUEBA (POSITIVO, NEGATIVO). Los porcentajes S_f:S_i de la cámara de CONTROL superiores o iguales al 85% 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 BIOLOGICOS
El paludismo es un problema de salud pública a escala internacional, y se estima que hay unos 3200 millones de personas de 97 países en riesgo de infección.[3] Según las estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2013 hubo 198 millones de casos con aproximadamente 584 000 muertes.[3] La causa del paludismo es un parásito intracelular, *Plasmodium*, que se transmite a los seres humanos a través de los mosquitos hembras del género *Anopheles*.[3] Después de infectar a una persona, *Plasmodium* pasa por un ciclo vital con múltiples estadios morfológicos entre el crecimiento inicial en los hepatocitos y la invasión de los eritrocitos.[4] *Plasmodium* se replica en el interior de los eritrocitos, y provoca la ruptura de las células y los síntomas clínicos de la enfermedad.[4]

Se sabe que hay cinco especies de *Plasmodium* que provocan el paludismo en los seres humanos (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* y *Plasmodium knowlesi*), aunque la mayoría de las infecciones se deben a *P. falciparum* y *P. vivax*. El tratamiento del paludismo depende de la especie de *Plasmodium*, del estado clínico del paciente y de la sensibilidad antimicrobiana.[5] Las infecciones causadas por *P. falciparum* y *P. knowlesi* suelen ser las más graves y requieren un tratamiento rápido.[5]

La OMS recomienda hacer pruebas diagnósticas a todas las personas en quienes se sospeche la presencia de paludismo.[3] El estudio al microscopio de frotis en gota fina y gruesa es actualmente el método de diagnóstico de referencia. Sin embargo, la exactitud y la precisión de la microscopia depende mucho de la pericia del técnico (el límite de detección es de 4 – 100 parásitos/µL o más), tiene una tasa de falsos negativos y falsos positivos del 10 – 25% y una variabilidad aproximada del orden de 2 – 3 veces en la cuantificación.[6, 7, 8] Además, en un examen microscópico ordinario es habitual identificar erróneamente la especie de *Plasmodium*.[8] Otro tipo de métodos que también están disponibles son las pruebas diagnósticas rápidas (PDR) basadas en inmunoensayos. Las pruebas de evaluación de la calidad realizadas por la OMS han puesto de manifiesto que con una densidad baja de parásitos (200 parásitos/µL), sólo el 76% y el 42% de las PDR disponibles son capaces de detectar *P. falciparum* y *P. vivax*, respectivamente[3].

Los ensayos Alethia Malaria proporcionan resultados rápidamente con mayor sensibilidad que la microscopia y las PDR.

REACTIVOS/MATERIALES PROPORCIONADOS

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

1. **Dispositivo de prueba Alethia Malaria (artículo #2875):** Dispositivo de dos cámaras que contiene reactivos de amplificación liofilizados (ADN polimerasa, desoxirribonucleótidos trifosfato) y cebadores específicos para *Plasmodium sp*. (cámara de PRUEBA) o cebadores específicos para ADN mitocondrial humano (cámara de CONTROL).
2. **Tampón I Alethia (artículo #2932-02):** Solución de lisis con hidróxido de sodio 0,2 N.
3. **Aparato para la preparación de muestras IV (SMP PREP IV) Alethia (artículo #2824-02):** Solución tamponada con tris con un 0,09% de azida como conservante.
4. **Tubo I Alethia (artículo #2337):** Tubos de 1,5 mL.

MATERIALES PROPORCIONADOS POR SEPARADO

1. Kit de control externo Alethia Malaria, Meridian Bioscience, Inc. Número de catálogo: 479970

MATERIALES NO PROPORCIONADOS

1. Guantes desechables de látex, sin polvo
2. Puntas de pipeta resistentes a los aerosoles, sin ribonucleasa/desoxirribonucleasa
3. Tubos de extracción de sangre con EDTA como anticoagulante

EQUIPO NO PROPORCIONADO

1. Cronómetro de intervalos
2. Mezclador vortex (opcional)
3. Micropipeta capaz de dispensar 50 µL
4. incubador/lector Alethia, Meridian Bioscience, Inc. Número de catálogo: 610189

PRECAUCIONES

1. Todos los reactivos son sólo para uso diagnóstico in vitro.
2. No intercambie reactivos del kit ni dispositivos de prueba de distintos lotes. Los lotes individuales del tubo I y los tubos ST se pueden intercambiar dentro de cada tipo de kit siempre y cuando se usen antes de la fecha de caducidad asignada.
3. El incubador/lector Alethia puede producir resultados incorrectos si no se usa para correr la prueba el programa para el ensayo de Malaria.
4. 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.
5. Use guantes desechables cuando maneje las muestras y lávese bien las manos después.
6. Se deben emplear programas de Control de Calidad para Laboratorios de Prueba Molecular, incluyendo el uso y cuidado correctos del equipo.[10]
7. Los dispositivos de prueba Alethia Malaria contienen reactivos liofilizados. Las bolsas de protección no deberían abrirse hasta que se esté listo para realizar el ensayo.
8. Los dispositivos de prueba Alethia Malaria incluyen un sistema de cierre diseñado para evitar la contaminación de la zona de pruebas con el producto de amplificación. NO utilice dispositivos de prueba con cierres rotos.
9. Deseche los dispositivos de prueba Alethia Malaria y los tubos usados inmediatamente después del procesamiento. Deje bien asegurado el cierre de los dispositivos de prueba. NO abra el dispositivo de prueba después del procesamiento. Si se abre el dispositivo después de la amplificación, el producto de amplificación puede contaminar la zona de pruebas.
10. Cualquier incidente grave que haya podido producirse en relación con el producto debe notificarse a Meridian Bioscience, Inc., 3471 River Hills Drive, Cincinnati, Ohio 45244 EE. UU., o llamando al teléfono del Centro de Asistencia Técnica (1-800-343-3858), y a las autoridades competentes del Estado Miembro de la UE en el que resida el médico y/o el paciente.
11. IMPORTANTE: Consulte la FDS para obtener información adicional sobre la seguridad y los riesgos.

DECLARACIONES DE RIESGO Y PRECAUCIÓN

 Buffer I	**Palabra de advertencia** Advertencia **Indicaciones de peligro** H315 – Provoca irritación cutánea H319 – Provoca irritación ocular grave **Consejos de prudencia – UE (§28, 1272/2008)** P280 – Llevar guantes/prendas/gafas/mäscara de protección

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 (19 - 30 C) antes de su uso. Asegure que el Tampón I se trae a temperatura ambiente completamente antes de usar y no hay precipitado visible. 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: Muestras de sangre venosa humana completa con EDTA como conservante.

Toma de muestras: Las muestras de sangre venosa completa deben recogerse en tubos de muestra con EDTA siguiendo las directrices del centro en cuanto a la extracción de muestras clínicas para la infección palúdica. Dele la vuelta al tubo de extracción de sangre inmediatamente después de la extracción al menos 8 veces (o lo que indiquen las instrucciones del fabricante).

Después de la extracción y durante el transporte al laboratorio, las muestras de sangre venosa completa con EDTA pueden conservarse a 2 – 30 C. Aunque conviene analizar las muestras lo antes posible, pueden conservarse un máximo de 7 días a temperatura ambiente (19 – 30 C) y un máximo de 14 días refrigeradas (2 – 8 C) antes del análisis. Las muestras que no se vayan a analizar en este periodo de tiempo deben congelarse inmediatamente a -20 C durante un máximo de 30 días hasta que se analicen. Las muestras se pueden congelar y descongelar 2 veces después de almacenarlas a -20 C antes de analizarlas con los ensayos Alethia Malaria.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

NOTA: Asegúrese de que el Alethia Incubator/Reader esté encendido y de que se hayan completado las verificaciones de funcionamiento necesarias antes de iniciar la PREPARACIÓN DE LA MUESTRA. Consulte el Manual del operador del incubador/lector Alethia para obtener más información acerca de la instalación y el funcionamiento del instrumento.

NOTA: Asegúrese de que las muestras están a temperatura ambiente (19 C-30 C) antes de la preparación de las muestras.

1. **Preparación de muestras para Alethia Malaria**
   a. Invierta la muestra de sangre completa con EDTA 2 – 3 veces para mezclarla.
   b. Añada 50 µL de la muestra de sangre venosa completa extraída (con EDTA) a un tubo de tampón I. Dele la vuelta 5 veces para que se mezcle o use un agitador vortex durante aproximadamente 10 segundos. Deje reposar la muestra durante 2 minutos.
   c. Dele la vuelta 5 veces para que se mezcle o use un agitador vortex durante aproximadamente 10 segundos, y transfiera inmediatamente 50 µL del lisado al SMP PREP IV. Dele la vuelta 5 veces para que se mezcle o use un agitador vortex durante 10 segundos.
   d. Apriete el SMP PREP IV con suavidad y recoja despacio 5 – 10 gotas con un tubo I limpio. Compruebe que el eluido está teñido de un color rojo o marrón rojizo. Etiquete el tubo con la información de identificación de la muestra y prosiga con el procedimiento de prueba.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

NOTA: Se pueden procesar un máximo de 10 muestras por cada incubador/lector Alethia.

1. Saque 1 dispositivo de prueba Alethia Malaria de su bolsa de protección para cada muestra. Abra el dispositivo con cuidado, levantando el cierre y sujetando las cámaras de modo que el reactivo liofilizado no se caigan al abrirlo. Coloque el dispositivo sobre una superficie plana o en una gradilla en la que se pueda poner el dispositivo.
2. Utilizando una micropipeta, transfiera 50 µL de la muestra tanto a la cámara de PRUEBA (lado izquierdo/Perla Blanca) como a la cámara de CONTROL (lado derecho/Perle Aamarilla) del dispositivo de prueba Alethia Malaria. Procure no introducir aire en la mezcla de reacción. No mezcle las reacciones con pipeta.
3. Cierre el dispositivo de prueba Alethia y asegure bien el cierre.
4. Golpee ligeramente el dispositivo contra la superficie de la mesa de laboratorio o mezcle bien para quitar las burbujas de aire. Examine atentamente el dispositivo de prueba para comprobar la rehidratación de las microesferas de control y de prueba, y la presencia de burbujas de aire en la cámara y de líquido en la parte superior del dispositivo. Si observa microesferas sin disolver, burbujas de aire o líquido en la parte superior del dispositivo, golpee ligeramente el dispositivo contra la superficie de la mesa de laboratorio y repita la inspección visual. La amplificación y la detección deben comenzar en un plazo de 15 minutos.
5. Repita los pasos del procedimiento de la prueba con todas las muestras que se vayan a analizar.
6. Introduzca los dispositivos de prueba Alethia en el incubador/lector Alethia e inicie el análisis **usando el programa Malaria**. Los resultados se indican al final del análisis.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

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

CONTROL DE CALIDAD

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

1. Cada dispositivo contiene un control interno que comprueba la inhibición de la amplificación y la eficacia de los reactivos del ensayo, de la preparación del ADN y del procesamiento de la muestra. El ADN mitocondrial humano, que es el ADN utilizado para el control interno, se aísla de la muestra de sangre completa y se procesa pasando por todos los pasos del procedimiento. La cámara de control del dispositivo de prueba Alethia contiene cebadores para amplificar el ADN del control interno.
2. Las buenas prácticas de laboratorio recomiendan el uso de materiales de control. Los usuarios deberían seguir las directrices federales, estatales y locales adecuadas relativas a la ejecución de controles de calidad externos.
3. El reactivo del control positivo externo Alethia Malaria se suministra por separado (número de catálogo 479970). Como alternativa, las muestras de sangre previamente caracterizadas como positivas para *Plasmodium sp*. o preparadas para dar resultados positivos se pueden usar como control positivo externo. Como control negativo externo se puede utilizar una muestra negativa validada de sangre completa humana con EDTA. Es conveniente comprobar la reactividad de cada nuevo lote y cada nuevo envío de Alethia Malaria en el momento de la recepción y antes de usarlos. A partir de entonces, deben realizarse pruebas de control externo de conformidad con las directrices nacionales, regionales y locales correspondientes. Los kits de prueba Alethia Malaria no deben usarse para analizar a pacientes si los controles externos no dan los resultados correctos.
4. Se debe utilizar un dispositivo de prueba independiente para cada reactivo de control externo.

VALORES ESPERADOS

En el estudio clínico de 2015 se obtuvo una incidencia de *Plasmodium sp*., detectado con el ensayo Alethia Malaria, del 68.1% (147/216) usando el método de preparación de muestras Alethia Malaria. Más abajo se indica la incidencia global de cada especie de *Plasmodium*.

Prevalencia de las especies de *Plasmodium*		
	Alethia Malaria (n=216)	
Especie	**Total positivos**	**Prevalencia**
P. falciparum	137	63.4%
P. vivax	0	0%
P. ovale	1	0.5%
P. malariae	1	0.5%
P. knowlesi	0	0%
Desconocido*	8	3.7%

*Las cepas no pudieron ser determinadas dado que las muestras eran negativas por microscopía.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. Este producto solo se puede utilizar con el instrumento incubador/lector Alethia.
2. Alethia Malaria no distinguen entre las especies de *Plasmodium*.
3. Si el hematocrito (> 57.5%) y los niveles de hemoglobina (> 30 g/dL) son superiores a los niveles fisiológicos normales, los resultados de los ensayos Alethia Malaria pueden no ser válidos.
4. No se ha determinado el rendimiento de los ensayos Alethia Malaria con muestras de concentrado de eritrocitos.
5. El rendimiento de Alethia Malaria con *Plasmodium knowlesi* fue establecido solamente usando genoma del ADN purificado; no se llevó a cabo pruebas con el organismo completo.
6. Alethia Malaria son ensayos cualitativos y no proporcionan valores cuantitativos ni información sobre la cantidad de microorganismos.
7. La detección de ácidos nucleicos requiere que las muestras se obtengan, manipulen, transporten, almacenen y preparen adecuadamente. Si no se utiliza el procedimiento adecuado en cualquiera de estos pasos pueden obtenerse resultados incorrectos.
8. Los ácidos nucleicos de los microorganismos pueden perdurar in vivo, independientemente de la viabilidad del microorganismo. Alethia Malaria no distinguen entre microorganismos viables y no viables.
9. Al igual que sucede con todas las pruebas de diagnóstico molecular, pueden obtenerse (A) falsos resultados negativos por la presencia de inhibidores, errores técnicos, por confundir las muestras o porque haya muy pocos microorganismos en la muestra clínica, y (B) falsos resultados positivos por contaminación cruzada con los microorganismos analizados, sus ácidos nucleicos o el producto amplificado, así como por señales inespecíficas.

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO
Las características de rendimiento de los ensayos de amplificación de ADN Alethia Malaria se determinaron en diversos estudios clínicos llevados a cabo en noviembre de 2015 en Senegal, África. Las características de rendimiento del ensayo se compararon con el método de referencia, el estudio al microscopio de frotis en gota fina y gruesa. Las especies de *Plasmodium* de todas las muestras positivas se identificaron mediante microscopia.

Las muestras incluían muestras de sangre venosa completa con EDTA prospectivas y retrospectivas de enfermos con signos y síntomas de infección por *Plasmodium*. Se analizaron un total de 216 muestras aptas de sangre completa anonimizadas. 66 muestras se analizaron de manera prospectiva, y 150 muestras se extrajeron de manera prospectiva y se conservaron congeladas hasta el análisis con el ensayo Alethia Malaria (retrospectivo). Todas y cada una de las muestras se prepararon usando los métodos de preparación de muestras tanto de Alethia Malaria. Todas las muestras se estudiaron al microscopio de forma prospectiva.

El análisis del rendimiento de los ensayos con muestras prospectivas y retrospectivas puso de manifiesto que no había diferencias entre las muestras recientes y congeladas en el ensayo Alethia Malaria. En las tablas siguientes se resume el rendimiento de los ensayos de amplificación de ADN Alethia Malaria con las muestras prospectivas y retrospectivas combinadas.

Rendimiento de Alethia Malaria comparado con la microscopia

		Microscopia			Alethia	Rendimiento			
		Pos	Neg	Total	INV[a]				95% CI
Alethia Malaria	Pos	139	8	147	0(1)	Sensibilidad	100.0%	139/139	97.3-100.0%
	Neg	0	67	67	2(2)	Especificidad	89.3%	67/75	80.3-94.5%
	Total	139	75	214	2				

[a]Resultados inicialmente inválidos están reportados dentro del paréntesis. El número final de resultados inválidos que restan luego de repetir la prueba están al frente del paréntesis.

Las muestras se obtuvieron de pacientes con edades comprendidas entre 4 y 77 años. 15 eran de pacientes de 1 a 12 años de edad, 75 de pacientes de 13 a 21 años, 125 de pacientes de ≥ 22 años y la edad de un paciente no fue definida. No se advirtieron diferencias de rendimiento en función de la edad. La población del estudio incluía 84 (38.9%) mujeres y 131 (60.6%) hombres; el género de un paciente no fue definido. No es previsible que el sexo influya en el rendimiento del ensayo.

SENSIBILIDAD ANALITICA
Para determinar el límite de detección (LD) se usaron *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax*. El LD se confirmó utilizando 20 réplicas y una determinada probabilidad (p. ej., 95%, o 19 de 20 réplicas positivas) de obtener respuestas positivas.

	Alethia Malaria
Especies de *Plasmodium*	**Parásitos/µL**
P. falciparum (3D7)	2
P. vivax (India VII)	0.125

REACTIVIDAD DEL ENSAYO
Se diluyeron cepas cuantificadas de ADN de *P. malariae*, *P. ovale* y *P. knowlesi* en sangre completa negativa hasta aproximadamente tres veces el límite de detección del método de preparación de muestras de Alethia Malaria (aproximadamente 72 copias/µL ó 6 parásitos/µL). Todas las especies reaccionaron a las concentraciones analizadas.

REPRODUCIBILIDAD
Tres laboratorios internos realizaron estudios de reproducibilidad. Se suministraron paneles de 10 muestras codificadas con enmascaramiento a los laboratorios participantes. Los paneles incluían muestras artificiales de *Plasmodium falciparum* (cepa 3D7) positivas moderadas, positivas bajas o negativas altas. El panel también incluía una muestra negativa de sangre completa. Al menos 2 técnicos diferentes de cada centro hicieron la prueba el mismo día (variabilidad intranalítica) durante cinco días (variabilidad interanalítica). En este estudio se utilizaron tres lotes de Alethia Malaria y 8 instrumentos incubador/lector Alethia. Con cada panel se analizaron controles externos positivos y negativos; como control negativo se utilizó una muestra negativa validada de sangre.

Resumen del estudio de reproducibilidad: Método de preparación de muestras de Alethia Malaria								
Tipo de muestra	**Centro 1**		**Centro 2**		**Centro 3**		**Total**	
	Porcentaje de concordancia		**Porcentaje de concordancia**		**Porcentaje de concordancia**		**Porcentaje de concordancia**	
Positiva moderada (8 Parásitos/µL)	30/30	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90	100.0%
Positiva baja (2 Parásitos/µL)	30/30	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90	100.0%
Negativa alta (0.458 Parásitos/µL)	30/30	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90	100.0%
Negativa	10/10	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90	100.0%
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
Para los estudios de reactividad cruzada se emplearon muestras de sangre completa positivas (*P. falciparum* 3D7) y negativas inoculadas con bacterias u hongos a una concentración mínima de 1,0 x 10^6 UFC/mL, virus a una concentración mínima de 1,0 x 10^5 $TCID_{50}$/mL o protozoos a una concentración mínima de 1,0 x 10^5 organismos/mL. En los casos en los que no había microorganismos completos disponibles, se analizaron 1,0 x 10^6 copias/mL de ADN genómico. Ninguno de los siguientes microorganismos, ni su material genético, reaccionaron con los ensayos Alethia Malaria:
Babesia microtei, Borrelia burgdorferi, Hemophilus influenza, Klebsiella pneumoniae, Leishmania donovani, Leishmania infantum, Leptospira interrogans, Mycobacterium smegmatis, Salmonella typhi, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus pneumoniae, Treponema pallidum, Trypanosoma cruzi, Trypanosoma rangeli, Vibrio parahaemolyticus, citomegalovirus (CMV), virus de Epstein-Barr (EBV), virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus del herpes común 1 (HSV 1), HIV-1, virus de los papilomas humanos (HPV) y virus de la rubéola.

Los siguientes microorganismos o su ADN no se pudieron obtener para analizarlos y se evaluaron mediante un análisis informático. Sobre la base de este análisis, no es previsible que ninguno de los siguientes microorganismos reaccione con los ensayos Alethia Malaria:
Anaplasma phagocytophilium, Clostridium botulinum, Orientia tsutsugamushi, Rickettsia conorii, Rickettsia rickettsii, Rickettsia typhi, virus del chicunguña, virus del dengue (tipos 1 – 4), virus del Nilo Occidental y virus de la fiebre amarilla.

El ADN genómico humano fue no reactivo a una concentración de 1,0 x 10^6 copias/mL.

PRUEBAS PARA SUSTANCIAS INTERFERENTES

Se realizaron pruebas de interferencia en presencia de sustancias químicas y biológicas a las concentraciones más desfavorables introducidas directamente en muestras artificiales positivas bajas (*P. falciparum* 3D7) y negativas de sangre completa. No se observaron interferencias en ninguno de los métodos de preparación de muestras Alethia Malaria con las siguientes sustancias:

paracetamol (1 mg/mL), amoxicilina (0,1 mg/mL), artesunato (1 mg/mL), ácido acetilsalicílico (1 mg/mL), atovacuona (0,1 mg/mL), cefalexina (0,1 mg/mL), cloroquina (1 mg/mL), ciprofloxacino (0,1 mg/mL), clindamicina (1 mg/mL), clorhidrato de doxiciclina (1 mg/mL), eritromicina (0,1 mg/mL), sulfato de hidroxicloroquina (1 mg/mL), ibuprofeno (1 mg/mL), lumefantrina (1 mg/mL), mefloquina (1 mg/mL), fosfato de primaquina (1 mg/mL), clorhidrato de proguanil (1 mg/mL), pirimetamina (1 mg/mL), sulfato de quinina (1 mg/mL), citrato sódico (0.11 M), niveles elevados de bilirrubina (> 0,15 mg/mL, recuento leucocitario alto (capa leucocitaria) > 10 % v/v), seroalbúmina (> 0,03 g/mL), y triglicéridos (> 9,9 mg/mL).

Si el hematocrito (> 57.5%) y los niveles de hemoglobina (> 30 g/dL) son superiores a los niveles fisiológicos normales, los resultados de los ensayos Alethia Malaria pueden no ser válidos.

DEUTSCH

alethia®
Malaria
DNA Amplification Assay

DNA-Amplifikationstests für den Nachweis von *Plasmodium sp*.

REF **480925** IVD **Rx Only**

VERWENDUNGSZWECK
Die DNA-Amplifikationstests Alethia Malaria, die auf dem Alethia Inkubator/-Lesegerät durchgeführt werden, sind qualitative Diagnosetests für den direkten Nachweis von DNA von *Plasmodium sp*. in menschlichen, venösen EDTA-Vollblutproben von Patienten mit Anzeichen und Symptomen einer Malariaerkrankung. Die Ergebnisse der Alethia Malaria Tests dienen zur Unterstützung bei der Diagnose einer Malariainfektion bei Menschen.

Die Alethia Malaria Tests verwenden die „Loop-Mediated isothermal Amplification" (LAMP)-Technologie zum Nachweis von *Plasmodium sp*. Dabei werden gezielt DNA-Abschnitte im *Plasmodium* Genom nachgewiesen. Man kann mit den Alethia Malaria Tests nicht zwischen den verschiedenen *Plasmodium*-Arten unterscheiden.

Alethia Malaria sind für den Einsatz in Krankenhäusern, Referenzlaboren oder staatlichen Laboren vorgesehen. Diese Assays sind nicht für die „Point-of-Care-Diagnostik" außerhalb eines Labors vorgesehen.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DES TESTS
Die molekularen Tests Alethia Malaria beruhen auf der LAMP-Methode.[1, 2] Die Assays weisen eine Region im Genom von *Plasmodium* nach, die bei *Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* und *Plasmodium knowlesi* konserviert ist. Die Alethia Malaria Tests haben als DNA-Zielregion einen Sequenzabschnitt von 214 Basenpaaren (bp), der in der nichtkodierenden Mitochondrien-DNA von *Plasmodium sp.* vorkommt.

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

Zum Alethia Malaria Kit gehören die Alethia Malaria Analysegefäße, der Probenvorbereitungsapparat IV (SMP PREP IV), der Alethia Puffer I und die Röhrchen. Zuerst werden die Vollblutproben mit dem Puffer I behandelt: die Zellen werden aufgebrochen und die Nukleinsäuren freigesetzt. Das Lysat wird in den SMP PREP IV überführt und durch sanftes Drücken in ein sauberes Röhrchen I gefiltert. Das so erhaltene nukleinsäurehaltige Probefiltrat ist für das Testen in dem Alethia Malaria Analysegefäß vorgesehen.

In den beiden Kammern des Alethia Malaria Analysegefäßes befindet sich je ein Kügelchen aus lyophilisierten Reagenzien für die Amplifikation sowie entweder spezifische Primer gegen *Plasmodium sp* (TEST-Kammer) oder spezifische Primer gegen die humane Mitochondrien-DNA (KONTROLL-Kammer). Die humane Mitochondrien-DNA der Vollblutproben dient zusammen mit den spezifischen Primern gegen die humane mitochondriale DNA in der KONTROLL-Kammer des Analysegefäßes als interne Kontrolle für den Test. Bei der Probenvorbereitung wird die humane Mitochondrien-DNA zusammen mit der Mitochondrien-DNA von *Plasmodium sp.* extrahiert. So können die Ziel-DNA und die Kontroll-DNA parallel amplifiziert und nachgewiesen werden. Mit der internen Kontrolle wird die Effizienz der DNA-Extraktion und der Probenverarbeitung, die Inhibition der Amplifikation und die Leistung der Test Reagenzien überwacht und kontrolliert. Die Zielsequenz der Kontrolle muss amplifiziert und in der endgültigen Reaktion nachgewiesen werden, oder der Test wird als ungültig erachtet und die Ergebnisse werden nicht weitergegeben.

Zur Überwachung der Änderungen der Absorptionsmerkmale misst das Alethia Inkubator/Lesegerät den Lichtdurchlass durch die TEST- und die KONTROLL-Reaktionslösungen. Der Lichtdurchlass wird zu Beginn des Testdurchlaufs ($Signal_{initial}$, S_i) und am Ende des Testdurchlaufs ($Signal_{final}$, S_f) bestimmt. Die Änderung des Lichtdurchlasses zwischen Ende und Beginn des Durchlaufs (S_f:S_i) wird vom Alethia Inkubator/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_f:S_i-Verhältnisse der TEST-Kammer von weniger als 70% werden als „POSITIV", S_f:S_i-Verhältnisse der TEST-Kammer, größer als oder gleich 70% werden als „NEGATIV" gemeldet. *Es werden keine numerischen Werte ausgegeben.*

Die Gültigkeit wird anhand fester Cutoff-Werte für die KONTROLL-Kammer beurteilt. S_f:S_i-Verhältnisse der KONTROLL-Kammer von weniger als 85% werden für gültig erachtet und lassen die Meldung der Ergebnisse der TEST-Kammer zu (POSITIV, NEGATIV). S_f:S_i-Verhältnisse der KONTROLL-Kammer größer als oder gleich 85% 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
Malaria bedroht die öffentliche Gesundheit weltweit. Laut Schätzungen besteht für 3,2 Milliarden Menschen in 97 Ländern eine Infektionsgefahr.[3] Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) schätzt, dass 2013 198 Millionen Erkrankungsfälle vorkamen, die 584.000 Todesfälle zur Folge hatten.[3] Malaria wird von dem intrazellulären Parasit *Plasmodium* verursacht und von weiblichen *Anopheles*-Stechmücken übertragen.[3] Nach der Infektion eines Menschen durchläuft *Plasmodium* mehrere Lebensphasen und Morphologien nach der anfänglichen Einnistung in Leberzellen, gefolgt von einer Invasion der roten Blutzellen.[4] *Plasmodium* vervielfältigt sich in den roten Blutzellen, was Zellrupturen und klinische Erkrankungssymptome bewirkt.[4]

Von fünf *Plasmodium*-Arten ist bekannt, dass sie Malaria bei Menschen *(Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* und *Plasmodium knowlesi*) verursachen; Infektionen sind jedoch überwiegend auf *P. falciparum* und *P. vivax* zurückzuführen. Die Behandlung gegen Malaria hängt von der *Plasmodium*-Art, dem klinischen Status des Patienten und der Empfindlichkeit gegenüber Antimikrobiotika ab.[5] Infektionen durch *P. falciparum* und *P. knowlesi* nehmen typischerweise einen schweren Verlauf und müssen zeitnah behandelt werden.[5]

Die WHO empfiehlt, dass bei allen Personen mit Verdacht auf Malaria Diagnosetests durchgeführt werden sollten.[3] Normale (Dünner Tropfen) und angereicherte Blutausstriche (Dicker Tropfen) stellen zurzeit die Goldstandard-Diagnosemethode dar. Sorgfalt und Präzision dieser mikroskopischen Methode hängen jedoch stark von den Fähigkeiten des Anwenders ab (Nachweisgrenze 4-100 Parasiten/µL oder höher); falsch-negative und falsch-positive Raten liegen zwischen 10-25%, und bei der Quantifizierung wird eine 2- bis 3-fache Variabilität beobachtet.[6, 7, 8] Darüber hinaus treten bei der mikroskopischen Identifikation der *Plasmodium*-Art oft Fehler auf.[8] Auf Immunassays basierende, sogenannte schnelle Diagnosetests (RDT, *Rapid Diagnostic Tests*) sind eine alternative Diagnosemethode. Die WHO untersuchte die Qualität dieser Schnelltests und kam zum Schluss, dass bei niedrigen Parasitendichten (200 Parasiten/µL) *P. falciparum* mit nur 76% der erhältlichen RDTs nachgewiesen werden konnte und *P. vivax* mit nur 42%.[3]

Die Alethia Malaria Tests liefern schnelle Ergebnisse mit einer höheren Empfindlichkeit als die Mikroskopie und RDTs.

REAGENZIEN/ENTHALTENE MATERIALIEN

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

1. **Alethia Malaria Analysegefäß (item #2875):** Analysegefäß mit zwei Kammern, die lyophilisierte Amplifikationsreagenzien (DNA-Polymerase, Deoxynukleotidtriphosphate) und entweder spezifische Primer gegen *Plasmodium sp.* (TEST-Kammer) oder Primer gegen menschliche Mitochondrien-DNA (KONTROLL-Kammer) enthalten.
2. **Alethia Puffer I (item #2932-02):** Lyselösung (0,2 N Natriumhydroxid).
3. **Alethia Probenvorbereitungsapparat IV (SMP PREP IV) (item #2824-02):** Tris-gepufferte Lösung mit Konservierungsmittel Natriumazid (0,09 %)
4. **Alethia Röhrchen I (item #2337):** 1,5-mL-Röhrchen

SEPARAT GELIEFERTE MATERIALIEN

1. Alethia Malaria externes Kontroll-Kit, Meridian Bioscience, Inc. Bestellnummer: 479970

BENÖTIGTE, ABER NICHT ENTHALTENE MATERIALIEN

1. Einweg-Latexhandschuhe, ungepudert
2. DNase/RNase-freie, aerosolbeständige Pipettenspitzen
3. Blutentnahmeröhrchen mit Antikoagulanz EDTA

NICHT MITGELIEFERTE AUSTÜSTUNG

1. Intervall-Stoppuhr
2. Vortexmischer (optional)
3. Mikropipette zur Abgabe von 50 µL
4. Alethia Inkubator/-Lesegerät, Bestellnummer von Meridian Bioscience, Inc.: 610189

VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Sämtliche Reagenzien sind ausschließlich für die In-vitro-Diagnostik bestimmt.
2. Kombinieren Sie keine Kitreagenzien oder Analysegefäße unterschiedlicher Chargen. Bei Kits des gleichen Typs können jedoch Einzelchargen von Röhrchen I und ST-Röhrchen frei miteinander kombiniert werden, solange das jeweilige Haltbarkeitsdatum bei der Verwendung noch nicht abgelaufen ist.
3. Es entstehen falsche Ergebnisse, wenn nicht das Programm für den Malaria-Test auf dem Alethia Inkubator/Lesegerät verwendet wird.
4. Befolgen Sie bei den Untersuchungen die Biosicherheitsstufe 2 und eine gute Laborpraxis.[9] Behandeln Sie alle Proben und gebrauchte Testsysteme so als könnten sie infektiöse Erreger übertragen. In den Bereichen, in denen die Proben und Reagenzien der Kits bearbeitet werden, darf weder gegessen, noch getrunken oder geraucht werden.
5. Bei der Handhabung der Proben sind Einweghandschuhe zu tragen. Nach der Arbeit sind die Hände gründlich zu waschen.
6. Qualitätskontrollprogramme für Laboratorien, die molekulare Tests durchführen, einschließlich für den richtigen Gebrauch und die Pflege der Ausrüstung, sollten angewendet werden.[10]
7. Die Alethia Malaria-Analysegefäße enthalten lyophilisierte Reagenzien. Der Schutzbeutel darf erst dann geöffnet werden, wenn der Test durchgeführt wird.
8. Die Alethia Malaria-Analysegefäße sind mit einer Verschlußlasche ausgestattet, um eine Kontamination des Testbereichs mit dem Amplifikationsprodukt zu verhindern. Analysegefäße mit defekter Verschlußlasche NICHT verwenden.
9. Entsorgen Sie gebrauchte Alethia Malaria Analysegefäße, und Röhrchen sofort nach dem Gebrauch. Halten Sie die Analysegefäße sicher geschlossen. Öffnen Sie die Analysegefäße nach der Bearbeitung NICHT mehr. Ein Öffnen der Analysegefäße nach der Amplifikation kann zu einer Kontamination des Testbereichs mit dem Amplifikationsprodukt führen.
10. Jeder schwerwiegende Vorfall, der in Verbindung mit dem Gerät aufgetreten ist, sollte Meridian Bioscience, Inc., 3471 River Hills Drive, Cincinnati, Ohio 45244 USA oder dem technischen Kundendienst unter 1 800.343.3858 und der zuständigen Behörde des EU-Mitgliedstaates, in dem der Arzt und/oder der Patient ansässig ist, gemeldet werden.
11. WICHTIG: Weitere Sicherheits- und Gefahrenhinweise sind im SDB enthalten.

GEFAHREN UND SICHERHEITSHINWEISE

Buffer I	**Signalwort** Warnung **Gefahrenhinweise** H315 – Verursacht Hautreizungen H319 – Verursacht schwere Augenreizung **Sicherheitshinweise – Verodnung (EG) §28, Nr. 1272/2008** P280 – Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen

HALTBARKEIT UND LAGERUNG

Das Verfallsdatum ist auf dem Etikett des Kits angegeben. Kit bei 2-20 C aufbewahren.

VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Stellen Sie sicher, dass die Kitreagenzien vor dem Gebrauch Raumtemperatur (19-30 C) erreicht haben. Stellen Sie sicher, dass der Puffer I vor dem Gebrauch Raumtemperatur erreicht hat und kein Präzipitat sichtbar ist. Werden die Reagenzien vor dem Gebrauch nicht auf Raumtemperatur gebracht, kann dies zu falschen Ergebnissen führen.

PROBENNAHME UND -VORBEREITUNG

Probentyp: Humane, venöse Vollblutproben mit EDTA als Konservierungsmittel.

Probennahme: Die Entnahme von venösen Vollblutproben in ein EDTA-Probenröhrchen muss übereinstimmend mit den Richtlinien der Einrichtung zur Entnahme klinischer Proben bei einer Malariainfektion erfolgen. Das Blutentnahmeröhrchen muss nach der Entnahme sofort mindestens 8-mal über Kopf gedreht werden (oder gemäß den Anweisungen des Herstellers).

Venöse EDTA-Vollblutproben können nach der Entnahme und beim Transport zum Labor bei 2-30 C gelagert werden. Die Proben sollten so schnell wie möglich getestet werden. Falls notwendig können die Proben vor dem Test 7 Tage lang bei Raumtemperatur (19-30 C) oder 14 Tage lang gekühlt (2-8 C) aufbewahrt werden. Proben, die nicht innerhalb dieses Zeitraums getestet werden können, sollten sofort bei -20 C eingefroren werden. Diese Proben können so 30 Tage lang aufbewahrt werden. Die Proben dürfen vor dem Testen mit den Alethia Malaria Tests nach der Aufbewahrung bei -20 C zweimal wieder aufgetaut und wieder eingefroren werden.

PROBENVORBEREITUNG

HINWEIS: Darauf achten, dass das Alethia Inkubator/Lesegerät -Gerät 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 Inkubator/Lesegerät -Bedienerhandbuch.

HINWEIS: Stellen Sie sicher, dass die Proben vor der Vorbereitung Raumtemperatur (19–30 C) haben.

1. **Alethia Malaria Probenvorbereitung**
   a. Drehen Sie die EDTA-Vollblutprobe zum Vermischen 2- bis 3-mal über Kopf.
   b. Geben Sie 50 µL des entnommenen, venösen Vollbluts (mit EDTA) in ein Röhrchen mit dem Puffer I. Drehen Sie das Röhrchen entweder 5-mal über Kopf oder mischen Sie es ungefähr 10 Sekunden lang mit dem Vortexmischer. Inkubieren Sie die Proben 2 Minuten lang.
   c. Drehen Sie das Röhrchen 5-mal über Kopf oder mischen Sie es ungefähr 10 Sekunden lang mit dem Vortexmischer. Geben Sie sofort 50 µL Lysat in den SMP PREP IV. Drehen Sie den SMP PREP IV 5-mal über Kopf oder mischen Sie ihn 10 Sekunden lang mit dem Vortexmischer.
   d. Drücken Sie den SMP PREP IV vorsichtig zusammen und sammeln Sie 5 bis 10 Tropfen in einem sauberen Röhrchen I. Überprüfen Sie, dass das Eluat rot bis braun-rot gefärbt ist. Beschriften Sie das Röhrchen mit den Probenangaben und fahren Sie mit dem eigentlichen Testen fort.

TESTDURCHFÜHRUNG

HINWEIS: Bei einem einzigen Lauf auf dem Alethia Inkubator/Lesegerät können maximal 10 Proben verarbeitet werden.

1. Nehmen Sie pro Probe ein Alethia Malaria Analysegefäß aus dem Schutzbeutel. Öffnen Sie vorsichtig das Gerät, indem Sie die Sperrvorrichtung anheben, und halten Sie die Kammern so, dass das lyophilisierte Reagenz beim Öffnen nicht herausfällt. Platzieren Sie das Analysegefäß auf einer ebenen Oberfläche oder in einen für das System passenden Probenständer.
2. Überführen Sie mit einer Mikropipette je 50 µL der vorbereiteten Probe in die TEST-Kammer (Links/weißes Kügelchen) und in die KONTROLL-Kammer (Rechts/gelbes Kügelchen) des Alethia Malaria Analysegefäßes. Achten Sie dabei darauf, dass keine Luft in das Reaktionsgemisch kommt. Mischen Sie die Reaktionen nicht mit der Pipette.
3. Schließen Sie das Alethia Analysegefäß und sichern Sie die Sperrvorrichtung fest. Schließen Sie die Alethia Testvorrichtung und befestigen Sie die Verschlusslaschen.
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 auf Flüssigkeit im oberen Teil des Analysegefäßes. Falls nicht gelöste Kügelchen, Luftblasen oder Flüssigkeit im oberen Teil des Analysegefäßes zu erkennen sind, klopfen Sie dieses vorsichtig auf die Arbeitsfläche und wiederholen Sie die Sichtkontrolle. Die Amplifikation und Detektion sollten innerhalb von 15 Minuten initiiert werden.
5. Wiederholen Sie die Schritte des Testverfahrens für alle zu testenden Proben.
6. Stellen Sie das Alethia Analysegefäß in das Alethia Gerät und starten Sie das **Programm für Malaria**. Die Ergebnisse werden am Ende des Laufs angezeigt.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Proben-ID	Ausgegebenes Ergebnis	Interpretation
Patientenprobe	POSITIV	Die Probe enthält die Ziel-DNA von *Plasmodium sp.*
	NEGATIV	Die Probe enthält keine Ziel-DNA von *Plasmodium sp.*
	UNGÜLTIG	**Kein angezeigtes Ergebnis. Wiederholen Sie den Test unter Verwendung der originalen Patientenprobe.** Inhibitorische Patientenprobe, unsachgemäße Probenvorbereitung, Reagenzversagen, Instrumentenversagen oder interner Kontrollfehler.
Positivkontrolle	POSITIV	Gültiges positives Kontrollergebnis. Reagenzien, die zum Zeitpunkt der Verwendung aktiv sind, funktionieren mit dem Alethia Inkubator/-Lesegerät korrekt.
	NEGATIV	**Falsches Kontrollergebnis.** Wiederholen Sie als ersten Schritt die Kontrolltests, um die Fehlerquelle zu ermitteln. Lassen sich auch bei wiederholten Tests die erwarteten Reaktionen nicht erzielen, rufen Sie bitte den Technischen Support von Meridian Bioscience an (USA): (001) 800-343-3858 oder wenden Sie sich an Ihren zuständigen Vertriebspartner.
	UNGÜLTIG	**Kein angezeigtes Ergebnis. Wiederholen Sie den gesamten Testlauf unter Verwendung der ursprünglichen Proben.** Falsche Probenvorbereitung, Reagenzversagen, 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, die zum Zeitpunkt der Verwendung aktiv sind, funktionieren mit dem, Alethia Inkubator/-Lesegerät korrekt.
	UNGÜLTIG	**Kein angezeigtes Ergebnis. Wiederholen Sie den gesamten Testlauf unter Verwendung der ursprünglichen Proben.** Falsche Probenvorbereitung, Reagenzversagen, Instrumentenversagen oder interner Kontrollfehler.
LEERER SCHACHT	KEINER	Kein Alethia Analysegefäß in der Alethia Inkubator/Lesegerät -Vertiefung. **ODER** Das vorhandene Alethia Analysegefäß ist aufgrund fehlerhafter Probenvorbereitung, verunreinigtem Gefäß oder falsch aufgestelltem Gefäß beeinträchtigt. **Wiederholen Sie den Test unter Verwendung der ursprünglichen Proben.**

QUALITÄTSKONTROLLE

Führen Sie den Test gemäß der einschlägigen lokalen, bundesstaatlichen oder nationalen bzw. zulassungsbehördlichen Auflagen durch.

1. Jede Testvorrichtung enthält eine interne Kontrolle, mit der die Effizienz der Test Reagenzien, der DNA-Extraktion, der Probenbearbeitung und die Inhibition der Amplifikation überwacht und kontrolliert wird. Die humane Mitochondrien-DNA dient als interne Kontroll-DNA. Sie stammt aus der ursprünglichen Blutprobe und bleibt bei allen Verfahrensschritten erhalten. Die Primer für die Amplifikation der internen Kontroll-DNA befinden sich in der Kontrollkammer des Alethia Analysegefäßes.
2. Gemäß guter Laborpraxis wird die Anwendung von Kontrollmaterialien empfohlen. Die Anwender sollten die entsprechenden bundesstaatlichen, staatlichen und kommunalen Richtlinien zur Mitführung von externen Qualitätskontrollen befolgen.
3. Externe positive Kontrollreagenzien für den Alethia Malaria Test sind separat erhältlich (Bestell-Nr. 479970). Alternativ können vorher als *Plasmodium sp.* positiv charakterisierte klinische oder künstlich hergestellte Blutproben als externe Positivkontrolle verwendet werden. Eine bekannte negative humane EDTA-Vollblutprobe kann als externe negative Kontrolle dienen. Es wird empfohlen, die Reaktivität jeder neuen Charge und jeder neuen Lieferung der Alethia Malaria Tests beim Empfang und vor Gebrauch zu überprüfen. Danach sind externe Kontrolltests gemäß der bundestaatlichen, staatlichen und kommunalen Richtlinien durchzuführen. Die Alethia Malaria Testkits sollen nicht für Tests an Patientenproben verwendet werden, wenn die externen Kontrollen nicht die richtigen Ergebnisse ergeben.
4. Für jedes externe Kontrollreagenz muss ein separates Testgefäß-verwendet werden.

ERWARTETE WERTE

Bei der klinischen Studie 2015 lag die Inzidenz von *Plasmodium sp.* gemäß dem Nachweis mit dem Alethia Malaria Test bei 68.1% (147/216) mit der Alethia Malaria Probenvorbereitungsmethode. Die Gesamtinzidenz jeder *Plasmodium*-Art ist weiter unten aufgeführt.

Prävalenz von *Plasmodium*-Arten		
	Alethia Malaria (n=216)	
Arten	**Insgesamt positiv**	**Prävalenz**
P. falciparum	137	63.4%
P. vivax	0	0%
P. ovale	1	0.5%
P. malariae	1	0.5%
P. knowlesi	0	0%
Unbekannt*	8	3.7%

*Es konnten keine Arten bestimmt werden, da die Proben bei der Mikroskopie negativ waren.

EINSCHRÄNKUNGEN

1. Dieses Produkt kann nur mit dem Alethia Inkubator/Lesegerät -Instrument verwendet werden.
2. Mit dem Alethia Malaria Test kann nicht zwischen einzelnen *Plasmodium*-Arten unterschieden werden.
3. Hämatokrit (> 57.5%) und Hämoglobinwerte (> 30 g/dL) über dem normalen physiologischen Bereich können die Ergebnisse der Alethia Malaria Tests ungültig machen.
4. Alethia Malaria Tests sind nicht mit Proben aus dem Erythrozytenkonzentrat getestet worden.
5. Die Leistung des Alethia Malaria Tests zum Nachweis von *Plasmodium knowlesi* wurde mit aufgereingter, genomischer DNA bestimmt; es wurden dafür keine vollständigen Organismen verwendet.
6. Der Alethia Malaria Test sind qualitative Tests und geben keine Auskunft über quantitative Parameter z. B. Hinweise auf die Belastung des Organismus.
7. Der Nachweis von Nukleinsäuren hängt von der korrekten Probenentnahme sowie von der Handhabung, dem Transport, der Lagerung und der Vorbereitung der Proben ab. Wird bei einem dieser Schritte das ordnungsgemäße Verfahren nicht eingehalten, kann dies zu falschen Ergebnissen führen.
8. Die Nukleinsäuren des Organismus können unabhängig von der Lebensfähigkeit des Organismus in vivo fortbestehen. Mit dem Alethia Malaria Test kann nicht zwischen lebensfähigen und nicht-lebensfähigen Organismen unterschieden werden.
9. Wie bei allen anderen diagnostischen Tests auf molekularer Grundlage können (A) falsch-negative Ergebnisse infolge der Präsenz von Inhibitoren, technischen Fehlern, Vertauschen der Proben und geringer Organismenanzahl in der klinischen Probe sowie (B) falsch-positive Ergebnisse infolge der Präsenz einer Kreuzkontamination mit Zielorganismen, deren Nukleinsäuren oder dem amplifizierten Produkt sowie von nicht-spezifischen Signalen entstehen.

LEISTUNGSMERKMALE

Die Leistungsfähigkeit der Alethia Malaria DNA-Amplifikations Tests wurde in klinischen Studien im November 2015 in Senegal in Afrika ermittelt. Die Leistungsmerkmale des Tests wurden mit der Referenzmethode (verglichen Blutausstriche dünner und dicker Tropfen). Die Bestimmung der *Plasmodium*-Arten bei allen positiven Proben erfolgte mikroskopisch.

Zu den Proben gehörten venöse EDTA-Vollblutproben von Patienten mit Anzeichen und Symptomen einer *Plasmodium*-Infektion zur sofortigen Messung („prospektive Proben“) und zur späteren Messung („retrospektive Proben“). Insgesamt wurden 216 qualifizierte, de-identifizierte Vollblutproben untersucht. 66 Proben wurden sofort nach der Entnahme getestet (prospektiv) und 150 Proben wurden nach der Entnahme und vor dem Test mit dem Alethia Malaria Test gefroren aufbewahrt (retrospektiv). Alle Blutproben wurden sowohl dem Alethia Malaria als auch dem Probenvorbereitungsverfahren unterworfen. Alle Proben wurden prospektiv mikroskopisch untersucht.

Die Analyse der Ergebnisse der Alethia Malaria Tests im Vergleich der prospektiven und retrospektiven Proben ergab keinen Unterschied zwischen frischen und gefrorenen Proben. In der folgenden Tabelle werden die Ergebnisse der Alethia Malaria DNA-Amplifikationstests für prospektive und retrospektive Proben zusammengefasst.

Ergebnisse von Alethia Malaria im Vergleich zur Mikroskopie

		Mikroskopie			Alethia	Leistung			
		Pos	Neg	Gesamt	INV[a]				95% CI
Alethia Malaria	Pos	139	8	147	0(1)	Sensitivität	100.0%	139/139	97.3-100.0%
	Neg	0	67	67	2(2)	Spezifität	89.3%	67/75	80.3-94.5%
	Gesamt	139	75	214	2				

[a]Zunächst ungültige Ergebnisse werden in Klammern angegeben. Die auch nach Wiederholung verbliebene Anzahl an ungültigen Proben, steht vor der Klammer.

Die Proben wurden von Patienten im Alter von 4 bis 77 Jahren gesammelt. Das Alter von 15 Patienten lag zwischen 1 – 12 Jahren; 75 waren zwischen 13 – 21 Jahre alt; 125 waren ≥ 22 Jahre alt. Das Alter eines Patienten wurde nicht bestimmt. Es wurden keine altersabhängigen Unterschiede bei den Testergebnissen beobachtet. Die Studienpopulation umfasste 84 (38.9%) weibliche Patienten und 131 (60.6%) männliche Patienten; das Geschlecht eines Patienten wurde nicht bestimmt. Es wird nicht erwartet, dass das Testergebnis vom Geschlecht beeinflusst wird.

ANALYTISCHE SENSITIVITÄT

Für *Plasmodium falciparum* und *Plasmodium vivax* wurde die Nachweisgrenze (LoD, *Limit of Detection*) ermittelt. Die LoD eines positiven Nachweises wurde unter Verwendung von mindestens 20 Replikaten und anhand einer vorgegebenen Wahrscheinlichkeit (z. B. 95 % für den Fall, dass 19 von 20 Replikaten positiv sind) bestimmt.

	Alethia Malaria
***Plasmodium*-Arten**	**Parasiten/µL**
P. falciparum (3D7)	2
P. vivax (India VII)	0.125

TEST REAKTIVITÄT

P. malariae, *P. ovale* und *P. knowlesi* einer bekannten Menge DNA wurden in negativem Vollblut verdünnt. Die Konzentration wurde dabei auf das Dreifache der jeweiligen Nachweisgrenze für die Alethia Malaria Probenvorbereitungsmethoden (durchschnittlich 72 Kopien/µL oder 6 Parasiten/µL) eingestellt. Bei diesen getesteten Konzentrationen wurden alle Arten nachgewiesen.

REPRODUZIERBARKEIT

Die Reproduzierbarkeit wurde von drei internen Labors untersucht. Den teilnehmenden Labors wurden 10 verblindete Proben übergeben. Zu diesen Proben gehörten künstlich hergestellte Proben mit *Plasmodium falciparum* (Stamm 3D7), die schwach positiv, durchschnittlich positiv und stark positiv waren. Zu diesen Proben gehörte auch eine negative Vollblutprobe. Die Tests wurden am selben Tag von mindestens zwei verschiedenen Anwendern in jedem Labor (Intra-Assay-Variabilität) fünf Tage lang (Inter-Assay-Variabilität) durchgeführt. In dieser Studie wurden jeweils drei Chargen der Alethia Malaria bzw. 8 Alethia Inkubator/Lesegeräte verwendet. Die verblindeten Proben wurden zusammen mit externen positiven und negativen Kontrollen getestet; eine bekannte negative Vollblutprobe diente als negative Kontrolle.

Zusammenfassung der Reproduzierbarkeitsstudie: Alethia Malaria Probenvorbereitungsmethode								
Probentyp	**Standort 1**		**Standort 2**		**Standort 3**		**Gesamt**	
	Übereinstimmung in Prozent		**Übereinstimmung in Prozent**		**Übereinstimmung in Prozent**		**Übereinstimmung in Prozent**	
Mäßig positiv (8 Parasiten/µL)	30/30	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90	100.0%
Schwach positiv (2 Parasiten/µL)	30/30	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90	100.0%
Stark negativ (0.458 Parasiten/µL)	30/30	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90	100.0%
Negativ	10/10	100.0%	10/10	100.0%	10/10	100.0%	30/30	100.0%
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
In den Kreuzreaktivitätsstudien wurden positive (*P. falciparum* 3D7) und negative Vollblutproben mit fremden Organismen geimpft. Dabei lagen die Minimumkonzentrationen von bakteriellen bzw. fungalen Organismen bei 1,0 x 10^6 CFU/mL, von Viren bei 1,0 x 10^5 $TCID_{50}$/mL und von Protozoen bei 1,0 x 10^5 Organismen/mL. Wo keine vollständigen Organismen erhältlich waren, wurden 1,0 x 10^6 Kopien/mL Genom-DNA hinzu gegeben und getestet. Keiner der folgenden Organismen (oder deren genetisches Material) reagierte mit den Alethia Malaria Tests: *Babesia microtei, Borrelia burgdorferi, Hemophilus influenza, Klebsiella pneumoniae, Leishmania donovani, Leishmania infantum, Leptospira interrogans, Mycobacterium smegmatis, Salmonella typhi, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus pneumoniae, Treponema pallidum, Trypanosoma cruzi, Trypanosoma rangeli, Vibrio parahaemolyticus,* Cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr-Virus (EBV), Hepatitis-B-Virus, Hepatitis-C-Virus, Herpes simplex virus 1 (HSV 1), HIV-1, humanes Papillomvirus (HPV) und Rubellavirus.

Die folgenden Organismen bzw. deren DNA standen nicht für die Tests zur Verfügung und wurden einer *In-silico*-Analyse unterzogen. Auf Grundlage dieser Computeranalyse wird nicht erwartet, dass einer der folgenden Organismen die Alethia Malaria Tests stört:
Anaplasma phagocytophilium, Clostridium botulinum, Orientia tsutsugamushi, Rickettsia conorii, Rickettsia rickettsii, Rickettsia typhi, Chikungunya-Virus, Dengue-Virus (Typen 1-4), West-Nil-Virus und Gelbfieber-Virus.

Humangenom-DNS reagierte bei 1,0 × 10^6 Kopien/mL nicht.

STÖRSUBSTANZEN-TESTS
Das Testen von Interferenzen wurde in Anwesenheit von Worst-Case-Konzentrationen von chemischen und biologischen Substanzen durchgeführt, mit denen künstlich positive ((*P. falciparum* 3D7) und negative Vollblutproben versetzt wurden. Demnach verursachen die folgenden Substanzen keine Störung beider Alethia Malaria Vorbereitungsmethoden:
Acetaminophen (1 mg/mL), Amoxicillin (0,1 mg/mL), Artesunat (1 mg/mL), Aspirin (1 mg/mL), Atovaquon (0,1 mg/mL), Cephalexin (0,1 mg/mL), Chloroquin (1 mg/mL), Ciprofloxacin (0,1 mg/mL), Clindamycin (1 mg/mL), Doxycyclin hydrochlorid (1 mg/mL), Erythromycin (0,1 mg/mL), Hydroxychloroquinsulfat (1 mg/mL), Ibuprofen (1 mg/mL), Lumefantrin (1 mg/mL), Mefloquin (1 mg/mL), Primaquin phosphat (1 mg/mL), Proguanil hydrochlorid (1 mg/mL), Pyrimethamin (1 mg/mL), Quinin sulfat (1 mg/mL), Natriumcitrat (0.11 M), erhöhte Bilirubin-Werte (> 0,15 mg/mL), erhöhte Leukozytenwerte (Buffy-Coat) > 10 % v/v), Serumalbumin (> 0,03 g/mL) und Triglyceride (> 9,9 mg/mL).

Hämatokrit (> 57.5%) und Hämoglobinwerte (> 30 g/dL) über dem normalen physiologischen Bereich können die Ergebnisse der Alethia Malaria Tests ungültig machen

REFERENCES

1. Nagamine K, Hase T, Notoni T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplifications using loop primers. Mol Cell Probes 2002;16:223-29.
2. Mori Y, Kitao M, Tomita N, Notoni T. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantitating template DNA. J Biochem Biophys 2004;59:145-47.
3. World Malaria Report 2014. Global Malaria Programme, World Health Organization. http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report/en/.
4. Cowman AF and Crabb BS. Invasion of Red Blood Cells by Malaria Parasites. Cell 2006; 124: 755-766.
5. Treatment of Malaria (Guidelines for Physicians). Centers for Disease Control and Prevention, July 2013. www.cdc.gov/malaria/resources/pdf/clinicalguidance.pdf.
6. O'Meara WP, Barcus M, Wongsrichanalai C, Muth S, Maguire JD, Jordan RG, Prescott WR, and McKenzie FE. Reader Technique as a Source of Variability in Determining Malaria Parasite Density by Microscopy.
   Malaria J 2006;5:118.
7. McKenzie FE, Sirichaisinthop J, Miller RS, Gasser RA, and Wongsrichanalai C. Dependence of Malaria Detection and Species Diagnosis by Microscopy on Parasite Density. Am J Trop Med Hyg 2003;69(4):372-376.
8. Wongsrichanalai C, Barcus MJ, Muth S, Sutamihardja A, and Wernsdorfer WH. A Review of Malaria Diagnostic Tools: Microscopy and Rapid Diagnostic Test (RDT). Am J Trop Med Hyg 2007;77(6):119-127.
9. US Department of Health and Human Services PHS/CDC/NIH. Biosafety in microbiology and biomedical laboratories, Washington DC: US Government Printing Office, 2007.
10. CLSI: MM3-A2 Molecular diagnostic methods for infectious disease; approved guideline, 2nd ed. Wayne PA: Clinical Laboratory Standards Institute. 2006.

CE **0459** **SN11035** **REV. 01/26**

Manufactured By	Meridian Bioscience, Inc. 3471 River Hills Drive Cincinnati, OHIO - 45244 USA www.meridianbioscience.com Contacts: Main Telephone (+1) 513.271.3700 Customer Service/Orders 800.543.1980 Technical Support Center 800.343.3858 Information Fax: 513.272.5432 Ordering Fax: 513.271.0124 E-mail: info@meridianbioscience.com
EC REP	Meridian Bioscience Europe, SRL Via Dell'Industria 7, 20035 Villa Cortese (Milano) ITALY www.meridianbioscience.com Contacts: Main Telephone (+39) 0331.433636 E-mail: info@meridianbioscience.eu Technical Support: MBE-TechService@meridianbioscience.eu Customer Service/Orders: • For Italian Customers: ordini@meridianbioscience.com • For Distributors / International Customers: Export.CustomerService@meridianbioscience.eu
AUSTRALIAN SPONSOR	Emergo Australia Level 20, Tower II Darling Park 201 Sussex Street Sydney, NSW 2000 Australia
UK Authorised Representative	Launch Diagnostics Limited Lakeview West Crossways Business Park Galleon Boulevard Dartford Kent DA2 6QE United Kingdom
CH REP	**MedEnvoy Switzerland** Gotthardstrasse 28 6302 Zug Switzerland

INTERNATIONAL SYMBOL USAGE
You may see one or more of these symbols on the labeling/packaging of this product:
Key guide to symbols (Guida ai simboli, Guide des symboles, Guia de simbolos, 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
CE	Meridian products carrying the European Conformity (CE) mark fulfill the requirements of Directive 98/79/EC or the Regulation 2017/746 on in-vitro diagnostic medical devices / I prodotti Meridian recanti il marchio di Conformità Europea (CE) soddisfano i requisiti della Direttiva 98/79/CE o del Regolamento 2017/746 sui dispositivi medico-diagnostici in vitro / Les produits Meridian portant la marque de Conformité européenne (CE) sont conformes aux exigences de la Directive 98/79/CE ou du Règlement 2017/746 relatifs aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / Los productos de Meridian que llevan la marca de conformidad europea (CE) cumplen los requisitos de la Directiva 98/79/CE o del Reglamento 2017/746 sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Produkte von Meridian mit der CE-Kennzeichnung erfüllen die Anforderungen der EU-Richtlinie 98/79/EG bzw. der Verordnung (EU) 2017/746 über In-vitro-Diagnostika	SMP PREP DIL SPE	Sample Preparation Apparatus containing Sample Diluent / Dispositivo per la preparazione del campione contenente il diluente del campione / Système pour la préparation de l'échantillon, diluant inclus / Aparato para Preparación de Muestra con Diluyente de Muestra / System zur Probenvorbereitung, in dem sich Probenverdünngspuffer befindet
		STERILE R	Sterilization by gamma irradiation / Sterilizzazione con raggi gamma / Stérilisation par irradiation aux rayons gamma / Esterilizado por irradiación gamma / Sterilisation durch Gammastrahlen
REF	Catalogue number / Numero di catalogo / Référence 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 / Fabbricante / Fabricant / Fabricante / Hersteller		Caution, consult accompanying documents / Attenzione, vedere le istruzioni per l'uso / Attention voir notice d'instructions / Atención, ver instrucciones de uso / Achtung, Begleitdokumente beachten
SN	Serial number / Numero di serie / Numéro de série / Número de serie / Seriennummer	STERILE EO	Sterilization by ehylene oxide / Sterilizzazione con ossido di etilene / Stérilisation par oxyde d'éthylène / Esterilizado por oxidode etileno / Sterilisation durch Ethylenoxid
Σ	Contains sufficient for <n> tests / Contenuto sufficiente per "n" saggi / Contenu suffisant pour "n" tests / Contenido suficiente para <n> ensayos / Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen	BUF RXN	Reaction Buffer / Tampone di reazione / Solution de réaction tamponnée / Tampón de Reacción / Reaktionspuffer
	Temperature limitation / Limiti di temperatura / Limites de température / Limite de temperatura / Temperaturbegrenzung		ETL Registered Mark Certified / Marchio di certificazione registrato a livello nazionale / Certifié Conforme ETL / Marca de Certificación Registrada Nacional / ETL Konform beglaubigt
	Female / 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 / Recicle – no deseche como basura general / Recycling- dieses Produkt nicht über den Hausmüll entsorgen
	Single Use Only / Prodotto Monouso / A usage unique / Para Un Solo Uso / nur für die einmalige Anwendung		
TEST	Test Device / Dispositivo test / Dispositif de test / Dispositivo de Prueba / Testgerät	HT TUBE	Heat Treatment Tube / Provetta per il Trattamento termico / Tube pour le traitement thermique / Tubo de tratamiento de calor / Röhrchen zur Hitzebearbeitung
	Date of manufacture / Data di fabbricazione / Date de fabrication / Fecha de fabricación / Herstellungsdatum		For IVD Performance Evaluation Only / Soltanto per valutazione delle prestazioni / Réactifs IVD reservés à l'évaluation des performances / Sólo para evaluación del funcionamiento / Nur zur IVD Leistungsbewertung
	LASER RADIATION: Avoid Exposure to Beam / RADIAZIONE LASER: Evitare l'esposizione al raggio / RAYONNEMENT LASER: Eviter toute exposition au faisceau / Radiación Laser: Evite Exposición a los Rayos / LASERSTRAHLUNG: Direkten Kontakt mit dem Strahl vermeiden		HOT SURFACE: Keep hands Away from Hot Surfaces / Superficie calda: tenere le mani lontane dalle superfici calde / SURFACES CHAUDES: Ne pas toucher les surfaces chaudes / Superficie Caliente: Mantenga las manos alejadas de la superficie caliente / Heiße Oberfläche: Kontakt mit heißen Oberflächen vermeiden
CAUTION	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 tampne / Solution tamponnée / Tampón / Puffer		Warning / Avvertenze / Mise En Garde / Advertencia / Warnhinweise
MIN OIL	Mineral Oil / Olio Minerale / Huile Minérale / Aceite Mineral / Mineralöl	MEDIA	Media / Terreno di trasporto / Milieux / Medio / Medium
ST TUBE	Screw Top Tube / Provetta con tappo a vite / Tube à bouchon vissé / Tubo con tapa de rosca / Röhrchen mit Schnappverschluss	COL	Sample Preparation Column / Colonna di preparazione del campione / Colonne pour la préparation de l'échantillon / Columna de preparación de muestra / Säule zur Probenaufarbeitung
BUF SMP	Sample Buffer / Soluzione tampone per il campione / Tampon de l'échantillon / Tampón de muestra / Probenpuffer	PRE REAG	Pretreatment Reagent / Reagente di Pretrattamento / Réactif de prétraitement / Reactivo de pretratamiento / Reagenz für die Vorbehandlung
Rx Only	Prescription Use Only / Per l'uso su prescrizione medica / Uniquement sur prescription / Solo Para Uso Por Receta / verschreibungspflichtig	SMP PREP	Sample Preparation / Preparazione del campione / Préparation de l'échantillon / Preparación de Muestra / Probenvorbereitung
TUBE	Empty Tube / Provetta vuota / Tube vide / Tubo vacío / Leeres Gefäß	CH REP	Swiss Authorized Representative / Mandatario svizzero / Mandataire Suisse / Representante Autorizado Suizo / Schweizer Bevollmächtigter

For technical assistance, call Technical Support Services at 800-343-3858 between the hours of 8AM and 6PM, USA Eastern Standard Time. To place an order, call Customer Service Department at 800-543-1980.