

alethia[®]

CMV DNA Amplification Assay

DNA Amplification Assay for the
Detection of Cytomegalovirus DNA

REF 481325

IVD

Rx Only

INTENDED USE

The Alethia CMV Assay Test System includes separately provided test kits for the Alethia CMV DNA Amplification Assay and the Alethia CMV External Control Reagents.

The Alethia CMV DNA Amplification Assay, performed on the Alethia instrument, is a qualitative, in vitro diagnostic test system for the direct detection of Cytomegalovirus (CMV) DNA in saliva samples from neonates younger than 21 days of age. The test is used as an aid in the diagnosis of congenital CMV infection. The results of this test should be used in conjunction with the results of other clinical findings.

Flocked swabs should be used to collect saliva from neonates. The swab can be collected dry, without viral transport media (VTM), or placed in no more than 1 mL VTM.

The Alethia CMV External Control Reagents are used as part of a routine quality control program to aid the user in detection of unexpected conditions that may lead to test errors. The external controls are intended for use with the Alethia CMV DNA Amplification Assay; the controls are not intended for use with other assays or systems.

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

The Alethia CMV molecular assay is based on loop-mediated amplification (LAMP)^{1,2} technology. The assay targets a region of the Cytomegalovirus genome that is conserved across multiple CMV strains. The Alethia CMV target is a 194 base pair (bp) sequence of the Human herpesvirus 5 genome.

LAMP 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 solution. Reaction solution absorbance characteristics are monitored by the Alethia instrument. Changes in reaction solution turbidity 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 CMV kit includes Alethia CMV Test Devices and two separate CMV Buffers for sample processing and preparation. Saliva swab specimens are first treated with Buffer I (lysis buffer); viral capsids are disrupted and nucleic acids released. The lysate is then added to Buffer II (reaction buffer). The prepared sample contains nucleic acids for use with the Alethia CMV Test Device.

The Alethia CMV Test Device contains one lyophilized amplification reagent bead in each of two chambers: a TEST chamber with Cytomegalovirus specific primers and a CONTROL chamber with human mitochondrial DNA-specific primers. Human mitochondrial DNA in saliva samples, and the human mitochondrial DNA-specific primers in the Test Device CONTROL chamber, function as the Internal Control for the assay. During specimen preparation, human mitochondrial DNA is liberated with the Cytomegalovirus DNA to allow for parallel processing of target DNA and Control DNA through amplification and detection. The Internal Control monitors DNA 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 instrument 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 instrument 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 assay results. TEST chamber S_f:S_i ratios less than 82% are reported as 'POSITIVE'. TEST chamber S_f:S_i ratios greater than or equal to 82% are reported as 'NEGATIVE'. *Numerical values are not reported.*

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

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

BIOLOGICAL PRINCIPLES

Cytomegalovirus (CMV) is a ubiquitous virus that infects people worldwide. Infections are generally acquired in youth with risk of infection increasing with age. Most infections are mild or unnoticed. CMV infection occurs through contact with body fluids from infected individuals. Infection in the USA adult population can range from approximately 42% to nearly 90%, depending on the demographic factor used in evaluation of antibody prevalence.³ In contrast to the mild infections in pediatric and adult patients, congenital CMV infections of newborns can be serious.⁴

CMV is the leading cause of congenital infections worldwide, and approximately 1-5% of births in developing countries are affected.⁴ Congenital CMV infection is a leading, nongenetic cause of sensorineural hearing loss.⁵ Identification of congenital CMV infection within the first three weeks of life may improve hearing and cognitive outcomes and is currently a focus of the American Academy of Pediatrics⁶ and the American Medical Association.⁷

Until recently, the gold standard method for diagnosing congenital CMV infection in many countries was CMV culture of urine or saliva collected within two weeks of birth.⁸ Studies indicate that salivary molecular methods, using dried or liquid saliva, offer excellent sensitivity and specificity for detecting congenital CMV.^{6,8-10} The Centers for Disease Control and Prevention lists saliva CMV tests as the standard method for diagnosing congenital CMV infection.¹¹

REAGENTS/MATERIALS PROVIDED

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

1. Alethia **CMV Test Device (item #2835-01)**: Two-chambered device containing lyophilized amplification reagents (DNA polymerase, deoxynucleotide triphosphates) with Cytomegalovirus specific primers (TEST Chamber) and human mitochondrial DNA-specific primers (CONTROL Chamber).
2. Alethia **CMV Buffer I (item #2901-02)**: Lysis solution containing 0.2N sodium hydroxide and 1% Triton-X 100.
3. Alethia **CMV Buffer II (item #2779-02)**: Tris-buffer solution containing 0.09% azide as a preservative.

MATERIALS PROVIDED SEPARATELY

1. Alethia CMV External Control Kit; Meridian Bioscience, Inc. Catalog Number: 479880

MATERIALS NOT PROVIDED

1. Disposable latex gloves, powder free
2. DNase/RNase-free, aerosol resistant pipette tips
3. Specimen collection flocked swabs:
Dry Swab: Flocked swab in Dry Tube (e.g., Copan catalog 553C)

OR
Swab in Viral Transport Media: Flocked swab in Transport Media (Maximum Fill Volume: 1 mL; e.g., BD UVT catalog BD 220526 or Puritan UniTranz-RT UTM catalog UT116)


EQUIPMENT NOT PROVIDED

1. Interval Timer
2. Vortex mixer
3. Micropipette capable of dispensing 50 µL
4. Micropipette capable of dispensing 100 µL
5. Alethia Instrument; Meridian Bioscience, Inc. Catalog Number: 610189

PRECAUTIONS

1. All reagents are for in vitro diagnostic use only.
2. CAUTION: The device contains material of human origin and should be handled as a potential carrier and transmitter of disease.
3. Follow Biosafety Level 2 and good laboratory practices during testing.¹² Treat all specimens and used Test Devices as capable of transmitting infectious agents. Do not eat, drink or smoke in areas where specimens or kit reagents are handled.
4. Wear disposable gloves while handling specimens and thoroughly wash hands afterwards.
5. Quality control programs for molecular testing laboratories, including workflow, and proper use and care of equipment, should be employed.¹³
6. Alethia CMV Test Devices contain lyophilized reagents. The protective pouches should not be opened until ready to perform the assay.
7. Alethia CMV 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.
8. Dispose of used Alethia CMV 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.
9. 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.
10. 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) P264 - Wash face, hands and any exposed skin thoroughly after handling. P280 - Wear eye protection/ face protection. P337 + P313 - If eye irritation persists: Get medical advice/attention. P321 – See SDS Section 4 or Section 11 for specific medical treatment information
---	--

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. Incorrect results may be obtained if reagents are not brought to room temperature prior to use.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Sample type: Neonatal saliva swab. Saliva flocked swabs can be collected dry (without viral transport media) or placed in a viral transport media tube (no more than 1 mL).

Sample Collection: Collect saliva swab samples and place into a transport tube (with or without viral transport media) according to established laboratory methods. No special preparation of the neonate is required in order to collect the sample.

NOTE: Collect saliva swabs at least one hour after consumption of breastmilk.

Saliva swabs may be stored at room temperature (19-30 C), refrigerated (2-8 C), or frozen (≤ -20 C) after collection and during transportation to the laboratory. Samples should be tested as soon as possible but may be stored for up to 48 hours at 19-30 C, or 7 days refrigerated (2-8 C) prior to testing. Samples that will not be tested within 7 days should be frozen immediately at ≤ -20 C and may be stored up for to 14 days. Saliva samples on dry swabs or in VTM may be frozen and thawed up to 2 times after storage at ≤ -20 C prior to testing.

SPECIMEN PREPARATION

NOTE: Ensure the Alethia instrument is powered on and required performance verifications have been completed prior to initiation of SPECIMEN PREPARATION. Refer to the Alethia instrument 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.

NOTE: When vortexing solutions, care should be taken to avoid foaming to prevent splash, touch and aerosol contamination of target viral nucleic acids. Good laboratory practices should be adhered to when performing the Alethia CMV assay.

1. Swab preparation
 - **Dry Swab:** Remove cap from the Buffer I tube, and insert the swab head into the fluid. Rotate the swab head approximately 5 times to elute the saliva. Press the swab against the side of the tube to squeeze out fluid contents. Discard the swab and recap tube.
- OR**
 - **Swab in transport medium:** Remove the cap from the Buffer I tube. Using a micropipette, transfer 100 µL of transport medium to Buffer I tube and recap. Vortex tube for approximately 10 seconds to mix.
2. Incubate at 19-30 C for 2-3 minutes.
3. Remove the cap from the Buffer II tube. Using a micropipette, transfer 50 µL of Buffer I solution to the Buffer II tube. Recap the Buffer II tube.
4. Vortex the Buffer II tube for approximately 10 seconds to mix. Diluted samples may be held in Buffer II solution at 2-30 C for up to 3 hours. Samples must be warmed to room temperature (19-30 C) prior to preceding to TEST PROCEDURE.

TEST PROCEDURE

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

- For each sample, remove 1 Alethia CMV Test Device from its protective pouch. Carefully open the device by lifting the latch, holding the chambers such that the lyophilized reagent will not fall out upon opening. Place the device on a flat surface or in a rack that can accommodate the device.
- 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 CMV Test Device. Take care to not introduce air to the reaction mixtures. Do not mix reactions with pipette. Close the Alethia Test Device and fasten the latch securely.
- Tap the device on the bench top or mix to remove air bubbles. Examine the Test Device for rehydration of the Control and Test Beads, and 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. No more than 10 minutes should elapse before initiating amplification and detection (i.e., amplification and detection should be initiated within 10 minutes of adding the sample to the Test Device).
- Insert the Alethia Test Device into the Alethia instrument and initiate amplification reaction and detection. Results will be displayed at the conclusion of the run.

INTERPRETATION OF RESULTS

Sample ID	Reported Result	Interpretation
Patient Specimen	POSITIVE	Cytomegalovirus target DNA was detected
	NEGATIVE	No Cytomegalovirus DNA detected
	INVALID*	No reportable result. The test should be repeated: Samples can be retested from the Buffer II preparation within 3 hours of sample preparation.
Positive Control	POSITIVE	Valid positive control result. Reagents active at time of use; Alethia instrument 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 at 1-800-343-3858 (US) or your local distributor.
	INVALID	No reportable result. Run must be repeated. 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 at 1-800-343-3858 (US) or your local distributor.
	NEGATIVE	Valid negative control result. Reagents active at time of use, Alethia instrument performing correctly.
	INVALID	No reportable result. Run must be repeated. Improper sample preparation, reagent failure, instrument failure or internal control failure.
EMPTY WELL	NONE	No Alethia Test Device in the Alethia instrument well. OR The Alethia Test Device present is compromised due to sample preparation failure, dirty device or improperly seated device. Repeat testing on the sample.

*Interpretation Notes

- Invalid results may occur as a result of inhibitory specimens, improper sample preparation, reagent failure, no human DNA in the specimen, instrument failure, or internal control failure.
- For VTM specimens, retesting may be performed with the original specimen if sufficient volume remains (see Specimen Collection and Preparation section for additional guidance).

QUALITY CONTROL

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

- Each device contains an internal control that controls for amplification inhibition, assay reagents and sample processing effectiveness. Human mitochondrial DNA, which serves as the internal control DNA, is liberated from the saliva sample and processed through all steps of the procedure. Primers for amplification of human mitochondrial DNA are present in the Control Chamber of the Alethia Test Device.
- Good laboratory practice guidelines recommend the use of control materials.¹³ Users should follow the appropriate federal, state and local guidelines concerning the running of external quality controls.
- Alethia CMV External Control Reagents are supplied separately (Catalog 479880). It is recommended that the reactivity of each new lot and each new shipment of Alethia CMV be verified on receipt or before use. External control tests should be performed thereafter in accordance with appropriate federal, state and local guidelines. The Alethia CMV test kit should not be used in patient testing if the external controls do not produce the correct results.
- A separate Test Device must be used for each external control reagent.

EXPECTED VALUES

The observed prevalence of CMV from prospectively collected saliva specimens during this study was 0.3% (5/1,514). The results stratified by age and sex are provided below.

Sex/Age Group	Samples positive by CRM	Prevalence in Overall Prospectively Tested Population*
Female		
14-17 days	1	0.1%
Male		
0-3 days	4	0.3%
Total	5	0.3%

*Total number of prospectively tested specimens 1,514

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- This product can only be used with the Alethia instrument.
- Samples containing mucin at concentrations >25 mg/mL may produce invalid results with the Alethia CMV assay.
- The results of the Alethia CMV assay are not intended to be used as the sole basis for diagnosis, treatment, or other patient management decisions.**
- The Alethia CMV assay is a qualitative assay and does not provide quantitative values or information about viral load.
- 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 may lead to incorrect results.
- Viral nucleic acid may persist *in vivo*, independent of viability. The Alethia CMV assay does not distinguish between viable and nonviable virus.
- 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 virus nucleic acids or amplified product, and from non-specific signals.
- Saliva sample should be obtained at least one-hour after breast feeding to avoid contamination from cytomegalovirus which may result in a false positive result. Current treatment guidelines suggest waiting at least an hour after breastfeeding to obtain the sample.
- Viral transport media fill volumes greater than 1 mL are not acceptable for use with the Alethia CMV assay.
- Crossover contamination was observed for this device, it is recommended that good laboratory practices be adhered to when performing the Alethia CMV assay; gloves should be changed frequently to avoid carryover contamination.

SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

CLINICAL PERFORMANCE

The Alethia CMV DNA Amplification Assay was evaluated from August 2017 to March 2018 at seven clinical study sites representing geographically distinct regions throughout the United States, Canada, Europe, and Australia. One-thousand five-hundred and fourteen (1,514) specimens were prospectively collected and tested with Alethia CMV assay (forty-seven of these specimens were frozen at ≤ -20 C after collection and tested later). The saliva swabs were collected at least one hour after breastfeeding.

For estimation of CRM positive percent agreement, thirty-four (34) archived specimens were also tested by Alethia CMV assay. The archived samples were de-identified samples previously evaluated from prospective clinical studies and found to have CMV infection. These samples were collected from infants less than 21 days of age and stored at -80 C after the completion of the initial testing. The status of breastfeeding time in relation to time of saliva samples collected was not available.

All samples were tested with the Alethia CMV assay at the study sites, then shipped to Meridian Bioscience, Inc. for composite reference method (CRM) testing. The CRM consisted of two manufacturer-developed and validated PCR assays. Samples positive by either PCR assay were further tested by bidirectional sequencing (BDS). Samples were considered positive when bi-directional sequencing results from either comparator PCR assay confirmed the presence of CMV DNA. Samples were considered negative when neither of the comparator PCR assays produced amplicon at the end of the 40-cycle amplification or BDS was negative.

Composite Reference Method

PCR #1	PCR #2	Bidirectional Sequencing	Composite Reference Method
+	+	+	+
+	+	-	-
+	-	+	+
+	-	-	-
-	+	+	+
-	+	-	-
-	-	n/a	-

Performance of the Alethia CMV assay was based on evaluation of 1,514 prospectively collected samples. From the prospectively collected samples; five samples were positive by CRM, 1,475 samples were negative by CRM (prevalence was 0.3% (5/1,514)), and 34 samples were invalid by the CRM and removed from the analysis (one of the samples was invalid by the Alethia CMV Assay). Among archived preselected positive samples, there were 34 samples positive by CRM.

Prospective Study

Alethia CMV	Composite Reference Method		Total
	Positive	Negative	
Positive	5	3	8
Negative	0	1472	1472
Total	5	1475	1480

	Estimate	95% CI
Positive Percent Agreement	100% (5/5)	56.7%; 100%
Negative Percent Agreement	99.8% (1,472/1,475)	99.4%; 99.9%

Preselected positive archived sample study:

34 archived preselected positive samples were evaluated in the study and confirmed positive by the CRM and the Alethia CMV Assay.

Alethia CMV	Composite Reference Method		Total
	Positive	Negative	
Positive	34	0	34
Negative	0	0	0
Total	34	0	34

	Estimate	95% CI
Positive Percent Agreement	100% (34/34)	89.9%; 100%
Negative Percent Agreement	N/A	N/A

Combined positive and negative percent agreement for the prospective study and the pre-selected positive sample study:

The positive samples from the prospective study (5) and archived pre-selected positive sample study (34) both demonstrated 100% agreement with the composite reference method and were thus presented combined in the table below.

	Estimate	95% CI
Positive Percent Agreement	100% (39/39)	91.0%; 100%
Negative Percent Agreement	99.8% (1,472/1,475)	99.4%; 99.9%

Invalid Results by Alethia CMV Assay

Twenty-seven (27) samples produced invalid results during initial testing with Alethia CMV assay. The rate of initial invalid results was 1.7% (27/1,548) and ranged from 0.7% to 4.1% at different clinical sites. After Alethia CMV assay re-testing, 26 samples had valid results. The rate of final invalid results was 0.06% (1/1,548) with 95% CI: 0.01%; 0.37%.

Additional Clinical Study Description:

Alethia CMV Assay Performance by Age (prospective and preselected positive sample types combined)

Age Group	Samples Positive by CRM			Samples Negative by CRM		
	Positive Percent Agreement	Alethia/ CRM	95% CI	Negative Percent Agreement	Alethia/CRM	95% CI
0-3 days	100%	15/15	79.6%; 100%	99.9%	1,351/1,353	99.5%; 100%
4-7 days	n/a	n/a	n/a	99.1%	108/109	95.0%; 99.8%
8-10 days	n/a	n/a	n/a	100%	4/4	51.0%; 100%
11-13 days	n/a	n/a	n/a	100%	2/2	34.2%; 100%
14-17 days	100%	1/1	20.7%; 100%	100%	6/6	61.0%; 100%
18-20 days	n/a	n/a	n/a	100%	1/1	20.7%; 100%
Known <21 days	100%	23/23	85.7%; 100%	n/a	n/a	n/a
Clinical Site Totals	100%	39/39	91.0%; 100%	99.8%	1,472/1,475	99.4%; 99.9%

Alethia CMV Assay Sex-Specific Performance (prospective and preselected positive sample types combined)

Sex	Samples Positive by CRM			Samples Negative by CRM		
	Positive Percent Agreement	Alethia/CRM	95% CI	Negative Percent Agreement	Alethia/CRM	95% CI
Female	100%	5/5	56.6%; 100%	99.7%	708/710	99.0%; 99.9%
Male	100%	11/11	74.1%; 100%	99.9%	763/764	99.3%; 100%
Unknown	100%	23/23	85.7%; 100%	100%	1/1	20.7%; 100%
Clinical Site Totals	100%	39/39	91.0%; 100%	99.8%	1,472/1,475	99.4%; 99.9%

ANALYTICAL SENSITIVITY

The analytical sensitivity, described as Limit of Detection (LoD), is the concentration at which the Alethia CMV assay has positive results at least 95% of the time. The LoD of the Alethia CMV assay was determined for Cytomegalovirus strain Merlin in a negative sample matrix. This negative matrix consisted of saliva samples collected from healthy CMV negative adults which were tested and confirmed negative by the Alethia CMV assay. Three kit lots of Alethia CMV assay reagents and eight Alethia instruments were used. A minimum of 6 dilutions with 20 replicates were tested for each lot. LoD was determined using Probit analysis. LoD was determined separately for the two sample types, dry swab and swab in VTM. LoD concentrations for each sample type are summarized below.

Sample Type	LoD (Copies/mL)
Dry Swab ¹	1,025
Swab in VTM ²	15,686

¹The CMV cp/mL concentration in saliva on the swab for dry swab samples is calculated by multiplying the CMV concentration in Buffer I by a factor of 4.75 (the 4.75-fold dilution occurs when 0.080 mL of saliva on the swab is added to 0.3 mL of Buffer I [380÷80 = 4.75]; 100% transfer is assumed).

²The CMV cp/mL concentration in saliva on the swab for VTM samples is calculated by multiplying the CMV concentration in VTM by a factor of 13.5 (the 13.5-fold dilution occurs when 0.080 mL of saliva on the swab is placed in 1 mL of VTM [1080÷80 = 13.5]; 100% transfer is assumed).

ASSAY INCLUSIVITY

Samples containing 3 additional CMV strains other than CMV strain Merlin were evaluated with the Alethia CMV assay. These strains include Toledo, Towne, and AD-169. Quantified strains were diluted in simulated negative clinical matrix to approximately 2-3X LoD for both VTM and dry swab and tested in triplicate. All strains tested for both sample types produced positive results with Alethia CMV.

CMV Strain Tested	Dry Swab Samples		VTM Swab Samples	
	Test concentration (copies/mL)	Test Results (n _{pos} /n _{total})	Test concentration (copies/mL)	Test Results (n _{pos} /n _{total})
AD-169	2,493	3/3	45,077	3/3
Toledo	2,493	3/3	45,077	3/3
Towne	2,493	3/3	45,077	3/3

REPRODUCIBILITY

Panels of two sample types, dry swab and VTM, were supplied to three laboratories for this reproducibility study. The panels included contrived CMV samples manufactured as moderate-positive, low-positive samples, and high-negative samples (30 replicates per site for each sample). The panel also included one true negative sample (10 replicates per site). Positive and Negative Controls were tested with each panel also (10 replicates per site). Testing was performed by different operators at each site on the same day for five days. Three lots of Alethia CMV kits and six Alethia instruments were used in this study. Mean values, repeatability, between-operator, between-day, and between-site components of variance, percent of positive and negative results are provided in the tables below for each sample type tested in the reproducibility study.

Reproducibility for Dry Swab Samples

Saliva Samples on Dry Swabs														
	N	Mean	Repeatability		Between-operators ¹		Between-day		Between-site ²		Reproducibility		%Pos results	%Neg results
			SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV		
Moderate Positive	90	62.26	2.93	4.7%	1.69	2.7%	0.00	0.0%	0.91	1.5%	3.50	5.6%	100%	0%
Low Positive	90	62.38	4.44	7.1%	1.96	3.1%	1.11	1.8%	0.00	0.0%	4.98	8.0%	98.9%	1.1%
High Negative	90	99.05	6.68	6.7%	0.97	1.0%	0.00	0.0%	0.23	0.2%	6.76	6.8%	3.3%	96.7%
True Negative ³	30	100.13	0.69	0.7%	n/a	n/a	0.31	0.3%	0.40	0.4%	0.86	0.9%	0%	100%
Positive Control ³	30	61.84	2.72	4.4%	n/a	n/a	0.00	0.0%	1.11	1.8%	2.94	4.8%	100%	0%
Negative Control ³	30	100.23	2.06	2.1%	n/a	n/a	0.17	0.2%	0.22	0.2%	2.08	2.1%	0%	100%

¹ Includes between-operator and between-instrument components

² Includes between-site and between-kit lot components

³ Samples were run at each site for 5 days with 2 runs per day and 1 replicate per run.

Reproducibility for VTM samples

Saliva Samples in VTM														
			Repeatability		Between-operators ¹		Between-day		Between-site ²		Reproducibility		%Pos results	%Neg results
	N	Mean	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV		
Moderate Positive	90	61.99	3.18	5.1%	1.02	1.6%	0.00	0.0%	1.20	1.9%	3.55	5.7%	100%	0%
Low Positive	90	61.71	2.37	3.8%	1.43	2.3%	0.00	0.0%	0.67	1.1%	2.85	4.6%	100%	0%
High Negative	90	100.11	4.82	4.8%	0.00	0.0%	0.74	0.7%	0.00	0.0%	4.88	4.9%	1.1%	98.9%
True Negative ³	30	99.20	7.71	7.8%	N/A	N/A	0.00	0.0%	0.00	0.0%	7.71	7.8%	3.3%	96.7%
Positive Control ³	30	62.22	2.39	3.8%	N/A	N/A	0.00	0.0%	0.49	0.8%	2.44	3.9%	100%	0%
Negative Control ³	30	100.30	2.02	2.0%	N/A	N/A	0.00	0.0%	0.12	0.1%	2.02	2.0%	0%	100%

¹ Includes between-operator and between-instrument components

² Includes between-site and between-kit lot components

³ Samples were run at each site for 5 days with 2 runs per day and 1 replicate per run.

WITHIN-LABORATORY PRECISION STUDY

Panels of two sample types, dry swab and VTM, were tested at one site (internal) over 6 days. The panels included contrived CMV samples manufactured as moderate-positive, low-positive (around 2X LoD), and high-negative samples. The panel also included one true negative sample, Positive and Negative Controls. Three kit lots were used during the study, one lot per day of testing. Each kit lot was tested twice over the 6-day testing period. Mean values, repeatability, between-operator, between-day, and between-kit lot components of variance, percent of positive and negative results are provided in the tables below for each sample type tested in the precision study.

Within-Laboratory Precision for Dry Swab Samples

Saliva Samples on Dry Swabs														
			Repeatability ¹		Between-operators ¹		Between-day		Between-kit lot		Reproducibility		%Pos results	%Neg results
	N	Mean	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV		
Moderate Positive	48	60.29	1.99	3.3%	0.00	0.0%	0.00	0.0%	0.74	1.2%	2.12	3.5%	100%	0%
Low Positive	48	60.23	1.70	2.8%	0.62	1.0%	0.00	0.0%	0.74	1.2%	1.95	3.2%	100%	0%
High Negative	48	98.26	6.46	6.6%	4.36	4.4%	1.42	1.4%	0.80	0.8%	7.96	8.1%	4.2%	95.8%
True Negative	48	99.94	0.61	0.6%	0.00	0.0%	0.12	0.1%	0.14	0.1%	0.64	0.6%	0%	100%
Positive Control	24	60.57	1.96	3.2%	0.00	0.0%	1.47	2.4%	0.00	0.0%	2.45	4.0%	100%	0%
Negative Control	24	99.73	0.29	0.3%	0.00	0.0%	0.18	0.2%	0.16	0.2%	0.38	0.4%	0%	100%

¹ Includes between-operator and between-instrument components

Within-Laboratory Precision for VTM Samples

Saliva Samples in VTM														
			Repeatability		Between-operators ¹		Between-day		Between-kit lot		Reproducibility		%Pos results	%Neg results
	N	Mean	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV		
Moderate Positive	48	60.62	1.36	2.2%	0.91	1.5%	0.00	0.0%	0.77	1.3%	1.81	3.0%	100%	0%
Low Positive	48	60.55	1.67	2.8%	0.89	1.5%	0.72	1.2%	0.00	0.0%	2.02	3.3%	100%	0%
High Negative	48	99.91	0.64	0.6%	0.00	0.0%	0.22	0.2%	0.00	0.0%	0.68	0.7%	0%	100%
True Negative	48	100.00	0.84	0.8%	0.28	0.3%	0.00	0.0%	0.00	0.0%	0.89	0.9%	0%	100%
Positive Control	24	60.28	2.12	3.5%	0.00	0.0%	1.09	1.8%	0.00	0.0%	2.38	4.0%	100%	0%
Negative Control	24	100.29	1.53	1.5%	0.28	0.3%	0.00	0.0%	0.00	0.0%	1.56	1.6%	0%	100%

¹ Includes between-operator and between-instrument components

CROSS REACTIVITY STUDIES

Cross-reactivity studies were performed with a panel of 40 microorganisms and human genomic DNA, each diluted in dry swab simulated negative clinical matrix. Microorganisms selected include those with genetic similarity to CMV and those likely to be present in the oral cavity of neonates. Microorganisms were diluted in dry swab simulated negative clinical matrix to the indicated concentration (see table below) and tested in triplicate. No cross-reactivity with the Alethia CMV assay was observed.

Microorganism	Test concentration	Test Results (n _{pos} /n _{total})	Microorganism	Test concentration	Test Results (n _{pos} /n _{total})
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1.2x10 ⁷ CFU/mL	0/3	Adenovirus	3.80x10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	1.2x10 ⁷ CFU/mL	0/3	Coronavirus	2.19x10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Bordetella pertussis</i>	1.2x10 ⁷ CFU/mL	0/3	Coxsackievirus	4.07x10 ⁶ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Candida albicans</i>	1.2x10 ⁷ CFU/mL	0/3	Enterovirus 71	1.26x10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	1.2x10 ⁷ CFU/mL	0/3	Epstein Barr Virus	3.39x10 ⁸ cp/mL	0/3
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	1.2x10 ⁷ CFU/mL	0/3	Herpes Simplex Virus 1	9.5x10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Haemophilus influenzae</i>	1.2x10 ⁷ CFU/mL	0/3	Herpes Simplex Virus 2	1.3x10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	1.2x10 ⁷ CFU/mL	0/3	Human herpesvirus 6B	6.16x10 ⁷ cp/mL	0/3
<i>Moraxella catarrhalis</i>	1.2x10 ⁷ CFU/mL	0/3	Human herpesvirus 7	3.80x10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	3.70x10 ⁷ CCU/mL	0/3	Human herpesvirus 8	2.13x10 ⁸ cp/mL	0/3
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	1.2x10 ⁷ CFU/mL	0/3	Human metapneumovirus	6.61x10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1.2x10 ⁷ CFU/mL	0/3	Influenza A	3.80x10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.2x10 ⁷ CFU/mL	0/3	Influenza B	4.57x10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1.2x10 ⁷ CFU/mL	0/3	Parainfluenza virus 1	1.95x10 ⁶ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Streptococcus agalactiae</i> (GBS)	1.2x10 ⁷ CFU/mL	0/3	Parainfluenza virus 2	5.89x10 ⁶ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Streptococcus anginosus</i> (Group F)	1.2x10 ⁷ CFU/mL	0/3	Parainfluenza virus 3	2.19x10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Streptococcus mitis</i>	1.2x10 ⁷ CFU/mL	0/3	Respiratory syncytial virus A	3.2x10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Streptococcus oralis</i>	1.2x10 ⁷ CFU/mL	0/3	Respiratory syncytial virus B	4.6x10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Streptococcus salivarius</i>	1.2x10 ⁷ CFU/mL	0/3	Rhinovirus	1.51x10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Streptococcus sanguinis</i>	1.2x10 ⁷ CFU/mL	0/3	Varicella Zoster Virus	3.36x10 ⁹ cp/mL	0/3
Human Genomic DNA	6.18x10 ⁶ cp/mL	0/3	n/a	n/a	n/a

TESTS FOR MICROBIAL INTERFERENCE

Microbial interference studies were performed with a panel of 40 microorganisms and human genomic DNA, each diluted in dry swab simulated positive clinical matrix. Each sample tested contained CMV at a concentration of 3X LoD and microorganism or human genomic DNA at the test concentration indicated above (see table in Cross-reactivity section for microorganisms tested and final test concentrations). Once prepared, each sample was tested in triplicate. No microbial interference with the Alethia CMV assay was observed (i.e., all microorganisms diluted in dry swab simulated positive clinical matrix produced 3/3 positive test results with the Alethia CMV assay).

TESTS FOR INTERFERING SUBSTANCES

Interference testing was performed in the presence of chemical and biological substances introduced directly into contrived CMV low positive (3X LoD) and negative samples. Two unique positive samples and one negative sample were tested in triplicate. The substances tested, the concentrations evaluated, and test results are shown in the following table. No interference was observed with the following substances with the Alethia CMV assay at the specified test concentrations (i.e., all positive replicates tested produced positive Alethia CMV test results and all negative replicates tested produced negative Alethia CMV test results).

Substance Tested	Test concentration	Test Results (n _{detected} /n _{total})		
		CMV Negative Sample	CMV Positive Sample #1	CMV Positive Sample #2
Infants' Pain & Fever (Acetaminophen)	0.2 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Acetylsalicylic acid	0.65 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Caffeine	0.06 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Enfamil™ Fer-In-Sol® (Ferrous Sulfate)	1.5 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Enfamil Premium® Infant Formula Newborn	10% v/v	0/3	3/3	3/3
Infants' Mylicon® Gas Relief (Simethicone)	2 mg/0.3 mL	0/3	3/3	3/3
Gaviscon® infant (Sodium alginate)	1.2 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Magnesium alginate	0.467 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Infants' Ibuprofen	0.5 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Enfamil™ Poly-Vi-Sol®	8% v/v	0/3	3/3	3/3
Little Remedies® Saline spray/drops	10% v/v	0/3	3/3	3/3
Methadone	0.002 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Morphine sulphate	0.0005 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Nystatin	1000 U/mL	0/3	3/3	3/3
Prednisone	0.0003 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Casein	10 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Mucin (from porcine stomach – Type II)*	25 mg/mL	0/3	3/3	3/3
White blood cells	10% v/v	0/3	3/3	3/3
Whole blood	10% v/v	0/3	3/3	3/3

*When mucin was tested at a concentration of 50 mg/mL, the negative sample tested negative in 3/3 replicates and CMV positive sample #1 tested positive in 3/3 replicates. CMV positive sample #2 produced two invalid test results, and one positive test result for the three replicates tested. The mucin concentration in the samples was reduced to 25 mg/mL and testing was repeated, producing the results shown in the table. No interference was observed with a mucin concentration of 25 mg/mL.

CARRYOVER CONTAMINATION STUDIES

A series of alternating true negative and high viral load samples (30X LoD) were processed using the Alethia CMV assay. A total of 30 high positive and 30 true negative samples were processed. Six runs were conducted with 10 samples each (5 high positive and 5 true negative samples). All samples tested produced expected results with all positive samples producing positive Alethia CMV test results, and all negative samples producing negative Alethia CMV test results. No carryover was observed. Workflow studies revealed that foam present after vortexing samples presents an aerosol contamination risk (i.e., when bubbles break), and/or a transfer contamination risk if gloves come in contact with liquids. It is recommended that good laboratory practices be adhered to when performing the Alethia CMV assay; gloves should be changed frequently.

SAMPLE STABILITY STUDY SUMMARY

A panel of contrived CMV low positive (3X LoD) and negative samples of both types (dry swab and VTM) were prepared and stored in aliquots as indicated below. Aliquots of each sample were removed from storage at specified intervals and allowed to equilibrate to room temperature prior to testing in triplicate. For the storage parameters indicated, all positive samples produced positive Alethia CMV results, and all negative samples produced negative Alethia CMV results.

Storage Condition	Acceptable Storage Parameters
Room Temperature (19-30 C)	48 hours
Refrigerated (2-8 C)	7 days
Frozen (≤ -20 C)	14 days, may be frozen and thawed up to 2 times

alethia®

CMV

DNA Amplification Assay

Test di amplificazione del DNA per
il rilevamento del DNA di Citomegalovirus

REF 481325

IVD

Rx Only

FINALITÀ D'USO

Alethia CMV Assay Test System include kit di analisi forniti separatamente per il test di amplificazione del DNA Alethia CMV e per i reagenti di controllo esterni per Alethia CMV.

Il test di amplificazione del DNA Alethia CMV, eseguito sullo strumento Alethia, è un sistema di analisi diagnostico in vitro qualitativo per il rilevamento diretto del DNA di Citomegalovirus (CMV) in campioni di saliva prelevati da neonati con meno di 21 giorni di vita. Il test viene utilizzato come ausilio nella diagnosi di infezione congenita da CMV. I risultati di questo test devono essere utilizzati congiuntamente ai risultati di altri test clinici.

Per raccogliere i campioni di saliva dai neonati, è necessario utilizzare tamponi floccati. Il tampone può essere prelevato a secco, senza terreno di trasporto virale (VTM), oppure può essere inserito in una provetta contenente non più di 1 mL di VTM.

I reagenti di controllo esterni per Alethia CMV vengono utilizzati nell'ambito di un programma di controllo della qualità di routine e sono di ausilio all'operatore nel rilevamento di condizioni impreviste che possono portare ad errori di analisi. I controlli esterni sono destinati all'uso con il test di amplificazione del DNA Alethia CMV; non devono essere utilizzati con altri test o sistemi.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

Il test molecolare Alethia CMV si basa sulla tecnologia LAMP (amplificazione mediata da loop)^{1,2}. Il test riguarda una regione del genoma di Citomegalovirus conservata in più ceppi di CMV. Il test Alethia CMV ha come bersaglio una sequenza di 194 paia di basi (bp) del genoma dell'herpesvirus 5 umano.

L'amplificazione mediata da loop utilizza primer appositamente disegnati per fornire la specifica e continua amplificazione isoterma del DNA. Un sottoprodotto del processo di 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 dallo strumento Alethia. Le variazioni di torbidità della soluzione di reazione, determinate dalla precipitazione del magnesio pirofosfato, indicano la presenza del DNA bersaglio. L'assenza del DNA bersaglio non causa un cambiamento significativo nell'assorbanza del campione.

Il kit Alethia CMV include dispositivi di analisi Alethia CMV e due distinte Soluzioni Tampone CMV per il trattamento e la preparazione del campione. I campioni di saliva vengono innanzitutto trattati con il Tampone I (tampone di lisi); i capsidi virali vengono disgregati e si ottiene il rilascio degli acidi nucleici. Il lisato viene quindi aggiunto al Tampone II (tampone di reazione). Il campione preparato contiene gli acidi nucleici da utilizzare con il dispositivo di analisi Alethia CMV.

Il dispositivo di analisi Alethia CMV contiene una microsfera di reagente di amplificazione liofilizzata in ognuna delle due camere: una camera TEST con primer specifici per Citomegalovirus e una camera CONTROLLO con primer specifici del DNA mitocondriale umano. Il DNA mitocondriale umano nei campioni di saliva e i relativi primer specifici del DNA mitocondriale umano presenti nella camera CONTROLLO del dispositivo di analisi fungono da controllo interno del test. Durante la preparazione del campione, il DNA mitocondriale umano viene liberato con il DNA di Citomegalovirus per consentire l'elaborazione parallela del DNA bersaglio e del DNA di controllo attraverso l'amplificazione e il rilevamento. Il controllo interno monitora l'inibizione dell'amplificazione del DNA, le prestazioni del reagente analitico e l'efficacia di elaborazione del campione. Il bersaglio del controllo deve essere amplificato e rilevato nella reazione finale, altrimenti il test è considerato non valido e i risultati non vengono riportati.

Lo strumento 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 (Signal_{initial}, S_i) e alla fine (Signal_{final}, S_f) dell'analisi. Lo strumento Alethia calcola la variazione nella trasmissione della luce tra la fine e l'inizio dell'analisi (S_f/S_i) e confronta il rapporto con un valore fisso di cut-off.

I valori fissi di cut-off per la camera di TEST vengono utilizzati per refertare i risultati dell'analisi del campione. I rapporti S_f/S_i della camera TEST inferiori all'82% sono refertati come "POSITIVI". I rapporti S_f/S_i della camera TEST superiori o pari all'82% sono refertati come "NEGATIVI". *I valori numerici non vengono refertati.*

I valori fissi di cut-off per la camera CONTROLLO vengono utilizzati per determinare la validità. I rapporti S_f/S_i della camera CONTROLLO inferiori al 90% sono considerati validi e consentono di refertare i risultati della camera TEST (POSITIVI o NEGATIVI). I rapporti S_f/S_i della camera CONTROLLO superiori o pari al 90% sono considerati non validi e impediscono di refertare i risultati della camera TEST. Le reazioni della camera CONTROLLO non valide vengono refertate come "NON VALIDE". *I valori numerici non vengono refertati.*

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

PRINCIPI BIOLOGICI

Il Citomegalovirus (CMV) è un virus ubiquitario che causa infezioni in tutto il mondo. Le infezioni sono generalmente acquisite in gioventù, ma il rischio di infezione aumenta con l'età. Nella maggior parte dei casi le infezioni sono lievi o inosservate. L'infezione da CMV avviene attraverso il contatto con fluidi corporei provenienti da individui infetti. Negli Stati Uniti, l'infezione nella popolazione adulta può variare dal 42% circa a quasi il 90%, a seconda del fattore demografico utilizzato nella valutazione della prevalenza di anticorpi.³ Contrariamente alle infezioni lievi in pazienti pediatriche e adulti, le infezioni da CMV congenite dei neonati possono essere gravi.⁴

Il CMV è la causa principale delle infezioni congenite in tutto il mondo e viene colpito dall'1 al 5% circa delle nascite nei paesi in via di sviluppo.⁴ L'infezione congenita da CMV è una causa principale e non genetica della perdita dell'udito neurosensoriale.⁵ L'identificazione dell'infezione congenita da CMV nelle prime tre settimane di vita può migliorare l'udito e gli esiti cognitivi ed è attualmente al vaglio della American Academy of Pediatrics⁶ e della American Medical Association.⁷

Fino a non molto tempo fa, il metodo di riferimento per la diagnosi di infezione congenita da CMV in molti paesi era la coltura di CMV in urina o saliva, raccolte entro due settimane dalla nascita.⁸ Gli studi dimostrano che i metodi molecolari salivari, utilizzando saliva secca o liquida, offrono un'eccellente sensibilità e specificità per il rilevamento del CMV congenito.^{8,9-10} I Centers for Disease Control and Prevention considerano i test per CMV da campioni di saliva il metodo standard per la diagnosi di infezione congenita da CMV.¹¹

REAGENTI/MATERIALI FORNITI

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

- Dispositivo di Analisi CMV Alethia (articolo #2835-01):** dispositivo costituito da due camere contenente i reagenti di amplificazione liofilizzati (DNA polimerasi, deossinucleotidi trifosfati) con i primer specifici per Citomegalovirus (camera TEST) e i primer specifici per il DNA mitocondriale umano (camera CONTROLLO).
- Tampone I di CMV Alethia (articolo #2901-02):** soluzione di lisi contenente 0,2 N idrossido di sodio e 1% Triton-X 100.
- Tampone II di CMV Alethia (articolo #2799-02):** soluzione tampone Tris contenente azoturo (0,09%) come conservante.

MATERIALI FORNITI SEPARATAMENTE

1. Kit di controllo esterno per Alethia CMV, Meridian Bioscience, Inc., numero di catalogo: 479880

MATERIALI NON FORNITI

1. Guanti in lattice monouso, senza talco
2. Puntali per pipetta privi di DNasi/RNasi e resistenti alla contaminazione da aerosol
3. Tamponi floccati per la raccolta di campioni:
Tampone a secco: tampone floccato in provetta senza terreno di trasporto (ad esempio, catalogo Copan 553C)
OPPURE
Tampone in terreno di trasporto virale: tampone floccato in terreno di trasporto (volume di riempimento massimo: 1 mL; ad esempio, catalogo BD UVT BD 220526 o catalogo Puritan UniTranz-RT UTM UT116)


STRUMENTI NON FORNITI

1. Timer a intervalli
2. Miscelatore Vortex
3. Micropipetta in grado di dispensare 50 µL
4. Micropipetta in grado di dispensare 100 µL
5. Strumento Alethia; Meridian Bioscience, Inc., numero di catalogo: 610189

PRECAUZIONI

1. Tutti i reagenti sono esclusivamente per uso diagnostico in vitro.
2. **ATTENZIONE:** il dispositivo contiene materiale di origine umana e deve essere trattato come un potenziale vettore e trasmettitore di malattie.
3. Seguire il livello di biosicurezza 2 e le buone pratiche di laboratorio durante l'analisi.¹² Trattare tutti i campioni e i dispositivi di analisi utilizzati come potenziali vettori per la trasmissione di agenti infettivi. Non mangiare, bere o fumare in aree in cui vengono manipolati i campioni o i reagenti del kit.
4. Durante la manipolazione dei campioni indossare guanti monouso e subito dopo lavarsi accuratamente le mani.
5. Applicare programmi di controllo qualità per i laboratori di analisi molecolari che comprendano flusso di lavoro, nonché uso e manutenzione adeguati dell'apparecchiatura.¹³
6. I dispositivi di analisi Alethia CMV contengono reagenti liofilizzati. Le buste protettive non devono essere aperte fino a quando non si è pronti a eseguire il test.
7. I dispositivi di analisi Alethia CMV presentano un sistema di chiusura ideato per prevenire la contaminazione dell'area di analisi con il prodotto di amplificazione. **NON** utilizzare dispositivi di analisi con la chiusura danneggiata.
8. Smaltire i dispositivi di analisi Alethia CMV e le provette subito dopo l'utilizzo. Lasciare in posizione la linguetta di chiusura del dispositivo di analisi. **NON** aprire il dispositivo di analisi dopo il trattamento. L'apertura del dispositivo dopo l'amplificazione può comportare la contaminazione dell'area di analisi con il prodotto di amplificazione.
9. 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.
10. **IMPORTANTE:** per ulteriori informazioni sulla sicurezza e sui pericoli, consultare la SDS.

DICHIARAZIONI DI PERICOLO E PRUDENZA

 Buffer I	Segnalazione Avvertenza Indicazioni di pericolo H315 – Provoca irritazione cutanea H319 – Provoca grave irritazione oculare Consigli di Prudenza - UE (§28, 1272/2008) P264 - Lavare accuratamente viso, mani ed eventuale superficie cutanea esposta dopo l'uso. P280 - Indossare protezione per occhi/viso. P337 + P313 - Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico. P321 – Trattamento specifico (vedere le istruzioni supplementari per il primo soccorso su questa etichetta)
--	--

STABILITÀ E CONSERVAZIONE

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

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Assicurarsi che i reagenti del kit siano a temperatura ambiente (19-30 C) prima dell'uso. Se i reagenti non vengono portati a temperatura ambiente prima dell'uso, si potrebbero ottenere risultati non corretti.

RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Tipo di campione: tampone di saliva di neonato. I tamponi floccati di saliva possono essere prelevati a secco (senza terreno di trasporto virale) o inseriti in una provetta contenente terreno di trasporto virale (non più di 1 mL).

Prelievo del campione: raccogliere i campioni di tampone salivare e posizionarli in una provetta di trasporto (con o senza terreno di trasporto virale) in accordo ai metodi di laboratorio stabiliti. Per la raccolta del campione non è necessaria alcuna preparazione speciale del neonato.

NOTA: prelevare i tamponi di saliva almeno un'ora dopo il consumo del latte materno.

I tamponi di saliva possono essere conservati a temperatura ambiente (19-30 C), refrigerati (2-8 C) o congelati (≤ -20 C) dopo il prelievo e durante il trasporto al laboratorio. I campioni devono essere analizzati il prima possibile, ma prima dell'analisi possono essere conservati per un massimo di 48 ore a 19-30 C o fino a 7 giorni in frigorifero (2-8 C). I campioni che non verranno analizzati entro 7 giorni devono essere congelati immediatamente a temperatura inferiore o uguale a -20 C e possono essere conservati per un massimo di 14 giorni. I campioni di saliva raccolti su tamponi a secco o in terreno di trasporto virale (VTM) possono essere congelati e scongelati fino a 2 volte dopo essere stati conservati a una temperatura inferiore o uguale a -20 C prima di eseguire l'analisi.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

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

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

NOTA: quando si miscelano le soluzioni su vortex, evitare accuratamente la formazione di schiuma per impedire la contaminazione tramite spruzzi, contatto o inalazione di acidi nucleici virali bersaglio. Quando si esegue il test Alethia CMV è necessario attenersi alle buone pratiche di laboratorio.

1. Preparazione del tampone
 - **Tampone asciutto:** rimuovere il tappo dalla provetta del Tampone I e inserire la testa del tampone nel fluido. Ruotare la testa del tampone circa 5 volte per eluire la saliva. Premere il tampone contro il lato della provetta per estrarre il contenuto di fluido. Smaltire il tampone e richiudere la provetta.

OPPURE

- **Tampone in terreno di trasporto:** rimuovere il tappo dalla provetta del Tampone I. Con una micropipetta, trasferire 100 µL di terreno di trasporto nella provetta del Tampone I, quindi rimettere il tappo. Miscelare su vortex la provetta per circa 10 secondi.
2. Incubare a 19-30 C per 2-3 minuti.
3. Rimuovere il tappo dalla provetta del Tampone II. Usando una micropipetta, trasferire 50 µL di soluzione Tampone I alla provetta del Tampone II. Rimettere il tappo alla provetta del Tampone II.
4. Miscelare su vortex la provetta del Tampone II per circa 10 secondi. I campioni diluiti possono essere conservati nella soluzione del Tampone II a 2-30 C per un massimo di 3 ore. I campioni devono essere portati a temperatura ambiente (19-30 C) prima di eseguire la PROCEDURA DEL TEST.

PROCEDURA DEL TEST

NOTA: è possibile elaborare un massimo di 10 campioni in un singolo ciclo dello strumento Alethia.

1. Per ciascun campione, rimuovere 1 dispositivo di analisi Alethia CMV dalla busta protettiva. Aprire con attenzione il dispositivo sollevando il fermo, tenendo le camere in maniera tale che il reagente liofilizzato non fuoriesca all'apertura. Collocare il dispositivo su una superficie piana o in un portaprovette in grado di contenerlo.
2. Con una micropipetta, trasferire 50 µL di campione in entrambe le camere di TEST (microsfera bianca/sinistra) e CONTROLLO (microsfera gialla/destra) del dispositivo di analisi Alethia CMV. Fare attenzione a non introdurre aria nelle miscele di reazione. Non mescolare le reazioni con la pipetta. Chiudere il dispositivo di analisi Alethia e fissare saldamente la linguetta di chiusura.
3. Picchiettare il dispositivo sul bancone o mescolare per rimuovere le bolle d'aria. Esaminare il dispositivo di analisi per verificare la reidratazione della microsfera del controllo e di quella del test, nonché per escludere la presenza di bolle d'aria residue nella camera e 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. Non devono trascorrere più di 10 minuti prima di iniziare l'amplificazione e il rilevamento (ossia l'amplificazione e il rilevamento devono iniziare entro 10 minuti dall'aggiunta del campione al dispositivo di analisi).
4. Inserire il dispositivo di analisi Alethia nello strumento Alethia e iniziare la reazione di amplificazione e il rilevamento. I risultati saranno visualizzati alla conclusione del ciclo.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

ID campione	Risultato refertato	Interpretazione
Campione del paziente	POSITIVO	È stato rilevato DNA bersaglio di Citomegalovirus.
	NEGATIVO	Non è stato rilevato DNA di Citomegalovirus.
	NON VALIDO*	Nessun risultato refertabile. Il test deve essere ripetuto: i campioni possono essere analizzati di nuovo utilizzando la preparazione del Tampone II entro 3 ore dalla preparazione del campione.
Controllo positivo	POSITIVO	Risultato del controllo positivo valido. Reagenti reattivi al momento dell'uso, corretto funzionamento dello strumento Alethia.
	NEGATIVO	Risultato del controllo errato. Come prima opzione per identificare la causa del fallimento ripetere i test di controllo. Se il fallimento dei test di controllo dovesse ripetersi, contattare il Servizio di Assistenza tecnica Meridian (negli USA 001-800-343-3858) o il Distributore Locale (Italia +390331433636).
	NON VALIDO	Nessun risultato refertabile. Il ciclo deve essere ripetuto. Preparazione del campione non corretta, mancato funzionamento del reagente, guasto dello strumento o mancato funzionamento del controllo interno.
Controllo negativo	POSITIVO	Risultato del controllo errato. Come prima opzione per identificare la causa del fallimento ripetere i test di controllo. Se il fallimento dei test di controllo dovesse ripetersi, contattare il Servizio di Assistenza tecnica Meridian (negli USA 001-800-343-3858) o il Distributore Locale (Italia +390331433636).
	NEGATIVO	Risultato di controllo negativo valido. Reagenti reattivi al momento dell'uso, corretto funzionamento dello strumento Alethia.
	NON VALIDO	Nessun risultato refertabile. Il ciclo deve essere ripetuto. Preparazione del campione non corretta, mancato funzionamento del reagente, guasto dello strumento o mancato funzionamento del controllo interno.
POZZETTO VUOTO	NESSUNO	Nessun dispositivo di analisi Alethia nel pozzetto dello strumento Alethia. OPPURE Il presente dispositivo di analisi Alethia è compromesso a causa di un errore nella preparazione del campione, dispositivo sporco o posizionamento errato del dispositivo. Ripetere l'analisi sul campione.

Note relative all'interpretazione*

- I risultati non validi possono verificarsi a causa di campioni inibitori, di una preparazione non corretta del campione, del mancato funzionamento del reagente, di assenza di DNA umano nel campione, di un guasto dello strumento o del mancato funzionamento del controllo interno.
- Per i campioni in terreno di trasporto virale, la ripetizione del test può essere eseguita con il campione originale se il volume residuo è sufficiente (vedere la sezione di Raccolta e Preparazione dei campioni per ulteriori indicazioni).

CONTROLLO QUALITÀ

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

1. Ogni dispositivo contiene un controllo interno che controlla l'inibizione dell'amplificazione, i reagenti di analisi e l'efficacia del trattamento del campione. Il DNA mitocondriale umano, che funge da DNA di controllo interno, viene liberato dal campione di saliva e sottoposto a tutte le fasi della procedura. I primer per l'amplificazione del DNA mitocondriale umano sono presenti nella camera del controllo del dispositivo di analisi Alethia.
2. Le buone pratiche di laboratorio raccomandano l'uso dei materiali di controllo.¹³ Gli operatori devono attenersi alle linee guida locali, nazionali e regionali pertinenti l'esercizio dei controlli di qualità esterni.
3. I reagenti di controllo esterni per Alethia CMV vengono forniti separatamente (numero di catalogo 479880). Si consiglia di verificare la reattività di ciascun nuovo lotto e di ogni nuova spedizione di Alethia CMV al momento della ricezione o prima dell'uso. 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 CMV non va utilizzato per l'analisi dei pazienti se i controlli esterni non producono i risultati corretti.
4. È necessario utilizzare un dispositivo di analisi separato per ciascun reagente di controllo esterno.

VALORI ATTESI

La prevalenza di CMV osservata dai campioni di saliva raccolti in modo prospettico durante questo studio è stata dello 0,3% (5/1.514). Di seguito sono forniti i risultati stratificati per età e sesso.

Gruppo sesso/età	Campioni positivi con CRM	Prevalenza nella popolazione complessiva analizzata in modo prospettico*
Femmina		
14-17 giorni	1	0,1%
Maschio		
0-3 giorni	4	0,3%
Totale	5	0,3%

*Numero totale di campioni analizzati in modo prospettico 1.514

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

- Questo prodotto può essere utilizzato solo con lo strumento Alethia.
- I campioni che contengono muco in concentrazioni superiori a 25 mg/mL possono produrre risultati non validi con il test Alethia CMV.
- I risultati del test Alethia CMV non possono essere utilizzati come unica base per la diagnosi, il trattamento o per altre decisioni relative alla gestione del paziente.**
- Il test Alethia CMV è un test qualitativo e non fornisce valori quantitativi o informazioni relative alla carica virale.
- Il rilevamento degli acidi nucleici dipende dall'adeguatezza delle procedure di raccolta, manipolazione, trasporto, conservazione e preparazione del campione. Il mancato rispetto della procedura appropriata per ciascuna di queste fasi può portare a risultati errati.
- È possibile che l'acido nucleico virale persista *in vivo* indipendentemente dalla vitalità del virus. Il test Alethia CMV non distingue tra virus vitali e virus non vitali.
- 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 acidi nucleici virali bersaglio o del prodotto di amplificazione, nonché di segnali aspecifici.
- I campioni di saliva devono essere ottenuti almeno un'ora dopo l'allattamento al seno per evitare la contaminazione da Citomegalovirus che può produrre un risultato falso positivo. Le attuali linee guida sul trattamento suggeriscono di attendere almeno un'ora dopo l'allattamento al seno per ottenere il campione.
- Volumi di riempimento del terreno di trasporto virale superiori a 1 mL non sono accettabili per l'uso con il test Alethia CMV.
- Per questo dispositivo è stata osservata una contaminazione crociata; pertanto, quando si esegue il test Alethia CMV, è necessario attenersi alle buone pratiche di laboratorio; è necessario cambiare spesso i guanti per impedire la contaminazione residua.

PRESTAZIONI SPECIFICHE

PRESTAZIONI CLINICHE

Il test di amplificazione del DNA Alethia CMV è stato valutato da agosto 2017 a marzo 2018 da sette laboratori di analisi cliniche che rappresentano regioni geograficamente distinte tra Stati Uniti, Canada, Europa e Australia. Millecinquecentoquattordici (1.514) campioni sono stati raccolti in modo prospettico e analizzati con il test Alethia CMV (quarantasette di questi campioni sono stati congelati a una temperatura pari o inferiore a -20 C dopo la raccolta e sono stati analizzati in un secondo momento). I tamponi di saliva sono stati prelevati almeno un'ora dopo l'allattamento al seno.

Per la stima della percentuale di concordanza positiva con CRM (Metodo di Riferimento Composito), sono stati analizzati con il test Alethia CMV anche trentaquattro (34) campioni archiviati. I campioni archiviati erano campioni anonimi valutati precedentemente da studi clinici prospettici e sono risultati infetti da CMV. Questi campioni sono stati raccolti da neonati con meno di 21 giorni di vita e sono stati conservati a -80 C dopo il completamento dell'analisi iniziale. L'intervallo di tempo dall'allattamento al seno rispetto al tempo della raccolta dei campioni di saliva prelevati non era disponibile.

Tutti i campioni sono stati analizzati con il test Alethia CMV nei singoli laboratori di analisi cliniche, quindi sono stati spediti a Meridian Bioscience, Inc. per essere analizzati con il metodo di riferimento composito (CRM). Il metodo di riferimento composito consiste di due test PCR sviluppati e validati dal produttore. I campioni risultati positivi in entrambi i test PCR sono stati ulteriormente analizzati mediante sequenziamento bidirezionale (BDS). I campioni sono stati considerati positivi quando i risultati del sequenziamento in entrambi i test PCR comparatori hanno confermato la presenza di DNA di CMV. I campioni sono stati considerati negativi quando nessuno dei due test PCR comparatori ha prodotto ampliconi alla fine dell'amplificazione a 40 cicli o se il sequenziamento bidirezionale era negativo.

Metodo di riferimento composito

PCR N. 1	PCR N. 2	Sequenziamento bidirezionale	Metodo di riferimento composito
+	+	+	+
+	+	-	-
+	-	+	+
+	-	-	-
-	+	+	+
-	+	-	-
-	-	n/d	-

Le prestazioni del test Alethia CMV erano basate sulla valutazione di 1.514 campioni raccolti in modo prospettico. Dei campioni raccolti in modo prospettico, cinque campioni erano positivi con il metodo di riferimento composito, 1.475 campioni erano negativi con il metodo di riferimento composito (la prevalenza è stata dello 0,3% (5/1.514)), mentre 34 campioni non erano validi con il metodo di riferimento composito e sono stati rimossi dall'analisi (uno dei campioni era risultato non valido con il test Alethia CMV). Tra i campioni positivi archiviati preselezionati, 34 campioni erano risultati positivi con il metodo di riferimento composito.

Studio prospettico

Alethia CMV	Metodo di Riferimento Composito		Totale
	Positivo	Negativo	
Positivo	5	3	8
Negativo	0	1472	1472
Totale	5	1475	1480

Percentuale di concordanza positiva	Stima	IC 95%
	100% (5/5)	56,7%; 100%
Percentuale di concordanza negativa	Stima	IC 95%
	99,8% (1.472/1.475)	99,4%; 99,9%

Studio sui campioni archiviati positivi preselezionati:

Per lo studio sono stati valutati 34 campioni positivi preselezionati archiviati, la cui positività è stata confermata dal metodo di riferimento composito e dal test Alethia CMV.

Alethia CMV	Metodo di Riferimento Composito		Totale
	Positivo	Negativo	
Positivo	34	0	34
Negativo	0	0	0
Totale	34	0	34

Percentuale di concordanza positiva	Stima	IC 95%
	100% (34/34)	89,9%; 100%
Percentuale di concordanza negativa	Stima	IC 95%
	N/D	N/D

Percentuale di concordanza positiva e negativa combinata per lo studio prospettico e lo studio sui campioni positivi preselezionati:

Lo studio prospettico sui campioni positivi (5) e lo studio sui campioni positivi preselezionati archiviati (34) hanno entrambi confermato una concordanza del 100% con il metodo di riferimento composito, pertanto vengono presentati combinati nella tabella sottostante.

Percentuale di concordanza positiva	Stima	IC 95%
	100% (39/39)	91,0%; 100%
Percentuale di concordanza negativa	Stima	IC 95%
	99,8% (1.472/1.475)	99,4%; 99,9%

Risultati non validi con il test Alethia CMV

Ventisette (27) campioni hanno prodotto risultati non validi durante l'analisi iniziale con il test Alethia CMV. La percentuale dei risultati non validi iniziali è stata dell'1,7% (27/1.548), con valori compresi nel range 0,7-4,1% nei diversi laboratori. Dopo aver eseguito nuovamente l'analisi con il test Alethia CMV, 26 campioni hanno fornito risultati validi. La percentuale dei risultati non validi finali è stata dello 0,06% (1/1.548) con IC 95%: 0,01%; 0,37%.

Descrizione di studi clinici aggiuntivi:**Prestazioni del test Alethia CMV per età (tipi di campioni positivi prospettici e preselezionati combinati)**

Gruppo d'età	Campioni positivi con CRM			Campioni negativi con CRM		
	Percentuale di concordanza positiva	Alethia/CRM	IC 95%	Percentuale di concordanza negativa	Alethia/CRM	IC 95%
0-3 giorni	100%	15/15	79,6%; 100%	99,9%	1.351/1.353	99,5%; 100%
4-7 giorni	n/d	n/d	n/d	99,1%	108/109	95,0%; 99,8%
8-10 giorni	n/d	n/d	n/d	100%	4/4	51,0%; 100%
11-13 giorni	n/d	n/d	n/d	100%	2/2	34,2%; 100%
14-17 giorni	100%	1/1	20,7%; 100%	100%	6/6	61,0%; 100%
18-20 giorni	n/d	n/d	n/d	100%	1/1	20,7%; 100%
Noto <21 giorni	100%	23/23	85,7%; 100%	n/d	n/d	n/d
Totali laboratori clinici	100%	39/39	91,0%; 100%	99,8%	1.472/1.475	99,4%; 99,9%

Prestazioni del test Alethia CMV per sesso (tipi di campioni positivi prospettici e preselezionati combinati)

Sesso	Campioni positivi con CRM			Campioni negativi con CRM		
	Percentuale di concordanza positiva	Alethia/CRM	IC 95%	Percentuale di concordanza negativa	Alethia/CRM	IC 95%
Femminile	100%	5/5	56,6%; 100%	99,7%	708/710	99,0%; 99,9%
Maschile	100%	11/11	74,1%; 100%	99,9%	763/764	99,3%; 100%
Sconosciuto	100%	23/23	85,7%; 100%	100%	1/1	20,7%; 100%
Totali laboratori clinici	100%	39/39	91,0%; 100%	99,8%	1.472/1.475	99,4%; 99,9%

SENSIBILITÀ ANALITICA

La sensibilità analitica, descritta come limite di rilevamento (LoD), è la concentrazione alla quale il test Alethia CMV fornisce risultati positivi per almeno il 95% delle volte. Il LoD del test Alethia CMV è stato determinato per il ceppo di Citomegalovirus Merlin in una matrice di campioni negativa. Questa matrice negativa consiste di campioni di saliva raccolti da adulti sani negativi al CMV, che sono stati analizzati e confermati negativi dal test Alethia CMV. Sono stati utilizzati tre lotti del kit di reagenti per il test Alethia CMV e otto strumenti Alethia. Per ciascun lotto è stato analizzato un minimo di 6 diluizioni con 20 replicati. Il LoD è stato determinato utilizzando l'analisi Probit. Il LoD è stato determinato separatamente per i due tipi di campioni, il tampone a secco e il tampone in VTM. Le concentrazioni LoD per ciascun tipo di campione sono riepilogate di seguito.

Tipo di campione	LoD (Copie/mL)
Tampone a secco ¹	1.025
Tampone in VTM ²	15.686

¹La concentrazione cp/mL di CMV nella saliva sul tampone per campioni raccolti con tampone a secco viene calcolata moltiplicando la concentrazione di CMV nel tampone I per un fattore di 4,75 (la diluizione di 4,75 volte avviene quando si aggiunge 0,080 mL di saliva presente sul tampone a 0,3 mL della soluzione Tampone I [380÷80 = 4,75]; si presuppone un trasferimento al 100%).

²La concentrazione cp/mL di CMV nella saliva sul tampone per campioni in VTM viene calcolata moltiplicando la concentrazione di CMV in VTM per un fattore di 13,5 (la diluizione di 13,5 volte avviene quando si aggiunge 0,080 mL di saliva presente sul tampone a 1 mL di VTM [1080÷80 = 13,5]; si presuppone un trasferimento al 100%).

INCLUSIVITÀ DEL TEST

Con il test Alethia CMV sono stati valutati campioni contenenti 3 ceppi di CMV aggiuntivi diversi dal ceppo CMV Merlin. Tali ceppi corrispondono a Toledo, Towne e AD-169. I ceppi quantificati sono stati diluiti in matrice clinica negativa simulata a circa 2-3X LoD sia per il tampone a secco sia per quello VTM, quindi sono stati analizzati in triplicato. Tutti i ceppi analizzati per entrambi i tipi di campioni hanno prodotto risultati positivi con Alethia CMV.

Ceppo CMV analizzato	Campioni raccolti con tampone a secco		Campioni raccolti con tampone VTM	
	Concentrazione del test (copie/mL)	Risultati del test (n _{Pos} /n _{Totali})	Concentrazione del test (copie/mL)	Risultati del test (n _{Pos} /n _{Totali})
AD-169	2.493	3/3	45.077	3/3
Toledo	2.493	3/3	45.077	3/3
Towne	2.493	3/3	45.077	3/3

RIPRODUCIBILITÀ

Per questo studio di riproducibilità sono stati forniti pannelli di due tipi di campioni, prelevati con tampone a secco e in VTM a tre laboratori. I pannelli includevano campioni CMV artificiali prodotti come campioni positivi moderati, campioni positivi bassi e campioni negativi alti (30 replicati per singolo laboratorio per ciascun campione). Il pannello includeva anche un campione vero negativo (10 replicati per singolo laboratorio). Sono stati analizzati con ciascun pannello anche i Controlli Positivi e Negativi (10 replicati per singolo laboratorio). L'analisi è stata condotta da diversi operatori in ciascun laboratorio lo stesso giorno per cinque giorni. In questo studio sono stati utilizzati tre lotti del kit Alethia CMV e sei strumenti Alethia. Nelle tabelle sottostanti vengono forniti i valori medi, la ripetibilità, i componenti della variabilità tra operatori, tra laboratori e tra giorni diversi, la percentuale di risultati positivi e negativi per ciascun tipo di campione analizzato nello studio di riproducibilità.

Riproducibilità per campioni prelevati con tampone a secco

	N	Campioni di saliva su tamponi a secco													
		Ripetibilità			Tra operatori ¹		Tra giorni diversi		Tra laboratori ²		Riproducibilità		% risultati pos	% risultati neg	
	Media	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV		
Positivo Moderato	90	62,26	2,93	4,7%	1,69	2,7%	0,00	0,0%	0,91	1,5%	3,50	5,6%	100%	0%	
Basso Positivo	90	62,38	4,44	7,1%	1,96	3,1%	1,11	1,8%	0,00	0,0%	4,98	8,0%	98,9%	1,1%	
Alto Negativo	90	99,05	6,68	6,7%	0,97	1,0%	0,00	0,0%	0,23	0,2%	6,76	6,8%	3,3%	96,7%	
Vero Negativo³	30	100,13	0,69	0,7%	n/d	n/d	0,31	0,3%	0,40	0,4%	0,86	0,9%	0%	100%	
Controllo Positivo³	30	61,84	2,72	4,4%	n/d	n/d	0,00	0,0%	1,11	1,8%	2,94	4,8%	100%	0%	
Controllo Negativo³	30	100,23	2,06	2,1%	n/d	n/d	0,17	0,2%	0,22	0,2%	2,08	2,1%	0%	100%	

¹ Include i componenti della variabilità tra operatori e tra strumenti

² Include i componenti della variabilità tra laboratori e tra lotti del kit

³ I campioni sono stati analizzati in ciascun laboratorio per 5 giorni con 2 cicli e 1 replicato per ciclo.

Riproducibilità per campioni VTM

Campioni di saliva in VTM														
	N	Media	Ripetibilità		Tra operatori ¹		Tra giorni diversi		Tra laboratori ²		Riproducibilità		% risultati pos	% risultati neg
			SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV		
Positivo Moderato	90	61,99	3,18	5,1%	1,02	1,6%	0,00	0,0%	1,20	1,9%	3,55	5,7%	100%	0%
Basso Positivo	90	61,71	2,37	3,8%	1,43	2,3%	0,00	0,0%	0,67	1,1%	2,85	4,6%	100%	0%
Alto Negativo	90	100,11	4,82	4,8%	0,00	0,0%	0,74	0,7%	0,00	0,0%	4,88	4,9%	1,1%	98,9%
Vero Negativo³	30	99,20	7,71	7,8%	N/D	N/D	0,00	0,0%	0,00	0,0%	7,71	7,8%	3,3%	96,7%
Controllo Positivo³	30	62,22	2,39	3,8%	N/D	N/D	0,00	0,0%	0,49	0,8%	2,44	3,9%	100%	0%
Controllo Negativo³	30	100,30	2,02	2,0%	N/D	N/D	0,00	0,0%	0,12	0,1%	2,02	2,0%	0%	100%

¹ Include i componenti della variabilità tra operatori e tra strumenti

² Include i componenti della variabilità tra laboratori e tra lotti del kit

³ I campioni sono stati analizzati in ciascun laboratorio per 5 giorni con 2 cicli e 1 replicato per ciclo.

STUDIO DI PRECISIONE INTRA-LABORATORIO

Pannelli di due tipi di campioni, uno prelevato con tampone a secco e l'altro in VTM, sono stati analizzati in un laboratorio (interno) per 6 giorni. I pannelli includevano campioni CMV artificiali prodotti come campioni positivi moderati, campioni bassi positivi (circa 2X LoD) e campioni alti negativi. Il pannello comprendeva anche un campione vero negativo, controlli positivi e controlli negativi. Durante lo studio, sono stati utilizzati tre lotti del kit, un lotto per ciascun giorno di analisi. Ciascun lotto del kit è stato testato due volte nel periodo di 6 giorni di analisi. Nelle tabelle sottostanti vengono riportati i valori medi, la ripetibilità, i componenti della variabilità tra operatori, tra laboratori e tra giorni diversi, la percentuale di risultati positivi e negativi per ciascun tipo di campione analizzato nello studio di precisione.

Precisione intra-laboratorio per campioni raccolti con tampone a secco

Campioni di saliva su tamponi a secco														
	N	Media	Ripetibilità ¹		Tra operatori ¹		Tra giorni diversi		Tra lotti del kit		Riproducibilità		% risultati pos	% risultati neg
			SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV		
Positivo Moderato	48	60,29	1,99	3,3%	0,00	0,0%	0,00	0,0%	0,74	1,2%	2,12	3,5%	100%	0%
Basso Positivo	48	60,23	1,70	2,8%	0,62	1,0%	0,00	0,0%	0,74	1,2%	1,95	3,2%	100%	0%
Alto Negativo	48	98,26	6,46	6,6%	4,36	4,4%	1,42	1,4%	0,80	0,8%	7,96	8,1%	4,2%	95,8%
Vero Negativo	48	99,94	0,61	0,6%	0,00	0,0%	0,12	0,1%	0,14	0,1%	0,64	0,6%	0%	100%
Controllo Positivo	24	60,57	1,96	3,2%	0,00	0,0%	1,47	2,4%	0,00	0,0%	2,45	4,0%	100%	0%
Controllo Negativo	24	99,73	0,29	0,3%	0,00	0,0%	0,18	0,2%	0,16	0,2%	0,38	0,4%	0%	100%

¹ Include i componenti della variabilità tra operatori e tra strumenti

Precisione intra-laboratorio per campioni raccolti con tampone VTM

Campioni di saliva in VTM														
	N	Media	Ripetibilità		Tra operatori ¹		Tra giorni diversi		Tra lotti del kit		Riproducibilità		% risultati pos	% risultati neg
			SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV		
Positivo Moderato	48	60,62	1,36	2,2%	0,91	1,5%	0,00	0,0%	0,77	1,3%	1,81	3,0%	100%	0%
Basso Positivo	48	60,55	1,67	2,8%	0,89	1,5%	0,72	1,2%	0,00	0,0%	2,02	3,3%	100%	0%
Alto Negativo	48	99,91	0,64	0,6%	0,00	0,0%	0,22	0,2%	0,00	0,0%	0,68	0,7%	0%	100%
Vero Negativo	48	100,00	0,84	0,8%	0,28	0,3%	0,00	0,0%	0,00	0,0%	0,89	0,9%	0%	100%
Controllo Positivo	24	60,28	2,12	3,5%	0,00	0,0%	1,09	1,8%	0,00	0,0%	2,38	4,0%	100%	0%
Controllo Negativo	24	100,29	1,53	1,5%	0,28	0,3%	0,00	0,0%	0,00	0,0%	1,56	1,6%	0%	100%

¹ Include i componenti della variabilità tra operatori e tra strumenti

STUDI DI CROSS-REATTIVITÀ

Sono stati eseguiti studi di reattività crociata con un pannello di 40 microorganismi e DNA genomico umano, ciascuno diluito in matrice clinica negativa simulata i cui campioni sono stati raccolti con tampone a secco. I microorganismi selezionati includono quelli con somiglianze genetiche a CMV e quelli che potrebbero essere presenti nella cavità orale dei neonati. I microorganismi sono stati diluiti in matrice clinica negativa simulata i cui campioni sono stati raccolti con tampone a secco, alla concentrazione indicata (vedere la tabella sottostante) e analizzati in triplicato. Non è stata osservata alcuna reattività crociata con il test Alethia CMV.

Microorganismo	Concentrazione del test	Risultati del test (n _{pos} /n _{totali})	Microorganismo	Concentrazione del test	Risultati del test (n _{pos} /n _{totali})
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1,2x10 ⁷ CFU/mL	0/3	Adenovirus	3,80x10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	1,2x10 ⁷ CFU/mL	0/3	Coronavirus	2,19x10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Bordetella pertussis</i>	1,2x10 ⁷ CFU/mL	0/3	Coxsackievirus	4,07x10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Candida albicans</i>	1,2x10 ⁷ CFU/mL	0/3	Enterovirus 71	1,26x10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	1,2x10 ⁷ CFU/mL	0/3	Virus di Epstein Barr	3,39x10 ⁸ cp/mL	0/3
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	1,2x10 ⁷ CFU/mL	0/3	Virus Herpes Simplex di tipo 1	9,5x10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Hemophilus influenzae</i>	1,2x10 ⁷ CFU/mL	0/3	Virus Herpes Simplex di tipo 2	1,3x10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	1,2x10 ⁷ CFU/mL	0/3	Herpesvirus umano 6B	6,16x10 ⁷ cp/mL	0/3
<i>Moraxella catarrhalis</i>	1,2x10 ⁷ CFU/mL	0/3	Herpesvirus umano 7	3,80x10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	3,70x10 ⁷ CCU/mL	0/3	Herpesvirus umano 8	2,13x10 ⁸ cp/mL	0/3
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	1,2x10 ⁷ CFU/mL	0/3	Metapneumovirus umano	6,61x10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,2x10 ⁷ CFU/mL	0/3	Influenza di tipo A	3,80x10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,2x10 ⁷ CFU/mL	0/3	Influenza di tipo B	4,57x10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1,2x10 ⁷ CFU/mL	0/3	Virus parainfluenzale 1	1,95x10 ⁶ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Streptococcus agalactiae</i> (GBS)	1,2x10 ⁷ CFU/mL	0/3	Virus parainfluenzale 2	5,89x10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Streptococcus anginosus</i> (Gruppo F)	1,2x10 ⁷ CFU/mL	0/3	Virus parainfluenzale 3	2,19x10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Streptococcus mitis</i>	1,2x10 ⁷ CFU/mL	0/3	Virus respiratorio sinciziale A	3,2x10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Streptococcus oralis</i>	1,2x10 ⁷ CFU/mL	0/3	Virus respiratorio sinciziale B	4,6x10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Streptococcus salivarius</i>	1,2x10 ⁷ CFU/mL	0/3	Rinovirus	1,51x10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Streptococcus sanguinis</i>	1,2x10 ⁷ CFU/mL	0/3	Virus della varicella zoster	3,36x10 ⁹ cp/mL	0/3
DNA genomico umano	6,18x10 ⁶ cp/mL	0/3	n/d	n/d	n/d

TEST PER L'INTERFERENZA MICROBICA

Sono stati eseguiti studi sull'interferenza microbica con un pannello di 40 microorganismi e DNA genomico umano, ciascuno diluito in matrice clinica negativa simulata i cui campioni sono stati raccolti con tampone a secco. Ciascun campione analizzato conteneva CMV a una concentrazione di 3X LoD e DNA genomico umano o microorganismo alla concentrazione del test sopra indicata (per i microorganismi analizzati e le concentrazioni del test finali, vedere la tabella nella sezione della Cross-reattività). Una volta preparato, ciascun campione è stato analizzato in triplicato. Non è stata osservata alcuna interferenza microbica con il test Alethia CMV (ossia tutti i microorganismi diluiti in matrice clinica negativa simulata, i cui campioni sono stati raccolti con tampone a secco, hanno prodotto 3/3 risultati di test positivi con il test Alethia CMV).

ANALISI DI SOSTANZE INTERFERENTI

Il test sull'interferenza è stato condotto in presenza di sostanze chimiche e biologiche introdotte direttamente nei campioni CMV artificiali positivi bassi (3XLoD) e nei campioni negativi. Due soli campioni positivi e un campione negativo sono stati analizzati in triplicato. Le sostanze analizzate, le concentrazioni valutate e i risultati delle analisi sono riportati nella tabella sottostante. Non è stata osservata alcuna interferenza con le seguenti sostanze utilizzando il test Alethia CMV alle concentrazioni del test specificate (ossia tutti i replicati positivi analizzati hanno prodotto risultati del test Alethia CMV positivi e tutti i replicati negativi analizzati hanno prodotto risultati del test Alethia CMV negativi).

Sostanze analizzate	Concentrazione del test	Risultati del test (N rilevati/N totali)		
		Campione negativo CMV	Campione positivo CMV N. 1	Campione positivo CMV N. 2
Dolore e febbre nei lattanti (paracetamolo)	0,2 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Acido acetilsalicilico	0,65 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Caffeina	0,06 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Enfamil™ Fer-In-Sol® (solfato ferroso)	1,5 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Enfamil Premium® Latte artificiale per neonati	10% v/v	0/3	3/3	3/3
Mylicon® Antimetorico per neonati (Simeticone)	2 mg/0,3 mL	0/3	3/3	3/3
Gaviscon® per neonati (alginato di sodio)	1,2 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Alginato di magnesio	0,467 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Ibuprofene per neonati	0,5 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Enfamil™ Poly-Vi-Sol®	8% v/v	0/3	3/3	3/3
Little Remedies® soluzione salina spray/gocce	10% v/v	0/3	3/3	3/3
Metadone	0,002 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Solfato di morfina	0,0005 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Nistatina	1000 U/mL	0/3	3/3	3/3
Prednisone	0,0003 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Caseina	10 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Mucina (dallo stomaco porcino – Tipo II)*	25 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Leucociti	10% v/v	0/3	3/3	3/3
Sangue intero	10% v/v	0/3	3/3	3/3

*Quando la mucina è stata analizzata a una concentrazione di 50 mg/mL, il campione negativo è risultato negativo in 3/3 replicati e il campione positivo CMV N. 1 è risultato positivo in 3/3 replicati. Il campione positivo CMV N. 2 ha prodotto due risultati non validi e un risultato positivo per i tre replicati analizzati. La concentrazione di mucina nei campioni è stata ridotta a 25 mg/mL e l'analisi è stata ripetuta, producendo i risultati riportati nella tabella. Non è stata osservata alcuna interferenza con una concentrazione di mucina di 25 mg/mL.

STUDI SULLA CONTAMINAZIONE DA CARRY OVER

Utilizzando il test Alethia CMV, è stata elaborata una serie di campioni alternati con carica virale elevata e veri negativi (30X LoD). Sono stati processati un totale di 30 campioni alti positivi e di 30 campioni veri negativi. Sono stati condotti sei cicli con 10 campioni ciascuno (5 campioni alti positivi e 5 campioni veri negativi). Tutti i campioni analizzati hanno prodotto i risultati previsti: tutti i campioni positivi hanno prodotto risultati del test Alethia CMV positivi, e tutti i campioni negativi hanno prodotto risultati del test Alethia CMV negativi. Non è stata osservata alcuna contaminazione da carry over. Gli studi sul flusso di lavoro hanno rivelato che la schiuma che si forma dopo aver miscelato i campioni su vortex presenta un rischio di contaminazione per inalazione (ad esempio, quando si rompe una bolla), e/o un rischio di contaminazione tramite trasferimento se i guanti entrano a contatto con i liquidi. Quando si esegue un test Alethia CMV, attenersi alle buone pratiche di laboratorio; è necessario cambiare spesso i guanti.

RIEPILOGO DELLO STUDIO SULLA STABILITÀ DEI CAMPIONI

Un pannello di campioni bassi positivi (3X LoD) e negativi CMV strumentali di entrambi i tipi (tampone a secco e VTM) è stato preparato e conservato nelle aliquote come indicato di seguito. Le aliquote di ciascun campione sono state prelevate dal sito di conservazione a intervalli specificati perché potessero raggiungere la temperatura ambiente prima di eseguire l'analisi in triplicato. Per tutti i parametri di conservazione indicati, tutti i campioni positivi hanno prodotto risultati del test Alethia CMV positivi, e tutti i campioni negativi hanno prodotto risultati del test Alethia CMV negativi.

Condizioni di conservazione	Parametri di conservazione accettabili
Conservare a temperatura ambiente (19-30 C)	48 ore
Refrigerati (2-8 C)	7 giorni
Congelati (≤ -20 C)	14 giorni, i campioni possono essere congelati e scongelati 2 volte

alethia®

CMV

DNA Amplification Assay

Test d'amplification de l'ADN pour la
détection de l'ADN du cytomégalo virus

REF 481325

IVD

Rx Only

BUT DE LA METHODE

Le système de test du CMV Alethia comporte des coffrets de test fournis séparément pour le test d'amplification de l'ADN du CMV Alethia et les réactifs de contrôle externe du CMV Alethia.

Le test d'amplification de l'ADN du CMV Alethia, effectué sur l'instrument Alethia, est un système de test de diagnostic *in vitro* qualitatif pour la détection directe de l'ADN du cytomégalo virus (CMV) dans des échantillons de salive prélevés sur des nouveau-nés âgés de moins de 21 jours. Ce test est utilisé comme aide au diagnostic de l'infection congénitale à CMV. Les résultats de ce test doivent être utilisés de concert avec d'autres résultats cliniques.

La salive des nouveau-nés doit être recueillie à l'aide d'un écouvillon floqué. L'écouvillon peut être prélevé à sec, sans milieu de transport viral (VTM) ou placé dans 1 mL maximum de VTM.

Les réactifs de contrôle externe du CMV Alethia aident l'utilisateur, dans le cadre d'un programme de contrôle qualité de routine, à détecter des situations inattendues qui pourraient conduire à des erreurs de tests. Les contrôles externes sont prévus pour être utilisés avec le test d'amplification de l'ADN du CMV Alethia ; ils ne sont pas prévus pour être utilisés avec d'autres tests ou systèmes.

RESUME ET EXPLICATION DU TEST

Le test moléculaire du CMV Alethia repose sur la technologie d'amplification génique isotherme facilitée par boucle (LAMP)^{1,2}. Il vise une région du génome du cytomégalo virus présente dans plusieurs souches du CMV. La cible du CMV Alethia est une séquence de 194 paires de bases (pb) du génome de l'herpès virus 5 humain.

La méthode LAMP utilise des amorces spécialement conçues pour obtenir une amplification isotherme spécifique et continue de l'ADN. Le pyrophosphate de magnésium, sous-produit de cette amplification, forme un précipité blanc qui trouble la solution. Les caractéristiques d'absorbance de la solution de réaction sont lues par l'instrument Alethia. La présence de l'ADN cible est signalée par la modification de la turbidité 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 coffret CMV Alethia comporte des dispositifs de test du CMV Alethia et deux tampons CMV séparés pour le traitement et la préparation de l'échantillon. Les échantillons de salive sur l'écouvillon sont d'abord traités avec le tampon I (tampon de lyse) ; les capsides virales sont brisées libérant des acides nucléiques. Le lysat est ensuite ajouté au tampon II (tampon de réaction). L'échantillon préparé contient les acides nucléiques à utiliser avec le dispositif de test du CMV Alethia.

Ce dispositif de test contient une bille de réactif d'amplification lyophilisé dans chacun de ses deux puits : un puits TEST comprenant des amorces spécifiques au cytomégalo virus et un puits CONTRÔLE comprenant des amorces spécifiques à l'ADN mitochondrial humain. L'ADN mitochondrial humain dans les échantillons de salive et les amorces spécifiques à l'ADN mitochondrial humain dans le puits CONTRÔLE du dispositif de test jouent le rôle de contrôle interne du test. Pendant la préparation de l'échantillon, l'ADN mitochondrial humain est libéré avec l'ADN du cytomégalo virus 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 déceler l'inhibition de l'amplification de l'ADN, l'efficacité des réactifs du test et du traitement des échantillons. La cible de 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 feront pas l'objet d'un rapport.

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

Des valeurs seuil prédéfinies pour le puits TEST sont utilisées pour rapporter les résultats du test pour les échantillons. Les rapports S_f:S_i du puits TEST inférieurs à 82 % sont rapportés comme étant « POSITIFS ». Les rapports S_f:S_i du puits TEST supérieurs ou égaux à 82 % sont rapportés comme étant « NEGATIFS ». *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 90 % dans le puits CONTRÔLE sont considérés comme étant valides et permettent de rapporter les résultats du puits TEST (POSITIF ou NEGATIF). Les rapports S_f:S_i supérieurs ou égaux à 90 % dans le puits CONTRÔLE sont considérés comme étant non valides et ne permettent pas de rapporter les résultats pour le puits TEST. Les réactions non valides du puits CONTRÔLE sont présentées comme étant « NON VALIDES ». *Les valeurs numériques ne sont pas rapportées.*

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 agissent comme prévu et que l'échantillon a été traité de manière appropriée.

PRINCIPE DU TEST

Le cytomégalo virus (CMV) est un virus omniprésent qui infecte les êtres humains dans le monde entier. Les infections interviennent généralement au cours de la jeunesse, le risque d'infection augmentant avec l'âge. La plupart des infections sont légères ou passent inaperçues. L'infection à CMV se produit au contact des liquides corporels d'individus infectés. Aux États-Unis, l'infection de la population adulte peut varier d'environ 42 % à près de 90 %, en fonction du facteur démographique utilisé lors de l'évaluation de la prévalence de l'anticorps³. À la différence des infections légères chez les patients pédiatriques et adultes, les infections congénitales à CMV chez les nouveau-nés peuvent être graves⁴.

Le CMV est la principale cause d'infections congénitales dans le monde et touche environ 1 à 5 % des naissances dans les pays en développement⁴. L'infection congénitale à CMV est l'une des principales causes non génétiques de la surdité de perception⁵. L'identification de l'infection congénitale à CMV au cours des trois premières semaines de vie peut améliorer les résultats auditifs et cognitifs, et est actuellement l'un des principaux centres d'intérêt de l'American Academy of Pediatrics⁶ et de l'American Medical Association⁷.

Jusqu'à il y a peu, dans de nombreux pays, la norme en matière de diagnostic de l'infection congénitale à CMV était la culture de CMV à partir d'échantillons d'urine ou de salive recueillis dans les deux semaines suivant la naissance⁸. Les études indiquent que la sensibilité et la spécificité des méthodes moléculaires salivaires, qui utilisent de la salive séchée ou liquide, sont excellentes pour la détection du CMV congénital^{6, 9-10}. Les centres de prévention et de contrôle des maladies indiquent que les tests du CMV sur la salive sont la norme en matière de diagnostic de l'infection congénitale à CMV¹¹.

MATERIEL FOURNI

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

1. **Dispositif de test du CMV Alethia (article #2835-01)**: dispositif à deux puits contenant les réactifs d'amplification lyophilisés (ADN polymérase, triphosphates désoxynucléotidiques) avec des amorces spécifiques au cytomégalo virus (puits TEST) et des amorces spécifiques à l'ADN mitochondrial humain (puits CONTRÔLE).
2. **Tampon I CMV Alethia (article #2901-02)**: solution de lyse contenant de l'hydroxyde de sodium 0,2N et du Triton-X 100 à 1 %.
3. **Tampon II CMV Alethia (article #2799-02)**: solution tamponnée au Tris contenant une solution d'azide à 0,09 % en tant que conservateur.

MATERIEL FOURNI SEPAREMENT

1. Coffret de contrôle externe du CMV Alethia ; Meridian Bioscience, Inc. Numéro de référence : 479880

MATERIEL NON FOURNI

1. Gants jetables en latex, non poudrés
2. Embouts de pipettes résistant aux aérosols, exempts de DNase/RNase
3. Écouvillons floqués de prélèvement d'échantillons :
Écouvillon sec : écouvillon floqué dans un tube sec (ex. Copan, référence 553C)
OU
Écouvillon dans un milieu de transport viral : écouvillon floqué dans un milieu de transport (volume de remplissage maximum : 1 mL ; ex., BD UVT, référence BD 220526 ou Puritan UniTranz-RT UTM, référence UT116)


EQUIPEMENT NON FOURNI

1. Minuteur
2. Agitateur-mélangeur Vortex
3. Micropipette pouvant distribuer 50 µL
4. Micropipette pouvant distribuer 100 µL
5. Instrument Alethia; Meridian Bioscience, Inc. Numéro de référence : 610189

PRECAUTIONS D'EMPLOI

1. Tous les réactifs sont prévus pour un usage diagnostique *in vitro* uniquement.
2. **AVERTISSEMENT** : le dispositif contient des matières d'origine humaine et doit être manipulé de la même manière qu'un porteur et vecteur de maladie potentiel.
3. Respecter les recommandations de biosécurité de niveau 2 et les bonnes pratiques de laboratoire pendant l'analyse¹². Traiter tous les échantillons et tous les dispositifs de test usagés comme étant susceptibles de transmettre des agents infectieux. Ne pas manger, boire ou fumer dans les espaces où les échantillons ou les réactifs du coffret sont manipulés.
4. Porter des gants jetables lors de la manipulation des échantillons. Se laver minutieusement les mains après la manipulation.
5. Suivre les programmes de contrôle de la qualité pour les laboratoires de diagnostic moléculaire, y compris pendant le flux de travail ; procéder à l'utilisation et l'entretien corrects de l'équipement¹³.
6. Les dispositifs de test du CMV Alethia contiennent des réactifs lyophilisés. Ne pas ouvrir les pochettes de protection avant d'être prêt à effectuer le test.
7. Les dispositifs de test du CMV Alethia comportent un loquet conçu pour éviter la contamination de la zone de test par le produit d'amplification. NE PAS utiliser les dispositifs de test dont le loquet serait brisé.
8. Jeter les dispositifs de test du CMV Alethia et les tubes immédiatement après les avoir utilisés. Laisser le loquet du dispositif de test 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.
9. 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.
10. **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 sévé Conseils de prudence - UE (par 28, 1272/2008) P264 - Se laver le visage, les mains et toute surface de peau exposée soigneusement après manipulation. P280 - Porter un équipement de protection des yeux/du visage. P337 + P313 - Si l'irritation oculaire persiste : Consulter un médecin. P321 – Traitement spécifique (voir les instructions complémentaires de premier secours sur cette étiquette).
--	---

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 coffret sont à température ambiante (19 à 30 C) avant leur emploi. Si les réactifs ne sont pas à la température ambiante avant l'emploi, les résultats pourraient être erronés.

PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Type d'échantillon : écouvillon de salive de nouveau-né. Les écouvillons floqués de salive peuvent être prélevés à sec (sans milieu de transport viral) ou placés dans un tube de milieu de transport viral (pas plus de 1 mL).

Prélèvement des échantillons : prélever des échantillons d'écouvillonnage de salive et les placer dans un tube de transport (avec ou sans milieu de transport viral) conformément aux méthodes établies du laboratoire. Aucune préparation particulière du nouveau-né n'est requise pour prélever l'échantillon.

REMARQUE : prélever les écouvillons de salive au moins une heure après la consommation de lait maternel.

Les écouvillons de salive peuvent être conservés à température ambiante (entre 19 et 30 C), réfrigérés (entre 2 et 8 C) ou congelés (≤ -20 C) après le prélèvement et pendant le transport jusqu'au laboratoire. Les échantillons doivent être testés dès que possible, mais peuvent être conservés jusqu'à 48 heures entre 19 et 30 C, ou 7 jours au réfrigérateur (entre 2 et 8 C) avant d'être testés. Les échantillons qui ne seront pas testés dans les 7 jours doivent être immédiatement congelés à une température ≤ -20 C, conditions dans lesquelles ils peuvent être conservés jusqu'à 14 jours. Les échantillons de salive sur des écouvillons secs ou dans un VTM peuvent être congelés et décongelés jusqu'à 2 fois après stockage à ≤ -20 C avant d'être testés.

REPARATION DES ECHANTILLONS

REMARQUE: s'assurer que l'instrument Alethia est sous tension et que les vérifications de performance requises ont été réalisées avant le début de la PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS. Consulter le manuel de l'utilisateur de l'instrument 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 à 30 C) avant de les préparer.

REMARQUE: lors du passage des solutions au Vortex, éviter la formation de mousse afin de prévenir la contamination des acides nucléiques viraux cibles par des éclaboussures, le toucher et des aérosols. Les bonnes pratiques de laboratoire être respectées lors de la réalisation du test du CMV Alethia.

- Préparation de l'écouvillon
 - Écouvillon sec :** enlever le capuchon du tube de tampon I et insérer la tête de l'écouvillon dans le liquide. Faire tourner la tête de l'écouvillon environ 5 fois pour éluer la salive. Presser l'écouvillon contre la paroi du tube pour en essorer le liquide. Jeter l'écouvillon et refermer le capuchon du tube.
- OU**
- Écouvillon dans un milieu de transport :** retirer le capuchon du tube de tampon I. À l'aide d'une micropipette, transférer 100 µL de milieu de transport dans le tube de tampon I et refermer le capuchon. Passer le tube au Vortex pendant environ 10 secondes pour mélanger.
- Incuber le tube entre 19 et 30 C pendant 2 à 3 minutes.
- Retirer le capuchon du tube de tampon II. À l'aide d'une micropipette, transférer 50 µL de solution tampon I dans le tube de tampon II. Refermer le capuchon du tube de tampon II.
- Passer le tube de tampon II au Vortex pendant environ 10 secondes pour mélanger. Les échantillons dilués peuvent être conservés dans la solution de tampon II entre 2 et 30 C pendant 3 heures maximum. Les échantillons doivent être ramenés à température ambiante (entre 19 et 30 C) avant de passer à la PROCEDURE DE TEST.

PROCEDURE DE TEST

REMARQUE : il est possible de traiter au maximum 10 échantillons lors d'un seul passage dans l'instrument Alethia.

- Pour chaque échantillon, sortir 1 dispositif de test du CMV Alethia de sa pochette de protection. 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.
- À l'aide d'une micropipette, transférer 50 µL de l'échantillon à la fois vers le puits TEST (gauche/bille blanche) et vers le puits CONTRÔLE (droite/bille jaune) du dispositif de test du CMV Alethia. Veiller à ne pas faire entrer d'air dans les mélanges réactifs. Ne pas mélanger les réactifs avec la pipette. Fermer le dispositif de test Alethia et rabattre correctement le loquet.
- Tapoter le dispositif sur la pailasse ou mélanger pour éliminer les bulles d'air. Examiner le dispositif de test pour vérifier la réhydratation des billes de contrôle et de test, l'absence de bulles d'air dans le puits et de liquide au sommet du dispositif. Si les billes ne sont pas dissoutes, ou en présence de bulles d'air ou de liquide au sommet du dispositif, tapoter ce dernier sur la pailasse et répéter l'examen visuel. L'amplification et la détection doivent commencer dans les 10 minutes (qui suivent l'ajout de l'échantillon dans le dispositif de test).
- Insérer le dispositif de test Alethia dans l'instrument Alethia et lancer la réaction d'amplification et la détection. Les résultats seront affichés à la fin de l'exécution du test.

INTERPRETATION DES RESULTATS

ID échantillon	Résultats indiqués	Interprétation
Échantillon du patient	POSITIF	L'ADN cible du cytomégalo virus a été détecté
	NÉGATIF	Aucun ADN de cytomégalo virus détecté
	NON VALIDE*	Aucun résultat exploitable. Le test doit être répété : des échantillons issus de la préparation de tampon II peuvent être de nouveau testés dans les 3 heures qui suivent leur préparation.
Contrôle positif	POSITIF	Résultat de contrôle positif valide. Réactifs actifs au moment de l'utilisation ; fonctionnement correct de l'instrument Alethia.
	NÉGATIF	Résultat de contrôle non valide. En premier lieu, recommencer les tests de contrôle pour déterminer la cause de l'échec. Si les échecs du contrôle se reproduisent, contacter le service technique de Meridian au 1-800-343-3858 (États-Unis) ou le distributeur local.
	NON VALIDE	Aucun résultat exploitable. Le test doit être répété. Mauvaise préparation des échantillons, échec du réactif, panne de l'instrument ou échec du contrôle interne.
Contrôle négatif	POSITIF	Résultat de contrôle non valide. En premier lieu, recommencer les tests de contrôle pour déterminer la cause de l'échec. Si les échecs du contrôle se reproduisent, contacter le service technique de Meridian au 1-800-343-3858 (États-Unis) ou le distributeur local.
	NÉGATIF	Résultat de contrôle négatif valide. Réactifs actifs au moment de l'utilisation, fonctionnement correct de l'instrument Alethia.
	NON VALIDE	Aucun résultat exploitable. Le test doit être répété. Mauvaise préparation des échantillons, échec du réactif, panne de l'instrument ou échec du contrôle interne.
PUITS VIDE	AUCUN	Aucun dispositif de test Alethia dans le puits de l'instrument Alethia. OU Le dispositif de test Alethia présent ne répond pas en raison d'une mauvaise préparation de l'échantillon, de la présence de saleté ou d'un mauvais positionnement du dispositif. Répéter le test sur l'échantillon.

*Remarques d'interprétation

- Des résultats non valides peuvent se produire du fait d'échantillons inhibiteurs, d'une préparation incorrecte de l'échantillon, d'un échec des réactifs, de l'absence d'ADN humain dans l'échantillon, de la défaillance de l'instrument ou d'un échec du contrôle interne.
- Pour les échantillons dans du VTAM, le test peut être répété sur l'échantillon d'origine s'il en reste un volume suffisant (voir la section Prélèvement et préparation des échantillons pour des consignes supplémentaires).

CONTROLE DE QUALITE

Ce test doit être réalisé conformément aux exigences des réglementations fédérales, régionales ou locales ou des directives des organismes d'accréditation.

- Chaque dispositif contient un contrôle interne qui vérifie l'absence d'inhibition de l'amplification, l'efficacité des réactifs et du traitement des échantillons. L'ADN mitochondrial humain, qui sert de contrôle d'ADN interne, est libéré de l'échantillon de salive et passe par toutes les étapes de la procédure. Des amorces d'amplification de l'ADN mitochondrial humain sont présentes dans le puits de contrôle du dispositif de test Alethia.
- Les directives des bonnes pratiques de laboratoire recommandent l'emploi de matériels de contrôle¹³. Les utilisateurs doivent suivre les directives fédérales, régionales ou locales appropriées relatives à l'exécution de contrôles de qualité externes.
- Les réactifs de contrôle externe du CMV Alethia sont fournis séparément (référence 479880). Il est recommandé de vérifier la réactivité de chaque nouveau lot et de chaque nouvel envoi du CMV Alethia dès sa réception ou avant l'emploi. Les tests de contrôle externe doivent être exécutés par la suite conformément aux directives fédérales, régionales ou locales. Le coffret de test du CMV Alethia ne doit pas être utilisé pour tester les patients si les contrôles externes ne fournissent pas de résultats corrects.
- Utiliser un dispositif de test séparé pour chaque réactif de contrôle externe.

VALEURS ATTENDUES

La prévalence observée du CMV présent dans des échantillons de salive prélevés prospectivement pendant cette étude était de 0,3 % (5/1 514). Les résultats, ventilés par âge et par sexe, sont présentés ci-dessous.

Sexe/Groupe d'âge	Échantillons positifs avec la MRC	Prévalence dans l'ensemble de la population testée de manière prospective*
Féminin		
14-17 jours	1	0,1 %
Masculin		
0-3 jours	4	0,3 %
Total	5	0,3 %

* Nombre total d'échantillons testés prospectivement = 1 514

LIMITES DU TEST

- Ce produit ne peut être utilisé qu'avec l'instrument Alethia.
- Les échantillons contenant de la mucine à des concentrations >25 mg/mL peuvent produire des résultats non valides avec le test du CMV Alethia.
- Les résultats du test du CMV Alethia ne sont pas prévus pour être utilisés à eux seuls pour le diagnostic, le traitement ou toute autre décision relative à la prise en charge du patient.**
- Le test du CMV Alethia est un test qualitatif et ne fournit pas de valeurs ou d'informations quantitatives sur la charge virale.
- La détection des acides nucléiques dépend de la réalisation correcte du prélèvement, de la manipulation, du transport, de la conservation et de la préparation de l'échantillon. Le non-respect de la procédure appropriée lors de l'une de ces étapes peut entraîner des résultats incorrects.
- Les acides nucléiques peuvent persister *in vivo*, indépendamment de la viabilité. Le test du CMV Alethia ne fait pas de distinction entre les virus viables et non viables.
- Comme avec tous les tests de diagnostic moléculaire : a) des résultats faussement négatifs peuvent se produire en raison de la présence d'inhibiteurs, d'une erreur technique, 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 acides nucléiques cibles du virus ou du produit amplifié, et en raison de signaux non spécifiques.
- Les échantillons de salive doivent être obtenus au moins une heure après l'allaitement au sein pour éviter la contamination par cytomégalovirus qui pourrait provoquer un résultat faussement positif. Les directives de traitement en vigueur préconisent d'attendre au moins une heure après l'allaitement avant de prélever l'échantillon.
- Les volumes de remplissage de milieu de transport viral supérieurs à 1 mL ne sont pas acceptables avec le test du CMV Alethia.
- Une contamination croisée a été observée pour ce dispositif ; il est recommandé de suivre les bonnes pratiques de laboratoire lors de l'exécution du test du CMV Alethia. Les gants doivent être changés fréquemment pour éviter tout transfert de contamination.

PERFORMANCES DU TEST PERFORMANCES CLINIQUES

Le test d'amplification de l'ADN du CMV Alethia a été évalué entre août 2017 et mars 2018 dans sept centres d'études cliniques représentant différentes régions géographiques aux États-Unis, au Canada, en Europe et en Australie. Mille cinq cent quatorze (1 514) échantillons ont été recueillis prospectivement et testés avec le test du CMV Alethia (quarante-sept de ces échantillons étaient congelés à ≤ -20 C après leur prélèvement et testés ultérieurement). Les écouvillons de salive ont été prélevés au moins une heure après l'allaitement au sein.

Pour une estimation de la concordance en pourcentage positif de la MRC, trente-quatre (34) échantillons archivés ont aussi été testés avec le test du CMV Alethia. Les échantillons archivés étaient des échantillons dépersonnalisés préalablement évalués par des études cliniques prospectives et diagnostiqués comme étant infectés par le CMV. Ces échantillons ont été prélevés sur des nourrissons âgés de moins de 21 jours et stockés à -80 C après la réalisation du test initial. Le laps de temps entre l'heure de l'allaitement au sein et l'heure de prélèvement des échantillons de salive n'était pas disponible.

Tous les échantillons ont été soumis au test du CMV Alethia sur les sites d'étude, puis envoyés à Meridian Bioscience, Inc. pour être testés suivant la méthode de référence composite (MRC). La MRC consistait en deux tests de PCR développés et validés par le fabricant. Les échantillons positifs pour l'un quelconque des tests de PCR ont subi des tests supplémentaires par séquençage bidirectionnel (SBD). Les échantillons ont été considérés comme étant positifs lorsque les résultats du séquençage bidirectionnel de l'un quelconque test de PCR comparateur a confirmé la présence de l'ADN du CMV. Les échantillons ont été considérés comme étant négatifs lorsqu'aucun des tests de PCR comparateurs n'a produit d'amplicons au terme des 40 cycles d'amplification ou lorsque le séquençage bidirectionnel était négatif.

Méthode de référence composite

PCR n° 1	PCR n° 2	Séquençage bidirectionnel	Méthode de référence composite
+	+	+	+
+	+	-	-
+	-	+	+
+	-	-	-
-	+	+	+
-	+	-	-
-	-	s/o	-

Les performances du test du CMV Alethia étaient basées sur l'évaluation de 1 514 échantillons recueillis prospectivement. Parmi les échantillons recueillis prospectivement, cinq échantillons étaient positifs selon la MRC, 1 475 échantillons étaient négatifs selon la MRC (la prévalence était de 0,3 % [5/1 514]), et 34 échantillons étaient non valides selon la MRC et éliminés de l'analyse (l'un des échantillons était non valide d'après le test du CMV Alethia). Parmi les échantillons positifs présélectionnés archivés, 34 échantillons étaient positifs selon la MRC.

Étude prospective

CMV Alethia	Méthode de référence composite		Total
	Positif	Négatif	
Positif	5	3	8
Négatif	0	1 472	1 472
Total	5	1 475	1 480

	Estimation	IC à 95 %
Concordance en pourcentage positif	100 % (5/5)	56,7 % ; 100 %
Concordance en pourcentage négatif	99,8 % (1 472/1 475)	99,4 % ; 99,9 %

Étude d'échantillons positifs archivés présélectionnés :

34 échantillons positifs archivés présélectionnés ont été évalués dans l'étude et confirmés comme étant positifs selon la MRC et le test du CMV Alethia.

CMV Alethia	Méthode de référence composite		Total
	Positif	Négatif	
Positif	34	0	34
Négatif	0	0	0
Total	34	0	34

	Estimation	IC à 95 %
Concordance en pourcentage positif	100 % (34/34)	89,9 % ; 100 %
Concordance en pourcentage négatif	s/o	s/o

Combinaison de la concordance en pourcentage positif et pourcentage négatif pour l'étude prospective et l'étude des échantillons positifs présélectionnés :

Les échantillons positifs de l'étude prospective (5) et de l'étude des échantillons positifs archivés présélectionnés (34) ont montré une concordance de 100 % avec la méthode de référence composite et sont donc présentés en combinaison dans le tableau ci-dessous.

	Estimation	IC à 95 %
Concordance en pourcentage positif	100 % (39/39)	91,0 % ; 100 %
Concordance en pourcentage négatif	99,8 % (1 472/1 475)	99,4 % ; 99,9 %

Résultats non valides selon le test du CMV Alethia

Vingt-sept (27) échantillons ont donné lieu à des résultats non valides lors du test initial avec le test du CMV Alethia. Le taux de résultats non valides initiaux était de 1,7 % (27/1 548) et allait de 0,7 % à 4,1 % dans les différents centres cliniques. Après un nouveau test avec le test du CMV Alethia, 26 échantillons ont obtenu des résultats valides. Le taux de résultats non valides finaux était de 0,06 % (1/1 548) avec un IC à 95 % de : 0,01 % ; 0,37 %.

Description d'une étude clinique supplémentaire :

Performance de l'étude du CMV Alethia en fonction de l'âge (combinaison des types d'échantillons positifs prospectifs et présélectionnés)

Groupe d'âge	Échantillons positifs selon la MRC			Échantillons négatifs selon la MRC		
	Concordance en pourcentage positif	Alethia/MRC	IC à 95 %	Concordance en pourcentage négatif	Alethia/MRC	IC à 95 %
0-3 jours	100 %	15/15	79,6 % ; 100 %	99,9 %	1 351/1 353	99,5 % ; 100 %
4-7 jours	s/o	s/o	s/o	99,1 %	108/109	95,0 % ; 99,8 %
8-10 jours	s/o	s/o	s/o	100 %	4/4	51,0 % ; 100 %
11-13 jours	s/o	s/o	s/o	100 %	2/2	34,2 % ; 100 %
14-17 jours	100 %	1/1	20,7 % ; 100 %	100 %	6/6	61,0 % ; 100 %
18-20 jours	s/o	s/o	s/o	100 %	1/1	20,7 % ; 100 %
Connus <21 jours	100 %	23/23	85,7 % ; 100 %	s/o	s/o	s/o
Totaux centres cliniques	100 %	39/39	91,0 % ; 100 %	99,8 %	1 472/1 475	99,4 % ; 99,9 %

Performance de l'étude du CMV Alethia en fonction du sexe (combinaison des types d'échantillons positifs prospectifs et présélectionnés)

Sexe	Échantillons positifs selon la MRC			Échantillons négatifs selon la MRC		
	Concordance en pourcentage positif	Alethia/MRC	IC à 95 %	Concordance en pourcentage négatif	Alethia/MRC	IC à 95 %
Féminin	100 %	5/5	56,6 % ; 100 %	99,7 %	708/710	99,0 % ; 99,9 %
Masculin	100 %	11/11	74,1 % ; 100 %	99,9 %	763/764	99,3 % ; 100 %
Inconnu	100 %	23/23	85,7 % ; 100 %	100 %	1/1	20,7 % ; 100 %
Totaux centres cliniques	100 %	39/39	91,0 % ; 100 %	99,8 %	1 472/1 475	99,4 % ; 99,9 %

SENSIBILITE ANALYTIQUE

La sensibilité analytique, décrite par la limite de détection (LD), est la concentration à laquelle le test du CMV Alethia obtient des résultats positifs au moins 95 % des fois. La LD du test du CMV Alethia a été déterminée pour la souche Merlin de Cytomegalovirus dans une matrice d'échantillons négative. La matrice négative contenait des échantillons de salive prélevés chez des adultes sains négatifs pour le CMV testés et confirmés comme étant négatifs avec le test du CMV Alethia. Trois lots de coffrets de réactifs du test du CMV Alethia et huit instruments ont été utilisés. Au moins 6 dilutions avec 20 réplicats ont été testés pour chaque lot. La LD a été définie en utilisant l'analyse de Probit. Elle a été définie séparément pour deux types d'échantillons, à savoir écouvillon sec et écouvillon dans le VTM. Les concentrations de la LD de chaque type d'échantillon sont indiquées ci-dessous.

Type d'échantillon	LD (copies/mL)
Écouvillon sec ¹	1 025
Écouvillon dans le VTM ²	15 686

¹La concentration de CMV en copies/mL dans la salive sur l'écouvillon pour les échantillons sur écouvillon sec est calculée en multipliant la concentration du CMV dans le tampon I par un facteur de 4,75 (la dilution par 4,75 se produit lorsque 0,080 mL de salive sur l'écouvillon est ajouté à 0,3 mL de tampon I [380:80 = 4,75] ; on suppose un transfert de 100 %).

²La concentration de CMV en copies/mL dans la salive sur l'écouvillon pour les échantillons dans le VTM est calculée en multipliant la concentration du CMV dans le VTM par un facteur de 13,5 (la dilution par 13,5 se produit lorsque 0,080 mL de salive sur l'écouvillon est placé dans 1 mL de VTM [1080:80 = 13,5] ; on suppose un transfert de 100 %).

INCLUSIVITE DU TEST

Des échantillons contenant 3 souches de CMV supplémentaires autres que la souche Merlin de CMV ont été évalués à l'aide du test du CMV Alethia. Ces trois souches sont Toledo, Towne et AD-169. Les souches quantifiées ont été diluées dans une matrice clinique négative simulée à environ 2 à 3 fois la LD tant pour l'écouvillon sec que pour l'échantillon dans du VTM et testées en triple. Toutes les souches testées pour les deux types d'échantillons ont produit des résultats positifs avec le test du CMV Alethia.

Souche de CMV testée	Échantillons d'écouvillon sec		Échantillons d'écouvillon dans du VTM	
	Concentration du test (copies/mL)	Résultats du test (n _{pos} /n _{total})	Concentration du test (copies/mL)	Résultats du test (n _{pos} /n _{total})
AD-169	2 493	3/3	45 077	3/3
Toledo	2 493	3/3	45 077	3/3
Towne	2 493	3/3	45 077	3/3

REPRODUCTIBILITE DU TEST

Des microplaques de deux types d'échantillons, écouvillon sec et écouvillon dans VTM, ont été fournies à trois laboratoires pour cette étude de reproductibilité. Les microplaques incluaient des échantillons de CMV artificiels fabriqués comme des échantillons positifs modérés, des échantillons faiblement positifs et des échantillons fortement négatifs (30 réplicats par site pour chaque échantillon). La microplaque incluait aussi un échantillon vrai négatif (10 réplicats par site). Les contrôles positifs et négatifs ont aussi été testés avec chaque microplaque (10 réplicats par site). Les tests ont été exécutés par des techniciens différents dans chaque centre, le même jour pendant cinq jours. Trois lots de coffrets de CMV Alethia et six instruments Alethia ont été utilisés pour cette étude. Les tableaux ci-dessous indiquent les valeurs moyennes, la répétabilité, la variance d'un opérateur à l'autre, d'un jour à l'autre, et d'un composant de centre à l'autre, le pourcentage de résultats positifs et de résultats négatifs pour chaque type d'échantillon testé lors de l'étude de reproductibilité.

Reproductibilité pour les échantillons sur écouvillon sec

Échantillons de salive sur écouvillons secs														
	N	Moyenne	Répétabilité		D'un opérateur à l'autre ¹		D'un jour à l'autre		D'un centre à l'autre ²		Reproductibilité		% résultats pos	% résultats nég
			E-T	%CV	E-T	%CV	E-T	%CV	E-T	%CV	E-T	%CV		
Modérément positif	90	62,26	2,93	4,7 %	1,69	2,7 %	0,00	0,0 %	0,91	1,5 %	3,50	5,6 %	100 %	0 %
Faiblement positif	90	62,38	4,44	7,1 %	1,96	3,1 %	1,11	1,8 %	0,00	0,0 %	4,98	8,0 %	98,9 %	1,1 %
Fortement négatif	90	99,05	6,68	6,7 %	0,97	1,0 %	0,00	0,0 %	0,23	0,2 %	6,76	6,8 %	3,3 %	96,7 %
Vrai négatif ³	30	100,13	0,69	0,7 %	s/o	s/o	0,31	0,3 %	0,40	0,4 %	0,86	0,9 %	0 %	100 %
Contrôle positif ³	30	61,84	2,72	4,4 %	s/o	s/o	0,00	0,0 %	1,11	1,8 %	2,94	4,8 %	100 %	0 %
Contrôle négatif ³	30	100,23	2,06	2,1 %	s/o	s/o	0,17	0,2 %	0,22	0,2 %	2,08	2,1 %	0 %	100 %

¹ Inclut la variance d'un opérateur à l'autre et d'un composant d'instrument à l'autre

² Inclut la variance d'un centre à l'autre et d'un composant de lot de coffrets à l'autre

³ Les échantillons ont été analysés dans chaque centre pendant 5 jours avec 2 analyses par jour et 1 réplicat par analyse.

Reproductibilité des échantillons dans du VTM

Échantillons de salive dans du VTM														
	N	Moyenne	Répétabilité		D'un opérateur à l'autre ¹		D'un jour à l'autre		D'un centre à l'autre ²		Reproductibilité		% résultats pos	% résultats nég
			E-T	%CV	E-T	%CV	E-T	%CV	E-T	%CV	E-T	%CV		
Modérément positif	90	61,99	3,18	5,1 %	1,02	1,6 %	0,00	0,0 %	1,20	1,9 %	3,55	5,7 %	100 %	0 %
Faiblement positif	90	61,71	2,37	3,8 %	1,43	2,3 %	0,00	0,0 %	0,67	1,1 %	2,85	4,6 %	100 %	0 %
Fortement négatif	90	100,11	4,82	4,8 %	0,00	0,0 %	0,74	0,7 %	0,00	0,0 %	4,88	4,9 %	1,1 %	98,9 %
Vrai négatif ³	30	99,20	7,71	7,8 %	s/o	s/o	0,00	0,0 %	0,00	0,0 %	7,71	7,8 %	3,3 %	96,7 %
Contrôle positif ³	30	62,22	2,39	3,8 %	s/o	s/o	0,00	0,0 %	0,49	0,8 %	2,44	3,9 %	100 %	0 %
Contrôle négatif ³	30	100,30	2,02	2,0 %	s/o	s/o	0,00	0,0 %	0,12	0,1 %	2,02	2,0 %	0 %	100 %

¹ Inclut la variance d'un opérateur à l'autre et d'un composant d'instrument à l'autre

² Inclut la variance d'un centre à l'autre et d'un composant de lots de coffrets à l'autre

³ Les échantillons ont été analysés dans chaque centre pendant 5 jours avec 2 analyses par jour et 1 réplicat par analys

ETUDE DE PRECISION INTRA-LABORATOIRE

Des microplaques de deux types d'échantillons, écouvillon sec et écouvillon dans VTM, ont été testées dans un même centre (interne) pendant 6 jours. Les microplaques des échantillons de CMV artificiels fabriqués comme des échantillons positifs modérés, des échantillons faiblement positifs (aux alentours de 2 fois la LD) et des échantillons fortement négatifs. La microplaque comprenait également un échantillon vrai négatif, un contrôle positif et un contrôle négatif. Trois lots de coffrets ont été utilisés pendant l'étude, un lot par jour de test. Chaque lot de coffrets a été testé deux fois pendant la période de test de 6 jours. Les tableaux ci-dessous indiquent les valeurs moyennes, la répétabilité, la variance d'un opérateur à l'autre, d'un jour à l'autre, et d'un composant de lot de coffrets à l'autre, le pourcentage de résultats positifs et de résultats négatifs pour chaque type d'échantillon testé lors de l'étude de précision.

Précision intra-laboratoire pour les échantillons d'écouvillon sec

Échantillons de salive sur écouvillons secs														
	N	Moyenne	Répétabilité ¹		D'un opérateur à l'autre ¹		D'un jour à l'autre		D'un lot de coffret à l'autre		Reproductibilité		% résultats pos	% résultats nég
			E-T	%CV	E-T	%CV	E-T	%CV	E-T	%CV	E-T	%CV		
Modérément positif	48	60,29	1,99	3,3 %	0,00	0,0 %	0,00	0,0 %	0,74	1,2 %	2,12	3,5 %	100 %	0 %
Faiblement positif	48	60,23	1,70	2,8 %	0,62	1,0 %	0,00	0,0 %	0,74	1,2 %	1,95	3,2 %	100 %	0 %
Fortement négatif	48	98,26	6,46	6,6 %	4,36	4,4 %	1,42	1,4 %	0,80	0,8 %	7,96	8,1 %	4,2 %	95,8 %
Vrai négatif	48	99,94	0,61	0,6 %	0,00	0,0 %	0,12	0,1 %	0,14	0,1 %	0,64	0,6 %	0 %	100 %
Contrôle positif	24	60,57	1,96	3,2 %	0,00	0,0 %	1,47	2,4 %	0,00	0,0 %	2,45	4,0 %	100 %	0 %
Contrôle négatif	24	99,73	0,29	0,3 %	0,00	0,0 %	0,18	0,2 %	0,16	0,2 %	0,38	0,4 %	0 %	100 %

¹ Inclut la variance d'un opérateur à l'autre et d'un composant d'instrument à l'autre

Précision intra-laboratoire pour les échantillons dans du VTM

Échantillons de salive dans du VTM														
	N	Moyenne	Répétabilité		D'un opérateur à l'autre ¹		D'un jour à l'autre		D'un lot de coffret à l'autre		Reproductibilité		% résultats pos	% résultats nég
			E-T	%CV	E-T	%CV	E-T	%CV	E-T	%CV	E-T	%CV		
Modérément positif	48	60,62	1,36	2,2 %	0,91	1,5 %	0,00	0,0 %	0,77	1,3 %	1,81	3,0 %	100 %	0 %
Faiblement positif	48	60,55	1,67	2,8 %	0,89	1,5 %	0,72	1,2 %	0,00	0,0 %	2,02	3,3 %	100 %	0 %
Fortement négatif	48	99,91	0,64	0,6 %	0,00	0,0 %	0,22	0,2 %	0,00	0,0 %	0,68	0,7 %	0 %	100 %
Vrai négatif	48	100,00	0,84	0,8 %	0,28	0,3 %	0,00	0,0 %	0,00	0,0 %	0,89	0,9 %	0 %	100 %
Contrôle positif	24	60,28	2,12	3,5 %	0,00	0,0 %	1,09	1,8 %	0,00	0,0 %	2,38	4,0 %	100 %	0 %
Contrôle négatif	24	100,29	1,53	1,5 %	0,28	0,3 %	0,00	0,0 %	0,00	0,0 %	1,56	1,6 %	0 %	100 %

¹ Inclut la variance d'un opérateur à l'autre et d'un composant d'instrument à l'autre

REACTIONS CROISEES

Des études de réactivité croisée ont été réalisées avec un ensemble de 40 micro-organismes et de l'ADN génomique humain, tous dilués dans une matrice clinique négative simulée sur un écouvillon sec. Les micro-organismes sélectionnés incluaient ceux qui étaient génétiquement proches du CMV et ceux qui étaient susceptibles d'être présents dans la cavité buccale des nouveau-nés. Les micro-organismes ont été dilués dans une matrice clinique négative simulée sur un écouvillon sec à la concentration indiquée (voir tableau ci-dessous) et testés en triple. Aucune réactivité croisée n'a été observée avec le test du CMV Alethia.

Micro-organisme	Concentration du test	Résultats du test (n _{pos} /n _{total})	Micro-organisme	Concentration du test	Résultats du test (n _{pos} /n _{total})
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1,2x10 ⁷ UFC/mL	0/3	Adénovirus	3,80x10 ⁵ DICT ₅₀ /mL	0/3
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	1,2x10 ⁷ UFC/mL	0/3	Coronavirus	2,19x10 ⁵ DICT ₅₀ /mL	0/3
<i>Bordetella pertussis</i>	1,2x10 ⁷ UFC/mL	0/3	Coxsackievirus	4,07x10 ⁶ DICT ₅₀ /mL	0/3
<i>Candida albicans</i>	1,2x10 ⁷ UFC/mL	0/3	Entérovirus 71	1,26x10 ⁵ DICT ₅₀ /mL	0/3
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	1,2x10 ⁷ UFC/mL	0/3	Virus Epstein Barr	3,39x10 ⁶ copies/mL	0/3
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	1,2x10 ⁷ UFC/mL	0/3	Virus Herpès simplex 1	9,5x10 ⁵ DICT ₅₀ /mL	0/3
<i>Haemophilus influenzae</i>	1,2x10 ⁷ UFC/mL	0/3	Virus Herpès simplex 2	1,3x10 ⁵ DICT ₅₀ /mL	0/3
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	1,2x10 ⁷ UFC/mL	0/3	Herpèsvirus 6B humain	6,16x10 ⁷ copies/mL	0/3
<i>Moraxella catarrhalis</i>	1,2x10 ⁷ UFC/mL	0/3	Herpèsvirus 7 humain	3,80x10 ⁵ DICT ₅₀ /mL	0/3
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	3,7x10 ⁷ UFC/mL	0/3	Herpèsvirus 8 humain	2,13x10 ⁸ copies/mL	0/3
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	1,2x10 ⁷ UFC/mL	0/3	Métabonomevirus humain	6,61x10 ⁵ DICT ₅₀ /mL	0/3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,2x10 ⁷ UFC/mL	0/3	Grippe A	3,80x10 ⁵ DICT ₅₀ /mL	0/3
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,2x10 ⁷ UFC/mL	0/3	Grippe B	4,57x10 ⁵ DICT ₅₀ /mL	0/3
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1,2x10 ⁷ UFC/mL	0/3	Virus Parainfluenza 1	1,95x10 ⁶ DICT ₅₀ /mL	0/3
<i>Streptococcus agalactiae</i> (GBS)	1,2x10 ⁷ UFC/mL	0/3	Virus Parainfluenza 2	5,89x10 ⁶ DICT ₅₀ /mL	0/3
<i>Streptococcus anginosus</i> (groupe F)	1,2x10 ⁷ UFC/mL	0/3	Virus Parainfluenza 3	2,19x10 ⁵ DICT ₅₀ /mL	0/3
<i>Streptococcus mitis</i>	1,2x10 ⁷ UFC/mL	0/3	Virus respiratoire syncytial type A	3,2x10 ⁵ DICT ₅₀ /mL	0/3
<i>Streptococcus oralis</i>	1,2x10 ⁷ UFC/mL	0/3	Virus respiratoire syncytial type B	4,6x10 ⁵ DICT ₅₀ /mL	0/3
<i>Streptococcus salivarius</i>	1,2x10 ⁷ UFC/mL	0/3	Rhinovirus	1,51x10 ⁵ DICT ₅₀ /mL	0/3
<i>Streptococcus sanguinis</i>	1,2x10 ⁷ UFC/mL	0/3	Virus de la varicelle-zona	3,36x10 ⁹ copies/mL	0/3
ADN génomique humain	6,18x10 ⁶ copies/mL	0/3	s/o	s/o	s/o

TESTS POUR LES MICROBES INTERFERANTS

Des études d'interférence microbienne ont été réalisées avec un ensemble de 40 micro-organismes et de l'ADN génomique humain, tous dilués dans une matrice clinique négative simulée sur un écouvillon sec. Chaque échantillon testé contenait le CMV à une concentration 3 fois supérieure à la LD et des micro-organismes ou de l'ADN génomique humain aux concentrations du test indiquées ci-dessus (voir le tableau dans la section relative à la réactivité croisée pour voir les micro-organismes testés et les concentrations finales du test). Après sa préparation, chaque échantillon a été testé en triple. Aucune interférence n'a été observée avec le test du CMV Alethia (tous les micro-organismes dilués dans la matrice clinique négative simulée sur un écouvillon sec ont produit 3/3 résultats de test positifs avec le test du CMV Alethia).

TESTS POUR LES SUBSTANCES INTERFERENTES

Un test d'interférence a été mené en présence de concentrations de substances chimiques et biologiques introduites directement dans des échantillons faiblement positifs préparés artificiellement (3 fois la LD) et des échantillons de sang total négatifs. Deux échantillons positifs uniques et un échantillon négatif ont été testés en triple. Les substances testées, les concentrations évaluées et les résultats du test sont présentés dans le tableau suivant. Aucune interférence n'a été observée entre le test du CMV Alethia et les substances suivantes aux concentrations spécifiées du test (tous les réplicats positifs testés ont produit des résultats positifs avec le test du CMV Alethia et tous les réplicats négatifs testés ont produit des résultats négatifs avec le test du CMV Alethia).

Substances testées	Concentration du test	Résultats du test (n _{détectés} /n _{total})		
		Échantillon négatif CMV	Échantillon positif CMV 1	Échantillon positif CMV 2
Douleur et fièvres des nourrissons (Acétaminophène)	0,2 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Acide acétylsalicylique	0,65 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Caféine	0,06 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Enfamil™ Fer-In-Sol® (sulfate ferreux)	1,5 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Lait infantile nouveau-nés Enfamil Premium®	10 % v/v	0/3	3/3	3/3
Antiflatulent nourrissons Mylicon® (Siméticone)	2 mg/0,3 mL	0/3	3/3	3/3
Gaviscon® nourrissons (alginate de sodium)	1,2 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Alginate de magnésium	0,467 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Ibuprofène nourrissons	0,5 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Enfamil™ Poly-Vi-Sol®	8 % v/v	0/3	3/3	3/3
Aérosol/gouttes de solution physiologique Little Remedies®	10 % v/v	0/3	3/3	3/3
Méthadone	0,002 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Sulfate de morphine	0,0005 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Nystatine	1 000 U/mL	0/3	3/3	3/3
Prednisone	0,0003 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Caséine	10 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Mucine (issue d'estomac de porc - type II)*	25 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Leucocytes	10 % v/v	0/3	3/3	3/3
Sang total	10 % v/v	0/3	3/3	3/3

*Lorsque la mucine a été testée à une concentration de 50 mg/L, l'échantillon négatif a obtenu un résultat négatif dans 3 réplicats sur 3 et l'échantillon positif CMV 1 a obtenu un résultat positif dans 3 réplicats sur 3. L'échantillon positif CMV 2 a obtenu des résultats de test non valides, et un résultat de test positif pour les trois réplicats testés. La concentration de mucine dans les échantillons a été réduite à 25 mg/L et le test a été renouvelé, obtenant les résultats présentés dans le tableau. Aucune interférence n'a été observée avec une concentration de mucine de 25 mg/L.

ETUDES DE TRANSFERT DE CONTAMINATION

Une série d'échantillons alternés vrais négatifs et à charge virale élevée (30 fois la LD) a été analysée avec le test du CMV Alethia. Au total, 30 échantillons fortement positifs et 30 échantillons vrais négatifs ont été analysés. Six analyses ont été réalisées avec 10 échantillons chacune (5 échantillons fortement positifs et 5 échantillons vrais négatifs). Tous les échantillons testés ont obtenu les résultats prévus, tous les échantillons positifs obtenant des résultats positifs avec le test du CMV Alethia et tous les échantillons négatifs obtenant des résultats négatifs avec le test du CMV Alethia. Aucun transfert n'a été observé. Des études du flux de travail ont révélé que la présence de mousse après le passage au Vortex des échantillons présente un risque de contamination par aérosol (au moment où les bulles éclatent) et/ou un risque de transfert de contamination si les gants entrent en contact avec les liquides. Il est recommandé de suivre les bonnes pratiques de laboratoire lors de l'exécution du test du CMV Alethia. Les gants doivent être changés fréquemment.

RESUME DE L'ETUDE DE STABILITE DES ECHANTILLONS

Une microplaque d'échantillons faiblement positifs préparés artificiellement (3 fois la LD) et d'échantillons négatifs des deux types (écouvillon sec et VTM) a été préparée et stockée sous forme d'aliquotes comme indiqué ci-dessous. Des aliquotes de chaque échantillon ont été récupérées à des intervalles donnés et ramenées à température ambiante avant d'être testées en triple. Pour les paramètres de stockage indiqués, tous les échantillons positifs testés ont obtenu des résultats positifs avec le test du CMV Alethia et tous les échantillons négatifs ont obtenu des résultats négatifs avec le test du CMV Alethia.

Conditions de stockage	Paramètres de stockage acceptables
Température ambiante (entre 19 et 30 C).	48 heures
Réfrigération (entre 2 et 8 C)	7 jours
Congélation (≤ -20 C)	14 jours, 2 cycles maximum de congélation/décongélation

alethia®

CMV

DNA Amplification Assay

Ensayo de amplificación de ADN para la
detección de ADN de citomegalovirus

REF 481325

IVD

Rx Only

USO INDICADO

El sistema de prueba del ensayo Alethia CMV incluye kits de prueba suministrados por separado para el ensayo de amplificación de ADN Alethia CMV y los reactivos de control externo de Alethia CMV.

El ensayo de amplificación de ADN Alethia CMV, que se lleva a cabo en el analizador Alethia, es un sistema de diagnóstico cualitativo in vitro para la detección directa de ADN de citomegalovirus (CMV) en muestras de saliva de neonatos menores de 21 días de edad. La prueba se puede utilizar como complemento para el diagnóstico de la infección congénita por CMV. Los resultados de este análisis deben utilizarse junto con los de otros hallazgos clínicos.

Para recoger la saliva de los recién nacidos se deben usar hisopos flocados. El hisopado puede recolectarse en seco, sin medio de transporte de virus (MTV), o colocarse en 1 mL de MTV como máximo.

Los reactivos de control externo de Alethia CMV se emplean como parte de un programa habitual de control de calidad para ayudar al usuario a detectar factores inesperados que puedan dar lugar a errores de la prueba. Los controles externos están pensados para usarse con el ensayo de amplificación de ADN CMV, y no deben utilizarse con otros ensayos o sistemas.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

El ensayo molecular Alethia CMV se basa en la tecnología de amplificación isotérmica de ADN mediante tallo-bucle (LAMP)^{1, 2}. El ensayo se dirige a una región del genoma del citomegalovirus que está conservada en múltiples cepas del CMV. La diana de Alethia CMV es una secuencia de 194 pares de bases (pb) del genoma del herpesvirus humano 5.

En la LAMP se utilizan 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 produce una solución turbia. El analizador Alethia monitoriza la absorbencia de la solución de la reacción. Los cambios de turbidez de la solución de la reacción producidos por la precipitación del pirofosfato de magnesio indican la presencia del ADN buscado. En ausencia del ADN buscado, la absorbencia de la muestra no cambia de forma significativa.

El kit Alethia CMV incluye los dispositivos de prueba de Alethia CMV y dos tampones para CMV separados para el procesamiento y la preparación de la muestra. Primero se tratan los hisopados de saliva con tampón I (tampón de lisis), que rompe las cápsides de los virus y libera los ácidos nucleicos. Seguidamente se añade el lisado al tampón II (tampón de reacción). La muestra preparada contiene ácidos nucleicos que se pueden usar con el dispositivo de prueba de Alethia CMV.

El dispositivo de prueba de Alethia CMV contiene una microesfera de reactivo de amplificación liofilizado en cada una de sus dos cámaras: una cámara de PRUEBA con cebadores específicos para citomegalovirus y una cámara de CONTROL con cebadores específicos para ADN mitocondrial humano. El ADN mitocondrial humano de las muestras de saliva y los cebadores específicos para ADN mitocondrial humano de la cámara de CONTROL de los dispositivos de prueba funcionan como control interno del ensayo. Durante la preparación de las muestras, se libera ADN mitocondrial humano con el ADN de citomegalovirus 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 inhibición de la amplificación del ADN, 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 analizador Alethia monitoriza los cambios de absorbencia midiendo la transmisión de la luz a través de las soluciones de las reacciones de Prueba y Control. La transmisión de la luz se comprueba al comienzo (Señal_{inicial}, S_i) y al final del análisis (Señal_{final}, S_f). El analizador Alethia calcula el cambio de la transmisión lumínica entre el final y el comienzo del análisis (S_f:S_i) y compara el cociente con un valor de corte fijo.

Los valores de corte fijos de la cámara de PRUEBA se utilizan para notificar los resultados del análisis de las muestras. Si el cociente S_f:S_i de la cámara de PRUEBA es inferior al 82 %, se notifica como 'POSITIVO'. Si el cociente S_f:S_i de la cámara de PRUEBA es igual o superior al 82 %, se notifica como 'NEGATIVO'. *No se notifican valores numéricos.*

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

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

PRINCIPIOS BIOLÓGICOS

El citomegalovirus (CMV) es un virus ubicuo que infecta a personas de todo el mundo. Las infecciones se adquieren generalmente en la juventud, y el riesgo de infección aumenta con la edad. La mayoría de las infecciones son leves o pasan desapercibidas. La infección por CMV se produce a través del contacto con los líquidos y secreciones corporales de individuos infectados. La infección en la población adulta de los Estados Unidos puede oscilar entre aproximadamente el 42 % y casi el 90 % dependiendo del factor demográfico utilizado para evaluar la prevalencia de los anticuerpos³. A diferencia de las infecciones leves en pacientes pediátricos y adultos, las infecciones congénitas por CMV en recién nacidos pueden llegar a ser graves⁴.

El CMV es la principal causa de infecciones congénitas en todo el mundo, y afecta a aproximadamente entre el 1 y el 5 % de los nacimientos que se producen en los países en desarrollo⁴. La infección congénita por CMV es una de las principales causas no genéticas de pérdida auditiva neurosensorial⁵. La identificación de la infección congénita por CMV durante las primeras tres semanas de vida puede mejorar los resultados auditivos y cognitivos, y actualmente es uno de los objetivos de la American Academy of Pediatrics⁶ y de la American Medical Association⁷.

Hasta hace poco, el método de referencia para el diagnóstico de la infección congénita por CMV en muchos países era el cultivo de CMV de orina o saliva recogidas en las dos semanas siguientes al nacimiento⁸. Los estudios indican que los métodos moleculares salivales, que utilizan saliva seca o líquida, detectan el CMV congénito con una sensibilidad y una especificidad excelentes^{6, 8-10}. Los Centers for Disease Control and Prevention consideran las pruebas de detección del CMV en saliva como el método de referencia para el diagnóstico de la infección congénita por CMV¹¹.

REACTIVOS/MATERIALES PROPORCIONADOS

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

1. **Dispositivo de prueba de Alethia CMV (artículo #2835-01):** dispositivo de dos cámaras que contiene reactivos de amplificación liofilizados (ADN polimerasa, desoxirribonucleótidos trifosfato) con cebadores específicos para citomegalovirus (cámara de PRUEBA) y cebadores específicos para ADN mitocondrial humano (cámara de CONTROL).
2. **Tampón I de Alethia CMV (artículo #2901-02):** solución de lisis con hidróxido de sodio 0,2 N y Triton-X 100 al 1 %.
3. **Tampón II de Alethia CMV (artículo #2799-02):** solución tamponada con tris con un 0,09 % de azida como conservante.

MATERIALES PROPORCIONADOS POR SEPARADO

1. Kit de control externo de Alethia CMV; Meridian Bioscience, Inc., número de catálogo: 479880

MATERIALES NO PROPORCIONADOS

1. Guantes desechables de látex, sin polvo
2. Puntas de pipeta resistentes a los aerosoles, sin ribonucleasa/desoxirribonucleasa
3. Hisopos flocados para la recolección de muestras:
Hisopo seco: hisopo flocado en un tubo seco (p. ej., Copan referencia 553C)
O
Hisopo en medio de transporte de virus: hisopo flocado en medio de transporte (volumen máximo de llenado: 1 mL; p. ej., BD UVT referencia BD 220526 o Puritan UniTranz-RT UTM referencia UT116)


EQUIPO NO PROPORCIONADO

1. Temporizador de intervalos
2. Agitador vórtex
3. Micropipeta capaz de dispensar 50 µL
4. Micropipeta capaz de dispensar 100 µL
5. Analizador Alethia; Meridian Bioscience, Inc., Número de catálogo: 610189

PRECAUCIONES

1. Todos los reactivos son sólo para uso diagnóstico in vitro.
2. **PRECAUCIÓN:** El dispositivo contiene material de origen humano y debe manipularse como un posible portador y transmisor de enfermedades.
3. Siga las buenas prácticas de laboratorio y las prácticas del nivel 2 de bioseguridad durante la prueba¹². Trate todas las muestras y los dispositivos de prueba usados como si pudieran transmitir agentes infecciosos. No coma, beba ni fume en las zonas donde se manipulen los reactivos del kit o las muestras.
4. Utilice guantes desechables para manipular las muestras y lávese después muy bien las manos.
5. Deben emplearse programas de control de calidad para laboratorios de pruebas moleculares en los que se incluya el flujo de trabajo y el correcto uso y cuidado del equipo¹³.
6. Los dispositivos de prueba de Alethia CMV contienen reactivos liofilizados. No debe abrir las bolsas de protección hasta que esté listo para hacer el ensayo.
7. Los dispositivos de prueba de Alethia CMV incluyen un sistema de cierre diseñado para evitar contaminar la zona de pruebas con el producto de amplificación. NO utilice dispositivos de prueba con cierres rotos.
8. Deseche los dispositivos de prueba de Alethia CMV 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.
9. 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.
10. **IMPORTANTE:** Consulte la FDS para obtener información adicional sobre la seguridad y los riesgos.

DECLARACIONES DE RIESGO Y PRECAUCIÓN

 Buffer I	Palabra de advertencia Atención Indicaciones de peligro H315 – Provoca irritación cutánea H319 – Provoca irritación ocular grave Consejos de prudencia - UE (§28, 1272/2008) P264 - Lavarse la cara, las manos y las áreas de la piel expuestas concienzudamente tras la manipulación. P280 - Llevar gafas/ máscara de protección. P337 + P313 - Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico. P321 – Se necesita un tratamiento específico (ver las instrucciones adicionales de primeros auxilios en esta etiqueta).
---	---

VIDA ÚTIL Y ALMACENAMIENTO

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

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Asegúrese de que los reactivos del kit estén a temperatura ambiente (19-30 C) antes de utilizarlos. Si los reactivos no están a temperatura ambiente antes de usarlos, se pueden obtener resultados incorrectos.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Tipo de muestra: hisopado de saliva neonatal. Los hisopos flocados con saliva pueden guardarse en seco (sin medio de transporte de virus) o colocarse en un tubo de medio de transporte de virus (con un máximo de 1 mL).

Toma de muestras: tome muestras de saliva y póngalas en un tubo de transporte (con o sin medio de transporte de virus) siguiendo los métodos de laboratorio establecidos. No se requiere ninguna preparación especial del recién nacido para recoger la muestra.

NOTA: Obtenga los hisopados de saliva al menos una hora después de la lactancia.

Los hisopados de saliva se pueden conservar a temperatura ambiente (19-30 C), refrigerados (2-8 C) o congelados (≤ -20 C) después de la recolección y durante el transporte al laboratorio. Aunque conviene analizar las muestras lo antes posible, pueden conservarse un máximo de 48 horas a 19-30 C y un máximo de 7 días refrigeradas (2-8 C) antes del análisis. Las muestras que no se vayan a analizar antes de 7 días deben congelarse inmediatamente a ≤ -20 C y pueden almacenarse hasta un máximo de 14 días. Las muestras de saliva en hisopos secos o en MTV pueden congelarse y descongelarse un máximo de dos veces si se almacenan a ≤ -20 C antes de analizarse.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

NOTA: Compruebe que el analizador Alethia está encendido y que se han efectuado las verificaciones de funcionamiento necesarias antes de empezar la PREPARACIÓN DE LA MUESTRA. Consulte el Manual del operador del analizador Alethia para obtener más información sobre la instalación y el funcionamiento del instrumento.

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

NOTA: Cuando se mezclan soluciones con un agitador vórtex, hay que procurar que no se forme espuma para evitar que salpiquen, entren en contacto o contaminen a través de los aerosoles los ácidos nucleicos diana del virus. El ensayo Alethia CMV debe realizarse siguiendo las buenas prácticas de laboratorio.

- Preparación del hisopo
 - Hisopo seco:** quite la tapa del tubo de tampón I e introduzca el extremo del hisopo en el líquido. Gire el extremo del hisopo unas 5 veces para eluir la saliva. Apriete el hisopo contra el lateral del tubo para exprimir el líquido que contiene. Deseche el hisopo y vuelva a tapar el tubo.
- O**
- Hisopo en medio de transporte:** quite la tapa del tubo de tampón I. Usando una micropipeta, transfiera 100 µL de medio de transporte al tubo de tampón I y ponga de nuevo la tapa. Mezcle el contenido del tubo con el agitador vórtex durante aproximadamente 10 segundos.
- Incube a 19-30 C durante 2-3 minutos.
- Quite la tapa del tubo de tampón II. Usando una micropipeta, transfiera 50 µL de la solución tampón I al tubo de tampón II. Vuelva a tapar el tubo de tampón II.
- Mezcle el contenido del tubo de tampón II con el agitador vórtex durante aproximadamente 10 segundos. Las muestras diluidas se pueden conservar en una solución tampón II a 2-30 C durante un máximo de 3 horas. Las muestras deben llevarse a temperatura ambiente (19-30°C) antes de continuar con el PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

NOTA: En un análisis individual del analizador Alethia se pueden procesar un máximo de 10 muestras.

- Saque 1 dispositivo de prueba de Alethia CMV de la bolsa de protección por cada muestra. Abra el dispositivo con cuidado, levantando el cierre y sujetando las cámaras de modo que el reactivo liofilizado no se caiga al abrirlo. Coloque el dispositivo sobre una superficie plana o en una gradilla adecuada para ello.
- Utilizando una micropipeta, transfiera 50 µL de la muestra tanto a la cámara de PRUEBA (microesfera blanca/izquierda) como a la cámara de CONTROL (microesfera amarilla/derecha) del dispositivo de prueba de Alethia CMV. Tenga cuidado de no introducir aire en las mezclas de reacción. No mezcle las reacciones con la pipeta. Cierre el dispositivo de prueba de Alethia y asegure bien el cierre.
- Golpee ligeramente el dispositivo contra la superficie de la mesa de laboratorio o mezcle bien para quitar las burbujas de aire. Examine 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 tiempo máximo de 10 minutos (es decir, tras añadir la muestra al dispositivo de prueba no se deben dejar pasar más de 10 minutos para iniciar la amplificación y la detección).
- Introduzca el dispositivo de prueba de Alethia en el analizador Alethia e inicie la reacción de amplificación y detección. Los resultados se indican al final del análisis.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

ID de la muestra	Resultado notificado	Interpretación
Muestra del paciente	POSITIVO	Se ha detectado el ADN diana del citomegalovirus
	NEGATIVO	No se ha detectado ADN de citomegalovirus
	NO VÁLIDO*	Sin resultados notificables. Debe repetirse la prueba: las muestras se pueden volver a analizar a partir de la preparación del tampón II en las 3 horas siguientes a la preparación de la muestra.
Control positivo	POSITIVO	Resultado del control positivo válido. Reactivos activos en el momento de usarlos; el analizador 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. Debe repetirse la serie analítica. 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 del control negativo válido. Reactivos activos en el momento de usarlos, el analizador Alethia funciona correctamente.
	NO VÁLIDO	Sin resultados notificables. Debe repetirse la serie analítica. Preparación de la muestra inadecuada, fallo del reactivo, fallo del instrumento o fallo de control interno.
POCILLO VACÍO	NINGUNO	No hay ningún dispositivo de prueba de Alethia en el pocillo del analizador Alethia. O El dispositivo de prueba de Alethia no funciona bien debido a un fallo en la preparación de la muestra o a que el dispositivo está sucio o mal colocado. Repita el análisis de la muestra.

*Notas de interpretación

- Los resultados obtenidos pueden no ser válidos debido a la presencia de muestras inhibitorias, una mala preparación de la muestra, fallos de los reactivos, la ausencia de ADN humano en la muestra, un fallo del instrumento o un fallo del control interno.
- En el caso de las muestras en MTV, se puede volver a analizar la muestra original si queda suficiente volumen (consulte el apartado Recolección y preparación de la muestra para obtener más información).

CONTROL DE CALIDAD

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

- Cada dispositivo contiene un control interno para verificar la inhibición de la amplificación y la eficacia de los reactivos del ensayo y del procesamiento de la muestra. El ADN mitocondrial humano, que es el ADN utilizado para el control interno, se libera de la muestra de saliva y se procesa pasando por todos los pasos del procedimiento. La cámara de control del dispositivo de prueba de Alethia contiene cebadores para amplificar el ADN mitocondrial humano.
- Las buenas prácticas de laboratorio recomiendan usar materiales de control¹³. Los usuarios deberían seguir las correspondientes directrices federales, estatales y locales relativas al análisis de controles de calidad externos.
- Los reactivos de control externo de Alethia CMV se suministran por separado (número de catálogo 479880). Se recomienda comprobar la reactividad de cada nuevo lote y cada nuevo envío de Alethia CMV en el momento de la recepción y antes de usarlo. A partir de entonces, deben realizarse pruebas de control externo de conformidad con las directrices federales, estatales y locales correspondientes. El kit de prueba Alethia CMV no debe usarse para analizar a pacientes si los controles externos no dan los resultados correctos.
- Debe utilizarse un dispositivo de prueba distinto para cada reactivo de control externo.

VALORES ESPERADOS

La prevalencia de CMV observada en muestras de saliva recolectadas de forma prospectiva durante este estudio fue del 0,3 % (5/1514). A continuación se presentan los resultados estratificados por edad y sexo.

Sexo/Grupo de edad	Muestras positivas con el MRC	Prevalencia prospectiva general Población analizada*
Femenino		
14-17 días	1	0,1 %
Masculino		
0-3 días	4	0,3 %
Total	5	0,3 %

*Número total de muestras analizadas de forma prospectiva: 1514

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Este producto solo se puede utilizar con el analizador Alethia.
- Las muestras que contienen concentraciones de mucina superiores a 25 mg/mL pueden dar resultados no válidos con el ensayo Alethia CMV.
- Los resultados del ensayo Alethia CMV no deben ser lo único en lo que se base el diagnóstico, tratamiento u otras decisiones de atención sanitaria de los pacientes.**
- El ensayo Alethia CMV es un ensayo cualitativo y no proporciona valores cuantitativos ni información sobre la carga viral.
- Para poder detectar ácidos nucleicos es imprescindible obtener, manipular, transportar, almacenar y preparar adecuadamente las muestras. Si no se utiliza el procedimiento adecuado en cualquiera de estos pasos pueden obtenerse resultados incorrectos.
- Los ácidos nucleicos de los virus pueden perdurar *in vivo* independientemente de la viabilidad del virus. El ensayo Alethia CMV no distingue entre virus viables y no viables.
- 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 organismos en la muestra clínica, y b) falsos resultados positivos por contaminación cruzada con los ácidos nucleicos de los virus analizados o el producto amplificado, así como por señales inespecíficas.
- La muestra de saliva debe obtenerse al menos una hora después de la lactancia materna para evitar la contaminación por citomegalovirus, que puede dar lugar a un resultado falso positivo. Las pautas de tratamiento actuales sugieren esperar al menos una hora después de la lactancia para obtener la muestra.
- En el ensayo Alethia CMV no se debe usar un volumen de más de 1 mL de medio de transporte de virus.
- Se ha observado contaminación cruzada al usar este dispositivo, por lo que se recomienda seguir las buenas prácticas de laboratorio al hacer el ensayo Alethia CMV, así como cambiarse los guantes con frecuencia para evitar la contaminación por arrastre.

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

FUNCIONAMIENTO CLÍNICO

El ensayo de amplificación de ADN Alethia CMV fue evaluado desde agosto de 2017 hasta marzo de 2018 en siete centros de estudios clínicos que representan regiones geográficas diferenciadas en Estados Unidos, Canadá, Europa y Australia. Se obtuvieron de forma prospectiva mil quinientas catorce (1514) muestras, que se analizaron con el ensayo Alethia CMV (cuarenta y siete de estas muestras se congelaron a ≤ -20 C después de la recolección y se analizaron más tarde). Los hisopados de saliva se obtuvieron al menos una hora después de la lactancia.

Para estimar el porcentaje de concordancia positiva del MRC, también se analizaron con el ensayo Alethia CMV treinta y cuatro (34) muestras archivadas. Las muestras archivadas eran muestras anonimizadas previamente evaluadas en estudios clínicos prospectivos que resultaron estar infectadas por CMV. Estas muestras se habían obtenido de niños menores de 21 días de edad y conservado a -80 C una vez finalizado el análisis inicial. No se disponía de datos sobre el tiempo transcurrido entre la lactancia materna y la obtención de las muestras de saliva.

Todas las muestras se analizaron con el ensayo Alethia CMV en los centros de estudio, y se enviaron luego a Meridian Bioscience, Inc. para analizarlas con el método de referencia compuesto (MRC). El MRC consistió en dos ensayos de PCR desarrollados y validados por el fabricante. Las muestras con un resultado positivo en cualquiera de los dos ensayos de PCR se sometieron a un análisis adicional de secuenciación bidireccional (SBD). Las muestras se consideraron positivas si los resultados de la secuenciación bidireccional de alguno de los ensayos de PCR comparativos confirmaban la presencia de ADN de CMV. Las muestras se consideraron negativas si ninguno de los ensayos de PCR comparativos producía amplicones al final de los 40 ciclos de amplificación o la SBD era negativa.

Método de referencia compuesto

PCR 1	PCR 2	Secuenciación bidireccional	Método de referencia compuesto
+	+	+	+
+	+	-	-
+	-	+	+
+	-	-	-
-	+	+	+
-	+	-	-
-	-	N.P.	-

Para determinar el rendimiento del ensayo Alethia CMV se evaluaron 1514 muestras recolectadas de forma prospectiva. Al analizar las muestras recolectadas de forma prospectiva con el MRC, cinco muestras dieron positivo, 1475 muestras dieron negativo (la prevalencia fue del 0,3 % (5/1514)) y 34 muestras no fueron válidas y se eliminaron del análisis (una de las muestras fue invalidada por el ensayo Alethia CMV). De las muestras positivas archivadas preseleccionadas, 34 dieron positivo con el MRC.

Estudio prospectivo

Alethia CMV	Método de referencia compuesto		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	5	3	8
Negativo	0	1472	1472
Total	5	1475	1480

	Estimación	IC del 95 %
Porcentaje de concordancia positiva	100 % (5/5)	56,7 %; 100 %
Porcentaje de concordancia negativa	99,8 % (1472/1475)	99,4 %; 99,9 %

Estudio de muestras archivadas positivas preseleccionadas:

En este estudio se analizaron 34 muestras archivadas positivas preseleccionadas que se confirmaron como positivas con el MRC y el ensayo Alethia CMV.

Alethia CMV	Método de referencia compuesto		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	34	0	34
Negativo	0	0	0
Total	34	0	34

	Estimación	IC del 95 %
Porcentaje de concordancia positiva	100 % (34/34)	89,9 %; 100 %
Porcentaje de concordancia negativa	N.P.	N.P.

Porcentaje de concordancia positiva y negativa combinada para el estudio prospectivo y el estudio de muestras positivas preseleccionadas:

Las muestras positivas del estudio prospectivo (5) y del estudio de muestras positivas archivadas preseleccionadas (34) concordaron al 100 % con el método de referencia compuesto, por lo que se presentaron combinadas en el cuadro siguiente.

	Estimación	IC del 95 %
Porcentaje de concordancia positiva	100 % (39/39)	91,0 %; 100 %
Porcentaje de concordancia negativa	99,8 % (1472/1475)	99,4 %; 99,9 %

Resultados no válidos del ensayo Alethia CMV

En veintisiete (27) muestras se obtuvieron resultados no válidos durante la prueba inicial con el ensayo Alethia CMV. La tasa de resultados iniciales no válidos fue del 1,7 % (27/1548) y osciló entre el 0,7 % y el 4,1 % en los diferentes centros clínicos. Después de repetir el análisis con el ensayo Alethia CMV, se obtuvieron resultados no válidos en 26 muestras. La tasa de resultados finales no válidos fue del 0,06 % (1/1548) con un IC del 95 %: 0,01 %; 0,37 %.

Descripción del estudio clínico adicional:

Rendimiento del ensayo Alethia CMV por edad (tipos de muestras positivas prospectivas y preseleccionadas combinadas)

Grupo de edad	Muestras positivas con el MRC			Muestras negativas con el MRC		
	Porcentaje de concordancia positiva	Alethia/MRC	IC del 95 %	Porcentaje de concordancia negativa	Alethia/MRC	IC del 95 %
0-3 días	100 %	15/15	79,6 %; 100 %	99,9 %	1351/1353	99,5 %; 100 %
4-7 días	N.P.	N.P.	N.P.	99,1 %	108/109	95,0 %; 99,8 %
8-10 días	N.P.	N.P.	N.P.	100 %	4/4	51,0 %; 100 %
11-13 días	N.P.	N.P.	N.P.	100 %	2/2	34,2 %; 100 %
14-17 días	100 %	1/1	20,7 %; 100 %	100 %	6/6	61,0 %; 100 %
18-20 días	N.P.	N.P.	N.P.	100 %	1/1	20,7 %; 100 %
Conocido < 21 días	100 %	23/23	85,7 %; 100 %	N.P.	N.P.	N.P.
Totales de los centros clínicos	100 %	39/39	91,0 %; 100 %	99,8 %	1472/1475	99,4 %; 99,9 %

Rendimiento del ensayo Alethia CMV por sexo (tipos de muestras positivas prospectivas y preseleccionadas combinadas)

Sexo	Muestras positivas con el MRC			Muestras negativas con el MRC		
	Porcentaje de concordancia positiva	Alethia/MRC	IC del 95 %	Porcentaje de concordancia negativa	Alethia/MRC	IC del 95 %
Femenino	100 %	5/5	56,6 %; 100 %	99,7 %	708/710	99,0 %; 99,9 %
Masculino	100 %	11/11	74,1 %; 100 %	99,9 %	763/764	99,3 %; 100 %
Desconocido	100 %	23/23	85,7 %; 100 %	100 %	1/1	20,7 %; 100 %
Totales de los centros clínicos	100 %	39/39	91,0 %; 100 %	99,8 %	1472/1475	99,4 %; 99,9 %

SENSIBILIDAD ANALÍTICA

La sensibilidad analítica, expresada como límite de detección (LD), es la concentración a la que el ensayo Alethia CMV produce resultados positivos al menos el 95 % de las veces. Se determinó el LD del ensayo Alethia CMV para la cepa Merlín del citomegalovirus en una matriz de muestra negativa. Esta matriz negativa consistía en muestras de saliva procedentes de adultos sanos con resultados negativos para CMV que fueron analizadas y confirmadas como negativas por el ensayo Alethia CMV. Se utilizaron kits de reactivos de tres lotes para el ensayo Alethia CMV y ocho analizadores Alethia. Se analizaron un mínimo de 6 diluciones con 20 réplicas para cada lote. El LD se determinó usando un análisis de probit. El LD se determinó por separado para los dos tipos de muestras: hisopo seco y hisopo en MTV. A continuación se resumen las concentraciones del LD para cada tipo de muestra.

Tipo de muestra	LD (copias/mL)
Hisopo seco ¹	1025
Hisopo en MTV ²	15 686

¹La concentración en saliva de CMV (cp/mL) del hisopado para las muestras de hisopo seco se calcula multiplicando la concentración de CMV en el tampón I por un factor de 4,75 (la dilución de 4,75 veces se obtiene al añadir 0,080 mL de saliva del hisopo a 0,3 mL de tampón [380÷80 = 4,75]; se asume una transferencia del 100 %).

²La concentración en saliva de CMV (cp/mL) del hisopado para las muestras en MTV se calcula multiplicando la concentración de CMV en el MTV por un factor de 13,5 (la dilución de 13,5 veces se obtiene al añadir 0,080 mL de saliva del hisopo a 1 mL de MTV [1080÷80 = 13,5]; se asume una transferencia del 100 %).

INCLUSIÓN ANALÍTICA

Se analizaron con el ensayo Alethia CMV muestras que contenían 3 cepas de CMV adicionales distintas de la cepa Merlín. Estas cepas fueron Toledo, Towne y AD-169. Las cepas cuantificadas se diluyeron en una matriz clínica negativa simulada hasta aproximadamente 2-3 x LD, tanto para el hisopo en MTV como para el hisopo seco, y se analizaron por triplicado. Todas las cepas ensayadas para ambos tipos de muestras dieron resultados positivos con Alethia CMV.

Cepas de CMV ensayadas	Muestras de hisopo seco		Muestras de hisopo en MTV	
	Concentración del ensayo (copias/mL)	Resultados analíticos (n _{pos} /n _{total})	Concentración del ensayo (copias/mL)	Resultados analíticos (n _{pos} /n _{total})
AD-169	2493	3/3	45 077	3/3
Toledo	2493	3/3	45 077	3/3
Towne	2493	3/3	45 077	3/3

REPRODUCIBILIDAD

Para este estudio de reproducibilidad se suministraron paneles de dos tipos de muestras, hisopo seco y MTV, a tres laboratorios. Los paneles incluían muestras de CMV fabricadas como moderadamente positivas, positivas bajas y negativas altas (30 réplicas por centro de cada muestra). El panel también incluía una muestra negativa verdadera (10 réplicas por centro). Con cada panel se analizaron también controles positivos y negativos (10 réplicas por centro). La prueba fue realizada por técnicos diferentes en cada centro el mismo día durante cinco días. En el estudio se utilizaron kits de tres lotes de Alethia CMV y seis analizadores Alethia. En las tablas a continuación se indican los valores medios, la repetibilidad, los componentes de la varianza entre técnicos, entre días y entre centros, y el porcentaje de resultados positivos y negativos para cada tipo de muestra analizada en el estudio de reproducibilidad.

Reproducibilidad de las muestras en hisopos secos

Muestras de saliva en hisopos secos														
	N	Media	Repetibilidad		Entre técnicos ¹		Entre días		Entre centros ²		Reproducibilidad		% resultados positivos	% resultados negativos
			DE	% CV	DE	% CV	DE	% CV	DE	% CV	DE	% CV		
Positiva moderada	90	62,26	2,93	4,7 %	1,69	2,7 %	0,00	0,0 %	0,91	1,5 %	3,50	5,6 %	100 %	0 %
Positiva baja	90	62,38	4,44	7,1 %	1,96	3,1 %	1,11	1,8 %	0,00	0,0 %	4,98	8,0 %	98,9 %	1,1 %
Negativa alta	90	99,05	6,68	6,7 %	0,97	1,0 %	0,00	0,0 %	0,23	0,2 %	6,76	6,8 %	3,3 %	96,7 %
Negativa verdadera ³	30	100,13	0,69	0,7 %	N.P.	N.P.	0,31	0,3 %	0,40	0,4 %	0,86	0,9 %	0 %	100 %
Control positivo ³	30	61,84	2,72	4,4 %	N.P.	N.P.	0,00	0,0 %	1,11	1,8 %	2,94	4,8 %	100 %	0 %
Control negativo ³	30	100,23	2,06	2,1 %	N.P.	N.P.	0,17	0,2 %	0,22	0,2 %	2,08	2,1 %	0 %	100 %

¹ Incluye los componentes entre técnicos y entre instrumentos

² Incluye los componentes entre centros y entre lotes de kits

³ En cada centro se analizaron muestras durante 5 días con 2 series analíticas al día y 1 réplica por serie.

Reproducibilidad de las muestras en MTV

Muestras de saliva en MTV														
	N	Media	Repetibilidad		Entre técnicos ¹		Entre días		Entre centros ²		Reproducibilidad		% resultados positivos	% resultados negativos
			DE	% CV	DE	% CV	DE	% CV	DE	% CV	DE	% CV		
Positiva moderada	90	61,99	3,18	5,1 %	1,02	1,6 %	0,00	0,0 %	1,20	1,9 %	3,55	5,7 %	100 %	0 %
Positiva baja	90	61,71	2,37	3,8 %	1,43	2,3 %	0,00	0,0 %	0,67	1,1 %	2,85	4,6 %	100 %	0 %
Negativa alta	90	100,11	4,82	4,8 %	0,00	0,0 %	0,74	0,7 %	0,00	0,0 %	4,88	4,9 %	1,1 %	98,9 %
Negativa verdadera ³	30	99,20	7,71	7,8 %	N.P.	N.P.	0,00	0,0 %	0,00	0,0 %	7,71	7,8 %	3,3 %	96,7 %
Control positivo ³	30	62,22	2,39	3,8 %	N.P.	N.P.	0,00	0,0 %	0,49	0,8 %	2,44	3,9 %	100 %	0 %
Control negativo ³	30	100,30	2,02	2,0 %	N.P.	N.P.	0,00	0,0 %	0,12	0,1 %	2,02	2,0 %	0 %	100 %

¹ Incluye los componentes entre técnicos y entre instrumentos

² Incluye los componentes entre centros y entre lotes de kits

³ En cada centro se analizaron muestras durante 5 días con 2 series analíticas al día y 1 réplica por serie.

ESTUDIO DE PRECISIÓN DENTRO DE UN MISMO LABORATORIO

Se analizaron paneles de dos tipos de muestras, hisopo seco y MTV, en un centro (interno) durante 6 días. Los paneles incluían muestras de CMV fabricadas como moderadamente positivas, positivas bajas (aprox. 2 x LD) y negativas altas. El panel incluía también una muestra negativa verdadera y controles positivo y negativo. Durante el estudio se utilizaron kits de tres lotes, uno por cada día de análisis. Cada lote de kits se analizó dos veces durante el período de análisis de 6 días. En las tablas a continuación se indican los valores medios, la repetibilidad, los componentes de la varianza entre técnicos, entre días y entre lotes de kits, así como el porcentaje de resultados positivos y negativos para cada tipo de muestra analizada en el estudio de precisión.

Precisión dentro de un mismo laboratorio para muestras en hisopos secos

Muestras de saliva en hisopos secos														
	N	Media	Repetibilidad ¹		Entre técnicos ¹		Entre días		Entre lotes de kits		Reproducibilidad		% resultados positivos	% resultados negativos
			DE	% CV	DE	% CV	DE	% CV	DE	% CV	DE	% CV		
Positiva moderada	48	60,29	1,99	3,3 %	0,00	0,0 %	0,00	0,0 %	0,74	1,2 %	2,12	3,5 %	100 %	0 %
Positiva baja	48	60,23	1,70	2,8 %	0,62	1,0 %	0,00	0,0 %	0,74	1,2 %	1,95	3,2 %	100 %	0 %
Negativa alta	48	98,26	6,46	6,6 %	4,36	4,4 %	1,42	1,4 %	0,80	0,8 %	7,96	8,1 %	4,2 %	95,8 %
Negativa verdadera	48	99,94	0,61	0,6 %	0,00	0,0 %	0,12	0,1 %	0,14	0,1 %	0,64	0,6 %	0 %	100 %
Control positivo	24	60,57	1,96	3,2 %	0,00	0,0 %	1,47	2,4 %	0,00	0,0 %	2,45	4,0 %	100 %	0 %
Control negativo	24	99,73	0,29	0,3 %	0,00	0,0 %	0,18	0,2 %	0,16	0,2 %	0,38	0,4 %	0 %	100 %

¹ Incluye los componentes entre técnicos y entre instrumentos

Precisión dentro de un mismo laboratorio para muestras en MTV

Muestras de saliva en MTV														
	N	Media	Repetibilidad		Entre técnicos ¹		Entre días		Entre lotes de kits		Reproducibilidad		% resultados positivos	% resultados negativos
			DE	% CV	DE	% CV	DE	% CV	DE	% CV	DE	% CV		
Positiva moderada	48	60,62	1,36	2,2 %	0,91	1,5 %	0,00	0,0 %	0,77	1,3 %	1,81	3,0 %	100 %	0 %
Positiva baja	48	60,55	1,67	2,8 %	0,89	1,5 %	0,72	1,2 %	0,00	0,0 %	2,02	3,3 %	100 %	0 %
Negativa alta	48	99,91	0,64	0,6 %	0,00	0,0 %	0,22	0,2 %	0,00	0,0 %	0,68	0,7 %	0 %	100 %
Negativa verdadera	48	100,00	0,84	0,8 %	0,28	0,3 %	0,00	0,0 %	0,00	0,0 %	0,89	0,9 %	0 %	100 %
Control positivo	24	60,28	2,12	3,5 %	0,00	0,0 %	1,09	1,8 %	0,00	0,0 %	2,38	4,0 %	100 %	0 %
Control negativo	24	100,29	1,53	1,5 %	0,28	0,3 %	0,00	0,0 %	0,00	0,0 %	1,56	1,6 %	0 %	100 %

¹ Incluye los componentes entre técnicos y entre instrumentos

ESTUDIOS DE REACTIVIDAD CRUZADA

Se llevaron a cabo estudios de reactividad cruzada con un panel de 40 microorganismos y ADN genómico humano, cada uno diluido en una matriz clínica negativa simulada en un hisopo seco. Entre los microorganismos seleccionados estaban algunos con similitudes genéticas con el CMV y otros que probablemente estén presentes en la cavidad bucal de los recién nacidos. Los microorganismos se diluyeron en una matriz clínica negativa simulada en un hisopo seco a la concentración indicada (véase la tabla a continuación) y se ensayaron por triplicado. No se observó reactividad cruzada con el ensayo Alethia CMV.

Microorganismo	Concentración del ensayo	Resultados analíticos (n _{pos} /n _{total})	Microorganismo	Concentración del ensayo	Resultados analíticos (n _{pos} /n _{total})
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1,2 x 10 ⁷ UFC/mL	0/3	Adenovirus	3,80 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	1,2 x 10 ⁷ UFC/mL	0/3	Coronavirus	2,19 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Bordetella pertussis</i>	1,2 x 10 ⁷ UFC/mL	0/3	Virus de Coxsackie	4,07 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Candida albicans</i>	1,2 x 10 ⁷ UFC/mL	0/3	Enterovirus 71	1,26 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	1,2 x 10 ⁷ UFC/mL	0/3	Virus de Epstein Barr	3,39 x 10 ⁸ cp/mL	0/3
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	1,2 x 10 ⁷ UFC/mL	0/3	Virus del herpes simple tipo 1	9,5 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Haemophilus influenzae</i>	1,2 x 10 ⁷ UFC/mL	0/3	Virus del herpes simple tipo 2	1,3 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	1,2 x 10 ⁷ UFC/mL	0/3	Herpesvirus humano 6B	6,16 x 10 ⁷ cp/mL	0/3
<i>Moraxella catarrhalis</i>	1,2 x 10 ⁷ UFC/mL	0/3	Herpesvirus humano 7	3,80 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	3,70 x 10 ⁷ UCC/mL	0/3	Herpesvirus humano 8	2,13 x 10 ⁸ cp/mL	0/3
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	1,2 x 10 ⁷ UFC/mL	0/3	Metaneumovirus humano	6,61 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,2 x 10 ⁷ UFC/mL	0/3	Gripe A	3,80 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,2 x 10 ⁷ UFC/mL	0/3	Gripe B	4,57 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1,2 x 10 ⁷ UFC/mL	0/3	Virus paragripal 1	1,95 x 10 ⁶ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Streptococcus agalactiae</i> (GBS)	1,2 x 10 ⁷ UFC/mL	0/3	Virus paragripal 2	5,89 x 10 ⁶ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Streptococcus anginosus</i> (Grupo F)	1,2 x 10 ⁷ UFC/mL	0/3	Virus paragripal 3	2,19 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Streptococcus mitis</i>	1,2 x 10 ⁷ UFC/mL	0/3	Virus respiratorio sincitial A	3,2 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Streptococcus oralis</i>	1,2 x 10 ⁷ UFC/mL	0/3	Virus respiratorio sincitial B	4,6 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Streptococcus salivarius</i>	1,2 x 10 ⁷ UFC/mL	0/3	Rinovirus	1,51 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Streptococcus sanguinis</i>	1,2 x 10 ⁷ UFC/mL	0/3	Virus de la varicela zóster	3,36 x 10 ⁹ cp/mL	0/3
ADN genómico humano	6,18 x 10 ⁶ cp/mL	0/3	N.P.	N.P.	N.P.

PRUEBAS DE INTERFERENCIA MICROBIANA

Se llevaron a cabo pruebas de interferencia microbiana con un panel de 40 microorganismos y ADN genómico humano, cada uno diluido en una matriz clínica positiva simulada en un hisopo seco. Cada muestra analizada contenía CMV a una concentración de 3 x LD y ADN genómico humano o de microorganismos a la concentración del ensayo anteriormente indicada (consulte la tabla del apartado Reactividad cruzada para ver los microorganismos ensayados y las concentraciones finales del ensayo). Una vez preparada, cada muestra se analizó por triplicado. No se observaron interferencias microbianas con el ensayo Alethia CMV (es decir, todos los microorganismos diluidos en una matriz clínica positiva simulada en un hisopo seco dieron resultados positivos (3/3) con el ensayo Alethia CMV).

PRUEBAS PARA SUSTANCIAS INTERFERENTES

Se realizaron pruebas de interferencia en presencia de sustancias químicas y biológicas introducidas directamente en muestras artificiales positivas bajas (3 x LD) y negativas para CMV. Se analizaron por triplicado dos muestras positivas distintas y una muestra negativa. En la siguiente tabla se indican las sustancias analizadas, las concentraciones evaluadas y los resultados de las pruebas. En el ensayo Alethia CMV no se observaron interferencias con las siguientes sustancias a las concentraciones de ensayo especificadas (es decir, todas las réplicas positivas dieron resultados positivos y todas las réplicas negativas dieron resultados negativos en el ensayo Alethia CMV).

Sustancia analizada	Concentración del ensayo	Resultados analíticos (n _{detectado} /n _{total})		
		Muestra negativa para CMV	Muestra positiva 1 para CMV	Muestra positiva 2 para CMV
Infants' Pain & Fever (paracetamol)	0,2 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Ácido acetilsalicílico	0,65 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Cafeína	0,06 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Enfamil™ Fer-In-Sol® (sulfato ferroso)	1,5 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Enfamil Premium® Leche infantil para lactantes	10 % v/v	0/3	3/3	3/3
Infants' Mylicon® Gas Relief (simeticona)	2 mg/0,3 mL	0/3	3/3	3/3
Gaviscon® infant (alginato de sodio)	1,2 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Alginato de magnesio	0,467 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Infants' Ibuprofen	0,5 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Enfamil™ Poly-Vi-Sol®	8 % v/v	0/3	3/3	3/3
Little Remedies® Saline en spray/gotas	10 % v/v	0/3	3/3	3/3
Metadona	0,002 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Sulfato de morfina	0,0005 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Nistatina	1000 U/mL	0/3	3/3	3/3
Prednisona	0,0003 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Caseína	10 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Mucina (de estómago porcino – Tipo II)*	25 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Leucocitos	10 % v/v	0/3	3/3	3/3
Sangre completa	10 % v/v	0/3	3/3	3/3

*Al analizar la mucina a una concentración de 50 mg/mL, la muestra negativa produjo resultados negativos en 3 de 3 réplicas, mientras que la muestra positiva 1 para CMV produjo resultados positivos en 3 de 3 réplicas. La muestra positiva 2 para CMV produjo dos resultados no válidos y uno positivo para las tres réplicas analizadas. Tras reducir la concentración de mucina de las muestras a 25 mg/mL y repetir las pruebas, se obtuvieron los resultados que se indican en la tabla. No se observaron interferencias con una concentración de mucina de 25 mg/mL.

ESTUDIOS DE CONTAMINACIÓN POR ARRASTRE

Se procesaron una serie de muestras alternas negativas verdaderas y con una carga viral alta (30 x LD) utilizando el ensayo Alethia CMV. Se procesaron un total de 30 muestras positivas altas y 30 muestras negativas verdaderas. Se procesaron seis series analíticas con 10 muestras cada una (5 positivas altas y 5 negativas verdaderas). En todas las muestras analizadas se obtuvieron los resultados esperados: todas las muestras positivas dieron resultados positivos y todas las muestras negativas dieron resultados negativos en el ensayo Alethia CMV. No se observó ningún arrastre. Los estudios relativos al flujo de trabajo pusieron de manifiesto que la espuma presente después de mezclar las muestras en el agitador vórtex conlleva un riesgo de contaminación por aerosoles (es decir, cuando se rompen las burbujas), así como un riesgo de contaminación por transferencia si los guantes entran en contacto con los líquidos. Se recomienda seguir las buenas prácticas de laboratorio al hacer el ensayo Alethia CMV y cambiar los guantes con frecuencia.

RESUMEN DEL ESTUDIO DE ESTABILIDAD DE LAS MUESTRAS

Tras preparar un panel de muestras de CMV artificiales positivas bajas (3 x LD) y negativas de ambos tipos (hisopo seco y MTV), las muestras se almacenaron distribuidas en alícuotas como se indica a continuación. Las alícuotas almacenadas de cada muestra se sacaron a determinados intervalos y, tras alcanzar la temperatura ambiente, se analizaron por triplicado. Con los parámetros de almacenamiento indicados, todas las muestras positivas dieron resultados positivos y todas las muestras negativas dieron resultados negativos en el ensayo Alethia CMV.

Condiciones de almacenamiento	Parámetros de almacenamiento aceptables
Temperatura ambiente (19-30 C).	48 horas
Refrigeradas (2-8 C)	7 días
Congeladas (\leq -20 C)	14 días, pueden congelarse y descongelarse hasta 2 veces

alethia®

CMV DNA Amplification Assay

DNA-Amplifikationsassays für den
Nachweis von Zytomegalievirus-DNA

REF 481325

IVD

Rx Only

VERWENDUNGSZWECK

Das Alethia CMV-Assay-Testsystem beinhaltet separat zur Verfügung gestellte Testkits für den Alethia CMV-DNA-Amplifikationsassay und die Alethia CMV Externen Kontrollreagenzien.

Der Alethia CMV-DNA-Amplifikationsassay wird auf dem Alethia-Gerät ausgeführt und ist ein qualitatives In-vitro-Diagnostik-Testsystem zum direkten Nachweis von Zytomegalievirus(CMV)-DNA in Speichelproben von Neugeborenen, die jünger als 21 Tage sind. Der Test kann als diagnostisches Hilfsmittel zur Diagnose einer kongenitalen CMV-Infektion eingesetzt werden. Die Ergebnisse dieses Tests müssen in Verbindung mit anderen klinischen Befunden verwendet werden.

Für die Entnahme einer Speichelprobe bei Neugeborenen sollten Beflockte Abstrichtupfer verwendet werden. Der Abstrich kann mit trockenen Tupfern vorgenommen werden, d. h. ohne virales Transportmedium (VTM), oder der Abstrichtupfer wird in maximal 1 mL VTM überführt.

Die Alethia CMV Externen Kontrollreagenzien gehören zur routinemäßigen Qualitätskontrolle und geben dem Anwender Hinweise auf unerwartete Bedingungen, die zu Testfehlern führen können. Die externen Kontrollen sind für die Verwendung mit dem Alethia CMV-DNA-Amplifikationsassay und nicht für die Verwendung mit anderen Assays oder Systemen vorgesehen.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DES TESTS

Der molekulare Alethia CMV-Assay basiert auf der „Loop-mediated Amplification“ (LAMP Technologie)^{1, 2}. Mit dem Assay wird gezielt eine Region im Genom des Zytomegalievirus nachgewiesen das in mehreren CMV-Stämmen konserviert ist. Der Alethia CMV-Assay hat als Zielsequenz eine 194-Basenpaarsequenz (bp) des humanen Herpesvirus-5-Genoms.

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

Das Alethia CMV-Kit beinhaltet Alethia CMV-Testvorrichtungen sowie zwei separate CMV-Puffer für die Probenverarbeitung und -vorbereitung. Speichelprobenabstriche werden zuerst mit Puffer I (Lysepuffer) behandelt; wodurch die Viruskapside zerstört und die Nukleinsäuren werden freigesetzt werden. Anschließend wird das Lysat in Puffer II (Reaktionspuffer) überführt. Die vorbereitete Probe enthält Nukleinsäuren für die Verwendung mit der Alethia CMV-Testvorrichtung.

In beiden Kammern der Alethia CMV-Testvorrichtung befindet sich ein Kügelchen aus lyophilisierten Reagenzien für die Amplifikation: je ein Kügelchen in der TEST-Kammer mit spezifischen Primern für den Zytomegalievirus und je ein Kügelchen in der KONTROLL-Kammer mit spezifischen Primern für die humane Mitochondrien-DNA. Die humane Mitochondrien-DNA der Speichelproben dient zusammen mit den spezifischen Primer für die humane Mitochondrien-DNA in der KONTROLL-Kammer der Testvorrichtung als interne Kontrolle für den Assay. Bei der Probenvorbereitung wird die humane Mitochondrien-DNA zusammen mit der Zytomegalievirus-DNA freigesetzt. So können die Ziel-DNA und die Kontroll-DNA parallel amplifiziert und nachgewiesen werden. Die DNA-Amplifikationsinhibition, die Assay-Reagenzleistung und die Effizienz der Probenverarbeitung werden mit der internen Kontrolle überwacht. Der Zielsequenz der Kontrolle muss amplifiziert und in der endgültigen Reaktion nachgewiesen werden, oder der Test wird als ungültig erachtet und die Ergebnisse werden nicht berichtet.

Zur Überwachung der Änderungen der Absorptionsmerkmale misst das Alethia-Gerät den Lichtdurchlass durch die Test- und Kontroll-Reaktionslösungen. Der Lichtdurchlass wird zu Beginn des Testlaufs (Signal_{Initial}, S_i) und am Ende des Testlaufs (Signal_{Final}, S_f) des Assays gemessen. Die Änderung des Lichtdurchlasses zwischen Ende und Beginn des Testlaufs (S_f:S_i) wird vom Alethia-Gerät berechnet und das resultierende Verhältnis wird mit einem festgelegten Cutoff-Wert verglichen.

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

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

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

BIOLOGISCHE PRINZIPIEN

Das Zytomegalievirus (CMV) ist weit verbreitet und infiziert Menschen weltweit. Infektionen werden in der Regel in der Jugend erworben, wobei das Infektionsrisiko mit zunehmendem Alter steigt. Die meisten Infektionen haben einen leichten Verlauf oder werden nicht bemerkt. Die Infektion mit dem CMV Virus erfolgt durch den Kontakt mit Körperflüssigkeiten der infizierten Person. Infektionen in der erwachsenen Population in den USA reichen von ungefähr 42 % bis fast 90 %, je nachdem, welcher demographischer Faktor bei der Beurteilung der Antikörper-Prävalenz verwendet wurde.³ Im Gegensatz zu den leichten Infektionsverläufen bei Kindern und Erwachsenen können kongenitale CMV-Infektionen bei Neugeborenen einen schweren Verlauf haben.⁴

Eine CMV Infektion ist weltweit die Hauptursache für kongenitale Infektionen; ungefähr 1–5 % der Geburten in den Entwicklungsländern sind von dieser Infektion betroffen.⁴ Die kongenitale CMV-Infektion ist eine der nicht genetisch bedingten Hauptursachen einer Innenohrschwerhörigkeit.⁵ Wenn kongenitale CMV-Infektionen in den ersten drei Lebenswochen erkannt werden, können die Folgen der Infektion für das Hörvermögen und die kognitiven Fähigkeiten abgebildert werden. Daher steht die Früherkennung im Fokus der American Academy of Pediatrics⁶ und der American Medical Association⁷.

Bis vor kurzem war die CMV-Kultur mit Urin- bzw. Speichelproben, die innerhalb von zwei Wochen nach der Geburt gesammelt bzw. entnommen wurden, in vielen Ländern der Gold-Standard für die Diagnose einer kongenitalen Infektion.⁸ Studien zeigen, dass molekulare Methoden unter Verwendung getrockneter oder flüssiger Speichelproben eine herausragende Sensitivität und Spezifität beim Nachweis einer kongenitalen CMV Infektion bieten.^{6, 8-10} Die Centers for Disease Control and Prevention nennen CMV-Speicheltests als Standardmethode für die Diagnose einer kongenitalen CMV-Infektion.¹¹

REAGENZIEN/ENTHALTENE MATERIALIEN

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

1. Alethia **CMV-Testvorrichtung (item #2835-01)**: Vorrichtung mit zwei Kammern, die lyophilisierte Amplifikationsreagenzien (DNA-Polymerase, Deoxynukleotridiphosphate) und entweder spezifische Primer für das Zytomegalievirus (TEST-Kammer) oder spezifische Primer für die humane Mitochondrien-DNA (KONTROLL-Kammer) enthalten.
2. Alethia **CMV-Puffer I (item #2901-02)**: Lyselösung mit 0,2 N Natriumhydroxid und 1 % Triton-X 100.
3. Alethia **CMV-Puffer II (item #2799-02)**: Tris-gepufferte Lösung mit Azid (0,09 %) als Konservierungsmittel.

SEPARAT GELIEFERTE MATERIALIEN

1. Alethia CMV Externes Kontroll-Kit; Meridian Bioscience, Inc. Bestellnummer: 479880

BENÖTIGTE, ABER NICHT ENTHALTENE MATERIALIEN

1. Einweg-Latexhandschuhe, ungepudert
2. DNase-/RNase-freie, aerosolbeständige Pipettenspitzen
3. Beflockte Abstrichtupfer zur Probenahme:
Trockener Abstrich: beflochtener Abstrichtupfer in trockenem Röhrchen (z. B. Copan Bestellnr. 553C)
ODER
Abstrich im viralen Transportmedium: beflochtener Abstrichtupfer in Transportmedium (maximales Füllvolumen: 1 mL; z. B. BD UVT Bestellnr. BD 220526 oder Puritan UniTranz-RT UTM Bestellnr. UT116)


NICHT ENTHALTENE AUSTRÜSTUNG

1. Intervall-Stoppuhr
2. Vortexmischer
3. Mikropipette zur Abgabe von 50 µL
4. Mikropipette zur Abgabe von 100 µL
5. Alethia-Gerät; Meridian Bioscience, Inc. Bestellnummer: 610189

VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Sämtliche Reagenzien sind ausschließlich für die In-vitro-Diagnostik bestimmt.
2. VORSICHT: Das Gerät enthält Material menschlichen Ursprungs und sollte als potenzieller Träger und Überträger von Krankheiten behandelt werden.
3. Führen Sie die Tests gemäß den Anforderungen der biologischen Sicherheitsstufe 2 und den Grundsätzen der bewährten Laborpraktiken (Good Laboratory Practices) durch.¹² Behandeln Sie alle Proben und verwendeten Testvorrichtungen als potenzielle Überträger von Infektionserregern. In den Bereichen, in denen die Proben und Reagenzien der Kits bearbeitet werden, darf weder gegessen, noch getrunken oder geraucht werden.
4. Tragen Sie bei der Handhabung der Proben Einweghandschuhe. Nach der Arbeit sind die Hände gründlich zu waschen.
5. Qualitätskontrollprogramme für Labors für molekulare Diagnostik, einschließlich des Arbeitsablaufs und der korrekten Verwendung und Pflege der Geräte, sind anzuwenden.¹³
6. Die Alethia CMV-Testvorrichtungen enthalten lyophilisierte Reagenzien. Die Schutzbeutel dürfen erst dann geöffnet werden, wenn der Assay durchgeführt wird.
7. Die Alethia CMV-Testvorrichtung ist mit einer Sperrvorrichtung ausgestattet, um eine Kontamination des Testbereichs mit dem Amplifikationsprodukt zu verhindern. Testvorrichtungen mit defekter Sperrvorrichtung NICHT verwenden.
8. Entsorgen Sie gebrauchte Alethia CMV-Testvorrichtungen und Röhrchen sofort nach der Verwendung. Halten Sie die Testvorrichtung sicher geschlossen. Öffnen Sie die Testvorrichtung nach der Verarbeitung NICHT mehr. Ein Öffnen der Testvorrichtung nach der Amplifikation kann zu einer Kontamination des Testbereichs mit dem Amplifikationsprodukt führen.
9. 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.
10. WICHTIG: Weitere Sicherheits- und Gefahrenhinweise sind im SDB enthalten.

GEFAHREN- UND SICHERHEITSHINWEISE

 Buffer I	Signalwort Achtung Gefahrenhinweise H315 – Verursacht Hautreizungen H319 – Verursacht schwere Augenreizung Sicherheitshinweise – Verordnung (EG) §28, Nr. 1272/2008 P264 - Nach Gebrauch Gesicht, Hände und exponierte Haut gründlich waschen. P280 - Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. P337 + P313 - Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. P321 – Besondere Behandlung (siehe ergänzende Anweisungen zur Ersten Hilfe auf diesem Kennzeichnungsetikett).
---	---

HALTBARKEIT UND LAGERUNG

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

VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Stellen sie sicher, dass die Kitreagenzien vor Gebrauch Raumtemperatur (19–30 C) haben. Werden die Reagenzien vor Gebrauch nicht auf Raumtemperatur gebracht, kann es zu falschen Ergebnissen kommen.

PROBENNAHME UND -VORBEREITUNG

Probentyp: Speichelprobe eines Neugeborenen. Der Speichelabstrich kann trocken vorgenommen werden (ohne virales Transportmedium) oder der Abstrichtupfer wird in virales Transportmedium überführt (nicht mehr als 1 mL).

Probennahme: Entnehmen Sie mit dem Abstrichtupfer die Speichelprobe und überführen Sie es in ein Transportröhrchen (mit oder ohne virales Transportmedium). Befolgen Sie dabei die bewährten Labormethoden. Es ist keine spezielle Vorbereitung des Neugeborenen für die Probennahme erforderlich.

HINWEIS: Der Speichelabstrich sollte frühestens eine Stunde nach dem Stillen entnommen werden.

Die Speichelabstriche können nach der Entnahme und während des Transports zum Labor bei Raumtemperatur (19–30 C), gekühlt (2–8 C) oder eingefroren (≤ -20 C) aufbewahrt werden. Die Proben sollten so schnell wie möglich getestet werden. Falls notwendig können die Proben vor dem Test 48 Stunden lang bei 19–30 C oder 7 Tage lang gekühlt (2–8 C) aufbewahrt werden. Proben, die nicht innerhalb von 7 Tagen getestet werden, sollten sofort bei ≤ -20 C eingefroren werden. Diese Proben können 14 Tage lang aufbewahrt werden. Trockene Abstrichtupfer, die Speichelproben enthalten, oder die in VTM überführt worden sind, können nach einer Lagerung bei ≤ -20 C bis zu zweimal eingefroren und wieder aufgetaut werden, bevor sie getestet werden.

PROBENVORBEREITUNG

HINWEIS: Achten Sie darauf, dass das Alethia-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 Bedienerhandbuch zum Alethia-Gerät.

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

HINWEIS: Beim Mischen von Lösungen mit dem Vortexmischer ist Vorsicht geboten, um ein Schäumen und damit eine Kontamination der viralen Ziel-Nukleinsäuren durch Spritzer, Berührung und Aerosole zu vermeiden. Bei der Durchführung des Alethia CMV-Assays sollten die Grundsätze der bewährten Laborpraktiken (Good Laboratory Practices) beachtet werden.

- Vorbereitung des Abstrichs
 - Trockener Abstrich:** Entfernen Sie die Kappe von dem Röhrchen mit Puffer I und tauchen Sie die Spitze des Abstrichtupfers in die Speichelflüssigkeit ein. Drehen Sie die Spitze des Abstrichstäbchens 5-mal, um Speichel abzulösen. Drücken Sie den Abstrichtupfer gegen die Innenseite des Röhrchens, um die Flüssigkeit herauszudrücken. Entsorgen Sie den Abstrichtupfer und verschließen Sie das Röhrchen.
 - ODER**
 - Abstrich im Transportmedium:** Nehmen Sie die Kappe von dem Röhrchen mit Puffer I ab. Überführen Sie mit einer Mikropipette 100 µL des Transportmediums in das Röhrchen mit Puffer I und verschließen Sie das Röhrchen. Mischen Sie das Röhrchen ca. 10 Sekunden lang.
- Inkubieren Sie es 2–3 Minuten lang bei 19–30 C.
- Nehmen Sie die Kappe von dem Röhrchen mit Puffer II ab. Überführen Sie mit einer Mikropipette 50 µL der Lösung mit Puffer I in ein Röhrchen mit Puffer II. Verschließen Sie das Röhrchen mit Puffer II wieder.
- Mischen Sie das Röhrchen mit Puffer II ca. 10 Sekunden lang. Verdünnte Proben können bis zu 3 Stunden bei 2–30 C in Lösung mit Puffer II aufbewahrt werden. Die Proben müssen Raumtemperatur (19–30 C) haben, bevor Sie mit der TESTDURCHFÜHRUNG fortfahren.

TESTDURCHFÜHRUNG

HINWEIS: In einem Lauf des Alethia-Geräts können maximal 10 Proben verarbeitet werden.

- Entnehmen Sie für jede Probe 1 Alethia CMV-Testvorrichtung 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. Setzen Sie die Testvorrichtung auf einer ebenen Oberfläche oder in einem passenden Probenständer ab.
- Geben Sie mit einer Mikropipette je 50 µL der Probe in die TEST-Kammer (linkes/weißes Kügelchen) und in die KONTROLL-Kammer (rechtes/gelbes Kügelchen) der Alethia CMV-Testvorrichtung. Achten Sie darauf, dass keine Luft von außen in das Reaktionsgemisch eindringt. Mischen Sie Reaktionen nicht mit der Pipette. Schließen Sie die Alethia-Testvorrichtung und verschließen Sie die Sperrvorrichtung sicher.
- Klopfen Sie die Vorrichtung leicht auf die Arbeitsfläche auf oder schwenken Sie sie, um Luftblasen zu entfernen. Überprüfen Sie die Vorrichtung auf die Auflösung der Kontroll- und Test-Beads sowie auf Luftblasen in der Kammer und Flüssigkeit im oberen Teil der Vorrichtung. Falls nicht gelöste Beads, Luftblasen oder Flüssigkeit oben in der Vorrichtung zu erkennen sind, klopfen Sie die Vorrichtung vorsichtig auf die Arbeitsfläche und wiederholen Sie die Sichtkontrolle. Es sollten nicht mehr als 10 Minuten vergehen, bis Amplifikation und Detektion eingeleitet werden (die Amplifikation und Detektion sollten innerhalb von 10 Minuten nach Zugabe der Probe in die Testvorrichtung gestartet werden).
- Setzen Sie die Alethia-Testvorrichtung in das Alethia-Gerät und starten Sie die Amplifikationsreaktion und -detektion. Die Ergebnisse werden am Ende des Laufs angezeigt.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Proben-ID	Ausgewiesenes Ergebnis	Auswertung
Patientenprobe	POSITIV	Ziel-DNA des Zytomegalievirus wurde nachgewiesen
	NEGATIV	Es wurde keine Zytomegalievirus-DNA nachgewiesen
	UNGÜLTIG*	Kein meldefähiges Ergebnis. Der Test sollte wiederholt werden: Proben aus der Puffer II-Vorbereitung können innerhalb von 3 Stunden nach der Probenverarbeitung verwendet werden.
Positivkontrolle	POSITIV	Gültiges Ergebnis der Positivkontrolle. Reagenzien sind zum Zeitpunkt der Verwendung aktiv, das Alethia-Gerät funktioniert korrekt.
	NEGATIV	Falsches Kontrollergebnis. Wiederholen Sie die Kontrolltests als ersten Schritt zur Bestimmung der Fehlerquelle. Lassen sich auch bei wiederholten Tests die erwarteten Reaktionen nicht erzielen, bitte rufen Sie den Technischen Support von Meridian Bioscience an (USA):(001) 800-343-3858 oder wenden Sie sich an Ihren zuständigen Händler.
	UNGÜLTIG	Kein meldefähiges Ergebnis. Lauf muss wiederholt werden. Falsche Probenvorbereitung, fehlerhaftes Reagenz, Geräteversagen oder Fehler der internen Kontrolle.
Negativkontrolle	POSITIV	Falsches Kontrollergebnis. Wiederholen Sie die Kontrolltests als ersten Schritt zur Bestimmung der Fehlerquelle. Lassen sich auch bei wiederholten Tests die erwarteten Reaktionen nicht erzielen, bitte rufen Sie den Technischen Support von Meridian Bioscience an (USA): (001) 800-343-3858 oder wenden Sie sich an Ihren zuständigen Händler.
	NEGATIV	Gültiges Ergebnis der Negativkontrolle. Reagenzien sind zum Zeitpunkt der Verwendung aktiv, das Alethia-Gerät funktioniert korrekt.
	UNGÜLTIG	Kein meldefähiges Ergebnis. Lauf muss wiederholt werden. Falsche Probenvorbereitung, fehlerhaftes Reagenz, Geräteversagen oder Fehler der internen Kontrolle.
LEERES WELL	KEINE ERGEBNISSE	Keine Alethia-Testvorrichtung in der Vertiefung des Alethia-Geräts. ODER Die vorhandene Alethia-Testvorrichtung ist aufgrund fehlerhafter Probenvorbereitung, einer verunreinigten Vorrichtung oder falsch aufgestellten Vorrichtung beeinträchtigt. Test der Probe wiederholen.

* Auswertungshinweise

- Ungültige Ergebnisse können durch inhibitorische Proben, falsche Probenvorbereitung, fehlerhaftes Reagenz, nicht-humane DNA in der Probe, Geräteversagen oder Fehler der internen Kontrolle verursacht werden.
- VTM-Proben können mit der Originalprobe erneut getestet werden, wenn noch ausreichend Volumen vorhanden ist (zusätzliche Hinweise finden Sie im Abschnitt „Probennahme und -vorbereitung“).

QUALITÄTSKONTROLLE

Den Test gemäß den einschlägigen bundesstaatlichen, nationalen und kommunalen bzw. zulassungsbehördlichen Auflagen durchführen.

- Jedes Gerät enthält eine interne Kontrolle, die die Amplifikationsinhibition, Assay-Reagenzien und die Effizienz der Probenverarbeitung überwacht. Humane Mitochondrien-DNA dient als interne Kontroll-DNA. Sie wird aus der ursprünglichen Speichelprobe freigesetzt und bei allen Verfahrensschritten verarbeitet. Die Primer für die Amplifikation der humanen Mitochondrien-DNA befinden sich in der Kontrollkammer der Alethia-Testvorrichtung.
- Nach den bewährten Laborpraktiken (Good Laboratory Practices) werden die Anwendung von Kontrollmaterialien empfohlen.¹³ Die Anwender sollten die entsprechenden bundesstaatlichen, staatlichen und kommunalen Richtlinien zur Durchführung von externen Qualitätskontrollen befolgen.
- Die Externe Kontrollreagenzien für Alethia CMV Assay werden separat geliefert (Bestellnr. 479880). Es wird empfohlen, die Reaktivität jeder neuen Charge und jeder neuen Lieferung des Alethia CMV Kits beim Empfang und vor Gebrauch zu überprüfen. Danach sind externe Kontrolltests gemäß bundesstaatlichen, staatlichen und kommunalen Richtlinien durchzuführen. Das Alethia CMV-Testkit sollte nicht für Tests an Patientenproben verwendet werden, wenn die externen Kontrollen nicht die richtigen Ergebnisse erzeugen.
- Für jedes externe Kontrollreagenz muss eine separate Testvorrichtung verwendet werden.

ERWARTETE WERTE

Die beobachtete Prävalenz des CMV Virus aus Speichelproben, die im Rahmen dieser Studie prospektiv gesammelt wurden, betrug 0,3 % (5/1.514). Die nach Alter und Geschlecht geschichteten Ergebnisse sind nachstehend aufgeführt.

Alters-/Geschlechtsgruppe	Proben positiv gemäß CRM	Prävalenz in allen prospektiv getesteten Proben Getestete Population*
Frauen		
14–17 Tage	1	0,1 %
Männer		
0–3 Tage	4	0,3 %
Gesamt	5	0,3 %

* Gesamtanzahl der prospektiv getesteten Proben 1.514

EINSCHRÄNKUNGEN

- Dieses Produkt kann nur mit dem Alethia-Gerät verwendet werden.
- Proben, die Muzin mit einer Konzentration von > 25 mg/mL enthalten, können beim Test mit dem Alethia CMV-Assay ungültige Ergebnisse erzeugen.
- Die Ergebnisse des Alethia CMV-Assays sind nicht als einzige Grundlage für Diagnose, Behandlung oder Entscheidungen bezüglich des Patientenmanagements vorgesehen.**
- Beim Alethia CMV-Assay handelt es sich um einen qualitativen Assay, der keine quantitativen Ergebnisse oder Informationen zur Viruslast liefert.
- Der Nachweis von Nukleinsäuren hängt von der korrekten Probennahme 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.
- Die virale Nukleinsäure kann unabhängig von der Lebensfähigkeit *in vivo* fortbestehen. Der Alethia CMV-Assay unterscheidet nicht zwischen lebensfähigen und nicht-lebensfähigen Viren.
- 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 Nukleinsäuren des Zielvirus oder dem amplifizierten Produkt sowie von nicht-spezifischen Signalen entstehen.
- Speichelproben sollten frühestens eine Stunde nach dem Stillen gewonnen werden, um eine Kontamination mit dem Zytomegalievirus zu vermeiden, die zu einem falsch-positiven Ergebnis führen könnte. Die aktuellen Behandlungsrichtlinien empfehlen, eine Probe erst nach einer Wartezeit von mindestens einer Stunde nach dem Stillen zu entnehmen.
- Ein Füllvolumen des viralen Transportmediums von mehr als 1 mL ist für die Verwendung mit dem Alethia CMV-Assay nicht zulässig.
- Bei der Verwendung dieser Vorrichtung wurden Kreuzkontaminationen beobachtet. Daher sollten bei der Durchführung des Alethia CMV-Assays die Grundsätze der bewährten Laborpraktiken (Good Laboratory Practices) beachtet werden; Handschuhe sollten häufig gewechselt werden, um eine Kreuzkontamination zu vermeiden.

LEISTUNGSMERKMALE

KLINISCHE LEISTUNG

Der Alethia CMV-DNA-Amplifikationsassay wurde im Zeitraum von August 2017 bis März 2018 an sieben klinischen Prüfbüros in geographisch unterschiedlichen Regionen (USA, Kanada, Europa und Australien) bewertet. Eintausendfünfhundertvierzehn (1.514) Proben wurden prospektiv gesammelt und mit dem Alethia CMV-Assay getestet (siebenundvierzig dieser Proben wurden nach der Entnahme bei ≤ -20 C eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt getestet). Die Speichelabstriche wurden frühestens eine Stunde nach dem Stillen gesammelt.

Für eine Schätzung der CRM-positiven prozentualen Übereinstimmung wurden zudem vierunddreißig (34) archivierte Proben mit dem Alethia CMV-Assay getestet. Bei den archivierten Proben handelte es sich um anonymisierte Proben, die zuvor im Rahmen prospektiver klinischer Studien bewertet wurden und nachweislich das CMV Virus enthielten. Diese Proben wurden von Säuglingen gewonnen, die jünger als 21 Tage waren, und nach dem ersten Test bei -80 C gelagert worden sind. Aussagen über die Zeitspanne zwischen Stillen und Entnahme der Speichelproben standen nicht zur Verfügung.

Alle Proben wurden mit dem Alethia CMV-Assay an den Prüfbüros getestet und dann an Meridian Bioscience, Inc. für einen Test gemäß der Composite Reference Method (CRM) gesendet. Die CRM umfasst zwei vom Hersteller entwickelte und validierte PCR-Assays. Proben, die bei einem der PCR-Assay positiv ausfielen, werden mittels bidirektionaler Sequenzierung (BDS) weiter getestet. Die Proben wurden als positiv erachtet, wenn die Ergebnisse der bidirektionalen Sequenzierung eines der Vergleichs-PCR-Assays das Vorhandensein von CMV-DNA bestätigten. Die Proben wurden als negativ erachtet, wenn keiner der Vergleichs-PCR-Assays am Ende der 40-Zyklus-Amplifikation oder der BDS das Amplikon produzierte.

Composite Reference Method

PCR Nr. 1	PCR NR. 2	Bidirektionale Sequenzierung	Composite Reference Method
+	+	+	+
+	+	-	-
+	-	+	+
+	-	-	-
-	+	+	+
-	+	-	-
-	-	Nicht anwendbar	-

Die Leistung des Alethia CMV-Assays basierte auf der Evaluation von 1.514 prospektiv gesammelten Proben. Von den prospektiv gesammelten Proben waren fünf Proben positiv gemäß CRM, 1.475 Proben waren negativ gemäß CRM (Prävalenz betrug 0,3 % (5/1.514)) und 34 Proben waren ungültig gemäß CRM und wurden bei dem Test nicht berücksichtigt (eine der Proben war gemäß Alethia CMV-Assay ungültig). Von den archivierten und zuvor ausgewählten positiven Proben waren 34 Proben positiv gemäß CRM.

Prospektive Studie

Alethia CMV	Composite Reference Method		Gesamt
	Positiv	Negativ	
Positiv	5	3	8
Negativ	0	1472	1472
Gesamt	5	1475	1480

	Schätzwert	95 % KI
Positive Übereinstimmung in Prozent	100 % (5/5)	56,7 %; 100 %
Negative Übereinstimmung in Prozent	99,8 % (1.472/1.475)	99,4 %; 99,9 %

Studie mit vorausgewählten, archivierten positiven Proben:

34 archivierte, vorausgewählte positive Proben wurden im Rahmen der Studie evaluiert und gemäß CRM sowie mit dem Alethia CMV-Assay als positiv bestätigt.

Alethia CMV	Composite Reference Method		Gesamt
	Positiv	Negativ	
Positiv	34	0	34
Negativ	0	0	0
Gesamt	34	0	34

	Schätzwert	95 % KI
Positive Übereinstimmung in Prozent	100 % (34/34)	89,9 %; 100 %
Negative Übereinstimmung in Prozent	Nicht anwendbar	Nicht anwendbar

Kombinierte positive und negative prozentuale Übereinstimmung für die prospektive Studie und die Studie mit vorausgewählten, positiven Proben:

Die positiven Proben der prospektiven Studie (5) und die Studie mit archivierten, vorausgewählten, positiven Proben (34) zeigten eine 100%ige Übereinstimmung gemäß der Composite Reference Method und werden daher in der nachstehenden Tabelle kombiniert dargestellt.

	Schätzwert	95 % KI
Positive Übereinstimmung in Prozent	100 % (39/39)	91,0 %; 100 %
Negative Übereinstimmung in Prozent	99,8 % (1.472/1.475)	99,4 %; 99,9 %

Ungültige Ergebnisse des Alethia CMV-Assays

Siebenundzwanzig (27) Proben erzeugten ungültige Ergebnisse während des ersten Tests mit dem Alethia CMV-Assay. Die Rate der ersten ungültigen Ergebnisse betrug 1,7 % (27/1.548) und lag in verschiedenen klinischen Prüfcentren im Bereich von 0,7 % bis 4,1 %. Nach der Wiederholung des Tests mit dem Alethia CMV-Assay waren die Ergebnisse von 26 Proben gültig. Die Rate der endgültigen ungültigen Ergebnisse betrug 0,06 % (1/1.548), der KI lag bei 95 %: 0,01 %; 0,37 %.

Zusätzliche Beschreibung der klinischen Studie:

Leistung des Alethia CMV-Assays nach Alter (prospektive und vorausgewählte positive Probentypen wurden kombiniert)

Altersgruppe	Proben positiv gemäß CRM			Proben negativ gemäß CRM		
	Positive Übereinstimmung in Prozent	Alethia/CRM	95 % KI	Negative Übereinstimmung in Prozent	Alethia/CRM	95 % KI
0–3 Tage	100 %	15/15	79,6 %; 100 %	99,9 %	1.351/1.353	99,5 %; 100 %
4–7 Tage	Nicht anwendbar	Nicht anwendbar	Nicht anwendbar	99,1 %	108/109	95,0 %; 99,8 %
8–10 Tage	Nicht anwendbar	Nicht anwendbar	Nicht anwendbar	100 %	4/4	51,0 %; 100 %
11–13 Tage	Nicht anwendbar	Nicht anwendbar	Nicht anwendbar	100 %	2/2	34,2 %; 100 %
14–17 Tage	100 %	1/1	20,7 %; 100 %	100 %	6/6	61,0 %; 100 %
18–20 Tage	Nicht anwendbar	Nicht anwendbar	Nicht anwendbar	100 %	1/1	20,7 %; 100 %
Bekannt < 21 Tage	100 %	23/23	85,7 %; 100 %	Nicht anwendbar	Nicht anwendbar	Nicht anwendbar
Klinische Prüfcentren gesamt	100 %	39/39	91,0 %; 100 %	99,8 %	1.472/1.475	99,4 %; 99,9 %

Leistung des Alethia CMV-Assays nach Geschlecht (prospektive und vorausgewählte positive Probentypen wurden kombiniert)

Geschlecht	Proben positiv gemäß CRM			Proben negativ gemäß CRM		
	Positive Übereinstimmung in Prozent	Alethia/CRM	95 % KI	Negative Übereinstimmung in Prozent	Alethia/CRM	95 % KI
Frauen	100 %	5/5	56,6 %; 100 %	99,7 %	708/710	99,0 %; 99,9 %
Männer	100 %	11/11	74,1 %; 100 %	99,9 %	763/764	99,3 %; 100 %
Unbekannt	100 %	23/23	85,7 %; 100 %	100 %	1/1	20,7 %; 100 %
Klinische Prüfcentren gesamt	100 %	39/39	91,0 %; 100 %	99,8 %	1.472/1.475	99,4 %; 99,9 %

ANALYTISCHE SENSITIVITÄT

Die analytische Sensitivität, die auch als Nachweisgrenze (Limit of Detection, LoD) bezeichnet wird, ist die Konzentration, bei der der Alethia CMV-Assay in mindestens 95 % der Fälle positive Ergebnisse zeigt. Die Nachweisgrenze des Alethia CMV-Assays wurde für den Zytomegalievirus-Stamm Merlin in einer negativen Probenmatrix bestimmt. Diese negative Matrix bestand aus Speichelproben von gesunden CMV-negativen Erwachsenen, die mit dem Alethia CMV-Assay getestet wurden und deren negatives Ergebnis bestätigt wurde. Es kamen drei Kit-Chargen des Alethia CMV-Assays und acht Alethia-Geräte zum Einsatz. Von jeder Charge wurden 6 Verdünnungen mit 20 Replikaten getestet. Die LoD wurde mithilfe der Probit-Analyse bestimmt. Die LoD wurde für die beiden Probentypen (trockener Abstrich und Abstrich in VTM) separat bestimmt. Die LoD-Konzentrationen der einzelnen Probentypen sind nachstehend zusammengefasst.

Probentyp	LoD (Kopien/mL)
Trockener Abstrich ¹	1.025
Abstrich in VTM ²	15.686

¹ Die CMV-Konzentration (Kopien/mL) im Speichel auf dem Abstrichtupfer der trockenen Abstrichproben wird berechnet, indem die CMV-Konzentration in Puffer I mit dem Faktor 4,75 (der 4,75-fachen Verdünnung, die erzeugt wird, wenn 0,080 mL des auf dem Abstrichstäbchen befindlichen Speichels zu 0,3 mL Puffer I hinzugegeben werden [380:80 = 4,75]; dabei wird angenommen, dass 100 % transferiert wird) multipliziert wird.

² Die CMV-Konzentration (Kopien/mL) im Speichel auf dem Abstrichtupfer der VTM-Proben wird berechnet, indem die CMV-Konzentration im VTM mit dem Faktor 13,5 (der 13,5-fachen Verdünnung, die erzeugt wird, wenn 0,080 mL des auf dem Abstrichstäbchen befindlichen Speichels zu 1 mL VTM hinzugegeben werden [1080:80 = 13,5]; dabei wird angenommen, dass 100 % transferiert wird) multipliziert wird.

ASSAY-INKLUSIVITÄT

Es wurden Proben mit dem Alethia CMV-Assay getestet, die 3 weitere CMV-Stämme enthielten, bei denen es sich nicht um Merlin-CMV-Stämme handelte. Dazu gehörten die Stämme Toledo, Towne und AD-169. Quantifizierte Stämme beider Proben (trockener Abstrich und Abstrich in VTM) wurden in einer simulierten, negativen klinischen Matrix auf ungefähr 2–3 x LoD verdünnt und dreimal getestet. Alle Stämme, die für beide Probentypen getestet wurden, erzeugten beim Test mit dem Alethia CMV Assay positive Ergebnisse.

Getesteter CMV-Stamm	Trockene Abstrichproben		VTM-Abstrichproben	
	Testkonzentration (Kopien/mL)	Testergebnisse (n _{pos} /n _{gesamt})	Testkonzentration (Kopien/mL)	Testergebnisse (n _{pos} /n _{gesamt})
AD-169	2.493	3/3	45.077	3/3
Toledo	2.493	3/3	45.077	3/3
Towne	2.493	3/3	45.077	3/3

REPRODUZIERBARKEIT

Panel mit zwei Probenotypen (trockener Abstrich und Abstrich in VTM) wurden für diese Untersuchung der Reproduzierbarkeit an drei Labors geschickt. Die Panels umfassten künstlich hergestellte mäßig positive, schwach positive und stark negative CMV-Proben (30 Replikate pro Einrichtung und Probe). Zum Panel gehörte auch eine richtig negative Probe (10 Replikate pro Einrichtung). Außerdem wurden für jedes Panel die Positiv- und Negativkontrollen getestet (10 Replikate pro Einrichtung). Die Tests wurden am selben Tag für fünf Tage von verschiedenen Laboranten in jeder Einrichtung durchgeführt. Für diese Untersuchung wurden drei Chargen von Alethia CMV-Kits und sechs Alethia-Geräte eingesetzt. Mittelwerte, Wiederholbarkeit, Laborant-zu-Laborant-, Tag-zu-Tag- und Einrichtung-zu-Einrichtung-Varianzkomponenten sowie der Prozentsatz der positiven und negativen Ergebnisse sind in den untenstehenden Tabellen für jeden Probenotyp angegeben, der im Rahmen der Untersuchung der Reproduzierbarkeit getestet wurde.

Reproduzierbarkeit bei trockenen Abstrichproben

Speichelproben auf trockenen Abstrichstäbchen														
	N	Mittelwert	Wiederholbarkeit		Laborant-zu-Laborant ¹		Tag-zu-Tag		Einrichtung-zu-Einrichtung ²		Reproduzierbarkeit		% pos. Ergeb.	% neg. Ergeb.
			SA	% VK	SA	% VK	SA	% VK	SA	% VK	SA	% VK		
Mäßig positiv	90	62,26	2,93	4,7 %	1,69	2,7 %	0,00	0,0 %	0,91	1,5 %	3,50	5,6 %	100 %	0 %
Schwach positiv	90	62,38	4,44	7,1 %	1,96	3,1 %	1,11	1,8 %	0,00	0,0 %	4,98	8,0 %	98,9 %	1,1 %
Stark negativ	90	99,05	6,68	6,7 %	0,97	1,0 %	0,00	0,0 %	0,23	0,2 %	6,76	6,8 %	3,3 %	96,7 %
Richtig negativ³	30	100,13	0,69	0,7 %	Nicht anwend-bar	Nicht anwend-bar	0,31	0,3 %	0,40	0,4 %	0,86	0,9 %	0 %	100 %
Positivkontrolle³	30	61,84	2,72	4,4 %	Nicht anwend-bar	Nicht anwend-bar	0,00	0,0 %	1,11	1,8 %	2,94	4,8 %	100 %	0 %
Negativkontrolle³	30	100,23	2,06	2,1 %	Nicht anwend-bar	Nicht anwend-bar	0,17	0,2 %	0,22	0,2 %	2,08	2,1 %	0 %	100 %

¹ Umfasst Laborant-zu-Laborant- und Gerät-zu-Gerät-Komponenten

² Umfasst Einrichtung-zu-Einrichtung- und Kit-Charge-zu-Kit-Charge-Komponenten

³ Die Proben wurden an jeder Einrichtung über 5 Tage mit 2 Läufen pro Tag und 1 Replikat pro Lauf getestet.

Reproduzierbarkeit bei VTM-Proben

Speichelproben in VTM														
	N	Mittelwert	Wiederholbarkeit		Laborant-zu-Laborant ¹		Tag-zu-Tag		Einrichtung-zu-Einrichtung ²		Reproduzierbarkeit		% pos. Ergeb.	% neg. Ergeb.
			SA	% VK	SA	% VK	SA	% VK	SA	% VK	SA	% VK		
Mäßig positiv	90	61,99	3,18	5,1 %	1,02	1,6 %	0,00	0,0 %	1,20	1,9 %	3,55	5,7 %	100 %	0 %
Schwach positiv	90	61,71	2,37	3,8 %	1,43	2,3 %	0,00	0,0 %	0,67	1,1 %	2,85	4,6 %	100 %	0 %
Stark negativ	90	100,11	4,82	4,8 %	0,00	0,0 %	0,74	0,7 %	0,00	0,0 %	4,88	4,9 %	1,1 %	98,9 %
Richtig negativ³	30	99,20	7,71	7,8 %	Nicht anwend-bar	Nicht anwend-bar	0,00	0,0 %	0,00	0,0 %	7,71	7,8 %	3,3 %	96,7 %
Positivkontrolle³	30	62,22	2,39	3,8 %	Nicht anwend-bar	Nicht anwend-bar	0,00	0,0 %	0,49	0,8 %	2,44	3,9 %	100 %	0 %
Negativkontrolle³	30	100,30	2,02	2,0 %	Nicht anwend-bar	Nicht anwend-bar	0,00	0,0 %	0,12	0,1 %	2,02	2,0 %	0 %	100 %

¹ Umfasst Laborant-zu-Laborant- und Gerät-zu-Gerät-Komponenten

² Umfasst Einrichtung-zu-Einrichtung- und Kit-Charge-zu-Kit-Charge-Komponenten

³ Die Proben wurden an jeder Einrichtung über 5 Tage mit 2 Läufen pro Tag und 1 Replikat pro Lauf getestet.

UNTERSUCHUNG DER INTRA-LABOR-PRÄZISION

Panel mit zwei Probenotypen (trockener Abstrich und Abstrich in VTM) wurden in einem Labor (intern) über 6 Tage getestet. Die Panels umfassten künstlich hergestellte mäßig positive, schwach positive (ungefähr 2 x LoD) und stark negative Proben. Zum Panel gehörten auch eine richtig negative Probe sowie Positiv- und Negativkontrollen. Für die Untersuchung wurden drei Kit-Chargen (eine Charge pro Tag) verwendet. Jede Kit-Charge wurde zweimal über einen Zeitraum von 6 Tagen getestet. Mittelwerte, Wiederholbarkeit, Laborant-zu-Laborant-, Tag-zu-Tag- und Kit-Charge-zu-Kit-Charge-Varianzkomponenten sowie der Prozentsatz der positiven und negativen Ergebnisse sind in den untenstehenden Tabellen für jeden Probenotyp angegeben, der im Rahmen der Präzisionsuntersuchung getestet wurde.

Intra-Labor-Präzision bei trockenen Abstrichproben

Speichelproben auf trockenen Abstrichstäbchen														
	N	Mittelwert	Wiederholbarkeit ¹		Laborant-zu-Laborant ¹		Tag-zu-Tag		Kit-Charge-zu-Kit-Charge		Reproduzierbarkeit		% pos. Ergeb.	% neg. Ergeb.
			SA	% VK	SA	% VK	SA	% VK	SA	% VK	SA	% VK		
Mäßig positiv	48	60,29	1,99	3,3 %	0,00	0,0 %	0,00	0,0 %	0,74	1,2 %	2,12	3,5 %	100 %	0 %
Schwach positiv	48	60,23	1,70	2,8 %	0,62	1,0 %	0,00	0,0 %	0,74	1,2 %	1,95	3,2 %	100 %	0 %
Stark negativ	48	98,26	6,46	6,6 %	4,36	4,4 %	1,42	1,4 %	0,80	0,8 %	7,96	8,1 %	4,2 %	95,8 %
Richtig negativ	48	99,94	0,61	0,6 %	0,00	0,0 %	0,12	0,1 %	0,14	0,1 %	0,64	0,6 %	0 %	100 %
Positivkontrolle	24	60,57	1,96	3,2 %	0,00	0,0 %	1,47	2,4 %	0,00	0,0 %	2,45	4,0 %	100 %	0 %
Negativkontrolle	24	99,73	0,29	0,3 %	0,00	0,0 %	0,18	0,2 %	0,16	0,2 %	0,38	0,4 %	0 %	100 %

¹ Umfasst Laborant-zu-Laborant- und Gerät-zu-Gerät-Komponenten

Intra-Labor-Präzision bei VTM-Proben

Speichelproben in VTM														
	N	Mittelwert	Wiederholbarkeit		Laborant-zu-Laborant ¹		Tag-zu-Tag		Kit-Charge-zu-Kit-Charge		Reproduzierbarkeit		% pos. Ergeb.	% neg. Ergeb.
			SA	% VK	SA	% VK	SA	% VK	SA	% VK	SA	% VK		
Mäßig positiv	48	60,62	1,36	2,2 %	0,91	1,5 %	0,00	0,0 %	0,77	1,3 %	1,81	3,0 %	100 %	0 %
Schwach positiv	48	60,55	1,67	2,8 %	0,89	1,5 %	0,72	1,2 %	0,00	0,0 %	2,02	3,3 %	100 %	0 %
Stark negativ	48	99,91	0,64	0,6 %	0,00	0,0 %	0,22	0,2 %	0,00	0,0 %	0,68	0,7 %	0 %	100 %
Richtig negativ	48	100,00	0,84	0,8 %	0,28	0,3 %	0,00	0,0 %	0,00	0,0 %	0,89	0,9 %	0 %	100 %
Positivkontrolle	24	60,28	2,12	3,5 %	0,00	0,0 %	1,09	1,8 %	0,00	0,0 %	2,38	4,0 %	100 %	0 %
Negativkontrolle	24	100,29	1,53	1,5 %	0,28	0,3 %	0,00	0,0 %	0,00	0,0 %	1,56	1,6 %	0 %	100 %

¹ Umfasst Laborant-zu-Laborant- und Gerät-zu-Gerät-Kompo

UNTERSUCHUNG DER KREUZREAKTIVITÄT

Die Kreuzreaktivität wurde mit einem Panel mit 40 Mikroorganismen und Humangenom-DNA untersucht; jedes Panel wurde in einer simulierten, negativen klinischen Matrix eines trockenen Abstrichs verdünnt. Zu den ausgewählten Mikroorganismen gehörten solche, die eine genetische Ähnlichkeit mit CMV aufwiesen, und solche, die wahrscheinlich in der Mundflora von Neugeborenen vorkommen. Die Mikroorganismen wurden in einer simulierten, negativen klinischen Matrix eines trockenen Abstrichs auf die angegebene Konzentration (siehe Tabelle unten) verdünnt und dreimal getestet. Beim Alethia CMV-Assay wurde keine Kreuzreaktivität beobachtet.

Mikroorganismus	Testkonzentration	Test-ergebnisse (n _{pos.} /n _{gesamt})	Mikroorganismus	Testkonzentration	Test-ergebnisse (n _{pos.} /n _{gesamt})
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1,2 x 10 ⁷ KBE/mL	0/3	Adenovirus	3,80 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	1,2 x 10 ⁷ KBE/mL	0/3	Coronavirus	2,19 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Bordetella pertussis</i>	1,2 x 10 ⁷ KBE/mL	0/3	Coxsackievirus	4,07 x 10 ⁶ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Candida albicans</i>	1,2 x 10 ⁷ KBE/mL	0/3	Enterovirus 71	1,26 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	1,2 x 10 ⁷ KBE/mL	0/3	Epstein-Barr-Virus	3,39 x 10 ⁸ Kopien/mL	0/3
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	1,2 x 10 ⁷ KBE/mL	0/3	Herpes-Simplex-Virus 1	9,5 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Haemophilus influenzae</i>	1,2 x 10 ⁷ KBE/mL	0/3	Herpes-Simplex-Virus 2	1,3 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	1,2 x 10 ⁷ KBE/mL	0/3	Humanes Herpesvirus 6B	6,16 x 10 ⁷ Kopien/mL	0/3
<i>Moraxella catarrhalis</i>	1,2 x 10 ⁷ KBE/mL	0/3	Humanes Herpesvirus 7	3,80 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	3,70 x 10 ⁷ CCU/mL	0/3	Humanes Herpesvirus 8	2,13 x 10 ⁸ Kopien/mL	0/3
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	1,2 x 10 ⁷ KBE/mL	0/3	Humanes Metapneumovirus	6,61 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,2 x 10 ⁷ KBE/mL	0/3	Influenza A	3,80 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,2 x 10 ⁷ KBE/mL	0/3	Influenza B	4,57 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1,2 x 10 ⁷ KBE/mL	0/3	Parainfluenza-Virus 1	1,95 x 10 ⁶ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Streptococcus agalactiae</i> (Gruppe B)	1,2 x 10 ⁷ KBE/mL	0/3	Parainfluenza-Virus 2	5,89 x 10 ⁶ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Streptococcus anginosus</i> (Gruppe F)	1,2 x 10 ⁷ KBE/mL	0/3	Parainfluenza-Virus 3	2,19 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Streptococcus mitis</i>	1,2 x 10 ⁷ KBE/mL	0/3	Respiratory-Syncytial- Virus A	3,2 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Streptococcus oralis</i>	1,2 x 10 ⁷ KBE/mL	0/3	Respiratory-Syncytial- Virus B	4,6 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Streptococcus salivarius</i>	1,2 x 10 ⁷ KBE/mL	0/3	Rhinovirus	1,51 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /mL	0/3
<i>Streptococcus sanguinis</i>	1,2 x 10 ⁷ KBE/mL	0/3	Varizella-Zoster-Virus	3,36 x 10 ⁹ Kopien/mL	0/3
Humangenom-DNA	6,18 x 10 ⁶ Kopien/mL	0/3	Nicht anwendbar	Nicht anwendbar	Nicht anwendbar

TESTS AUF MIKROBIELLE INTERFERENZ

Untersuchungen auf mikrobielle Interferenzen wurden mit einem Panel mit 40 Mikroorganismen und Humangenom-DNA durchgeführt; jedes Panel wurde in einer simulierten, positiven klinischen Matrix eines trockenen Abstrichs verdünnt. Jede getestete Probe enthält CMV mit einer Konzentration von 3 x LoD und Mikroorganismen oder Humangenom-DNA mit der oben angegebenen Testkonzentration (Informationen zu den getesteten Mikroorganismen und endgültigen Testkonzentrationen finden Sie in der Tabelle im Abschnitt zur Kreuzreaktivität). Jede Probe wurde nach der Vorbereitung dreimal getestet. Es wurde keine mikrobielle Interferenz beim Alethia CMV-Assay festgestellt (d. h. alle Mikroorganismen, die in einer simulierten, positiven klinischen Matrix eines trockenen Abstrichs verdünnt wurden, erzeugten positive Testergebnisse (3/3) beim Test mit dem Alethia CMV-Assay).

STÖRSUBSTANZEN-TESTS

Störsubstanzen-Tests wurden bei Vorhandensein von chemischen und biologischen Substanzen durchgeführt, mit denen künstliche CMV-Proben mit einer schwach positiven (3 x LoD) Konzentration und negative CMV-Proben versetzt wurden. Zwei eindeutig positive Proben und eine negative Probe wurden dreimal getestet. In der folgenden Tabelle sind die getesteten Substanzen, evaluierten Konzentrationen und Testergebnisse aufgeführt. Die folgenden Substanzen führten in den spezifizierten Testkonzentrationen bei der Anwendung des Alethia CMV-Assays zu keinen Störungen (d. h. alle positiven Replikate erzeugten beim Test mit Alethia CMV positive Testergebnisse und alle negativen Replikate erzeugten beim Test mit Alethia CMV negative Testergebnisse).

Getestete Substanz	Testkonzentration	Testergebnisse (n _{nachgewiesen} /n _{gesamt})		
		CMV-negative Probe	CMV-positive Probe Nr. 1	CMV-positive Probe Nr. 2
Acetaminophen zur Schmerz- und Fieberbehandlung von Säuglingen	0,2 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Acetylsalicylsäure	0,65 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Koffein	0,06 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Enfamil™ Fer-In-Sol® (Eisensulfat)	1,5 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Enfamil Premium® Säuglingsanfangsnahrung	10 % (v/v)	0/3	3/3	3/3
Mylicon® zur Behandlung von Blähungen beim Säugling Simeticon)	2 mg/0,3 mL	0/3	3/3	3/3
Gaviscon® für Säuglinge (Natriumalginat)	1,2 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Magnesiumalginat	0,467 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Ibuprofen für Säuglinge	0,5 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Enfamil™ Poly-Vi-Sol®	8 % (v/v)	0/3	3/3	3/3
Little Remedies® Kochsalzspray/-tropfen	10 % (v/v)	0/3	3/3	3/3
Methadon	0,002 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Morphinsulfat	0,0005 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Nystatin	1000 U/mL	0/3	3/3	3/3
Prednison	0,0003 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Kasein	10 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Muzin (aus Schweinemagen – Typ II)*	25 mg/mL	0/3	3/3	3/3
Weißer Blutzellen	10 % (v/v)	0/3	3/3	3/3
Vollblut	10 % (v/v)	0/3	3/3	3/3

* Der Test von Muzin mit einer Konzentration von 50 mg/mL ergab bei der negativen Probe bei 3/3 Replikaten ein negatives Ergebnis und erzeugte bei der CMV-positiven Probe Nr. 1 bei 3/3 Replikaten ein positives Ergebnis. Die CMV-positive Probe Nr. 2 erzeugte zwei ungültige Testergebnisse und ein positives Testergebnis bei drei getesteten Replikaten. Die Muzin-Konzentration in den Proben wurde auf 25 mg/mL reduziert und die Tests wurden wiederholt und erzeugten die unten in der Tabelle aufgeführten Ergebnisse. Bei einer Muzin-Konzentration von 25 mg/mL wurde keine Störung beobachtet.

UNTERSUCHUNG AUF KREUZKONTAMINATION

Eine Reihe von abwechselnd richtig negativen Proben und Proben mit einer hohen Viruslast (30 x LoD) wurde mit dem Alethia CMV-Assay getestet. Insgesamt wurden 30 stark positive und 30 richtig negative Proben getestet. Es wurden sechs Läufe mit jeweils 10 Proben (5 stark positive und 5 richtig negative Proben) durchgeführt. Alle getesteten Proben erzeugten die erwarteten Ergebnisse, d. h. alle positiven Proben ergaben positive Ergebnisse beim Test mit Alethia-CMV und alle negativen Proben ergaben negative Ergebnisse beim Test mit Alethia CMV. Es wurde keine Kreuzkontamination festgestellt. Untersuchungen von Arbeitsabläufen haben ergeben, dass der beim Mischen mit dem Vortexmischer entstehende Schaum ein Aerosolkontaminationsrisiko darstellt (d. h. wenn Schaumbasen zerplatzen) und/oder ein Übertragungskontaminationsrisiko durch Kontakt der Handschuhe mit Flüssigkeiten besteht. Daher wird empfohlen, bei der Durchführung des Alethia CMV-Assays die Grundsätze der bewährten Laborpraktiken (Good Laboratory Practices) zu beachten und Handschuhe häufig zu wechseln.

ZUSAMMENFASSUNG DER UNTERSUCHUNG DER PROBENSTABILITÄT

Ein Panel mit künstlichen CMV-Proben mit einer schwach positiven (3 x LoD) Konzentration und negative CMV-Proben beider Probentypen (trockener Abstrich und Abstrich in VTM) wurden wie unten beschrieben in Aliquoten vorbereitet und aufbewahrt. Die Aliquote der einzelnen Proben wurden in bestimmten Zeitabständen aus der Lagerung entnommen und nahmen vor dem dreimaligen Testen Raumtemperatur an. Unter den angegebenen Lagerungsparametern erzeugten alle positiven Proben beim Test mit Alethia CMV positive Ergebnisse und alle negativen Proben beim Test mit Alethia CMV negative Ergebnisse.

Lagerbedingungen	Zulässige Lagerungsparameter
Raumtemperatur (19–30 C)	48 Stunden
Gekühlt (2–8 C)	7 Tage
Gefroren (\leq -20 C)	14 Tage, Proben können bis zu 2-mal eingefroren und aufgetaut werden

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. Bate SL et al. Cytomegalovirus seroprevalence in the United States: The National Health and Nutrition Examination Surveys, 1988-2004. *CID* 2010;50:1439-1447.
4. Manicklal S et al. The silent global burden of congenital cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev* 2013;26:86-102.
5. Boppana S et al. Saliva polymerase-chain-reaction assay for Cytomegalovirus screening in newborns. *NEJM* 2011;364:2111-2118.
6. American Academy of Pediatricians, Congenital Cytomegalovirus (CMV) infection and hearing loss. www.aap.org/aap-health-initiatives/PEHDIC/Documents.pdf.
7. Demmler-Harrison GJ. Editorial: Congenital cytomegalovirus infection. The elephant in our living room. jamanetwork.com/journals/jamapediatrics/fullarticle/2557386.
8. Ross SA et al. Detection of congenital cytomegalovirus infection by real-time polymerase chain reaction analysis of saliva or urine specimens. *JID* 2014;210:1415-1418.
9. Yamamoto Y et al. Is saliva as reliable as urine for detection of cytomegalovirus DNA for neonatal screening of congenital CMV infection? *J Clin Virol* 2006;36:228-230.
10. Bélec L, Brogan TV. Real-time PCR-based testing of saliva for cytomegalovirus at birth. *Expert Rev anti-Infect Ther* 2011;9:1119-1124.
11. Centers for Disease Control: Laboratory diagnosis of CMV infection for persons \geq 12 months of age. <http://cdc.gov/cmvc/clinical/lab-tests.html>.
12. US Department of Health and Human Services PHS/CDC/NIH. Biosafety in microbiology and biomedical laboratories, Washington DC: US Government Printing Office, 2007.
13. CLSI: MM3-A2 Molecular diagnostic methods for infectious disease; approved guideline, 2nd ed. Wayne PA: Clinical Laboratory Standards Institute. 2006.



SN11118




















REV. 03/26

 <p>Manufactured By</p>	<p>Meridian Bioscience, Inc. 3471 River Hills Drive Cincinnati, OHIO - 45244 USA www.meridianbioscience.com</p> <p><u>Contacts:</u> Main Telephone (+1) 513.271.3700 Customer Service/Orders 800.543.1980 Technical Support Center 800.343.3858 Information Fax: 513.272.5432 Ordering Fax: 513.271.0124 E-mail: info@meridianbioscience.com</p>
<p>EC REP</p>	<p>Meridian Bioscience Europe, SRL Via Dell'Industria 7, 20035 Villa Cortese (Milano) ITALY www.meridianbioscience.com</p> <p><u>Contacts:</u> Main Telephone (+39) 0331.433636 E-mail: info@meridianbioscience.eu Technical Support: MBE-TechService@meridianbioscience.eu Customer Service/Orders:</p> <ul style="list-style-type: none"> • For Italian Customers: ordini@meridianbioscience.com • For Distributors / International Customers: Export.CustomerService@meridianbioscience.eu
<p>UK Authorised Representative</p>	<p>Launch Diagnostics Limited Lakeview West Crossways Business Park Galleon Boulevard Dartford Kent DA2 6QE United Kingdom</p>
<p>CH REP</p>	<p>MedEnvoy Switzerland Gotthardstrasse 28 6302 Zug Switzerland</p>

INTERNATIONAL SYMBOL USAGE

You may see one or more of these symbols on the labeling/package 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
	Meridian products carrying the European Conformity (CE) mark fulfil 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 Probenverdünnungspuffer befindet
		STERILE R	Sterilization by gamma irradiation / Sterilizzazione con raggi gamma / Stérilisation par irradiation aux rayons gamma / Esterilizado por irradiación gamma / Sterilisation durch Gammastrahlen
REF	Catalogue number / Numero di catalogo / Référence du catalogue / Número de catálogo / Bestellnummer		Do not freeze / Non congelare / Ne pas congeler / No congelar / Nicht Einfrieren
	Consult Instructions for Use / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulter les instructions d'utilisation / Consulte las instrucciones de uso / Gebrauchsanweisung beachten	RoHS	Restriction of Hazardous Substances / Restrizione all'uso di sostanze pericolose / Limitation de substances dangereuses / Restricción de Substancias Nocivas / Beschränkung der Verwendung bestimmter gefährlicher Stoffe
	Manufacturer / Fabricante / Fabricant / Fabricante / Hersteller		Caution, consult accompanying documents / Attenzione, vedere le istruzioni per l'uso / Attention voir notice d'instructions / Atención, ver instrucciones de uso / Achtung, Begleitdokumente beachten
SN	Serial number / Numero di serie / Numéro de série / Número de serie / Seriennummer	STERILE EO	Sterilization by ethylene oxide / Sterilizzazione con ossido di etilene / Stérilisation par oxyde d'éthylène / Esterilizado por oxidode etileno / Sterilisation durch Ethylenoxid
	Contains sufficient for <n> tests / Contenuto sufficiente per "n" saggi / Contenu suffisant pour "n" tests / Contenido suficiente para <n> ensayos / Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen	BUF RXN	Reaction Buffer / Tampone di reazione / Solution de réaction tamponnée / Tampón de Reacción / Reaktionspuffer
	Temperature limitation / Limiti di temperatura / Limites de température / Limite de temperatura / Temperaturbegrenzung		ETL Registered Mark Certified / Marchio di certificazione registrato a livello nazionale / Certifié Conforme ETL / Marca de Certificación Registrada Nacional / ETL Konform beglaubigt
	Female / Femminile / De sexe féminin / Hembra / Frau		Recycle – do not dispose of as general waste / Riciclare – non eliminare come rifiuto generico / Recycler – ne pas jeter dans une poubelle / Recycle – no deseché 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	HT TUBE	Heat Treatment Tube / Provetta per il Trattamento termico / Tube pour le traitement thermique / Tubo de tratamiento de calor / Röhrrchen zur Hitzebearbeitung
	Date of manufacture / Data di fabbricazione / Date de fabrication / Fecha de fabricación / Herstellungsdatum		For IVD Performance Evaluation Only / Soltanto per valutazione delle prestazioni / Réactifs IVD réservés à l'évaluation des performances / Sólo para evaluación del funcionamiento / Nur zur IVD Leistungsbewertung
	LASER RADIATION: Avoid Exposure to Beam / RADIAZIONE LASER: Evitare l'esposizione al raggio / RAYONNEMENT LASER: Eviter toute exposition au faisceau / Radiación Laser: Evite Exposición a los Rayos / LASERSTRAHLUNG: Direkten Kontakt mit dem Strahl vermeiden		HOT SURFACE: Keep hands Away from Hot Surfaces / Superficie calda: tenere le mani lontane dalle superfici calde / SURFACES CHAUDES: Ne pas toucher les surfaces chaudes / Superficie Caliente: Mantenga las manos alejadas de la superficie caliente / Heiße Oberfläche: Kontakt mit heißen Oberflächen vermeiden
	CAUTION: Laser Radiation / ATTENZIONE: Radiazione Laser / AVERTISSEMENT: Rayonnement laser / Precaución: Radiación Laser / WARNUNG: Laserstrahlung	IPX-0	CAUTION: Protect from water / ATTENZIONE: Proteggere dall'acqua / AVERTISSEMENT: Protéger de l'humidité / Precaución: Proteja del agua / WARNUNG: Vor Feuchtigkeit schützen
	CAUTION: Risk of Danger / ATTENZIONE: Pericolo / AVERTISSEMENT: Risques de danger / Precaución: Peligroso / WARNUNG: Risikogefahr	CONTROL	Assay Control / Controllo del test / Test de contrôle / Control de Ensayo / Kontrolltest
BUF	Buffer / Soluzione tampone / Solution tamponnée / Tampón / Puffer		Warning / Avvertenze / Mise En Garde / Advertencia / Warnhinweise
MIN OIL	Mineral Oil / Olio Minerale / Huile Minérale / Aceite Mineral / Mineralöl	MEDIA	Media / Terreno di trasporto / Milieux / Medio / Medium
ST TUBE	Screw Top Tube / Provetta con tappo a vite / Tube à bouchon vissé / Tubo con tapa de rosca / Röhrrchen mit Schnappverschluss	COL	Sample Preparation Column / Colonna di preparazione del campione / Colonne pour la préparation de l'échantillon / Columna de preparación de muestra / Säule zur Probenaufarbeitung
BUF SMP	Sample Buffer / Soluzione tampone per il campione / Tampón de 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.