

**DNA Amplification Assay for the Detection of
Herpes Simplex Virus Type 1 and Herpes Simplex Virus Type 2**

REF 480650

IVD

R_x Only

INTENDED USE

The Alethia HSV 1&2 DNA amplification assay, performed on the Alethia reader is a qualitative in vitro diagnostic test for the direct detection and differentiation of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and herpes simplex virus type 2 (HSV-2) DNA in cutaneous and mucocutaneous lesion specimens from male and female patients suspected of Herpetic infections.

Alethia HSV 1&2 utilizes loop-mediated isothermal DNA amplification (LAMP) technology to detect HSV-1 and HSV-2 by targeting segments of the herpes simplex virus 1 and herpes simplex virus 2 genomes. Results from Alethia HSV 1&2 are used as an aid in the diagnosis of HSV infection in symptomatic patients.

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

WARNING: Alethia HSV 1&2 is not FDA cleared for use with cerebrospinal fluid (CSF) or to aid in the diagnosis of HSV infections of the central nervous system (CNS). The device is not intended for prenatal screening.

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Alethia HSV 1&2 is based on loop-mediated amplification (LAMP)^{1,2} technology. The assay individually targets regions of the HSV-1 and HSV-2 genomes in two separate Test Devices. The HSV-1 target is a 208 base pair (bp) sequence of the HSV-1 glycoprotein G (US4) gene. The HSV-2 target is a 189 bp sequence of the HSV-2 glycoprotein G (US4) gene.

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

The Alethia HSV 1&2 kit includes Alethia Sample Preparation Apparatus III (SMP PREP III), Alethia HSV 1 Test Devices, Alethia HSV 2 Test Devices, Mineral Oil, Heat Treatment Tubes, and 50 µL transfer pipettes. The Alethia SMP PREP III, used for specimen dilution and preparation, includes a Tris-buffered solution containing formalin-treated *E. coli* harboring *Staphylococcus aureus* DNA. The Alethia HSV 1 Test Device contains one lyophilized amplification reagent bead in each of two chambers: a TEST chamber with HSV-1-specific primers and a CONTROL chamber with *S. aureus*-specific primers. The Alethia HSV 2 Test Device contains one lyophilized amplification reagent bead in each of two chambers: a TEST chamber with HSV-2-specific primers and a CONTROL chamber with *S. aureus*-specific primers. The *S. aureus* DNA in SMP PREP III and the *S. aureus*-specific primers in the Test Device CONTROL chambers function as the Internal Control for the assay. During specimen preparation, each patient specimen is added to the SMP PREP III containing Assay Control and combined with the *S. aureus* DNA prior to amplification. Addition of *S. aureus* DNA to the patient sample allows for parallel processing of target DNA and control DNA through amplification and detection. The Internal Control monitors amplification inhibition, assay reagent performance and sample processing effectiveness. The control *S. aureus* target must be amplified and detected in the final reaction or the test is considered invalid and results are not reported.

The Alethia reader monitors changes in absorbance characteristics by measuring transmission of light through the TEST and CONTROL reaction solutions. Light transmission is determined at the assay Run Start (Signal_{initial}, S_i) and at the assay Run End (Signal_{final}, S_r). The Alethia reader calculates the change in light transmission between Run End and Run Start (S_r:S_i) and compares the ratio to a fixed cut-off value.

Fixed cut-off values for the TEST chamber are used to report sample results. TEST chamber S_r:S_i ratios less than 82% are reported as 'POSITIVE'; TEST chamber S_r: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_r:S_i ratios less than 90% are considered valid and allow for reporting of TEST chamber results (POSITIVE, NEGATIVE). CONTROL chamber S_r: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

Herpes simplex virus causes chronic, recurrent infections and viral meningitis in adults and children. Infection with herpes simplex virus type 1 (HSV-1) is relatively common, with an overall seroprevalence approaching 54% of the United States population.³ Herpes simplex virus Type 2 (HSV-2) is the primary cause of genital herpes. It is estimated that 50 million people in the US and >400 million worldwide are infected with HSV-2 genital herpes, or about 1 out of every 5 people.^{4,5} While either HSV-1 or HSV-2 is capable of oral or genital infections, HSV-1 is typically associated with oral lesions and HSV-2 is typically associated with genital lesions. However, the frequency of HSV-1 genital infection is increasing.^{3,6} HSV transmission to neonates can occur during birth, causing symptoms ranging from disseminated disease (CNS and visceral organs) to infection of the skin, eye, and mouth.⁷

HSV infection can be diagnosed using microscopy, cell culture, molecular, and serological methods;⁸ cell culture and PCR are the preferred diagnostic methods recommended by the Centers for Disease Control.⁴ The sensitivity of viral culture is low, particularly for recurrent or healing lesions, due to limited quantity of viable virus.⁴ The HSV type cannot be directly determined from viral culture, requiring additional typing methods (such as ELVIS).⁸ NAAT methods are more sensitive than culture, have the ability to differentiate between HSV types, and provide more rapid results.⁸

REAGENTS/MATERIALS PROVIDED

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

- Alethia Sample Preparation Apparatus III (SMP PREP III) (item #2792-02):** Tris-buffered solution containing formalin-treated *E. coli* harboring *S. aureus* DNA and sodium azide (0.09%) as a preservative.
- Alethia HSV 1 Test Device (item #2865):** Two-chambered device containing lyophilized amplification reagents (DNA polymerase, deoxynucleotide triphosphates) and either HSV-1-specific primers (TEST chamber) or *S. aureus*-specific primers (CONTROL chamber).
- Alethia HSV 2 Test Device (item #2870):** Two-chambered device containing lyophilized amplification reagents (DNA polymerase, deoxynucleotide triphosphates) and either HSV-2-specific primers (TEST chamber) or *S. aureus*-specific primers (CONTROL chamber). **The Alethia HSV 2 Test Device is visually identified by an orange band on the Test Device closure tab.**
- Mineral Oil (item #14298-01)** (bottle with dropper tip)
- Alethia Heat Treatment (HT) Tubes (item #2335)**
- Transfer Pipettes (item #11523A)**

MATERIALS PROVIDED SEPARATELY

Alethia HSV 1&2 External Control Kit, Catalog Number: 479960

MATERIALS NOT PROVIDED

1. Disposable latex gloves, powder free
2. DNase/RNase-free, aerosol resistant pipette tips
3. Viral transport medium (2-3 mL): MicroTest™ M4®, MicroTest™ M4RT®, MicroTest™ M6™, UniTranz-RT™ Transport System, Copan UTM™ Virus Collection, HealthLink® UTM or identical transport medium*, BD Universal Viral Transport Medium (UVT), ViraTrans™ VTM, Hardy Diagnostics VTM.
**HealthLink UTM is equivalent to Quest V-C-M Medium*

EQUIPMENT NOT PROVIDED

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

PRECAUTIONS

1. All reagents are for in vitro diagnostic use only.
2. Viral transport media containing protein stabilizers, such as MicroTest™ M5® and calcium alginate swabs, are not acceptable for Alethia HSV 1&2 specimen collection and transport.
3. Do not interchange the Sample Preparation Apparatus or Test Devices between lots. Mineral Oil and Heat Treatment Tubes are interchangeable provided they are within the assigned expiration date when used.
4. Follow Biosafety Level 2 and Good Laboratory practices during testing.⁹ Treat all specimens and used Test Devices as capable of transmitting infectious agents. Do not eat, drink or smoke in areas where specimens or kit reagents are handled.
5. Wear disposable gloves while handling specimens and thoroughly wash hands afterwards.
6. Quality Control Programs for Molecular Testing Laboratories, including proper use and care of equipment, should be employed.¹⁰
7. The Alethia HSV 1&2 Test Devices contain lyophilized reagents. The protective pouches should not be opened until ready to perform the assay.
8. The Alethia HSV 1&2 Test Devices include a latch feature that is designed to prevent contamination of the test area with amplification product. Do NOT use Test Devices with broken latches.
9. Dispose of used Alethia HSV 1&2 Test Devices immediately after processing, leaving the device latch securely in place. Do NOT open the Test Device after processing. Opening the device after amplification may result in contamination of the test area with amplification product.
10. Any serious incident that has occurred in relation to the device should be reported to Meridian Bioscience, Inc., 3471 River Hills Drive, Cincinnati, Ohio 45244 USA or Technical Support Center 800.343.3858 and competent authority of the EU Member State in which the clinician and/or patient is established.
11. IMPORTANT: See SDS for additional safety and hazard information.

HAZARD AND PRECAUTIONARY STATEMENTS

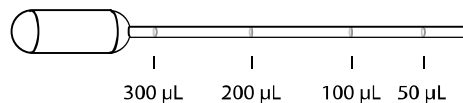
There are no known hazards associated with this product.

SHELF LIFE AND STORAGE

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

PROCEDURAL NOTES

The transfer pipette included in the Alethia HSV 1&2 kit is individually wrapped and capable of dispensing 50 µL. The pipette is diagrammed below.



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: Human cutaneous and mucocutaneous lesion swab samples in viral transport media. The following viral transport media are acceptable for use: MicroTest™ M4®, MicroTest™ M4RT®, MicroTest™ M6™, UniTranz-RT™ Transport System, Copan UTM™ Virus Collection, HealthLink® UTM or identical transport medium*, BD Universal Viral Transport Medium (UVT), ViraTrans™ VTM, Hardy Diagnostics VTM.

**HealthLink UTM is equivalent to Quest V-C-M Medium*

NOTE: Viral transport media with protein stabilizers, ie, MicroTest™ M5® and calcium alginate swabs, are not acceptable sample types for use.

Sample Collection: Cutaneous and mucocutaneous lesion sample collection should be performed in accordance with institutional guidelines for collection of clinical specimens for herpes simplex virus infection.

Place swab(s) in a viral transport medium. Samples should be stored refrigerated (2-8 C) after collection and during transportation to the laboratory. Samples should be tested as soon as possible, but may be stored refrigerated (2-8 C) up to 7 days prior to testing. Do not freeze samples. Do not store at room temperature.

SPECIMEN PREPARATION

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

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

1. Vortex the collected swab in transport medium for approximately 45-60 seconds.
2. Using a transfer pipette, transfer 50 µL of the swab medium into one Alethia SMP PREP III. Discard the transfer pipette. Label the SMP PREP with the specimen identification.
3. Replace SMP PREP III cap and vortex for approximately 10 seconds.
4. Remove the tip cap from the SMP PREP III and squeeze the entire contents of the SMP PREP III into a Heat Treatment Tube. Label the tube with the specimen identification.
5. Repeat SPECIMEN PREPARATION steps for all samples to be processed. Processed samples may be held up to 2 hours at room temperature (19-30 C) prior to heat treatment.
6. Heat each Heat Treatment Tube containing sample in a dry-bath/heat block at 95 ± 5 C for 10 ± 2 minutes. Monitor heat-treatment step with digital thermometer and interval timer.
7. Remove each Heat Treatment Tube from the dry-bath/heat block. Heat-treated samples may be held at room temperature (19-30 C) for up to 15 minutes prior to testing.

NOTE: The amount of sample prepared at the end of SPECIMEN PREPARATION is enough to complete both Alethia HSV 1 and HSV 2 testing.

TEST PROCEDURE

NOTE: A maximum of 5 samples can be processed for both HSV 1 and HSV 2 in a single Alethia reader run. **HSV 2 Test Devices are identified by an orange band on the Test Device closure tab.**

1. Vortex heat-treated samples for approximately 10 seconds.
2. Use 1 Alethia HSV 1 Test Device and 1 Alethia HSV 2 Test Device per sample. Remove the devices from their protective pouches. Carefully open the device by lifting the latch, holding the chambers such that the lyophilized reagents will not fall out upon opening. Place devices on a flat surface or in a rack that can accommodate the devices.
3. 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 HSV 1 Test Device and the HSV 2 Test Device. Take care to not introduce air to the reaction mixtures. Do not mix reactions with pipette.
4. Add 1 drop of Mineral Oil to both the TEST and CONTROL chambers of the Alethia HSV 1 and HSV 2 Test Devices. Close the Alethia Test Devices and fasten the latches securely.
5. Tap each device on the bench top or mix to remove air bubbles. Carefully examine each Test Device for rehydration of the Control/Test Beads, for air bubbles left in the chamber and liquid in the top of the device. If undissolved beads, air bubbles or liquid in the top of the device are noted, tap the device on the bench top and repeat visual inspection. Amplification and detection should be initiated within 15 minutes.
6. Repeat TEST PROCEDURE steps for all samples to be tested.
7. Insert the Alethia Test Devices into the Alethia reader and initiate run. Results will be displayed at the conclusion of the run.

INTERPRETATION OF RESULTS

Sample ID	Reported Result	Interpretation
Patient Specimen	POSITIVE	HSV 1 TEST DEVICE: Sample contains HSV-1 target DNA. HSV 2 TEST DEVICE: Sample contains HSV-2 target DNA.
	NEGATIVE	HSV 1 TEST DEVICE: No HSV-1 target DNA detected. HSV 2 TEST DEVICE: No HSV-2 target DNA detected.
	INVALID	No reportable result. Repeat the test using the original sample. Inhibitory patient specimen, improper sample preparation, reagent failure, instrument failure or internal control failure.
Positive Control	POSITIVE	Valid positive control result. Reagents active at time of use, Alethia reader performing correctly.
	NEGATIVE	Incorrect control result. Repeat the control tests as the first step in determining the root cause of the failure. If control failures are repeated please contact Meridian's Technical Services Department at 1-800-343-3858 (US) or your local distributor.
	INVALID	No reportable result. Repeat the control tests as the first step in determining the root cause of the failure. If control failures are repeated please contact Meridian's Technical Services Department at 1-800-343-3858 (US) or your local distributor. 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 reader performing correctly.
	INVALID	No reportable result. Repeat the control tests as the first step in determining the root cause of the failure. If control failures are repeated please contact Meridian's Technical Services Department at 1-800-343-3858 (US) or your local distributor. Improper sample preparation, reagent failure, instrument failure or internal control failure.
EMPTY WELL	NONE	No Alethia Test Device in the Alethia reader Well. OR The Alethia Test Device present is compromised due to sample preparation failure, dirty device or improperly seated device. Repeat the test using original sample.

QUALITY CONTROL

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

1. Each device contains an internal control that controls for amplification inhibition, assay reagents and sample processing effectiveness. Internal control DNA is present in the SMP PREP III and is processed through all steps of the procedure. Primers for amplification of internal control DNA are present in the Control Chamber of the Alethia Test Device.
2. The heat treatment step is monitored with an external thermometer and interval timer. Use the max/min temperature memory of the thermometer to ensure that a temperature of 95 ± 5 C is maintained. Use the interval timer to ensure that heat-treatment duration is 10 ± 2 minutes.
3. Good laboratory practice recommends the use of control materials. Users should follow the appropriate federal, state and local guidelines concerning the running of external quality controls.
4. Alethia HSV 1&2 External Control Reagents are supplied separately (Catalog 479960). It is recommended that the reactivity of each new lot and each new shipment of Alethia HSV 1&2 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 HSV 1&2 test kit should not be used in patient testing if the external controls do not produce the correct results.
5. A separate Test Device must be used for each external control reagent.

EXPECTED VALUES

The prevalence of HSV-1 and HSV-2 was calculated during 2014-2015 clinical studies based on the age of patient and by lesion anatomical location. The overall incidence during the study was 20.5% (237/1155) for HSV-1 and 19.4% (224/1156) for HSV-2. Specific prevalence data is given below.

Combined Study - Cutaneous Prevalence by Sample Anatomical Location (N=306)						
Source	HSV 1			HSV 2		
	Total #	Total Positive	Prevalence	Total #	Total Positive	Prevalence
Genital – Penis	92	7	7.6%	92	28	30.4%
Skin Lesion	214	47	22.0%	214	27	12.6%
Combined Study - Mucocutaneous Prevalence by Sample Anatomical Location						
Source	HSV-1 (N=849)			HSV-2 (N=850)		
	Total #	Total Positive	Prevalence	Total #	Total Positive	Prevalence
Anorectal	47 (1*)	7	14.9%	46 (2*)	9	19.6%
Genital -- Vaginal/Cervical	624 (2*)	112	17.9%	626	158	25.2%
Nasal	18	9	50.0%	18	0	0.0%
Ocular	20	0	0.0%	20	0	0.0%
Oral Lesion	135	54	40.0%	135	2	1.5%
Urethral	5	1	20.0%	5	0	0.0%

* Number of samples producing invalid Alethia result, which could not be resolved and therefore, were excluded from the analysis.

Combined Study - Cutaneous Prevalence by Age						
Age	HSV-1 (N=306)			HSV-2 (N=306)		
	Total #	Total Positive	Prevalence	Total #	Total Positive	Prevalence
≤ 5 years	38	12	31.6%	38	1	2.6%
6 to 11 years	14	7	50.0%	14	1	7.1%
12 to 21 years	51	14	27.5%	51	4	7.8%
22 to 59 years	166	18	10.8%	166	36	21.7%
≥ 60 years	37	3	8.1%	37	13	35.1%
Not Provided	0	0	0.0%	0	0	0.0%
Combined Study - Mucocutaneous Prevalence by Age						
Age	HSV-1 (N=849)			HSV-2 (N=850)		
	Total #	Total Positive	Prevalence	Total #	Total Positive	Prevalence
≤ 5 years	47	8	17.0%	47	0	0.0%
6 to 11 years	12	0	0.0%	12	0	0.0%
12 to 21 years	174 (1*)	46	26.4%	175	42	24.0%
22 to 59 years	550 (1*)	111	20.2%	551	116	21.1%
≥ 60 years	63 (1*)	18	28.6%	63 (1*)	11	17.5%
Not Provided	3	0	0.0%	2 (1*)	0	0.0%

* Number of samples producing invalid Alethia result, which could not be resolved and therefore, were excluded from the analysis.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

1. Performance of Alethia HSV 1&2 has been established with prospective, male and female cutaneous and mucocutaneous lesion specimens only. Performance with other specimen types (frozen specimens or CSF) has not been established.
2. The assay is not intended to be used for prenatal screening.
3. Medications containing the active ingredient Zincum Gluconicum produced invalid results when tested at 7% v/v with Alethia HSV 1&2. Lower concentrations were not tested. The effect of Zincum Gluconicum on Alethia HSV 1&2 results have not been determined using clinical specimens.
4. Casein at concentrations greater than 5 mg/mL was found to interfere with the Alethia HSV 1&2 assay.
5. Due to confirmed unacceptable results, refrigerated storage (2-8 C) will not be considered an acceptable storage condition for SMP PREP III processed specimens to be tested with the Alethia HSV 1&2 DNA Amplification Assay.
6. Negative results do not preclude infection and should not be used as the sole basis for treatment or other patient management decisions. This product can only be used with the Alethia instrument.
7. Alethia HSV 1&2 is a qualitative assay and does not provide quantitative values or information about organism load.
8. The detection of nucleic acids is dependent upon proper specimen collection, handling, transportation, storage and preparation. Failure to observe proper procedure in any one of these steps can lead to incorrect results.
9. Organism nucleic acid may persist *in vivo*, independent of organism viability. The Alethia HSV 1&2 does not distinguish between viable and nonviable organisms.
10. As with all molecular based diagnostic tests, (A) False-negative results may occur from the presence of inhibitors, mutations or polymorphisms in the HSV target region, technical error, sample mix-up or low numbers of organisms in the clinical specimen; (B) False-positive results may occur from the presence of crosscontamination by target organisms, their nucleic acids or amplified product, and from nonspecific signals.

SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The performance characteristics of the Alethia HSV 1&2 DNA Amplification Assay were established in clinical studies conducted between October 2014 and March 2015 at seven independent clinical test sites representing four geographically distinct regions throughout the United States. Performance characteristics of the assay were compared to the reference method ELVIS® HSV ID and D³ Typing Test System.

Samples included fresh cutaneous and mucocutaneous lesion swab specimens from patients suspected of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) or type 2 (HSV-2) infection. Samples classified as cutaneous included skin and genital – penis lesions. Samples categorized as mucocutaneous included anorectal, genital-vaginal/cervical, nasal, ocular, oral, and urethral sites.

A total of 1158 eligible leftover, deidentified lesion swab specimens from symptomatic male and female patients were evaluated. Samples were collected from patients ranging in age from 1 day to 89 years. From the 1158 eligible samples, 1156 samples gave valid ELVIS results. The ELVIS HSV ID and D³ Typing Test System is unable to detect HSV-1 if HSV-2 has been identified first in coinfected specimens. Therefore, if a specimen was HSV-2 positive by ELVIS it was removed from the calculation of the HSV-1 performance analysis. One hundred and eighty-one (181) specimens were identified as HSV-2 positive by ELVIS and were removed from the HSV-1 performance analysis. In addition, one sample tested by the Alethia HSV 1&2 DNA Amplification Assay for HSV-1 gave an initially invalid result and could not be re-tested; this sample was excluded from the HSV-1 performance analysis. Thus, a total of 974 specimen results were included in the performance analysis for HSV-1. From the 1156 samples that gave valid ELVIS results, one sample tested by the Alethia HSV 1&2 DNA Amplification Assay for HSV-2 gave an initially invalid result and could not be re-tested; this sample was excluded from the HSV-2 performance analysis. Thus, a total of 1155 specimen results were included in the performance analysis for HSV-2. The tables summarize the performance of the Alethia HSV 1&2 DNA Amplification Assay for all sites combined.

A total of 723 (74.3%) female and 247 (25.3%) male specimens were tested for HSV-1 and a total of 873 (75.6%) female and 277 (24.0%) male specimens were tested for HSV-2. There were four (4) specimens tested for HSV-1 (0.4%) and five (5) tested for HSV-2 samples with unknown gender (0.4%). There is no expectation that assay performance is influenced by gender.

Combined Sites: HSV-1 Cutaneous (N=264)

		Reference Method			Alethia	Performance			
		Pos	Neg	Total					95% CI
Alethia HSV 1&2	Pos	48	6 ^a	54	0 (0)	Sensitivity	48/51	94.1%	84.1-98.0%
	Neg	3 ^b	207	210	0 (0)	Specificity	207/213	97.2%	94.0-98.7%
	Total	51	213	264	0 (0)				

^a 6/6 samples identified as HSV-1 positive by an alternative, FDA-cleared molecular assay.

^b 1/3 samples identified as HSV-1 negative by an alternative, FDA-cleared molecular assay.

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

Combined Sites: HSV-1 Mucocutaneous (N=710)

		Reference Method			Alethia	Performance			
		Pos	Neg	Total					95% CI
Alethia HSV 1&2	Pos	152	28 ^b	180	0 (1)	Sensitivity	152/160	95.0%	90.5-97.5%
	Neg	8 ^c	522	530	0 (5)	Specificity	522/550	94.9%	92.7-96.5%
	Total	160	550	710	0 (6) ^a				

^a There were six initial INV samples by Alethia. Five repeated as Alethia negative (ELVIS negative); one repeated as Alethia HSV 1 positive (ELVIS HSV 1 positive).

^b 19/28 samples identified as HSV-1 positive by an alternative, FDA-cleared molecular assay; 3 samples could not be tested.

^c 7/8 samples were identified as HSV-1 negative by an alternative, FDA-cleared molecular assay; 1 sample could not be tested.

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

Combined Sites: HSV-2 Cutaneous (N=306)

		Reference Method			Alethia	Performance			
		Pos	Neg	Total					95% CI
Alethia HSV 1&2	Pos	42	13 ^b	55	0 (0)	Sensitivity	42/42	100%	91.6-100.0%
	Neg	0	251	251	0 (1)	Specificity	251/264	95.1%	91.8-97.1%
	Total	42	264	306	0 (1) ^a				

^a There was one initial INV sample by Alethia. The sample repeated as Alethia negative (ELVIS negative).

^b 8/13 samples were identified as HSV-2 positive by an alternative, FDA-cleared molecular assay; 1 sample could not be tested.

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

Combined Sites: HSV-2 Mucocutaneous (N=849)

		Reference Method			Alethia	Performance			
		Pos	Neg	Total					95% CI
Alethia HSV 1&2	Pos	137	31 ^b	168	0 (0)	Sensitivity	137/139	98.6%	94.9-99.6%
	Neg	2 ^c	679	681	0 (1)	Specificity	679/710	95.6%	93.9-96.9%
	Total	139	710	849	0 (1) ^a				

^a There was one initial INV sample by Alethia. The sample repeated as Alethia negative (ELVIS negative).

^b 24/31 samples were identified as HSV-2 positive by an alternative, FDA-cleared molecular assay; 4 samples could not be tested.

^c 1/2 samples were identified as HSV-2 negative by an alternative, FDA-cleared molecular assay.

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

ANALYTICAL SENSITIVITY

Analytical sensitivity or Limit of Detection (LoD) was determined using two strains each of HSV-1 and HSV-2. The LoD was confirmed using 60 replicates and a stated probability (eg, 95%, where 57/60 replicates are positive) of obtaining positive responses.

HSV Strain	LoD (TCID ₅₀ /mL)
HSV-1 HF (VR-260)	7.20×10^3
HSV-1 McIntyre (VR-539)	9.89×10^4
HSV-2 G (VR-734)	1.20×10^3
HSV-2 MS (VR-540)	1.60×10^3

The final assigned assay LoD is 9.89×10^4 TCID₅₀/mL for HSV-1 and 1.60×10^3 TCID₅₀/mL for HSV-2.

In addition, twenty (20) HSV-1 and twenty (20) HSV-2 clinical samples from a variety of anatomical locations (ie, oral, genital, anorectal, etc.) were evaluated at the assay LoD for HSV-1 (9.89×10^4 TCID₅₀/mL) and HSV-2 (1.60×10^3 TCID₅₀/mL). All clinical samples were detected by the Alethia HSV 1&2 assay at LoD, or lower, except one HSV-1 sample, which was detected at 7.20×10^7 TCID₅₀/mL.

REPRODUCIBILITY

Reproducibility studies were carried out by three of the seven participating Clinical Sites. Blind-coded panels of eighteen (18) samples were supplied to participating laboratories. Samples were randomly sorted within each panel to mask sample identities. The panels included contrived HSV-1 (strain HF) and HSV-2 (strain MS) samples manufactured as moderate positive samples (HSV-1: 2.16×10^4 TCID₅₀/mL or HSV-2: 4.80×10^3 TCID₅₀/mL), low positive samples (HSV-1: 1.08×10^4 TCID₅₀/mL or HSV-2: 2.40×10^3 TCID₅₀/mL), or two HSV-contrived negative samples (HSV-1 near cut-off: 308 TCID₅₀/mL, HSV-1 high negative: 29.7 TCID₅₀/mL; HSV-2 near cut-off: 24 TCID₅₀/mL, HSV-2 high negative: 2.2 TCID₅₀/mL). The panel also included two HSV-1 and HSV-2 negative samples and a Positive and Negative Control. Testing was performed by different operators at each site on the same day (intra-assay variability) for five days (inter-assay variability). Three lots of Alethia HSV 1&2 and five Alethia instruments were used in this study. Positive and Negative Controls were tested with each panel. The results are provided in the table below:

Reproducibility Study Summary for HSV-1								
Sample Type	Site 1		Site 2		Site 3		Total	
	Percent Agreement		Percent Agreement		Percent Agreement		Percent Agreement	
HSV-1 Moderate Positive	30/30	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90	100.0%
HSV-1 Low Positive	30/30	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90	100.0%
HSV-1 & HSV-2 Near Cut-Off	20/30	66.7%	26/30	86.7%	20/30	66.7%	66/90	73.3%
HSV-1 & HSV-2 High Negative	29/30	96.7%	30/30	100.0%	29/30	96.7%	88/90	97.8%
HSV-1 Negative	60/60	100.0%	60/60	100.0%	60/60	100.0%	180/180	100.0%
Negative Control	10/10	100.0%	10/10	100.0%	10/10	100.0%	30/30	100.0%
Positive Control	10/10	100.0%	10/10	100.0%	10/10	100.0%	30/30	100.0%

Reproducibility Study Summary for HSV-2								
Sample Type	Site 1		Site 2		Site 3		Total	
	Percent Agreement		Percent Agreement		Percent Agreement		Percent Agreement	
HSV-2 Moderate Positive	30/30	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90	100.0%
HSV-2 Low Positive	30/30	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90	100.0%
HSV-1 & HSV-2 Near Cut-Off	25/30	83.3%	29/30	96.7%	25/30	83.3%	79/90	87.8%
HSV-1 & HSV-2 High Negative	29/30	96.7%	30/30	100.0%	29/30	96.7%	88/90	97.8%
HSV-2 Negative	60/60	100.0%	60/60	100.0%	60/60	100.0%	180/180	100.0%
Negative Control	10/10	100.0%	10/10	100.0%	10/10	100.0%	30/30	100.0%
Positive Control	10/10	100.0%	10/10	100.0%	10/10	100.0%	30/30	100.0%

CROSSREACTIVITY STUDIES

Crossreactivity studies employed positive (HSV-1 strain HF and HSV-2 strain MS) and negative specimens inoculated with bacterial or fungal organisms to a minimum concentration of 1.0×10^6 CFU/mL (1.0×10^6 copies/mL where genomic DNA was used) or virus at a minimum of 1.0×10^5 TCID₅₀/mL (1.0×10^6 copies/mL where genomic DNA or RNA was used). None of the following organisms or their genetic material reacted with Alethia HSV 1&2:

Acinetobacter calcoaceticus, *Acinetobacter lwoffii*, *Bacteroides fragilis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella pertussis*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida lusitanae*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydomydia pneumoniae*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* (ESBL), *Fusobacterium nucleatum*, *Gardnerella vaginalis*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae* (Type A), *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus acidophilus*, *Legionella pneumophila*, *Mobiluncus curtisii*, *Mobiluncus mulieris*, *Moraxella catarrhalis*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma orale*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma salivarium*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Prevotella melaninogenica*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus salivarius*, *Toxoplasma gondii*, *Treponema palladium*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, Adenovirus, Coronavirus, Cocksackievirus, Cytomegalovirus, Echovirus, Enterovirus, Epstein Barr virus, Influenza A virus, Influenza B virus, Hepatitis B virus, Hepatitis C virus, Human herpes 6 virus, Human herpes 7 virus, Human herpes 8 virus, Human immunodeficiency virus type 1, Human metapneumovirus, Human papilloma virus, Measles virus, Mumps virus, Parainfluenza virus, Respiratory syncytial virus, Rubella virus, Varicella zoster virus.

Human genomic DNA was nonreactive at 1.0×10^6 copies/mL. In addition, there was no competitive inhibition observed between the organisms listed above and with HSV-1 or HSV-2 in the Alethia HSV 1&2 assay.

TESTS FOR INTERFERING SUBSTANCES

Interference testing was performed in the presence of worst-case concentrations of chemical and biological substances introduced directly into contrived positive (HSV-1 strains: McIntyre and HF; HSV-2 strains: G and MS) and negative samples. No interference was observed with the following substances:

- (1) At concentrations of 7% w/v or v/v: Abreva® (10% Docosanol), Balneol® Hygienic Cleansing Lotion, Carmex® Original Lip Balm (1.7% camphor, 0.7% menthol), Desitin® (40% zinc oxide), Douche (CVS Pharmacy® Disposable), Fluoride toothpaste (Crest®, 0.243% sodium fluoride), K-Y® Brand Jelly, Lanacane® (0.2% benzethonium chloride, 20% benzocaine), Lip Clear® Lysine+® (1.2% zinc oxide), Miconazole 3 (CVS™ Yeast Infection Relief: 2% miconazole nitrate), Mouthwash (Listerine® Original: 0.092% eucalyptol, 0.042% menthol, 0.060% methyl salicylate, 0.064% thymol), Preparation H® Hemorrhoidal Ointment (14% mineral oil, 74.9% petrolatum, 0.25% phenylephrine HCl), Releev® (0.13% benzalkonium chloride), Tioconazole, Vagisil® Regular Strength (5% benzocaine, 2% resorcinol), Yeast Guard® Gel Treatment (Candida albicans, 27X HPUS; Candida parapsilosis, 27X HPUS; Pulsatilla, 27X HPUS), Feces, Seminal fluid, Urine, Whole blood, Buffy coat.
- (2) At concentrations of: 60 µg/mL – Mucus (Mucin, bovine submaxillary gland type I-S); 1.25 mg/mL – Cornstarch; 3.3 mg/mL – Albumin; 5 mg/mL – Acetaminophen, Casein, Chlorpheniramine maleate; 7 mg/mL – Acyclovir; 10 mg/mL – Acetylsalicylic acid, Dextromethorphan hydrobromide.

Casein at concentrations greater than 5 mg/mL was found to interfere with the assay.

Cold-EEZE® Cold Remedy plus Sore Throat (zincum gluconicum 2X) was tested at 7% v/v and produced invalid results in all replicates.



**Test di amplificazione del DNA per il rilevamento del virus
Herpes Simplex tipo 1 e del virus Herpes Simplex tipo 2**

REF 480650

IVD

R_x Only

FINALITÀ D'USO

Il test di amplificazione del DNA, Alethia HSV 1&2, eseguito sul lettore Alethia, è un test diagnostico in vitro qualitativo per il rilevamento diretto e la differenziazione del virus Herpes simplex tipo 1 (HSV-1) e del virus Herpes simplex tipo 2 (HSV-2) in campioni raccolti da lesioni cutanee e muco-cutanee, di pazienti maschi e femmine, in cui si sospetta un'infezione erpetica.

Il test Alethia HSV 1&2 utilizza la tecnologia LAMP (amplificazione isoterma del DNA loop mediata) per rilevare HSV-1 e HSV-2 utilizzando come target i genomi del virus Herpes simplex tipo 1 e del virus Herpes simplex tipo 2. I risultati del test Alethia HSV 1&2 sono da utilizzarsi come ausilio nella diagnosi dell'infezione da HSV in pazienti sintomatici.

Questo test è destinato all'uso nei laboratori ospedalieri, statali o di riferimento. Il dispositivo non è destinato all'uso presso punti di assistenza sanitaria diversi dai laboratori.

AVVERTENZA: Il test Alethia HSV 1&2 non è FDA-cleared per l'uso con il liquido cerebrospinale (CSF) o come ausilio nella diagnosi delle infezioni da HSV del sistema nervoso centrale (SNC). Il dispositivo non deve essere utilizzato per lo screening prenatale.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

Il test Alethia HSV 1&2 è basato sulla tecnologia LAMP (amplificazione isoterma loop mediata).^{1,2} Il test identifica singolarmente le regioni dei genomi HSV-1 e HSV-2 in due distinti dispositivi del test. Il target HSV-1 è una sequenza di 208 paia di basi (bp) del gene della glicoproteina G (US4) di HSV-1. Il target HSV-2 è una sequenza di 189 paia di basi (bp) del gene della glicoproteina G (US4) di HSV-2.

L'amplificazione loop mediata utilizza primer specificamente disegnati per ottenere la specifica e continua amplificazione isoterma del DNA. Un sottoprodotto del processo di amplificazione è il magnesio pirofosfato, che forma un precipitato bianco che rende torbida la soluzione di reazione. Le caratteristiche di assorbanza della soluzione di reazione vengono lette dallo strumento Meridian, l'Incubatore/Lettore Alethia. I cambiamenti nelle caratteristiche di assorbanza della soluzione di reazione creata dalla precipitazione del magnesio pirofosfato indicano la presenza del DNA bersaglio. L'assenza di DNA bersaglio non determina un cambiamento significativo nell'assorbanza del campione.

Il kit Alethia HSV 1&2 include gli apparati di preparazione dei campioni III Alethia (SMP PREP III), i dispositivi Test Alethia HSV 1, i dispositivi Test Alethia HSV 2, olio minerale, provette per trattamento termico e pipette di trasferimento da 50 µL. L'apparato Alethia SMP PREP III, utilizzato per la diluizione e la preparazione dei campioni, include una soluzione tampone TRIS contenente DNA di *Staphylococcus aureus* in *E. coli* trattato con formalina. Il Dispositivo Test Alethia HSV 1 contiene un granulo di reagente di amplificazione liofilizzato in ognuna delle due camere: una camera TEST con primer specifici per HSV 1 e una camera CONTROLLO con primer specifici per *S. aureus*. Il dispositivo Test Alethia HSV 2 contiene un granulo di reagente di amplificazione liofilizzato in ognuna delle due camere: una camera TEST con primer specifici per HSV 2 e una camera CONTROLLO con primer specifici per *S. aureus*. Il DNA di *S. aureus* nell'Apparato di preparazione dei campioni SMP PREP III e i primer specifici per *S. aureus* presenti nelle camere CONTROLLO dei dispositivi Test fungono da controllo interno del test. Durante la preparazione dei campioni, ciascun campione del paziente viene aggiunto all'Apparato di preparazione dei campioni SMP PREP III che contiene il controllo del test e viene combinato con il DNA di *S. aureus* prima dell'amplificazione. L'aggiunta del DNA di *S. aureus* al campione del paziente consente l'elaborazione parallela del DNA bersaglio e del DNA di controllo mediante amplificazione e rilevamento. Il controllo interno monitora l'inibizione dell'amplificazione, la prestazione del reagente del test e l'efficacia del processamento del campione. La sequenza target di controllo di *S. aureus* deve essere amplificato e rilevato nella reazione finale, altrimenti il test è considerato non valido e i risultati non vengono refertati.

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

I valori stabiliti di cut-off per la camera TEST sono utilizzati per refertare i risultati 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 sono riportati.*

I valori stabiliti di cut-off per la camera CONTROLLO sono 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 (POSITIVO, NEGATIVO). 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 provetta CONTROLLO non valide sono riportate come "NON VALIDE". *I valori numerici non sono riportati.*

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

PRINCIPI BIOLOGICI

Il virus Herpes simplex causa infezioni croniche, ricorrenti e meningite virale in adulti e bambini. L'infezione da virus Herpes simplex tipo 1 (HSV-1) è relativamente diffusa, con una sieroprevalenza complessiva vicina al 54% nella popolazione degli Stati Uniti.³ Il virus Herpes simplex tipo 2 (HSV-2) è la causa principale dell'herpes genitale. Si stima che 50 milioni di persone negli Stati Uniti e oltre 400 milioni di persone in tutto il mondo siano affette da herpes genitale HSV-2, ovvero circa 1 persona su 5.^{4,5} Sebbene tanto HSV-1 quanto HSV-2 siano in grado di provocare infezioni orali o genitali, solitamente HSV-1 è associato alle lesioni orali e HSV-2 a quelle genitali. Tuttavia, la frequenza dell'infezione genitale da HSV-1 è in aumento.^{3,6} È possibile che HSV venga trasmesso ai neonati durante il parto, provocando sintomi che vanno dalla patologia diffusa (SNC e organi interni) all'infezione di pelle, occhi e bocca.⁷

È possibile diagnosticare l'infezione da HSV utilizzando il microscopio, la coltura cellulare e i metodi molecolari e sierologici.⁸ La coltura cellulare e PCR sono i metodi preferenziali consigliati dai Centri per il controllo delle malattie.⁴ La sensibilità della coltura virale è bassa, soprattutto nelle lesioni ricorrenti o in fase di guarigione, a causa della quantità ridotta di virus vitale.⁴ Non è possibile determinare il tipo di HSV direttamente con la coltura virale, e si rende quindi necessario l'impiego di metodi di tipizzazione aggiuntivi (quali ELVIS).⁸ I metodi NAAT sono più sensibili rispetto alla coltura, sono in grado di distinguere tra tipi di HSV e forniscono risultati più rapidi.⁸

REAGENTI/MATERIALI FORNITI

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

1. **Apparato di preparazione dei campioni III (SMP PREP III) Alethia (articolo #2792-02):** soluzione di tampone Tris contenente DNA di *S. aureus* in *E. coli* trattato con formalina e sodio azide (0,09%) come conservante.
2. **Dispositivo Test Alethia HSV 1 (articolo 2865):** dispositivo a due camere contenente i reagenti di amplificazione liofilizzati (DNA polimerasi, deossinucleotidi trifosfati) e i primer specifici per HSV-1 (camera TEST) o i primer specifici per *S. aureus* (camera CONTROLLO).
3. **Dispositivo Test Alethia HSV 2 (articolo 2870):** dispositivo a due camere contenente i reagenti di amplificazione liofilizzati (DNA polimerasi, deossinucleotidi trifosfati) e i primer specifici per HSV- 2 (camera TEST) o i primer specifici per *S. aureus* (camera CONTROLLO). **È possibile identificare visivamente il dispositivo Test Alethia HSV 2 mediante la fascia arancione presente sull'etichetta di chiusura del dispositivo Test.**
4. **Olio minerale (articolo 14298-01)** (flacone con puntale contagocce)
5. **Provette per trattamento termico Alethia (articolo 2335)**
6. **Pipette di trasferimento (articolo 11523A)**

MATERIALI FORNITI SEPARATAMENTE

Kit di controllo esterno Alethia HSV 1&2, numero di catalogo: 479960

MATERIAL NON FORNITI

1. Guanti in lattice monouso, senza talco
2. Puntali per pipetta privi di DNase/RNase e resistenti alla contaminazione da aerosol
3. Terreno di Trasporto per Virus (2-3 mL): MicroTest™ M4®, MicroTest™ M4RT®, MicroTest™ M6™, sistema di trasporto UniTranz-RT™, sistema di raccolta virus Copan UTM™, terreno di trasporto universale HealthLink® o terreno di trasporto analogo*, terreno di trasporto virale universale (UVT) BD, terreno di trasporto virale ViraTrans™ VTM, terreno di trasporto virale Hardy Diagnostics.
**Il terreno di trasporto universale HealthLink è equivalente a Quest V-C-M Medium.*

STRUMENTI NON FORNITI

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

PRECAUZIONI

1. Tutti i reagenti sono esclusivamente per uso diagnostico in vitro.
2. I terreni di trasporto virali che contengono stabilizzatori delle proteine, quali MicroTest™ M5® e tamponi a base di alginato di calcio, non sono idonei alla raccolta e al trasporto dei campioni per il test Alethia HSV 1&2.
3. Non scambiare gli apparati di preparazione dei campioni o i dispositivi Test tra lotti diversi. L'olio minerale e le provette per il trattamento termico sono intercambiabili, a patto che non siano ancora scaduti quando vengono utilizzati.
4. Seguire il livello di biosicurezza 2 e le buone pratiche di laboratorio durante l'esecuzione dei test.⁹ Trattare tutti i campioni e i dispositivi di analisi usati come capaci di trasmettere agenti infettivi. Non mangiare, bere o fumare in aree in cui vengono manipolati i campioni o i reagenti del kit.
5. Indossare guanti monouso per la manipolazione dei campioni e subito dopo lavarsi a fondo le mani.
6. Applicare i programmi di controllo qualità per i laboratori di analisi molecolari che comprendano impiego e manutenzione adeguati dell'apparecchiatura.¹⁰
7. Il dispositivo Test Alethia HSV 1&2 contiene reagenti liofilizzati. Le buste protettive non devono essere aperte fino a quando non si è pronti a eseguire il test.
8. I dispositivi Test Alethia HSV 1&2 comprendono un sistema di chiusura ideato per prevenire la contaminazione dell'area di lavoro con il prodotto di amplificazione. NON utilizzare dispositivi Test con linguette di chiusura rotte.
9. Smaltire i dispositivi Test Alethia HSV 1&2 subito dopo l'uso, lasciando chiusa la linguetta del dispositivo. NON aprire il dispositivo Test dopo l'uso. L'apertura del dispositivo dopo l'amplificazione potrebbe comportare la contaminazione dell'area di lavoro con il prodotto di amplificazione.
10. Qualsiasi incidente grave verificatosi in relazione al dispositivo deve essere segnalato a Meridian Bioscience, Inc., 3471 River Hills Drive, Cincinnati, Ohio 45244 USA o al Centro di assistenza tecnica al numero 1-800-343-3858 e all'autorità competente dello Stato membro dell'UE in cui si trovano il medico e/o il paziente.
11. **IMPORTANTE:** per ulteriori informazioni sulla sicurezza e sui pericoli, consultare la SDS.

DICHIARAZIONI DI PERICOLO E PRUDENZA

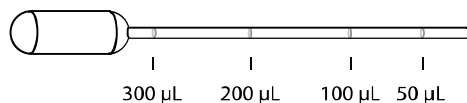
Per le nostre attuali conoscenze, non ci sono rischi associati a questo prodotto.

STABILITÀ E CONSERVAZIONE

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

NOTE PROCEDURALI

La pipetta di trasferimento inclusa nel kit Alethia HSV 1&2 è confezionata singolarmente ed è in grado di dispensare 50 µL. La pipetta è illustrata nel disegno sottostante.



PREPARAZIONE DEI REAGENTI

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

RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Tipo di campione: tamponi raccolti da lesioni umane cutanee e mucocutanee in terreni di trasporto virali. Sono idonei all'uso i seguenti mezzi di trasporto virali: MicroTest™ M4®, MicroTest™ M4RT®, MicroTest™ M6™, sistema di trasporto UniTranz-RT™, sistema di raccolta virus Copan UTM™, terreno di trasporto universale HealthLink® o terreno di trasporto analogo*, sistema di trasporto virale universale (UVT) BD, terreno di trasporto virale ViraTrans™ VTM, terreno di trasporto virale Hardy Diagnostics.
**Il terreno di trasporto universale HealthLink è equivalente a Quest V-C-M Medium.*

NOTA: i terreni di trasporto virali contenenti stabilizzatori delle proteine, ovvero, MicroTest™ M5® e tamponi a base di alginato di calcio, non sono tipi di campioni idonei all'uso.

Raccolta del campione: è opportuno eseguire la raccolta di campioni di lesioni cutanee e mucocutanee in conformità alle linee guida istituzionali relative alla raccolta di campioni clinici per infezione da virus herpes simplex.

Posizionare il(i) tampone(i) in un terreno di trasporto virale. In seguito alla raccolta e durante il trasporto in laboratorio, è opportuno conservare i campioni in frigorifero (temperatura compresa tra 2 e 8 C). È necessario analizzare i campioni quanto prima, anche se è possibile conservarli in frigorifero (tra 2 e 8 C) per un massimo di 7 giorni prima di eseguire l'analisi. Non congelare i campioni. Non conservare a temperatura ambiente.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

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

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

1. Agitare il tampone raccolto nel terreno di trasporto per circa 45-60 secondi.
2. Utilizzando una pipetta di trasferimento, trasferire 50 µL del terreno di trasporto del tampone in un Apparato di prepreazione dei campioni Alethia SMP PREP III. Gettare la pipetta di trasferimento. Etichettare l'apparato SMP PREP con le informazioni identificative del campione.
3. Rimettere il cappuccio dell' apparato SMP PREP III e agitare su vortex per circa 10 secondi.
4. Rimuovere il tappo inferiore dell' apparato SMP PREP III e trasferire tutto il contenuto dell'apparato SMP PREP III in una provetta per il trattamento termico. Etichettare la provetta con le informazioni identificative del campione.
5. Ripetere i passaggi relativi alla PREPARAZIONE DEI CAMPIONI per tutti i campioni da analizzare. È possibile conservare i campioni analizzati per un massimo di 2 ore a temperatura ambiente (19-30 C) prima di procedere con il trattamento termico.
6. Riscaldare ciascuna provetta per il trattamento termico contenente il campione in un bagno a secco/blocco termostatico a 95 ± 5 C per 10 ± 2 minuti. Monitorare la fase del trattamento termico con il termometro digitale e il timer a intervalli.
7. Rimuovere ciascuna provetta per il trattamento termico dal bagno a secco/blocco termostatico. I campioni sottoposti a trattamento termico possono essere conservati a temperatura ambiente (19-30 C) per un massimo di 15 minuti prima di procedere con l'analisi.

NOTA: la quantità di campione preparata al termine della procedura di PREPARAZIONE DEI CAMPIONI è sufficiente per completare entrambi i test Alethia HSV 1 e HSV 2.

PROCEDURA DEL TEST

NOTA: è possibile processare un massimo di 5 campioni per ciascun test HSV 1 e HSV 2 in un singolo ciclo Alethia. **I dispositivi Test HSV 2 vengono identificati da una fascia arancione sull'etichetta di chiusura del dispositivo Test.**

1. Agitare con Vortex i campioni sottoposti a trattamento termico per circa 10 secondi.
2. Utilizzare un Dispositivo Test Alethia HSV 1 e un dispositivo Test Alethia HSV 2 per campione. Rimuovere i dispositivi dalle rispettive buste protettive. Aprire con attenzione il dispositivo sollevando il fermo, tenendo le camere in maniera tale che il reagente liofilizzato non fuoriesca all'apertura. Collocare i dispositivi su una superficie piana o su un portaprovette in grado di contenere i dispositivi.
3. Con una micropipetta, trasferire 50 µL di campione in entrambe le camere TEST (Sinistra/granulo bianco) e CONTROLLO (Destra/granulo giallo) dei Dispositivi Test Alethia HSV 1 e HSV 2. Non miscelare la soluzione di reazione con la pipetta. Fare attenzione a non introdurre aria nelle miscele di reazione.
4. Aggiungere 1 goccia di olio minerale in entrambe le camere TEST e CONTROLLO dei Dispositivi Test Alethia HSV 1 e HSV 2. Chiudere i Dispositivi Test Alethia assicurando bene le linguette di chiusura.
5. Picchiettare ciascun dispositivo sul bancone o agitarlo per rimuovere le bolle d'aria. Esaminare attentamente il Dispositivo Test per verificare la dissoluzione dei granuli di controllo/test e per escludere la presenza di bolle d'aria residue nella camera e di liquido nella parte superiore del dispositivo. Se si nota la presenza di granulo non disciolto, bolle d'aria o liquido nella parte superiore del dispositivo, picchiettare il dispositivo sul bancone e ripetere l'ispezione visiva. L'amplificazione e il rilevamento devono iniziare entro 15 minuti.
6. Ripetere i passaggi della PROCEDURA DEL TEST per tutti i campioni da analizzare.
7. Inserire i Dispositivi Test Alethia nel lettore Alethia e iniziare la corsa. I risultati saranno visualizzati alla conclusione del ciclo.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

ID campione	Risultato riportato	Interpretazione
Campione del paziente	POSITIVO	DISPOSITIVO TEST HSV 1: il campione contiene il DNA target di HSV-1. DISPOSITIVO TEST HSV 2: il campione contiene il DNA target di HSV-2.
	NEGATIVO	DISPOSITIVO TEST HSV 1: nessun DNA target di HSV-1 rilevato. DISPOSITIVO TEST HSV 2: nessun DNA target di HSV-2 rilevato.
	NON VALIDO	Nessun risultato refertabile. Ripetere il test utilizzando il campione originale del paziente. Campione del paziente con effetto inibitorio, preparazione del campione non corretta, deterioramento del reagente, guasto dello strumento o fallimento del controllo interno.
Controllo positivo	POSITIVO	Risultato del controllo positivo valido. Reagenti reattivi al momento dell'uso, il lettore Alethia correttamente funzionante.
	NEGATIVO	Risultato del controllo non corretto. Come prima opzione per identificare la causa del fallimento ripetere i test di controllo. Se il fallimento dei test di controllo dovesse ripetersi, contattare il Servizio di Assistenza tecnica Meridian (negli USA 001-800-343-3858) o il Distributore Locale, (Italia +390331433636).
	NON VALIDO	Nessun risultato refertabile. 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). Preparazione del campione non corretta, deterioramento del reagente, guasto dello strumento o fallimento del controllo interno.
Controllo negativo	POSITIVO	Risultato di controllo non corretto. Come prima opzione per identificare la causa del fallimento ripetere i test di controllo. Se il fallimento dei test di controllo dovesse ripetersi, contattare il Servizio di Assistenza tecnica Meridian (negli USA 001-800-343-3858) o il Distributore Locale, (Italia +390331433636).
	NEGATIVO	Risultato del controllo negativo valido. Reagenti reattivi al momento dell'uso, il lettore Alethia correttamente funzionante.
	NON VALIDO	Nessun risultato refertabile. 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). Preparazione del campione non corretta, deterioramento del reagente, guasto dello strumento o fallimento del controllo interno.
POZZETTO VUOTO	NESSUNO	Nessun Dispositivo Test Alethia nel pozzetto del lettore Alethia. OPPURE Il Dispositivo Test Alethia presente è compromesso a causa di un errore nella preparazione del campione, dispositivo sporco o dispositivo non propriamente alloggiato. Ripetere il test utilizzando il campione originale.

CONTROLLO QUALITÀ

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

1. Ogni dispositivo contiene un controllo interno che controlla l'inibizione dell'amplificazione, i reagenti di analisi e l'efficacia del trattamento del campione. Il DNA del controllo interno è presente nell'apparato SMP PREP III e viene elaborato attraverso tutte le fasi della procedura. I primer per l'amplificazione del DNA di controllo interno sono presenti nella camera di controllo del Dispositivo Test Alethia.
2. La fase del trattamento termico è monitorata con un termometro esterno e con un timer a intervalli. Utilizzare la registrazione della temperatura max/min del termometro per garantire il mantenimento di una temperatura di 95 ± 5 C. Utilizzare il timer a intervalli per garantire che la durata del trattamento termico sia di 10 ± 2 minuti.
3. La buona pratica di laboratorio raccomanda l'uso di materiali di controllo. Gli operatori devono attenersi alle pertinenti linee guida federali, statali e locali in merito all'utilizzo dei controlli di qualità esterni.
4. I reagenti di controllo esterni Alethia HSV 1&2 sono forniti separatamente (numero di catalogo: 479960). Si raccomanda di verificare la reattività di ciascun nuovo lotto e di ogni nuova spedizione di Alethia HSV 1&2 al momento della ricezione o prima dell'uso. I test di controllo esterno possono essere eseguiti successivamente, in conformità con le appropriate linee guida regionali, statali e locali. Il kit del test Alethia HSV 1&2 non va utilizzato per l'analisi dei pazienti se i controlli esterni non producono i risultati corretti.
5. Occorre utilizzare un singolo Dispositivo Test per ciascun reagente di controllo esterno.

VALORI ATTESI

La prevalenza di HSV-1 e HSV-2 è stata calcolata durante alcuni studi clinici condotti nel 2014-2015 in base all'età del paziente e a seconda della posizione anatomica della lesione. L'incidenza complessiva emersa dallo studio era del 20,5% (237/1155) per HSV-1 e del 19,4% (224/1156) per HSV-2. I dati specifici sulla prevalenza sono riportati di seguito.

Studio combinato - Prevalenza cutanea a seconda della localizzazione anatomica del campione (N=306)						
Origine	HSV 1			HSV 2		
	N. totale	Totale positivi	Prevalenza	N. totale	Totale positivi	Prevalenza
Area genitale (pene)	92	7	7,6%	92	28	30,4%
Lesione cutanea	214	47	22,0%	214	27	12,6%
Studio combinato - Prevalenza mucocutanea a seconda della localizzazione anatomica del campione						
Origine	HSV-1 (N=849)			HSV-2 B(N=850)		
	N. totale	Totale positivi	Prevalenza	N. totale	Totale positivi	Prevalenza
Area ano-rettale	47 (1*)	7	14,9%	46 (2*)	9	19,6%
Area genitale (vagina/cervice)	624 (2*)	112	17,9%	626	158	25,2%
Area nasale	18	9	50,0%	18	0	0,0%
Area oculare	20	0	0,0%	20	0	0,0%
Lesione orale	135	54	40,0%	135	2	1,5%
Area uretrale	5	1	20,0%	5	0	0,0%

* Numero di campioni che ha generato un risultato Alethia non valido, per i quali non è stato possibile un'ulteriore analisi per la risoluzione e per tale motivo sono stati esclusi dalla valutazione.

Studio combinato - Prevalenza cutanea a seconda dell'età (N=306)						
Età	HSV-1 (N=306)			HSV-2 (N=306)		
	N. totale	Totale Positivi	Prevalenza	N. totale	Totale Positivi	Prevalenza
≤ 5 anni	38	12	31.6%	38	1	2.6%
Da 6 a 11 anni	14	7	50.0%	14	1	7.1%
Da 12 a 21 anni	51	14	27.5%	51	4	7.8%
Da 22 a 59 anni	166	18	10.8%	166	36	21.7%
≥ 60 anni	37	3	8.1%	37	13	35.1%
Non indicata	0	0	0.0%	0	0	0.0%
Studio combinato - Prevalenza mucocutanea a seconda dell'età						
Età	HSV-1 (N=849)			HSV-2 (N=850)		
	N. totale	Totale Positivi	Prevalenza	N. totale	Totale Positivi	Prevalenza
≤ 5 anni	47	8	17.0%	47	0	0.0%
Da 6 a 11 anni	12	0	0.0%	12	0	0.0%
Da 12 a 21 anni	174 (1*)	46	26.4%	175	42	24.0%
Da 22 a 59 anni	550 (1*)	111	20.2%	551	116	21.1%
≥ 60 anni	63 (1*)	18	28.6%	63 (1*)	11	17.5%
Non indicata	3	0	0.0%	2 (1*)	0	0.0%

* Numero di campioni che ha generato un risultato Alethia non valido, per i quali non è stato possibile un'ulteriore analisi per la risoluzione e per tale motivo sono stati esclusi dalla valutazione.

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

- Le prestazioni del test Alethia HSV 1&2 sono state determinate esclusivamente con campioni prospettici raccolti da lesioni cutanee e mucocutanee maschili e femminili. Non sono state determinate le prestazioni con altri tipi di campioni (campioni congelati o CSF).
- Questo test non deve essere utilizzato per lo screening prenatale.
- I farmaci che contengono il gluconato di zinco come principio attivo hanno generato risultati non validi se analizzati al 7% volume/volume con il test Alethia HSV 1&2. È stata omessa l'analisi di concentrazioni più basse. L'effetto del gluconato di zinco sui risultati del test Alethia HSV 1&2 non è stato determinato utilizzando campioni clinici.
- A concentrazioni superiori a 5 mg/mL la caseina ha interferito con il test Alethia HSV 1&2.
- A causa di risultati non accettabili confermati, non è ammessa la conservazione refrigerata (2-8 C) del campione processato all'interno dell'apparato SMP PREP III e la sua successiva analisi con il test Alethia HSV 1 & 2.
- Un risultato negativo non esclude la presenza dell'infezione e non dovrebbe esser usato come unico riferimento per il trattamento o per altre decisioni inerenti la gestione del paziente. Questo prodotto può essere usato esclusivamente con lo strumento Alethia.
- Il test Alethia HSV 1&2 è un test qualitativo e non fornisce valori quantitativi né informazioni relative alla carica batterica dell'organismo.
- Il rilevamento degli acidi nucleici dipende dall'adeguatezza delle procedure di prelievo, manipolazione, trasporto, conservazione e preparazione dei campioni. Il mancato rispetto della procedura appropriata per ciascuna di queste fasi può portare a risultati errati.
- È possibile che l'acido nucleico degli organismi persista *in vivo* indipendentemente dalla vitalità degli organismi stessi. Il test Alethia HSV 1&2 non distingue tra organismi vitali e non vitali.
- Come per tutti i test diagnostici molecolari, (A) I risultati falsi negativi possono verificarsi in presenza di inibitori, mutazioni o polimorfismi nella regione target di HSV, errori tecnici, scambio di campioni o basso numero di organismi nel campione clinico, (B) i risultati falsi positivi possono verificarsi in presenza di contaminazione crociata da parte degli organismi bersaglio, dei rispettivi acidi nucleici o del prodotto di amplificazione, nonché da segnali aspecifici.

PRESTAZIONI SPECIFICHE

Le caratteristiche prestazionali del test di amplificazione del DNA Alethia HSV 1&2 sono state definite nel corso di studi clinici condotti tra ottobre 2014 e marzo 2015 presso sette laboratori indipendenti che rappresentano quattro distinte regioni geografiche degli Stati Uniti. Le caratteristiche prestazionali del test sono state confrontate con il sistema del test di tipizzazione di riferimento ELVIS® HSV ID e D³.

I campioni freschi includevano tamponi raccolti da lesioni cutanee e mucocutanee di pazienti con sospetta infezione da virus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) o tipo 2 (HSV-2). I campioni classificati come cutanei includevano lesioni della pelle e dei genitali – pene. I campioni classificati come mucocutanee sono stati raccolti nelle seguenti aree: ano-rettale, genitale (vagina/cervice), nasale, oculare, orale e uretrale.

In tutto, sono stati analizzati 1158 tamponi idonei, residui, anonimi, raccolti da lesioni di pazienti maschili e femminili sintomatici. I campioni sono stati raccolti da pazienti di età compresa tra 1 giorno e 89 anni. Dei 1158 campioni eleggibili, 1156 hanno fornito risultati validi con il test ELVIS. Il test ELVIS HSV ID e il D³ Typing Test non sono in grado di rilevare HSV-1 se HSV-2 è stato identificato per primo nei campioni in cui c'è co-infezione. Per tale ragione, se un campione è risultato positivo ad HSV-2 con il test ELVIS, esso è stato rimosso dal calcolo delle prestazioni del test HSV-1. Centottantuno (181) campioni sono stati identificati come positivi per HSV-2 dal metodo ELVIS e sono quindi stati rimossi dall'analisi dei dati per HSV-1. In aggiunta, un campione analizzato con il test Alethia HSV 1&2 per HSV-1 ha dato un risultato invalido ma non è stato possibile ri-analizzarlo; questo campione è quindi stato escluso dall'analisi delle prestazioni per HSV-1. Quindi, un totale di 974 campioni sono stati inclusi nell'analisi delle prestazioni per HSV-1. Dei 1156 campioni che hanno fornito risultati validi con il metodo ELVIS, un campione analizzato con il test Alethia HSV 1&2 per HSV-2 ha dato un risultato invalido ma non è stato possibile ri-analizzarlo; questo campione è quindi stato escluso dall'analisi delle prestazioni per HSV-2. Quindi, un totale di 1155 campioni sono stati inclusi nell'analisi delle prestazioni per HSV-2. Le tabelle riassumono le prestazioni del test di amplificazione del DNA Alethia HSV 1&2 per tutti i siti combinati.

In tutto, sono stati analizzati 723 (74,3%) campioni femminili e 247 (25,3%) campioni maschili per HSV-1, e 871 (75,5%) campioni femminili e 277 (24,0%) campioni maschili per HSV-2. Sono stati analizzati anche quattro (4) campioni per HSV-1 (0,4%) e cinque (5) campioni per HSV-2 (0,4%) provenienti da pazienti di sesso non noto. Non si prevedono differenze nelle prestazioni del test in base al sesso.

Aree combinate: HSV-1 cutaneo (N=264)

		Metodo di riferimento			Alethia	Prestazioni			
		Pos	Neg	Totale					95% CI
Alethia HSV 1&2	Pos	48	6 ^a	54	0 (0)	Sensibilità	48/51	94.1%	84.1-98.0%
	Neg	3 ^b	207	210	0 (0)	Specificità	207/213	97.2%	94.0-98.7%
	Totale	51	213	264	0 (0)				

^a 6/6 campioni sono risultati positivi a HSV-1 con un altro test molecolare, approvato FDA.

^b 1/3 campione è risultato negativo a HSV-1 con un altro test molecolare, approvato FDA.

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

Aree combinate: HSV-1 mucocutaneo (N=710)

		Metodo di riferimento			Alethia	Prestazioni			
		Pos	Neg	Totale					95% CI
Alethia HSV 1&2	Pos	152	28 ^b	180	0 (1)	Sensibilità	152/160	95.0%	90.5-97.5%
	Neg	8 ^c	522	530	0 (5)	Specificità	522/550	94.9%	92.7-96.5%
	Totale	160	550	710	0 (6) ^a				

^a Ci sono stati inizialmente sei campioni INVALIDI con Alethia. Una volta ripetuti, uno è risultato negativo ad Alethia (negativo ad ELVIS); uno, una volta ripetuto, è risultato positivo ad Alethia HSV-1 (positivo ad ELVIS HSV-1).

^b 19/28 campioni sono risultati positivi a HSV-1 con un altro test molecolare, approvato FDA; non è stato possibile analizzare 3 campioni.

^c 7/8 campioni sono risultati negativi a HSV-1 con un altro test molecolare, approvato FDA; non è stato possibile analizzare 1 campione.

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

Aree combinate: HSV-2 cutaneo (N=306)

		Metodo di riferimento			Alethia	Prestazioni			
		Pos	Neg	Totale					95% CI
Alethia HSV 1&2	Pos	42	13 ^b	55	0 (0)	Sensibilità	42/42	100%	91.6-100.0%
	Neg	0	251	251	0 (1)	Specificità	251/264	95.1%	91.8-97.1%
	Totale	42	264	306	0 (1) ^a				

^a C'è stato inizialmente un campione INVALIDO con Alethia. Il campione, ripetuto, è risultato negativo ad Alethia (ELVIS negativo).

^b 8/13 campioni sono risultati positivi a HSV-2 con un altro test molecolare, approvato FDA; non è stato possibile analizzare 1 campione.

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

Aree combinate: HSV-2 mucocutaneo (N=849)

		Metodo di riferimento			Alethia	Prestazioni			
		Pos	Neg	Totale					95% CI
Alethia HSV 1&2	Pos	137	31 ^b	168	0 (0)	Sensibilità	137/139	98.6%	94.9-99.6%
	Neg	2 ^c	679	681	0 (1)	Specificità	679/710	95.6%	93.9-96.9%
	Totale	139	710	849	0 (1) ^a				

^a C'è stato inizialmente un campione INVALIDO con Alethia. Il campione, ripetuto, è risultato negativo ad Alethia (ELVIS negativo).

^b 24/31 campioni sono risultati positivi a HSV-2 con un altro test molecolare, approvato FDA; non è stato possibile analizzare 4 campioni.

^c 1/2 campioni è risultato negativo a HSV-2 con un altro test molecolare, approvato FDA.

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

SENSIBILITÀ ANALITICA

La sensibilità analitica o il limite di Rilevabilità (LoD) è stato determinato utilizzando due ceppi, uno di HSV-1 e uno di HSV-2. Il LoD è stato determinato utilizzando 60 repliche e una probabilità dichiarata (ad es., 95%, dove 57/60 repliche sono positive) di ottenere risposte positive.

HSV Ceppi	LoD (TCID ₅₀ /mL)
HSV-1 HF (VR-260)	7,20 x 10 ³
HSV-1 McIntyre (VR-539)	9,89 x 10 ⁴
HSV-2 G (VR-734)	1,20 x 10 ³
HSV-2 MS (VR-540)	1,60 x 10 ³

Il LoD assegnato finale del test è di 9,89 x 10⁴ TCID₅₀/mL per HSV-1 e 1,60 x 10³ TCID₅₀/mL per HSV-2.

Inoltre, venti (20) campioni clinici di HSV-1 e venti (20) campioni clinici di HSV-2 provenienti da una vasta gamma di localizzazioni anatomiche (ovvero, orale, genitale, ano-rettale ecc.) sono stati valutati con un LoD del test per HSV-1 (9,89 x 10⁴ TCID₅₀/mL) e per HSV-2 (1,60 x 10³ TCID₅₀/mL). Tutti i campioni clinici sono stati rilevati dal test Alethia HSV 1&2 al LoD, o inferiore, ad eccezione di un campione di HSV-1 che è stato rilevato a 7,20 x 10⁷ TCID₅₀/mL.

RIPRODUCIBILITÀ

Gli studi di riproducibilità sono stati eseguiti da tre dei sette laboratori partecipanti. A questi laboratori partecipanti sono stati forniti pannelli in cieco di diciotto (18) campioni codificati. I campioni sono stati ordinati casualmente all'interno di ciascun pannello per mascherare le identità dei campioni. I pannelli includevano campioni artificiali di HSV-1 (ceppo HF) e HSV-2 (ceppo MS) prodotti come campioni positivi moderati (HSV-1: 2,16 x 10⁴ TCID₅₀/mL o HSV-2: 4,80 x 10³ TCID₅₀/mL), campioni positivi bassi (HSV-1: 1,08 x 10⁴ TCID₅₀/mL o HSV-2: 2,40 x 10³ TCID₅₀/mL) o due campioni artificiali HSV negativi (HSV-1 in prossimità del cut-off: 308 TCID₅₀/mL, HSV-1 alto negativo: 29,7 TCID₅₀/mL; HSV-2 in prossimità del cut-off: 24 TCID₅₀/mL, HSV-2 alto negativo: 2,2 TCID₅₀/mL). Il pannello includeva anche due campioni negativi di HSV-1 e HSV-2 e un controllo positivo e negativo. L'analisi è stata condotta da diversi operatori in ciascun laboratorio lo stesso giorno (variabilità intra-analisi) per cinque giorni (variabilità inter-analisi). Tre lotti di test Alethia HSV 1&2 e cinque strumenti Alethia sono stati utilizzati in questo studio. I controlli positivi e negativi sono stati analizzati con ciascun pannello. I risultati sono illustrati nella tabella seguente:

Riepilogo dello studio di riproducibilità per HSV-1								
Tipo di campione	Laboratorio 1		Laboratorio 2		Laboratorio 3		Totale	
	Percentuale di concordanza		Percentuale di concordanza		Percentuale di concordanza		Percentuale di concordanza	
HSV-1 Positivo Moderato	30/30	100,0%	30/30	100,0%	30/30	100,0%	90/90	100,0%
HSV-1 Basso Positivo	30/30	100,0%	30/30	100,0%	30/30	100,0%	90/90	100,0%
HSV-1 & HSV-2 In prossimità del cut-off	20/30	66,7%	26/30	86,7%	20/30	66,7%	66/90	73,3%
HSV-1 & HSV-2 Alto Negativo	29/30	96,7%	30/30	100,0%	29/30	96,7%	88/90	97,8%
HSV-1 Negativo	60/60	100,0%	60/60	100,0%	60/60	100,0%	180/180	100,0%
Controllo Negativo	10/10	100,0%	10/10	100,0%	10/10	100,0%	30/30	100,0%
Controllo Positivo	10/10	100,0%	10/10	100,0%	10/10	100,0%	30/30	100,0%

Riepilogo dello studio di riproducibilità per HSV-2								
Tipo di campione	Laboratorio 1		Laboratorio 2		Laboratorio 3		Totale	
	Percentuale di concordanza		Percentuale di concordanza		Percentuale di concordanza		Percentuale di concordanza	
HSV-2 Positivo Moderato	30/30	100,0%	30/30	100,0%	30/30	100,0%	90/90	100,0%
HSV-2 Basso Positivo	30/30	100,0%	30/30	100,0%	30/30	100,0%	90/90	100,0%
HSV-1 & HSV-2 In prossimità del cut-off	25/30	83,3%	29/30	96,7%	25/30	83,3%	79/90	87,8%
HSV-1 & HSV-2 Alto Negativo	29/30	96,7%	30/30	100,0%	29/30	96,7%	88/90	97,8%
HSV-2 Negativo	60/60	100,0%	60/60	100,0%	60/60	100,0%	180/180	100,0%
Controllo Negativo	10/10	100,0%	10/10	100,0%	10/10	100,0%	30/30	100,0%
Controllo Positivo	10/10	100,0%	10/10	100,0%	10/10	100,0%	30/30	100,0%

STUDI SULLA CROSS-REATTIVITÀ

Negli studi di crossreattività sono stati impiegati campioni positivi (HSV-1 ceppo HF e HSV-2 ceppo MS) e negativi inoculati con batteri o funghi a una concentrazione minima di 1,0 x 10⁶ CFU/mL (1,0 x 10⁶ copie/mL dove è stato utilizzato il DNA genomico) o con virus a una concentrazione minima di 1,0 x 10⁵ TCID₅₀/mL (1,0 x 10⁶ copie/mL dove è stato utilizzato il DNA o l'RNA genomico). Nessuno dei seguenti orga nismi o dei relativi materiali genetici ha reagito con il test Alethia HSV 1&2:

Acinetobacter calcoaceticus, *Acinetobacter lwoffii*, *Bacteroides fragilis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella pertussis*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida lusitanae*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* (ESBL), *Fusobacterium nucleatum*, *Gardnerella vaginalis*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae* (Type A), *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus acidophilus*, *Legionella pneumophila*, *Mobiluncus curtisii*, *Mobiluncus mulieris*, *Moraxella catarrhalis*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma orale*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma salivarium*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Prevotella melaninogenica*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus salivarius*, *Toxoplasma gondii*, *Treponema palladium*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Adenovirus*, *Coronavirus*, *Coxsackievirus*, *Cytomegalovirus*, *Echovirus*, *Enterovirus*, *Epstein Barr virus*, *Influenza A virus*, *Influenza B virus*, *Hepatitis B virus*, *Hepatitis C virus*, *Herpesvirus umano 6*, *Herpesvirus umano 7*, *Herpesvirus umano 8*, *HIV tipo 1*, *metapneumovirus umano*, *papilloma virus umano*, *virus del morbillo*, *virus degli orecchioni*, *virus della parainfluenza*, *virus respiratorio sinciziale*, *virus Rubella*, *virus Varicella zoster*.

Il DNA genomico umano non ha reagito a 1,0 x 10⁶ copie/mL. In aggiunta, con il test Alethia HSV 1&2 nessuna inibizione competitiva è stata osservata tra HSV-1 & HSV-2 e gli organismi riportati nella lista.

ANALISI DI SOSTANZE INTERFERENTI

Il test sull'interferenza è stato condotto in presenza delle concentrazioni peggiori di sostanze chimiche e biologiche introdotte direttamente nei campioni positivi prodotti artificialmente (HSV-1 ceppi: McIntyre e HF; HSV-2 ceppi: G e MS) e nei campioni negativi. Non sono state osservate interferenze con le sostanze riportate di seguito.

- (1) A concentrazioni del 7% peso/volume o volume/volume: Abreva® (10% docosanolo), Balneol® lozione detergente, Carmex® balsamo labbra (1,7% canfora, 0,7% mentolo), Desitin® (40% ossido di zinco), lavanda vaginale (CVS Pharmacy® monouso), dentifricio al fluoro (Crest®, 0,243% fluoruro di sodio), K-Y® Brand Jelly, Lanacane® (0,2% cloruro di benzetonio, 20% benzocaina), Lip Clear® Lysine+® (1,2% ossido di zinco), Miconazolo 3 (rimedio per infezione da lievito CVS™: 2% miconazolo nitrate), collutorio (Listerine® Original: 0,092% eucaliptolo, 0,042% mentolo, 0,060% metil salicilato, 0,064% timolo), Preparation H® pomata emorroidale (14% olio minerale, 74,9% petrolato, 0,25% fenilefrina HCl), Releev® (0,13% cloruro di benzalconio), Tioconazolo, Vagisil® Regular Strength (5% benzocaina, 2% resorcinolo), Yeast Guard® Trattamento Gel (Candida albicans, 27X HPUS; Candida parapsilosis, 27X HPUS; Pulsatilla, 27X HPUS), feci, liquido seminale, urina, sangue intero, Strato leucocitario (Buffy Coat).
- (2) A concentrazioni di: 60 µg/mL - Muco (mucina, ghiandola sottomandibolare bovina di tipo I-S); 1,25 mg/mL - Amido di mais; 3,3 mg/mL - Albumina; 5 mg/mL - Acetaminofene, caseina, clorfeniramina maleato; 7 mg/mL - Aciclovir; 10 mg/mL - Acido acetilsalicilico, destrometorfano bromidrato.

La caseina a concentrazioni superiori a 5 mg/mL ha interferito con il test.

Cold-EEZE® rimedio per raffreddore e mal di gola (gluconato di zinco 2X) è stato analizzato a una concentrazione del 7% volume/volume e ha generato risultati non validi in tutte le repliche.



Test d'amplification de l'ADN pour la détection du virus herpes simplex de type 1 et de type 2

REF 480650

IVD

Rx Only

BUT DE LA METHODE

Le test Alethia HSV 1&2 par amplification d'ADN, effectué sur Alethia est un test de diagnostic in vitro qualitatif pour la détection et la différenciation de l'ADN du virus herpes simplex de type 1 (HSV-1) et du virus herpes simplex type 2 (HSV-2) dans des échantillons de lésion cutanée et cutanéomuqueuse d'homme ou de femme suspecté d'être porteur d'une infection herpétique.

Le test Alethia HSV 1&2 utilise la technique d'amplification isotherme de l'ADN facilitée par boucle (en anglais, loop-mediated isothermal DNA amplification ou LAMP) pour détecter HSV-1 et HSV-2 en ciblant des segments des génomes du virus herpes simplex 1 et herpes simplex 2. Les résultats du test d'Alethia HSV 1&2 servent comme aide au diagnostic d'une infection par HSV chez les patients symptomatiques.

Ce test est destiné à une utilisation en milieu hospitalier, dans les laboratoires de référence ou d'état. Le dispositif n'est pas prévu pour une utilisation dans une unité de soins, hors laboratoire.

ATTENTION: Alethia HSV 1&2 n'est pas approuvé pour la FDA pour être utilisé avec le liquide céphalo-rachidien (LCR) ni pour aider au diagnostic des infections HSV du système nerveux central (SNC). Le dispositif n'est pas prévu pour le dépistage prénatal.

RESUME ET EXPLICATION DU TEST

Le test Alethia HSV 1&2 est basé sur la technologie d'amplification génique isotherme (LAMP)^{1,2}. Le test cible individuellement des régions des génomes HSV-1 et HSV-2 dans deux dispositifs de test séparés. La cible de HSV-1 est une séquence de 208 paires de bases (pb) du gène de la glycoprotéine G (US4) de HSV-1. La cible de HSV-2 est une séquence de 189 pb du gène de la glycoprotéine G (US4) de HSV-2.

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

Le kit Alethia HSV 1&2 comprend un système de préparation des échantillons III (SMP PREP III) Alethia, des dispositifs de test Alethia HSV 1, des dispositifs de test Alethia HSV 2, de l'huile minérale, des tubes de traitement thermique et une pipette de transfert de 50 µL. Le système de préparation de l'échantillon Alethia SMP PREP III, utilisé pour la dilution et la préparation de l'échantillon, comprend une solution tamponnée Tris contenant des *E. coli* traités au formaldéhyde et contenant de l'ADN de *Staphylococcus aureus*. Le dispositif de test Alethia HSV 1 contient une bille de réactif d'amplification lyophilisé dans chacun des deux puits: un puits TEST avec des amorces spécifiques à HSV-1 et un puits CONTROLE avec des amorces spécifiques à *S. aureus*. Le dispositif de test Alethia HSV 2 contient une bille de réactif d'amplification lyophilisé dans chacun des deux puits: un puits TEST avec des amorces spécifiques à HSV-2 et un puits CONTROLE avec des amorces spécifiques à *S. aureus*. L'ADN de *S. aureus* du système de préparation de l'échantillon et les amorces spécifiques à *S. aureus* du puits CONTROLE servent de contrôle interne du test. Au cours de la préparation des spécimens, chaque échantillon de patient est ajouté au système de préparation SMP PREP III contenant le contrôle de dosage et l'ADN de *S. aureus* avant amplification. L'ajout d'ADN de *S. aureus* à l'échantillon d'un patient permet de traiter en parallèle l'ADN cible et l'ADN de contrôle au cours de l'amplification et de la détection. Le contrôle interne permet de déceler un problème d'inhibition de l'amplification et d'efficacité des réactifs du test ou du traitement des échantillons. La cible de contrôle de *S. aureus* doit être amplifiée et détectée dans la réaction finale. Dans le cas contraire, le test est considéré comme étant non valide et les résultats ne sont pas reportés.

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 CONTROLE. La transmission de la lumière est mesurée au début (Signal_{initial}, S_i) et à la fin (Signal_{final}, S_f) du processus d'amplification. L'Alethia calcule la variation de la transmission de la lumière entre le début et la fin du processus d'amplification (S_f:S_i) et il compare le rapport à une valeur seuil prédéfinie.

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

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

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

PRINCIPE DU TEST

Le virus herpes simplex provoque des infections chroniques récurrentes et une méningite virale chez les adultes et les enfants. L'infection par le virus herpes simplex de type 1 (HSV-1) est relativement courante, avec une séroprévalence globale approchant les 54% de la population des Etats-Unis.³ Le virus herpes simplex de type 2 (HSV-2) est la cause principale de l'herpès génital. On estime que 50 millions de personnes aux Etats-Unis et plus de 400 millions de personnes dans le monde sont infectées par l'herpès génital HSV-2, soit environ 1 personne sur 5.^{4,5} Bien que HSV-1 ou HSV-2 puissent provoquer des infections orales ou génitales, HSV-1 est généralement associé aux lésions orales et HSV-2 est généralement associé aux lésions génitales. Toutefois, la fréquence des infections génitales à HSV-1 ne cesse d'augmenter.^{3,6} La transmission de HSV aux nouveau-nés peut survenir pendant la naissance, provoquant des symptômes allant d'une maladie disséminée (SNC et organes viscéraux) aux infections de la peau, de l'œil et de la bouche.⁷

L'infection à HSV peut être diagnostiquée par microscopie, culture cellulaire, méthodes moléculaires et sérologiques;⁸ la culture cellulaire et la PCR sont les méthodes de diagnostic recommandées par les CDC (Centers of Disease Control)⁴. La sensibilité de la culture virale est faible, notamment pour les lésions récurrentes ou en voie de guérison, du fait de la quantité limitée de virus viables.⁴ Le type HSV ne peut être déterminé directement à partir de la culture virale, nécessitant des méthodes de typage complémentaires (telles que ELVIS).⁸ Les méthodes NAAT sont plus sensibles que la culture, permettant de différencier les divers types de HSV, et offrent des résultats plus rapides.⁸

MATERIEL FOURNI

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

1. **Système de préparation des échantillons III (SMP PREP III) Alethia (article# 2792-02):** solution tamponnée Tris contenant des *E. coli* traités au formaldéhyde et contenant de l'ADN de *S. aureus* ainsi que de l'azide de sodium (0,09 %) comme agent de conservation.
2. **Dispositif de test Alethia HSV 1 (article# 2865):** un dispositif à deux puits contenant des réactifs d'amplification lyophilisés (ADN polymérase, désoxynucléotide triphosphates) et, soit des amorces spécifiques de HSV-1 (Puits TEST), soit des amorces spécifiques de *S. aureus* (Puits CONTROLE).
3. **Dispositif de test Alethia HSV 2 (article# 2870):** un dispositif à deux puits contenant des réactifs d'amplification lyophilisés (ADN polymérase, désoxynucléotide triphosphates) et, soit des amorces spécifiques de HSV-2 (Puits TEST), soit des amorces spécifiques de *S. aureus* (Puits CONTROLE). **Le dispositif de test Alethia HSV 2 est identifié visuellement par une bande orange sur la languette de fermeture du dispositif.**
4. **Huile minérale** (conditionnée dans un flacon avec embout compte-gouttes) (article# 14298-01)
5. **Tubes pour le traitement thermique (TT) Alethia (article# 2335)**
6. **Pipettes de transfert (article# 11523A)**

MATERIEL FOURNI SEPAREMENT

Kit de contrôle externe Alethia pour HSV 1&2, numéro de référence: 479960

MATERIEL NON FOURNI

1. Gants en latex jetables, non poudrés
2. Embouts de pipettes résistant aux aérosols, sans ADNase/ARNase
3. Milieu de transport viral (2-3 mL): MicroTest™ M4®, MicroTest™ M4RT®, MicroTest™ M6™, système de transport UniTranz-RT™, Copan UTM™ Virus Collection, milieu de transport HealthLink® UTM ou identique*, milieu de transport viral universel (UVT) de BD, ViraTrans™ VTM, Hardy Diagnostics VTM.
**HealthLink UTM est équivalent à Quest V-C-M Medium*

EQUIPEMENT NON FOURNI

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

PRECAUTIONS D'EMPLOI

1. Tous les réactifs sont pour un usage diagnostique in vitro
2. Les milieux de transport viral contenant des stabilisateurs de protéines, tels que MicroTest™ M5® et des écouvillons à l'alginate de calcium, ne sont pas acceptables pour le prélèvement et le transport d'échantillons HSV 1&2 Alethia.
3. Ne pas intervertir les lots des systèmes de préparation des échantillons ou des dispositifs de test. L'huile minérale et les tubes pour le traitement thermique sont interchangeables à condition de respecter les dates limites de péremption indiquées au moment de leur utilisation.
4. Suivre les consignes de sécurité biologique de niveau 2 et les bonnes pratiques de laboratoire pendant les tests.⁹ Traiter tous les spécimens et dispositifs de test usagés comme susceptibles de transmettre des agents infectieux. Ne pas manger, boire ou fumer dans les espaces où les échantillons ou les réactifs du kit sont manipulés.
5. Porter des gants jetables lors de la manipulation des échantillons. Se laver minutieusement les mains après la manipulation.
6. Les programmes de contrôle de la qualité pour les laboratoires de diagnostic moléculaire, y compris la bonne utilisation et l'entretien de l'équipement, doivent être suivis.¹⁰
7. Les dispositifs de test Alethia HSV 1&2 contiennent des réactifs lyophilisés. Ne pas ouvrir les pochettes de protection avant d'être prêt à effectuer le test.
8. Les dispositifs de test Alethia HSV 1&2 sont munis d'un loquet conçu pour éviter la contamination de la zone de test avec le produit d'amplification. NE PAS utiliser les dispositifs de test dont le loquet est endommagé.
9. Jeter les dispositifs de test Alethia HSV 1&2 utilisés immédiatement après le test en laissant le loquet bien en place. NE PAS ouvrir le dispositif de test après le traitement. L'ouverture du dispositif après amplification peut contaminer la zone de test avec le produit d'amplification.
10. Tout incident grave lié au dispositif doit être signalé à Meridian Bioscience, Inc., 3471 River Hills Drive, Cincinnati, Ohio 45244, États-Unis, ou au Centre de service clientèle au 1-800-343-3858 ainsi qu'à l'autorité compétente de l'État membre de l'UE où le du clinicien et/ou le patient sont établis.
11. IMPORTANT : Voir la fiche de sécurité pour des informations supplémentaires concernant la sécurité et les dangers.

DANGER ET MISES EN GARDE

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

DUREE DE CONSERVATION ET STOCKAGE

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

REMARQUES SUR LA PROCEDURE

La pipette de transfert incluse dans le kit Alethia HSV 1&2 est emballée séparément et peut distribuer 50 µL. La pipette est représentée ci-dessous.



PREPARATION DES REACTIFS

S'assurer que les réactifs du kit sont à la température ambiante (19 C à 30 C) avant leur emploi. Si les réactifs ne sont pas amenés à la température ambiante avant l'emploi, des résultats incorrects pourraient être observés.

PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Type d'échantillon: prélèvements sur écouvillon de lésions humaines cutanées et cutanéomuqueuses en milieu de transport viral. L'utilisation des milieux de transport viral suivants est acceptable: MicroTest™ M4®, MicroTest™ M4RT®, MicroTest™ M6™, système de transport UniTranz-RT™, Copan UTM™ Virus Collection, milieu de transport HealthLink® UTM ou identique*, milieu de transport viral universel (UVT) BD, ViraTrans™ VTM, Hardy Diagnostics VTM.

**HealthLink UTM est équivalent à Quest V-C-M Medium*

REMARQUE: Les milieux de transport viral contenant des stabilisateurs de protéine, tels que MicroTest™ M5® et des écouvillons à l'alginate de calcium, ne sont pas des types d'échantillon acceptables.

Prélèvement de l'échantillon: Le prélèvement des échantillons de lésion cutanée et cutanéomuqueuse doit être effectué conformément aux directives de l'établissement pour le prélèvement des échantillons cliniques pour l'infection à l'herpes simplex.

Placez le ou les écouvillon(s) dans un milieu de transport viral. Les échantillons doivent être stockés au réfrigérateur (entre 2 et 8 C) après prélèvement et réfrigérés pendant le transport jusqu'au laboratoire. Les échantillons doivent être testés dès que possible, mais peuvent être conservés au réfrigérateur (entre 2 et 8 C) pendant 7 jours maximum avant d'être testés. Ne pas congeler les échantillons. Ne pas conserver à température ambiante.

PREPARATION DES ECHANTILLONS

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

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

1. Passer au Vortex l'écouvillonnage préservé dans le milieu de transport pendant environ 45 à 60 secondes.
2. A l'aide d'une pipette de transfert, transférer 50 µL du milieu de l'écouvillon dans un dispositif SMP PREP III Alethia. Jeter la pipette de transfert. Étiqueter le dispositif SMP PREP avec l'identification de l'échantillon.
3. Remettre en place le bouchon du SMP PREP III et passer au Vortex pendant 10 secondes environ.
4. Enlever le bouchon de l'embout du SMP PREP III et presser doucement pour transférer tout le contenu du SMP PREP III dans un tube de traitement thermique. Étiqueter le tube avec l'identification de l'échantillon.
5. Répéter les étapes de PRÉPARATION DES ECHANTILLONS pour tous les échantillons à traiter. Les échantillons traités peuvent être conservés à température ambiante (de 19 à 30 C) pendant 2 heures maximum avant le traitement thermique.
6. Chauffer chaque tube de traitement thermique contenant l'échantillon dans un bain sec/bloc chauffant à 95 ± 5 C pendant 10 ± 2 minutes. Surveiller l'étape de traitement thermique à l'aide d'un thermomètre numérique et d'un minuteur.
7. Retirer chaque tube de traitement thermique du bain sec/bloc chauffant. Les échantillons ayant été traités thermiquement peuvent être conservés à température ambiante (de 19 à 30 C) pendant un maximum de 15 minutes avant d'être testés.

REMARQUE: la quantité d'échantillon préparée recueillie à la fin des étapes de PRÉPARATION DES ECHANTILLONS doit être suffisante pour réaliser les deux tests Alethia HSV-1 et HSV-2.

PROCEDURE DE TEST

REMARQUE: il est possible de traiter au maximum 5 échantillons pour HSV-1 et HSV-2 en un seul passage dans l'Alethia. **Les dispositifs de test HSV 2 sont identifiés par une bande orange sur leur languette de fermeture.**

1. Passer au Vortex les échantillons traités thermiquement pendant environ 10 secondes.
2. Utiliser 1 dispositif de test Alethia HSV1 et 1 dispositif de test Alethia HSV2 par échantillon. Retirer les dispositifs de leurs pochettes 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 les dispositifs sur une surface plane ou sur un support adapté pour les recevoir.
3. A l'aide d'une pipette, transférer 50 µL de chaque échantillon vers les puits TEST (gauche / bille blanche) et le puits CONTROLE (droite / bille jaune) du dispositif de test Alethia HSV1 et du dispositif de test Alethia HSV2. Ne pas mélanger les mélanges réactionnels à la pipette. Veiller à ne pas faire entrer d'air dans les milieux réactionnels.
4. Ajouter 1 goutte d'huile minérale à la fois dans les puits TEST et dans les puits CONTROLE des dispositifs de test Alethia HSV-1 et HSV 2. Fermer les dispositifs de test Alethia et verrouiller en rabattant les loquets.
5. Tapoter le dispositif sur la paillasse ou mélanger pour éliminer les bulles d'air. Examiner soigneusement chaque dispositif de test pour vérifier la réhydratation de la bille de contrôle/de test, l'absence de bulles d'air dans les puits et de liquide au sommet du dispositif. Si les billes ne sont pas dissoutes, en cas de présence de bulles d'air ou de liquide au sommet du dispositif, tapoter celui-ci sur la paillasse et répéter l'examen visuel. L'amplification et la détection doivent commencer dans les 15 minutes.
6. Répéter les étapes de la PROCEDURE DE TEST pour tous les échantillons à tester.
7. Insérer les dispositifs de test Alethia dans l'e lecteur Alethia et lancer l'opération. Les résultats seront affichés à la fin de l'exécution du test.

INTERPRETATION DES RESULTATS

ID échantillon	Résultats indiqués	Interprétation
Echantillon de patient	POSITIF	DISPOSITIF DE TEST HSV-1: l'échantillon contient l'ADN HSV-1 cible. DISPOSITIF DE TEST HSV-2: l'échantillon contient l'ADN HSV-2 cible.
	NEGATIF	DISPOSITIF DE TEST HSV-1: pas d'ADN HSV-1 cible détecté. DISPOSITIF DE TEST HSV-2: pas d'ADN HSV-2 cible détecté.
	NON VALIDE	Aucun rendu de résultat possible. Recommencer le test à l'aide de l'échantillon de patient d'origine. Échantillon de patient inhibiteur, mauvaise préparation de l'échantillon, échec du réactif, erreur de l'instrument ou échec du contrôle interne.
Contrôle positif	POSITIF	Résultat de Contrôle positif valide. Réactifs actifs au moment de l'utilisation, fonctionnement correct du lecteur l'Alethia.
	NEGATIF	Résultat de contrôle non valide. La première étape pour déterminer la cause de l'échec est de répéter les tests de contrôle. Contacter le Service Technique de Meridian Bioscience ou votre distributeur local pour assistance si les résultats de contrôle escomptés ne sont pas observés de façon répétée.
	NON VALIDE	Aucun rendu de résultat possible. La première étape pour déterminer la cause de l'échec est de répéter les tests de contrôle. Contacter le Service Technique de Meridian Bioscience ou votre distributeur local pour assistance si les résultats de contrôle escomptés ne sont pas observés de façon répétée. Mauvaise préparation de l'échantillon, échec du réactif, erreur de l'instrument ou échec du contrôle interne.
Contrôle négatif	POSITIF	Résultat de contrôle non valide. La première étape pour déterminer la cause de l'échec est de répéter les tests de contrôle. Contacter le Service Technique de Meridian Bioscience ou votre distributeur local pour assistance si les résultats de contrôle escomptés ne sont pas observés de façon répétée.
	NEGATIF	Résultat de Contrôle négatif valide. Réactifs actifs au moment de l'utilisation, fonctionnement correct du lecteur l'Alethia.
	NON VALIDE	Aucun rendu de résultat possible. La première étape pour déterminer la cause de l'échec est de répéter les tests de contrôle. Contacter le Service Technique de Meridian Bioscience ou votre distributeur local pour assistance si les résultats de contrôle escomptés ne sont pas observés de façon répétée. Mauvaise préparation de l'échantillon, échec du réactif, erreur de l'instrument ou échec du contrôle interne.
PUITS VIDE	AUCUN	Aucun dispositif de test Alethia dans les puits du lecteur l'Alethia. OU le dispositif de test Alethia présent ne répond pas en raison d'une mauvaise préparation de l'échantillon, de saleté ou d'un mauvais positionnement du dispositif. Recommencer le test à l'aide de l'échantillon de patient d'origine.

CONTROLE DE QUALITE

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

1. Chaque dispositif contient un contrôle interne qui vérifie l'absence d'inhibition de l'amplification, l'efficacité des réactifs de test et du traitement des échantillons. L'ADN du contrôle interne est présent dans le SMP PREP III et il subit toutes les étapes de la procédure. Les amorces d'amplification de l'ADN du contrôle interne sont présentes dans le puits contrôle du dispositif de test Alethia.
2. L'étape du traitement thermique est surveillée avec un thermomètre et un minuteur externes. Utiliser la mémoire des températures maximum/minimum du thermomètre pour vérifier qu'une température de 95 ± 5 C est maintenue. Utiliser le minuteur pour vérifier que la durée du traitement thermique est de 10 ± 2 minutes.
3. Les bonnes pratiques de laboratoire recommandent l'emploi de matériels de contrôle. Les utilisateurs doivent suivre les directives locales, nationales ou fédérales appropriées relatives à l'exécution de contrôles de qualité externes.
4. Les réactifs de contrôle externes Alethia HSV 1&2 sont vendus séparément (référence 479960). Il est recommandé de vérifier la réactivité de chaque nouveau lot et de chaque nouvel envoi d' Alethia HSV 1&2 à la réception ou avant l'emploi. Les tests de contrôle externe doivent être exécutés par la suite conformément aux directives locales, nationales et fédérales. Le kit de test Alethia HSV 1&2 ne doit pas être utilisé pour tester les patients si les contrôles externes ne fournissent pas de résultats corrects.
5. Utiliser un dispositif de test séparé pour chaque réactif de contrôle externe.

VALEURS ATTENDUES

La prévalence de HSV-1 et HSV-2 a été calculée lors d'études cliniques en 2014-2015 suivant l'âge des patients et par emplacement des lésions anatomiques. L'incidence globale pendant l'étude était de 20.5% (237/1155) pour HSV-1 et de 19,4% (224/1156) pour HSV-2. Les données de prévalence spécifiques sont données ci-dessous.

Étude combinée - Prévalence cutanée suivant l'emplacement anatomique de l'échantillon (N=306)						
Source	HSV-1			HSV-2		
	Nbre total	Total positifs	Prévalence	Nbre total	Total positifs	Prévalence
Génital -- Pénis	92	7	7,6%	92	28	30,4%
Lésion cutanée	214	47	22,0%	214	27	12,6%
Étude combinée - Prévalence cutanéomuqueuse suivant l'emplacement anatomique de l'échantillon						
Source	HSV-1 (N=849)			HSV-2 (N=850)		
	Nbre total	Total positifs	Prévalence	Nbre total	Total positifs	Prévalence
Ano-rectal	47 (1*)	7	14,9%	46 (2*)	9	19,6%
Génital – Vaginal/Cervical	624 (2*)	112	17,9%	626	158	25,2%
Nasal	18	9	50,0%	18	0	0,0%
Oculaire	20	0	0,0%	20	0	0,0%
Lésion orale	135	54	40,0%	135	2	1,5%
Urétral	5	1	20,0%	5	0	0,0%

* Nombre d'échantillons produisant un résultat Alethia non valide, non résolus et de ce fait, exclus de l'analyse.

Etude combinée - Prévalence cutanée en fonction de l'âge (N=306)						
Age	HSV-1 (N=306)			HSV-2 (N=306)		
	Nbre total	Total positifs	Prévalence	Nbre total	Total positifs	Prévalence
≤ 5 ans	38	12	31.6%	38	1	2.6%
6 à 11 ans	14	7	50.0%	14	1	7.1%
12 à 21 ans	51	14	27.5%	51	4	7.8%
22 à 59 ans	166	18	10.8%	166	36	21.7%
≥ 60 ans	37	3	8.1%	37	13	35.1%
Non fourni	0	0	0.0%	0	0	0.0%
Etude combinée – Prévalence cutanéomuqueuse en fonction de l'âge- (N=852)						
Age	HSV-1 (N=849)			HSV-2 (N=850)		
	Nbre total	Total positifs	Prévalence	Nbre total	Total positifs	Prévalence
≤ 5 ans	47	8	17.0%	47	0	0.0%
6 à 11 ans	12	0	0.0%	12	0	0.0%
12 à 21 ans	174 (1*)	46	26.4%	175	42	24.0%
22 à 59 ans	550 (1*)	111	20.2%	551	116	21.1%
≥ 60 ans	63 (1*)	18	28.6%	63 (1*)	11	17.5%
Non fourni	3	0	0.0%	2 (1*)	0	0.0%

* Nombre d'échantillons produisant un résultat Alethia non valide, qui n'a pu être résolu et de ce fait, ont été exclus de l'analyse.

LIMITES DU TEST

- La performance d'Alethia HSV 1&2 a été établie avec des échantillons de lésion cutanée et cutanéomuqueuse prospective, chez des sujets masculins et féminins. La performance avec d'autres types d'échantillon (échantillons congelés ou LCR) n'a pas été établie.
- Le test n'est pas destiné à servir au dépistage prénatal.
- Des traitements comportant l'ingrédient actif Zincum Gluconicum ont produit des résultats non valides lorsque testés à 7% vol./vol. avec Alethia HSV 1&2. Des concentrations plus faibles n'ont pas été testées. L'effet du Zincum Gluconicum sur les résultats d'Alethia HSV 1&2 n'a pas été déterminé en utilisant des échantillons cliniques.
- Il a été constaté que la caséine à des concentrations supérieures à 5 mg/mL interférait avec le dosage d'Alethia HSV 1&2.
- Des résultats inacceptables ont été confirmés pour le stockage réfrigéré (2-8 C) des échantillons préparés dans le SMP PREP III, par le test d'amplification ADN Alethia HSV 1&2. Par conséquent, le stockage réfrigéré (2-8 C) des échantillons préparés n'est pas considéré comme une condition de conservation acceptable.
- Des résultats négatifs n'excluent pas une infection et ne doivent pas être utilisés comme seule base du traitement ou pour d'autres décisions relatives à la prise en charge du patient. Ce produit ne peut être utilisé qu'avec l'instrument Alethia.
- Le test Alethia HSV 1&2 est un test qualitatif et ne fournit pas de valeurs ni d'informations quantitatives sur la charge de l'organisme.
- La détection des acides nucléiques dépend d'un prélèvement, d'une manipulation, d'un transport, d'un stockage et d'une préparation adaptés. Le non-respect de la procédure décrite lors de l'une de ces étapes peut entraîner des résultats incorrects.
- Les acides nucléiques de l'organisme peuvent persister *in vivo*, indépendamment de la viabilité de l'organisme. Le test Alethia HSV 1&2 ne fait de pas de distinction entre organismes 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, de mutations ou de polymorphismes dans la région de la cible HSV, d'erreurs techniques, de mélanges d'échantillons ou de faibles quantités d'organismes dans l'échantillon clinique; (B) des résultats faussement positifs peuvent se produire en raison de la présence d'une contamination croisée par des organismes cibles, leurs acides nucléiques ou du produit amplifié, et en raison de signaux non spécifiques.

PERFORMANCES DU TEST

Les caractéristiques de performance du test d'amplification de l'ADN Alethia HSV 1&2 ont été évaluées dans des tests cliniques réalisés entre octobre 2014 et mars 2015 par sept centres de tests cliniques indépendants représentant quatre régions géographiquement distinctes à travers les Etats-Unis. Les caractéristiques de performance du test ont été comparées à la méthode de référence du système de test de typeage ELVIS® HSV ID et D³.

Les échantillons comprenaient des échantillons sur écouvillons frais de lésions cutanées et cutanéomuqueuses, provenant de patients suspectés d'infection par le virus herpès simplex de type 1 (HSV-1) ou de type 2 (HSV-2). Les échantillons classés comme cutanés comprenaient des lésions de peaux et des lésions génitales/du pénis. Les échantillons rangés dans la catégorie cutanéomuqueuse comprenaient les emplacements suivants : ano-rectal, génital-vaginal/cervical, nasal, oculaire, oral et urétral.

Un total de 1158 restes de prélèvements sur écouvillon de lésion éligibles, sans identification, provenant de patients symptomatiques masculins et féminins, ont été évalués. Les échantillons ont été prélevés sur des patients âgés de 1 jour à 89 ans. Des 1158 échantillons retenus dans l'étude, 1156 échantillons ont donné des résultats ELVIS valides. Le système de test ELVIS HSV ID et D³ est incapable de détecter le HSV-1 lorsque le HSV-2 a été identifié en premier lieu dans les échantillons co-infectés. Par conséquent, si un échantillon de HSV-2 était positif par ELVIS, il a été retiré du calcul de l'analyse des performances de HSV-1. Cent-quatre-vingt-un (181) échantillons ont été identifiés comme positifs à HSV-2 par ELVIS et ont été retirés de l'analyse des données HSV-1. En outre, un échantillon testé par le test d'amplification ADN Alethia HSV 1&2 pour le HSV-1 a donné un résultat initialement non valide et n'a pas pu être re-testé; cet échantillon a été exclu de l'analyse des performances de HSV-1. Ainsi, un total de 974 résultats a été inclus dans l'analyse de la performance pour le HSV-1. Des 1156 échantillons qui ont donné des résultats valides avec le test ELVIS, un échantillon testé par le test d'amplification ADN Alethia HSV 1&2 a donné un résultat initialement non valide pour le HSV-2 et n'a pas pu être re-testé; cet échantillon a été exclu de l'analyse des performances de HSV-2. Ainsi, un total de 1155 résultats de l'échantillon a été inclus dans l'analyse de la performance pour le HSV-2. Les tableaux résumant les performances du test d'amplification ADN Alethia HSV 1&2 pour l'ensemble des sites.

Pour HSV-1, un total de 723 (74,3%) échantillons de patients de sexe féminin et 247 (25,3%) de sexe masculin ont été testés. Pour HSV-2, un total de 871 (75,5%) échantillons de patients de sexe féminin et 277 (24,0%) de sexe masculin ont été testés. Quatre (4) échantillons testés pour HSV-1 (0,4%) et cinq (5) échantillons pour HSV-2 étaient de sexe inconnu (0,4%). Aucune influence sur les performances du test n'est attendue du fait du sexe des patients.

Sites combinés: HSV-1 cutané (N=264)

		Méthode de référence			Alethia	Performance			
		Pos	Nég	Total	INV ^c	IC à 95%			
Alethia HSV 1&2	Pos	48	6 ^a	54	0 (0)	Sensibilité	48/51	94.1%	84.1-98.0%
	Nég	3 ^b	207	210	0 (0)	Spécificité	207/213	97.2%	94.0-98.7%
	Total	51	213	264	0 (0)				

^a 6/6 échantillons identifiés comme positifs à HSV-1 par un test moléculaire alternatif, approuvé par la FDA.

^b 1/3 échantillons identifiés comme négatifs à HSV-1 par un test moléculaire alternatif, approuvé par la FDA.

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

Sites combinés: HSV-1 cutanéomuqueux (N=710)

		Méthode de référence			Alethia	Performance			
		Pos	Nég	Total	INV ^d	IC à 95%			
Alethia HSV 1&2	Pos	152	28 ^b	180	0 (1)	Sensibilité	152/160	95.0%	90.5-97.5%
	Nég	8 ^c	522	530	0 (5)	Spécificité	522/550	94.9%	92.7-96.5%
	Total	160	550	710	0 (6) ^a				

^a Initialement, il y avait six échantillons INV par le test Alethia. Cinq ont été répétés et donnés un résultat négatif par Alethia (ELVIS négatif); un seul échantillon répété a donné un résultat positif pour Alethia HSV-1 (ELVIS HSV 1 positif).

^b 19/28 échantillons ont été identifiés comme positifs à HSV-1 par un test moléculaire alternatif, approuvé par la FDA; 3 échantillons n'ont pas pu être testés.

^c 7/8 échantillons ont été identifiés comme négatifs à HSV-1 par un test moléculaire alternatif, approuvé par la FDA; 1 échantillon n'a pas pu être testé.

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

Sites combinés: HSV-2 cutanéomuqueux (N=306)

		Méthode de référence			Alethia	Performance			
		Pos	Nég	Total	INV ^c				IC à 95%
Alethia HSV 1&2	Pos	42	13 ^b	55	0 (0)	Sensibilité	42/42	100%	91.6-100.0%
	Nég	0	251	251	0 (1)	Spécificité	251/264	95.1%	91.8-97.1%
	Total	42	264	306	0 (1) ^a				

^a Initialement, il y avait un échantillon INV par le test Alethia. L'échantillon répété a donné un résultat négatif par Alethia (ELVIS négatif).

^b 8/13 échantillons ont été identifiés comme positifs à HSV-2 par un test moléculaire alternatif, approuvé par la FDA; 1 échantillon n'a pas pu être testé.

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

Sites combinés: HSV 2 cutanéomuqueux (N=849)

		Méthode de référence			Alethia	Performance			
		Pos	Nég	Total	INV ^d				IC à 95%
Alethia HSV 1&2	Pos	137	31 ^b	168	0 (0)	Sensibilité	137/139	98.6%	94.9-99.6%
	Nég	2 ^c	679	681	0 (1)	Spécificité	679/710	95.6%	93.9-96.9%
	Total	139	710	849	0 (1) ^a				

^a Initialement, il y avait un échantillon INV par le test Alethia. L'échantillon répété a donné un résultat négatif par Alethia (ELVIS négatif).

^b 24/31 échantillons ont été identifiés comme positifs à HSV-2 par un test moléculaire alternatif, approuvé par la FDA; 4 échantillons n'ont pas pu être testés.

^c 1/2 échantillons ont été identifiés comme négatifs à HSV-2 par un test moléculaire alternatif, approuvé par la FDA.

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

SENSIBILITE ANALYTIQUE

La sensibilité analytique ou limite de détection (LoD) a été déterminée à l'aide de deux souches, une de HSV-1 et une de HSV-2. La LoD a été confirmée à l'aide de 60 réplicats et une probabilité déclarée (par ex., 95%, où 57/60 réplicats sont positifs) d'obtenir des réponses positives.

Souche HSV	LoD (DICT ₅₀ /mL)
HSV-1 HF (VR-260)	7,20 x 10 ³
HSV-1 McIntyre (VR-539)	9,89 x 10 ⁴
HSV-2 G (VR-734)	1,20 x 10 ³
HSV-2 MS (VR-540)	1,60 x 10 ³

La LoD finale attribuée au test est 9,89 x 10⁴ DICT₅₀/mL pour HSV-1 et 1,60 x 10³ DICT₅₀/mL pour HSV-2.

En outre, vingt (20) échantillons cliniques HSV-1 et vingt (20) échantillons cliniques HSV-2 provenant de divers emplacements anatomiques (oral, génital, ano-rectal, etc.) ont été évalués à la LoD du test pour HSV-1 (9,89 x 10⁴ DICT₅₀/mL) et HSV-2 (1,60 x 10³ DICT₅₀/mL). Tous les échantillons cliniques ont été détectés par le test Alethia HSV 1&2 à la LoD, ou en dessous, sauf un échantillon HSV-1 qui a été détecté à 7,20 x 10⁷ DICT₅₀/mL

REPRODUCTIBILITE DU TEST

Des études de reproductibilité ont été menées par trois des sept sites cliniques participants. Les laboratoires participants ont reçu des microplaques codées en aveugle de 18 (dix-huit) échantillons. Les échantillons furent triés au hasard sur chaque microplaque afin de masquer les identités. Les microplaques testées comprenaient des échantillons HSV-1 (souche HF) et HSV-2 (souche MS) préparés artificiellement, tels que des échantillons faiblement positifs (HSV-1: 2,16 x 10⁴ DICT₅₀/mL ou HSV-2: 4,80 x 10³ DICT₅₀/mL), échantillons faiblement positifs (HSV-1: 1,08 x 10⁴ DICT₅₀/mL ou HSV-2: 2,40 x 10³ DICT₅₀/mL), ou deux échantillons HSV-fictif négatifs (HSV-1 échantillon proche de la valeur seuil: 308 DICT₅₀/mL, HSV-1 fortement négatif: 29,7 DICT₅₀/mL; HSV-2 échantillon proche de la valeur seuil: 24 DICT₅₀/mL, HSV-2 fortement négatif: 2,2 DICT₅₀/mL). La microplaque comprenait également deux échantillons HSV-1 et HSV-2 négatifs, un contrôle positif et un contrôle négatif. Les tests ont été exécutés par des techniciens différents dans chaque centre, le même jour (variabilité intra-test), pendant cinq jours (variabilité inter-tests). Trois lots de Alethia HSV 1&2 et cinq instruments Alethia furent utilisés dans cette étude. Les contrôles positifs et négatifs furent testés avec chaque microplaque. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Résumé de l'étude de reproductibilité pour HSV-1								
Type d'échantillon	Site 1		Site 2		Site 3		Total	
	Concordance en pourcentage		Concordance en pourcentage		Concordance en pourcentage		Concordance en pourcentage	
HSV-1 Modérément positif	30/30	100,0%	30/30	100,0%	30/30	100,0%	90/90	100,0%
HSV-1 Faiblement positif	30/30	100,0%	30/30	100,0%	30/30	100,0%	90/90	100,0%
HSV-1 & HSV-2 Échantillon proche de la valeur seuil	20/30	66,7%	26/30	86,7%	20/30	66,7%	66/90	73,3%
HSV-1 & HSV-2 Fortement négatif	29/30	96,7%	30/30	100,0%	29/30	96,7%	88/90	97,8%
HSV-1 Négatif	60/60	100,0%	60/60	100,0%	60/60	100,0%	180/180	100,0%
Contrôle négatif	10/10	100,0%	10/10	100,0%	10/10	100,0%	30/30	100,0%
Contrôle positif	10/10	100,0%	10/10	100,0%	10/10	100,0%	30/30	100,0%

Résumé de l'étude de reproductibilité pour HSV-2								
Type d'échantillon	Site 1		Site 2		Site 3		Total	
	Concordance en pourcentage		Concordance en pourcentage		Concordance en pourcentage		Concordance en pourcentage	
HSV-2 Modérément positif	30/30	100,0%	30/30	100,0%	30/30	100,0%	90/90	100,0%
HSV-2 Faiblement positif	30/30	100,0%	30/30	100,0%	30/30	100,0%	90/90	100,0%
HSV-1 & HSV-2 Échantillon proche de la valeur seuil	25/30	83,3%	29/30	96,7%	25/30	83,3%	79/90	87,8%
HSV-1 & HSV-2 Fortement négatif	29/30	96,7%	30/30	100,0%	29/30	96,7%	88/90	97,8%
HSV-2 Négatif	60/60	100,0%	60/60	100,0%	60/60	100,0%	180/180	100,0%
Contrôle négatif	10/10	100,0%	10/10	100,0%	10/10	100,0%	30/30	100,0%
Contrôle positif	10/10	100,0%	10/10	100,0%	10/10	100,0%	30/30	100,0%

REACTIONS CROISEES

Des études de réactivité croisée ont employé des échantillons positifs (HSV-1 souche HF et HSV-2 souche MS) et des échantillons négatifs dans lesquels ont été inoculés des organismes bactériens et fongiques à une concentration minimum de $1,0 \times 10^6$ UFC/mL ($1,0 \times 10^6$ copies/mL où de l'ADN génomique était utilisé) ou des virus à une concentration minimum de $1,0 \times 10^5$ DICT₅₀/mL ($1,0 \times 10^6$ copies/mL où de l'ADN ou de l'ARN génomique était utilisé). Aucun des organismes suivants ou leur matériel génétique n'a réagi avec Alethia HSV 1&2 :

Acinetobacter calcoaceticus, *Acinetobacter lwoffii*, *Bacteroides fragilis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella pertussis*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida lusitanae*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* (ESBL), *Fusobacterium nucleatum*, *Gardnerella vaginalis*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae* (Type A), *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus acidophilus*, *Legionella pneumophila*, *Mobiluncus curtisii*, *Mobiluncus mulieris*, *Moraxella catarrhalis*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma orale*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma salivarium*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Prevotella melaninogenica*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus salivarius*, *Toxoplasma gondii*, *Treponema pallidum*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, Adénovirus, Coronavirus, Coxsackievirus, Cytomégalo-virus, Echovirus, Enterovirus, virus d'Epstein Barr, Influenza A , Influenza B, Hépatite B, Hépatite C, virus Herpès humain de type 6, 7, 8, virus de l'immunodéficience humaine de type 1, métapneumovirus humain, papillomavirus humain, virus de la rougeole, virus des oreillons, virus parainfluenza, virus respiratoire syncytial, virus de la rubéole, virus varicelle-zona.

L'ADN génomique humain était non réactif à $1,0 \times 10^6$ copies/mL. En outre, aucune inhibition compétitive n'a été observée entre les organismes énumérés ci-dessus et le test HSV-1 ou le test HSV-2 avec le dosage Alethia HSV 1&2

TESTS POUR LES SUBSTANCES INTERFERENTES

Un test d'interférence a été mené en présence de pires cas de concentrations de substances chimiques et biologiques introduites directement dans des échantillons positifs préparés artificiellement (souches HSV-1: McIn tyre et HF; souches HSV-2: G et MS) et des échantillons négatifs. Aucune interférence n'a été observée avec les substances suivantes:

- (1) A des concentrations de 7% poids/vol. ou vol./vol.: Abreva® (10% Docosanol), lotion de nettoyage hygiénique Balneol®, Carmex® Original Lip Balm (1,7% camphre, 0,7% menthol), Desitin® (40% oxyde de zinc), Douche (CVS Pharmacy® jetable), dentifrice au fluor (Crest®, 0,243% de fluorure de sodium), gélatine de marque K-Y®, Lanacane® (0,2% de chlorure de benzéthonium, 20% de benzocaïne), Lip Clear® Lysine+® (1,2% d'oxyde de zinc), Miconazole 3 (soulagement d'infections aux levures CVS™: 2% nitrate de miconazole nitrate), bain de bouche (Listerine® Original: 0,092% eucalyptol, 0,042% menthol, 0,060% salicylate de méthyle, 0,064% thymol), onguent hémorroïdal Préparation H® (14% huile minérale, 74,9% pétrolatum, 0,25% chlorhydrate de phényléphrine), Releev® (0,13% chlorure de benzalkonium), Tioconazole, Vagisil® Regular Strength (5% benzocaïne, 2% résorcinol), gel de traitement Yeast Guard® (*Candida albicans*, 27X HPUS; *Candida parapsilosis*, 27X HPUS; *Pulsatilla*, 27X HPUS), selles, liquide séminal, urine, sang total, couche leucoplaquettaire ('Buffy Coat')
- (2) A des concentrations de: 60 µg/mL – mucus (mucine, glande sous-maxillaire bovine type I-S); 1,25 mg/mL – fécule de maïs; 3,3 mg/mL – albumine; 5 mg/mL – acétaminophène, caséine, maléate de chlorphéniramine; 7 mg/mL – Acyclovir; 10 mg/mL – acide acétylsalicylique, hydrobromure de dextrométhorphan.

Il a été constaté que la caséine à des concentrations supérieures à 5 mg/mL interférait avec le test.

Le remède pour le rhume et le mal de gorge Cold-EEZE® (zincum gluconicum 2X) a été testé à 7% vol./vol. et a produit des résultats non valides dans tous les réplicats.



Ensayo de amplificación de ADN para la detección del virus del herpes simple tipo 1 y del virus del herpes simple tipo 2

REF 480650

IVD

R_x Only

USO INDICADO

El ensayo de amplificación de ADN Alethia HSV 1&2, que se realiza en el Alethia es una prueba cualitativa de diagnóstico in vitro para la detección directa y la diferenciación del ADN del virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1) y del virus del herpes simple tipo 2 (HSV-2) en muestras de lesiones cutáneas y mucocutáneas de pacientes masculinos y femeninos que se sospechan tener infecciones herpéticas.

El Alethia HSV 1&2 utiliza la tecnología de amplificación isotérmica de ADN mediante tallo-bucle (*loop-mediated isothermal DNA amplification*, LAMP) para la detección de HSV-1 y HSV-2 tomando como diana segmentos del genoma del virus del herpes simple tipo 1 y del virus del herpes simple tipo 2. Los resultados del Alethia HSV 1&2 se utilizan como ayuda para el diagnóstico de la infección por HSV en pacientes sintomáticos.

El ensayo ha sido concebido para su uso en laboratorios hospitalarios y laboratorios estatales o de referencia. Este dispositivo no ha sido concebido para ser utilizado en ámbitos clínicos fuera de un laboratorio.

PRECAUCION: El Alethia HSV 1&2 no ha sido aprobado por la FDA para ser utilizado con líquido cefalorraquídeo (LCR) ni como ayuda para el diagnóstico de infecciones por HSV en el sistema nervioso central (SNC). El dispositivo no ha sido concebido para el cribado prenatal.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

El Alethia HSV 1&2 se basa en la tecnología de amplificación isotérmica de ADN mediante tallo-bucle (LAMP).^{1,2} El ensayo toma como objetivos individuales regiones de los genomas del HSV-1 y del HSV-2 en dos dispositivos de prueba independientes. La diana para el HSV-1 es una secuencia de 208 pares de bases (pb) del gen de la glucoproteína G (US4) del HSV-1. La diana para el HSV-2 es una secuencia de 189 pb del gen de la glucoproteína G (US4) del HSV-2.

La amplificación mediante tallo-bucle utiliza cebadores especialmente diseñados para proporcionar una amplificación isotérmica de ADN continua y específica. Un subproducto de esta amplificación es el pirofosfato de magnesio, que forma un precipitado blanco que lleva a una solución de reacción turbia. Las características de absorbancia de la solución de reacción son monitorizadas por el incubador/lector Alethia de Meridian. Los cambios en las características de absorbancia de la solución de reacción creados por la precipitación del pirofosfato de magnesio indican la presencia del ADN diana. La ausencia del ADN diana tiene como resultado un cambio no significativo en la absorbancia de la muestra.

El kit Alethia HSV 1&2 incluye el aparato para la preparación de muestras III (SMP PREP III) Alethia, dispositivos de prueba Alethia HSV 1, dispositivos de prueba Alethia HSV 2, aceite mineral, tubos para el tratamiento térmico y pipetas de transferencia de 50 µL. El SMP PREP III Alethia, utilizado para la dilución y preparación de muestras, incluye una solución tamponada con Tris que contiene *E. coli* tratada con formol que alberga ADN de *Staphylococcus aureus*. El dispositivo de prueba Alethia HSV 1 contiene una microesfera de reactivo de amplificación liofilizado en cada una de las dos cámaras: una cámara de PRUEBA con cebadores específicos para HSV-1 y una cámara de CONTROL con cebadores específicos para *S. aureus*. El dispositivo de prueba Alethia HSV 2 contiene una microesfera de reactivo de amplificación liofilizado en cada una de las dos cámaras: una cámara de PRUEBA con cebadores específicos para HSV-2 y una cámara de CONTROL con cebadores específicos para *S. aureus*. El ADN de *S. aureus* en el SMP PREP III y los cebadores específicos para *S. aureus* en las cámaras de CONTROL de los dispositivos de prueba funcionan como control interno para el ensayo. Durante la preparación de las muestras, cada muestra del paciente se añade al SMP PREP III que contiene el control del ensayo y se combina con el ADN de *S. aureus* antes de la amplificación. La adición de ADN de *S. aureus* a la muestra del paciente permite el procesamiento paralelo del ADN diana y del ADN de control durante la amplificación y la detección. El control interno monitoriza la inhibición de la amplificación, el rendimiento de los reactivos del ensayo y la eficacia del procesamiento de la muestra. La diana de control *S. aureus* debe amplificarse y detectarse en la reacción final; en caso contrario, la prueba se considerará no válida y no se notificarán los resultados.

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

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

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

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

PRINCIPIOS BIOLOGICOS

El virus del herpes simple provoca infecciones crónicas y recurrentes y meningitis vírica en adultos y niños. La infección por el virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1) es relativamente frecuente, con una seroprevalencia global que se aproxima al 54% de la población de los Estados Unidos.³ El virus del herpes simple tipo 2 (HSV-2) es la causa principal del herpes genital. Se estima que 50 millones de personas en los EE. UU. y más de 400 millones de personas en todo el mundo están infectadas de herpes genital por el HSV-2, aproximadamente 1 de cada 5 personas.^{4,5} Aunque tanto el HSV-1 como el HSV-2 pueden causar infecciones bucales o genitales, el HSV-1 está habitualmente asociado a las lesiones bucales y el HSV-2 está habitualmente asociado a las lesiones genitales. Sin embargo, la frecuencia de las infecciones genitales por el HSV-1 está aumentando.^{3,6} La transmisión del HSV a los neonatos puede ocurrir durante el parto, causando síntomas que van desde la enfermedad diseminada (SNC y vísceras) a la infección en la piel, ojos y boca.⁷

La infección por HSV puede diagnosticarse mediante microscopía, cultivo celular, y métodos moleculares y serológicos;⁸ el cultivo celular y la PCR son los métodos diagnósticos preferidos y recomendados por los centros para la prevención y el control de enfermedades estadounidenses.⁴ La sensibilidad del cultivo vírico es baja, en particular para lesiones recurrentes o en curación, debido a la limitada cantidad de virus viable.⁴ El tipo de HSV no puede determinarse directamente del cultivo vírico, por lo que se requiere un método adicional de tipado (como ELVIS).⁸ Los métodos PAAN son más sensibles que el cultivo, tienen la capacidad de diferenciar entre los tipos de HSV y proporcionan resultados con más rapidez.⁸

REACTIVOS/MATERIALES PROPORCIONADOS

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

1. **Aparato para la preparación de muestras III (SMP PREP III) Alethia (artículo# 2792-02):** Solución tamponada con Tris que contiene *E. coli* tratada con formol que alberga ADN de *S. aureus* y azida sódica (0,09%) como conservante.
2. **Dispositivo de prueba Alethia HSV 1 (artículo# 2865):** Dispositivo de dos cámaras que contiene reactivos de amplificación liofilizados (ADN-polimerasa, trifosfatos de desoxirribonucleótidos) y, o bien cebadores específicos para HSV-1 (cámara de PRUEBA) o cebadores específicos para *S. aureus* (cámara de CONTROL).
3. **Dispositivo de prueba Alethia HSV 2 (artículo# 2870):** Dispositivo de dos cámaras que contiene reactivos de amplificación liofilizados (ADN-polimerasa, trifosfatos de desoxirribonucleótidos) y, o bien cebadores específicos para HSV-2 (cámara de PRUEBA) o cebadores específicos para *S. aureus* (cámara de CONTROL). **El dispositivo de prueba Alethia HSV 2 se identifica visualmente por una banda naranja en la pestaña de cierre del dispositivo de prueba.**
4. **Aceite mineral** (frasco con cuentagotas) (artículo# 14298-01)
5. **Tubos para el tratamiento térmico (TT) Alethia (artículo# 2335)**
6. **Pipetas de transferencia (artículo# 11523A)**

MATERIALES PROPORCIONADOS POR SEPARADO

Kit de control externo del Alethia HSV 1&2, número de catálogo: 479960

MATERIALES NO PROPORCIONADOS

1. Guantes desechables de látex, sin polvo
2. Puntas de pipeta resistentes a los aerosoles, sin ribonucleasa/desoxirribonucleasa
3. Medio de transporte de virus (2-3 mL): MicroTest™ M4®, MicroTest™ M4RT®, MicroTest™ M6™, UniTranz-RT™ Transport System, Copan UTM™ Virus Collection, HealthLink® UTM o medio de transporte idéntico*, BD Universal Viral Transport Medium (UVT), ViraTrans™ VTM, Hardy Diagnostics VTM.
**HealthLink UTM es equivalente a Quest V-C-M Medium*

EQUIPO NO PROPORCIONADO

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

PRECAUCIONES

1. Todos los reactivos son solamente para uso de diagnóstico in vitro.
2. Los medios de transporte de virus que contienen estabilizadores de las proteínas, como MicroTest™ M5® e hisopos de alginato cálcico, no son aceptables para la recogida y el transporte de muestras para el ensayo Alethia HSV 1&2.
3. No intercambie el aparato para la preparación de muestras ni los dispositivos de prueba de lotes diferentes. El aceite mineral y los tubos para el tratamiento térmico son intercambiables siempre y cuando se usen dentro de la fecha de caducidad asignada.
4. Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio y Bioseguridad de Nivel 2 durante la prueba.⁹ Trate todas las muestras y los dispositivos de prueba usados como capaces de transmitir agentes infecciosos. No coma, beba ni fume en las zonas donde se manejan los reactivos del equipo o las muestras.
5. Use guantes desechables cuando maneje las muestras y lávese bien las manos después.
6. Se deben emplear programas de Control de Calidad para Laboratorios de Prueba Molecular, incluyendo el uso y cuidado correctos del equipo.¹⁰
7. Los dispositivos de prueba Alethia HSV 1&2 contienen reactivos liofilizados. Las bolsas de protección no deberían abrirse hasta que se esté listo para realizar el ensayo.
8. Los dispositivos de prueba Alethia HSV 1&2 incluyen un sistema de cierre diseñado para evitar la contaminación de la zona de pruebas con el producto de amplificación. NO utilice dispositivos de prueba con cierres rotos.
9. Deseche los dispositivos de prueba usados Alethia HSV 1&2 inmediatamente después de su procesamiento, dejando el dispositivo bien cerrado. NO abra el dispositivo de prueba después de su procesamiento. Abrir el dispositivo después de la amplificación puede provocar una contaminación de la zona de pruebas con el producto de amplificación.
10. Cualquier incidente grave que haya podido producirse en relación con el producto debe notificarse a Meridian Bioscience, Inc., 3471 River Hills Drive, Cincinnati, Ohio 45244 EE. UU., o llamando al teléfono del Centro de Asistencia Técnica (1-800-343-3858), y a las autoridades competentes del Estado Miembro de la UE en el que resida el médico y/o el paciente.
11. IMPORTANTE: Consulte la FDS para obtener información adicional sobre la seguridad y los riesgos.

DECLARACIONES DE RIESGO Y PRECAUCIÓN

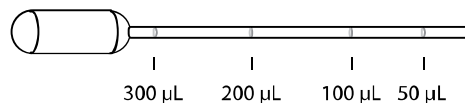
No se conoce ningún riesgo asociado con este producto

VIDA UTIL Y ALMACENAMIENTO

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

NOTAS PARA EL PROCEDIMIENTO

La pipeta de transferencia incluida en el kit Alethia HSV 1&2 tiene un envoltorio individual y puede dispensar hasta 50 µL. Se incluye más abajo un diagrama de la pipeta.



PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Asegúrese de que los reactivos del equipo están a temperatura ambiente (19 - 30 C) antes de su uso. Se pueden obtener resultados incorrectos si los reactivos no están a temperatura ambiente antes del uso.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Tipo de muestra: Muestras en hisopo de lesiones cutáneas y mucocutáneas humanas en medios de transporte de virus. Los siguientes medios de transporte de virus son aceptables para su utilización: MicroTest™ M4®, MicroTest™ M4RT®, MicroTest™ M6™, UniTranz-RT™ Transport System, Copan UTM™ Virus Collection, HealthLink® UTM o medio de transporte idéntico*, BD Universal Viral Transport Medium (UVT), ViraTrans™ VTM, Hardy Diagnostics VTM.

**HealthLink UTM es equivalente a Quest V-C-M Medium*

NOTA: Los medios de transporte de virus que contienen estabilizadores de las proteínas, como MicroTest™ M5® e hisopos de alginato cálcico, no son aceptables para su utilización con estos tipos de muestras.

Toma de muestras: La recogida de muestras de lesiones cutáneas y mucocutáneas debe realizarse de acuerdo con las directrices institucionales para la recogida de muestras clínicas en la infección por el virus del herpes simple.

Ponga el hisopo o hisopos en un medio de transporte de virus. Las muestras deben almacenarse refrigeradas (2 C-8 C) tras su recogida y durante el transporte al laboratorio. Las muestras deben evaluarse lo antes posible, aunque pueden almacenarse refrigeradas (2 C-8 C) durante un máximo de 7 días antes de ser evaluadas. No congele las muestras. No almacene a temperatura ambiente.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

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

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

1. Mezcle en vórtex el hisopo incluido en el medio de transporte durante aproximadamente 45-60 segundos.
2. Utilizando una pipeta de transferencia, transfiera 50 µL del medio del hisopo a un SMP PREP III Alethia. Deseche la pipeta de transferencia. Etiquete el SMP PREP con la identificación de la muestra.
3. Vuelva a colocar la tapa del SMP PREP III y mezcle en vórtex durante aproximadamente 10 segundos.
4. Retire la tapa de la punta del SMP PREP III e introduzca apretando todo el contenido del SMP PREP III en un tubo para el tratamiento térmico. Etiquete el tubo con la identificación de la muestra.
5. Repita los pasos de PREPARACIÓN DE LA MUESTRA para todas las muestras que se vayan a procesar. Las muestras procesadas pueden mantenerse hasta 2 horas a temperatura ambiente (19 C - 30 C) antes del tratamiento térmico.
6. Caliente cada tubo para tratamiento térmico que contenga una muestra en un baño seco/bloque de calor a 95 ± 5 C durante 10 ± 2 minutos. Monitoree el tratamiento térmico con un termómetro digital y un temporizador de intervalos.
7. Saque cada tubo de tratamiento térmico del baño seco/bloque de calor. Las muestras tratadas térmicamente pueden mantenerse a temperatura ambiente (19 C - 30 C) durante un máximo de 15 minutos antes de ser evaluadas.

NOTA: La cantidad de muestra preparada al final de la PREPARACIÓN DE LA MUESTRA es suficiente para completar tanto la evaluación Alethia HSV 1 como la HSV 2.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

NOTA: Se pueden procesar un máximo de 5 muestras tanto para HSV 1 como para HSV 2 en cada proceso del Alethia. **Los dispositivos de prueba HSV 2 se identifican por una banda naranja en la pestaña de cierre del dispositivo de prueba.**

1. Mezcle en vórtex las muestras tratadas térmicamente durante aproximadamente 10 segundos.
2. Utilice 1 dispositivo de prueba Alethia HSV 1 y 1 dispositivo de prueba Alethia HSV 2 por muestra. Retire los dispositivos de sus bolsas de protección. Abra el dispositivo con cuidado, levantando el cierre y sujetando las cámaras de modo que el reactivo liofilizado no se caiga al abrirlo. Coloque los dispositivos en una superficie plana o en una gradilla que pueda albergar los dispositivos.
3. Utilizando una micropipeta, transfiera 50 µL de la muestra tanto a la cámara de PRUEBA (lado izquierdo/Perla Blanca) como a la cámara de CONTROL (lado derecho/Perla Amarilla) de los dispositivos de prueba HSV 1 y HSV 2 Alethia. No mezcle las reacciones con pipeta. Tenga cuidado de no introducir aire en las mezclas de reacción.
4. Añada 1 gota de aceite mineral tanto a la cámara de PRUEBA como a la cámara de CONTROL de los dispositivos de prueba Alethia HSV 1 y HSV 2. Cierre los dispositivos de prueba Alethia y asegure bien los cierres.
5. Dé unos golpecitos en la parte plana superior de cada dispositivo o mezcle para quitar las burbujas de aire. Examine con cuidado en cada dispositivo de prueba la rehidratación de las microesferas de control y de prueba, la presencia de burbujas de aire en la cámara y de líquido en la parte superior del dispositivo. Si advierte microesferas sin disolver, burbujas de aire o líquido en la parte superior del dispositivo, dé unos golpecitos en la parte plana superior del dispositivo y repita la inspección visual. La amplificación y la detección deben comenzar en un plazo de 15 minutos.
6. Repita los pasos del PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA para todas las muestras que se vayan a evaluar.
7. Introduzca los dispositivos de prueba Alethia en el Alethia e inicie el proceso. Los resultados se mostrarán al final del proceso.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

ID de la muestra	Reported Result	Interpretación
Muestra de la paciente	POSITIVO	DISPOSITIVO DE PRUEBA HSV 1: La muestra contiene el ADN diana del HSV-1. DISPOSITIVO DE PRUEBA HSV 2: La muestra contiene el ADN diana del HSV-2.
	NEGATIVO	DISPOSITIVO DE PRUEBA HSV 1: No se ha detectado el ADN diana del HSV-1. DISPOSITIVO DE PRUEBA HSV 2: No se ha detectado el ADN diana del HSV-2.
	NO VÁLIDO	Sin resultados notificables. Repita la prueba usando la muestra de la paciente original. Muestra de la paciente inhibitoria, preparación de la muestra inadecuada, fallo del reactivo, fallo del instrumento a fallo de control interno.
Control positivo	POSITIVO	Resultado de control positivo válido. Reactivos activos en el momento del uso, el Alethia funciona correctamente.
	NEGATIVO	Resultado de control incorrecto. Repita la prueba de control como primer paso para determinar la causa de la falla. Si se repite la falla luego de repetir el control contacte el Departamento de Servicios Técnicos de Meridian al 1-800-343-3858 (USA) o su distribuidor local.
	NO VÁLIDO	Sin resultados notificables. Repita 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. Preparación de la muestra inadecuada, fallo del reactivo, fallo del instrumento o fallo de control interno.
Control negativo	POSITIVO	Resultado de control incorrecto. Repita la prueba de control como primer paso para determinar la causa de la falla. Si se repite la falla luego de repetir el control contacte el Departamento de Servicios Técnicos de Meridian al 1-800-343-3858 (USA) o su distribuidor local.
	NEGATIVO	Resultado de control negativo válido. Reactivos activos en el momento del uso, el Alethia funciona correctamente.
	NO VÁLIDO	Sin resultados notificables. 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. Preparación de la muestra inadecuada, fallo del reactivo, fallo del instrumento o fallo de control interno.
POCILLO VACIO	NINGUNO	No hay ningún dispositivo de prueba de Alethia en el pocillo del Alethia. O El dispositivo de prueba del Alethia no funciona bien debido a un fallo en la preparación de la muestra o a que el dispositivo está sucio o mal colocado. Repita la prueba usando la muestra original.

CONTROL DE CALIDAD

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

1. Cada dispositivo contiene un control interno que controla la inhibición de la amplificación, la eficacia de los reactivos del ensayo y el procesamiento de la muestra. En el SMP PREP III hay ADN de control interno que se procesa durante todos los pasos del procedimiento. En la cámara de control del dispositivo de prueba Alethia existen cebadores para la amplificación del ADN de control interno.
2. El tratamiento térmico se monitoriza con un termómetro externo y un temporizador de intervalos. Use la memoria de temperatura máx./mín. del termómetro para asegurarse de que se mantenga una temperatura de 95 ± 5 C. Use el temporizador de intervalos para asegurarse de que la duración del tratamiento térmico sea de 10 ± 2 minutos.
3. Las buenas prácticas de laboratorio recomiendan el uso de materiales de control. Los usuarios deberían seguir las directrices federales, estatales y locales adecuadas relativas a la ejecución de controles de calidad externos.
4. *Los reactivos de control externo* Alethia HSV 1&2 se suministran por separado (número de catálogo 479960). Se recomienda que la reactividad de cada nuevo lote y de cada nuevo envío de Alethia HSV 1&2 se verifique a la recepción o antes de su uso. Se deberían realizar pruebas de control externo a partir de ese momento, de conformidad con las directrices federales, estatales y locales adecuadas. El kit de prueba Alethia HSV 1&2 no debería utilizarse en pacientes si los controles externos no ofrecen los resultados correctos.
5. Se debe utilizar un dispositivo de prueba independiente para cada reactivo de control externo.

VALORES ESPERADOS

La prevalencia de HSV-1 y de HSV-2 se calculó durante los estudios clínicos realizados en 2014-2015 según la edad del paciente y la localización anatómica de las lesiones. La incidencia global durante el estudio fue del 20,5% (237/1155) para el HSV-1 y del 19,4% (224/1156) para el HSV-2. Se ofrecen a continuación datos de prevalencia específicos.

Estudio combinado - Prevalencia cutánea según la localización anatómica de la muestra (N=306)						
Fuente	HSV 1			HSV 2		
	Número total	Total positivos	Prevalencia	Número total	Total positivos	Prevalencia
Genital -- Pene	92	7	7,6%	92	28	30,4%
Lesión cutánea	214	47	22,0%	214	27	12,6%

Estudio combinado - Prevalencia mucocutánea según la localización anatómica de la muestra						
Fuente	HSV-1 (N=849)			HSV-2 (N=850)		
	Número total	Total positivos	Prevalencia	Número total	Total positivos	Prevalencia
Anorectal	47 (1*)	7	14,9%	46 (2*)	9	19,6
Genital -- Vaginal/Cervical	624 (2*)	112	17,9%	626	158	25,2%
Nasal	18	9	50,0%	18	0	0,0%
Ocular	20	0	0,0%	20	0	0,0%
Lesión bucal	135	54	40,0%	135	2	1,5%
Urethral	5	1	20,0%	5	0	0,0%

* Número de muestras que producen un resultado de Alethia no válido, las cual no se pueden resolver, de manera que se excluyeron del análisis.

Estudio combinado - Prevalencia cutánea por edad (N=306)						
Edad	HSV-1 (N=306)			HSV-2 (N=306)		
	Número total	Total positivos	Prevalencia	Número total	Total positivos	Prevalencia
≤ 5 años	38	12	31.6%	38	1	2.6%
6 a 11 años	14	7	50.0%	14	1	7.1%
12 a 21 años	51	14	27.5%	51	4	7.8%
22 a 59 años	166	18	10.8%	166	36	21.7%
≥ 60 años	37	3	8.1%	37	13	35.1%
No indicada	0	0	0.0%	0	0	0.0%

Estudio combinado - Prevalencia mucocutánea por edad						
Edad	HSV-1 (N=849)			HSV-2 (N=850)		
	Número total	Total positivos	Prevalencia	Número total	Total positivos	Prevalencia
≤ 5 años	47	8	17.0%	47	0	0.0%
6 a 11 y años	12	0	0.0%	12	0	0.0%
12 a 21 años	174 (1*)	46	26.4%	175	42	24.0%
22 a 59 años	550 (1*)	111	20.2%	551	116	21.1%
≥ 60 años	63 (1*)	18	28.6%	63 (1*)	11	17.5%
No indicada	3	0	0.0%	2 (1*)	0	0.0%

* Número de muestras que producen un resultado de Alethia no válido, las cual no se pueden resolver, de manera que se excluyeron del análisis.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- 1. El rendimiento de Alethia HSV 1&2 se ha establecido únicamente con muestras prospectivas de lesiones cutáneas y mucocutáneas en hombres y mujeres. No se ha establecido el rendimiento con otros tipos de muestras (muestras congeladas o LCR).
- 2. El ensayo no ha sido concebido para ser utilizado para el cribado prenatal.
- 3. Los medicamentos que contienen el ingrediente activo Zincum Gluconicum (gluconato de cinc) produjeron resultados no válidos cuando se evaluaron al 7% v/v con Alethia HSV 1&2. No se evaluaron concentraciones más bajas. El efecto del Zincum Gluconicum sobre los resultados de Alethia HSV 1&2 no se ha determinado utilizando muestras clínicas.
- 4. Se constató que la caseína a una concentración mayor de 5 mg/mL interfiere en el ensayo Alethia HSV 1&2.
- 5. Dado a resultados confirmados inaceptables, almacenamiento de refrigeración (2-8°C) no será considerado una condición de almacenamiento aceptable para muestras procesadas en SMP PREP III para ser probadas en la prueba de amplificación de ADN Alethia HSV 1&2.
- 6. Resultados negativos no indican que no hay infección y no se debe tomar como base única para el tratamiento u otras decisiones acerca del maejo del paciente. Este producto solo se puede utilizar con el instrumento Alethia.
- 7. El ensayo Alethia HSV 1&2 es un ensayo cualitativo y no proporciona valores cuantitativos ni información sobre la cantidad de microorganismo.
- 8. La detección de ácidos nucleicos depende de una obtención, manipulación, transporte, almacenamiento y preparación adecuados de las muestras. El no seguir el procedimiento adecuado en cualquiera de estos pasos puede dar lugar a resultados incorrectos.
- 9. Los ácidos nucleicos de los microorganismos pueden persistir *in vivo*, independientemente de la viabilidad del microorganismo. El ensayo Alethia HSV 1&2 no distingue entre microorganismos viables y no viables.
- 10. Al igual que sucede con todas las pruebas de diagnóstico moleculares: (A) pueden producirse falsos resultados negativos debido a la presencia de inhibidores, mutaciones o polimorfismo en las regiones de punto de HSV, a errores técnicos, a la mezcla de muestras o al escaso número de microorganismos presentes en la muestra clínica; (B) pueden producirse falsos resultados positivos debido a la presencia de contaminación cruzada con los microorganismos objetivo, con sus ácidos nucleicos o con el producto amplificado, así como por señales inespecíficas.

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

Las características de rendimiento del ensayo de amplificación de ADN Alethia HSV 1&2 se determinaron en los estudios clínicos realizados entre octubre de 2014 y marzo de 2015 en siete centros independientes de pruebas clínicas que representaban cuatro regiones geográficamente diferenciadas de los Estados Unidos. Las características de rendimiento del ensayo se compararon con el método de referencia, ELVIS® HSV ID and D³ Typing Test System.

Las muestras incluyeron hisopos frescos de lesiones cutáneas y mucocutáneas de pacientes en quienes se sospechaba una infección por el virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1) o tipo 2 (HSV-2). Las muestras clasificadas como cutáneas incluyeron las lesiones en la piel y genitales-pene. Las muestras categorizadas como mucocutáneas incluyeron las localizaciones anorrectal, genital-vaginal/cervical, nasal, ocular, bucal y uretral.

Se evaluaron un total de 1158 muestras sobrantes anonimizadas idóneas en hisopo de lesiones en hombres y mujeres sintomáticos. Las muestras se obtuvieron de pacientes con edades comprendidas entre 1 día y 89 años. De las 1158 muestras elegibles, 1156 muestras dieron resultados validos en la prueba de ELVIS. La prueba ELVIS HSV ID and D Typing Test System no puede detectar HSV-1 si HSV-2 ha sido identificado primero en una co-infección. De manera que si una muestra era HSV-2 positiva con ELVIS, dicha muestra fue retirada de las calculaciones de características de ejecución para HSV-1. Ciento ochenta y una (181) muestras fueron identificadas como positivas para HSV-2 con ELVIS y fueron retiradas del análisis de datos para HSV-1. En adición, una muestra probada por la prueba de amplificación del ADN Alethia HSV 1&2 inicialmente dio un resultado invalido y no se pudo repetir la prueba; esta muestra fue retirada del análisis de datos para HSV-1. De manera que 974 muestras fueron incluidas en el análisis de datos para HSV-1. De 1156 muestras que dieron resultados validos con ELVIS, una muestra de HSV-2 probada por la prueba de amplificación del ADN Alethia HSV 1&2 inicialmente dio un resultado invalido y no se pudo repetir la prueba; esta muestra fue retirada del análisis de datos para HSV-2. De manera que un total de 1155 resultados de muestras fueron incluidos en el análisis de datos para HSV-2. Las tablas proveen un resumen de la ejecución de la prueba de amplificación del ADN Alethia HSV 1&2 con todas las localidades combinadas

Se realizaron pruebas en un total de 723 (74,3%) muestras de mujeres y 247 (25,3%) muestras de hombres fueron probadas para el HSV-1 y en un total de 873 (75,6%) muestras de mujeres y 277 (24,0%) muestras de hombres fueron probadas para el HSV-2. No se dispuso de información sobre el sexo para cuatro (4) muestras de HSV-1 (0,4%) y cinco (5) muestras de HSV-2 (0,4%). No se espera que el rendimiento del ensayo se vea influido por el sexo.

Localizaciones combinadas: Cutáneas HSV-1 (N=264)

		Método de referencia			Alethia	Rendimiento			
		Pos	Neg	Total					95% CI
Alethia HSV 1&2	Pos	48	6 ^a	54	0 (0)	Sensitividad	48/51	94.1%	84.1-98.0%
	Neg	3 ^b	207	210	0 (0)	Especificidad	207/213	97.2%	94.0-98.7%
	Total	51	213	264	0 (0)				

^a 6/6 muestras identificadas como positivas para HSV-1 por un ensayo molecular alternativo autorizado por la FDA.
^b 1/3 muestras identificadas como negativas para HSV-1 por un ensayo molecular alternativo autorizado por la FDA.
^c Resultados inicialmente inválidos están reportados dentro del paréntesis. El número final de resultados inválidos que restan luego de repetir la prueba están al frente del paréntesis.

Localizaciones combinadas: Mucocutáneas HSV-1 (N=710)

		Método de referencia			Alethia	Rendimiento			
		Pos	Neg	Total					95% CI
Alethia HSV 1&2	Pos	152	28 ^b	180	0 (1)	Sensitividad	152/160	95.0%	90.5-97.5%
	Neg	8 ^c	522	530	0 (5)	Especificidad	522/550	94.9%	92.7-96.5%
	Total	160	550	710	0 (6) ^a				

^a Inicialmente habían 6 muestras invalidas (INV) por Alethia. Cinco repitieron como Alethia negativas (ELVIS negativas); una repitió como Alethia HSV-1 positiva (ELVIS HSV-1 positiva).
^b 19/28 muestras fueron identificadas como positivas para HSV-1 por un ensayo molecular alternativo autorizado por la FDA; 3 muestras no pudieron ser evaluadas.
^c 7/8 muestras fueron identificadas como negativas para HSV-1 por un ensayo molecular alternativo autorizado por la FDA; 1 muestra no pudo ser evaluada.
^d Resultados inicialmente inválidos están reportados dentro del paréntesis. El número final de resultados inválidos que restan luego de repetir la prueba están al frente del paréntesis.

Localizaciones combinadas: Cutáneas HSV-2 (N=306)

		Método de referencia			Alethia	Rendimiento			
		Pos	Neg	Total					95% CI
Alethia HSV 1&2	Pos	42	13 ^b	55	0 (0)	Sensitividad	42/42	100%	91.6-100.0%
	Neg	0	251	251	0 (1)	Especificidad	251/264	95.1%	91.8-97.1%
	Total	42	264	306	0 (1) ^a				

^a Inicialmente hubo una muestra invalida (INV) por Alethia. La muestra repitió como Alethia negativa (ELVIS negativa)
^b 8/13 muestras fueron identificadas como positivas para HSV-2 por un ensayo molecular alternativo autorizado por la FDA; 1 muestra no pudo ser evaluada.
^c Resultados inicialmente inválidos están reportados dentro del paréntesis. El número final de resultados inválidos que restan luego de repetir la prueba están al frente del paréntesis.

Localizaciones combinadas: Mucocutáneas HSV-2 (N=849)

		Método de referencia			Alethia	Rendimiento			
		Pos	Neg	Total	INV ^a				95% CI
Alethia HSV 1&2	Pos	137	31 ^b	168	0 (0)	Sensitividad	137/139	98.6%	94.9-99.6%
	Neg	2 ^c	679	681	0 (1)	Especificidad	679/710	95.6%	93.9-96.9%
	Total	139	710	849	0 (1) ^a				

^a Inicialmente hubo una muestra invalida (INV) por Alethia. La muestra repitió como Alethia negativa (ELVIS negativa).

^b 24/31 muestras fueron identificadas como positivas para HSV-2 por un ensayo molecular alternativo autorizado por la FDA; 4 muestras no pudieron ser evaluadas.

^c 1/2 muestras fueron identificadas como negativas para HSV-2 por un ensayo molecular alternativo autorizado por la FDA.

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

SENSIBILIDAD ANALITICA

La sensibilidad analítica o límite de detección (LdD) se determinó utilizando dos cepas de HSV-1 y dos cepas de HSV-2. El LdD se confirmó utilizando 60 copias y una determinada probabilidad (p. ej., 95%, donde 57/60 copias son positivas) de obtener respuestas positivas.

Cepa de HSV	LdD (TCID ₅₀ /mL)
HSV-1 HF (VR-260)	7,20 x 10 ³
HSV-1 McIntyre (VR-539)	9,89 x 10 ⁴
HSV-2 G (VR-734)	1,20 x 10 ³
HSV-2 MS (VR-540)	1,60 x 10 ³

El LdD final asignado al ensayo es 9,89 x 10⁴ TCID₅₀/mL para HSV-1 y 1,60 x 10³ TCID₅₀/mL para HSV-2.

Además, veinte (20) muestras clínicas de HSV-1 y veinte (20) muestras clínicas de HSV-2 de diferentes localizaciones anatómicas (esto es, bucal, genital, anorrectal, etc.) fueron evaluadas en el LdD del ensayo para HSV-1 (9,89 x 10⁴ TCID₅₀/mL) y para HSV-2 (1,60 x 10³ TCID₅₀/mL). Todas las muestras clínicas fueron detectadas por el ensayo Alethia HSV 1&2 en el LdD o con un valor inferior, excepto una muestra de HSV-1, que se detectó a 7,20 x 10⁷ TCID₅₀/mL.

REPRODUCIBILIDAD

Tres de los siete centros clínicos participantes realizaron estudios de reproducibilidad. Se suministraron paneles con dieciocho (18) muestras codificadas con enmascaramiento a los laboratorios participantes. Las muestras se distribuyeron aleatoriamente dentro de cada panel para enmascarar las identidades de las muestras. Los paneles incluyeron muestras artificiales de HSV-1 (cepa HF) y de HSV-2 (cepa MS) fabricadas como positivas moderadas (HSV-1: 2,16 x 10⁴ TCID₅₀/mL o HSV-2: 4,80 x 10³ TCID₅₀/mL), positivas bajas (HSV-1: 1,08 x 10⁴ TCID₅₀/mL o HSV-2: 2,40 x 10³ TCID₅₀/mL), y dos muestras artificiales negativas de HSV (HSV-1 cerca del corte de detección: 308 TCID₅₀/mL, HSV-1 negativa alta: 29,7 TCID₅₀/mL; HSV-2 cerca del corte de detección: 24 TCID₅₀/mL, HSV-2 negativa alta: 2,2 TCID₅₀/mL). El panel incluía también dos muestras negativas para HSV-1 y HSV-2 y un control positivo y negativo. La prueba fue realizada por diferentes operadores en cada centro el mismo día (variabilidad intraensayo) durante cinco días (variabilidad interensayo). En este estudio se utilizaron tres lotes de Alethia HSV 1&2 y cinco instrumentos Alethia. Se evaluaron los controles positivos y negativos con cada panel. Los resultados aparecen en la tabla que sigue:

Resumen de los estudios de reproducibilidad para el HSV-1								
Tipo de muestra	Centro 1		Centro 2		Centro 3		Total	
	Porcentaje de concordancia		Porcentaje de concordancia		Porcentaje de concordancia		Porcentaje de concordancia	
HSV-1 Positiva moderada	30/30	100,0%	30/30	100,0%	30/30	100,0%	90/90	100,0%
HSV-1 Positiva baja	30/30	100,0%	30/30	100,0%	30/30	100,0%	90/90	100,0%
HSV-1 & HSV-2 Cerca del corte de detección	20/30	66,7%	26/30	86,7%	20/30	66,7%	66/90	73,3%
HSV-1 & HSV-2 Negativa alta	29/30	96,7%	30/30	100,0%	29/30	96,7%	88/90	97,8%
HSV-1 Negativa	60/60	100,0%	60/60	100,0%	60/60	100,0%	180/180	100,0%
Negative Control	10/10	100,0%	10/10	100,0%	10/10	100,0%	30/30	100,0%
Positive Control	10/10	100,0%	10/10	100,0%	10/10	100,0%	30/30	100,0%

Resumen de los estudios de reproducibilidad para el HSV-2								
Tipo de muestra	Centro 1		Centro 2		Centro 3		Total	
	Porcentaje de concordancia		Porcentaje de concordancia		Porcentaje de concordancia		Porcentaje de concordancia	
HSV-2 Positiva moderada	30/30	100,0%	30/30	100,0%	30/30	100,0%	90/90	100,0%
HSV-2 Positiva baja	30/30	100,0%	30/30	100,0%	30/30	100,0%	90/90	100,0%
HSV-1 & HSV-2 Cerca del corte de detección	25/30	83,3%	29/30	96,7%	25/30	83,3%	79/90	87,8%
HSV-1 & HSV-2 Negativa alta	29/30	96,7%	30/30	100,0%	29/30	96,7%	88/90	97,8%
HSV-2 Negativa	60/60	100,0%	60/60	100,0%	60/60	100,0%	180/180	100,0%
Negative Control	10/10	100,0%	10/10	100,0%	10/10	100,0%	30/30	100,0%
Positive Control	10/10	100,0%	10/10	100,0%	10/10	100,0%	30/30	100,0%

ESTUDIOS DE REACTIVIDAD CRUZADA

Los estudios de reactividad cruzada utilizaron muestras positivas (cepa HF del HSV-1 y cepa MS del HSV-2) y negativas inoculadas con bacterias u hongos a una concentración mínima de $1,0 \times 10^6$ UFC/mL ($1,0 \times 10^6$ copias/mL cuando se utilizó ADN genómico) o virus a una concentración mínima de $1,0 \times 10^5$ TCID₅₀/mL ($1,0 \times 10^6$ copias/mL cuando se utilizaron ADN o ARN genómicos). Ninguno de los microorganismos siguientes, o su material genético, reaccionaron con Alethia HSV 1&2:

Acinetobacter calcoaceticus, *Acinetobacter lwoffii*, *Bacteroides fragilis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella pertussis*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida lusitanae*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* (ESBL), *Fusobacterium nucleatum*, *Gardnerella vaginalis*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae* (Type A), *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus acidophilus*, *Legionella pneumophila*, *Mobiluncus curtisii*, *Mobiluncus mulieris*, *Moraxella catarrhalis*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma orale*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma salivarium*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Prevotella melaninogenica*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus salivarius*, *Toxoplasma gondii*, *Treponema palladium*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, Adenovirus, Coronavirus, Coxsackievirus, Cytomegalovirus, Echovirus, Enterovirus, Epstein Barr virus, Influenza A virus, Influenza B virus, Hepatitis B virus, Hepatitis C virus, Human herpes 6 virus, Human herpes 7 virus, Human herpes 8 virus, Human immunodeficiency virus type 1, Human metapneumovirus, Human papilloma virus, virus del sarampión, virus de las paperas, Parainfluenza virus, virus sincitial respiratorio, Rubella virus, Varicella zoster virus.

El ADN genómico humano fue no reactivo a una concentración de $1,0 \times 10^6$ copias/mL. En adición, no se observó inhibiciones competitivas entre los organismos listados arriba y HSV-1 o HSV-2 con la prueba Alethia HSV 1&2.

PRUEBAS PARA SUSTANCIA INTERFERENTES

Se realizaron pruebas de interferencia en presencia de sustancias químicas y biológicas a las concentraciones más desfavorables introducidas directamente en muestras artificiales positivas (cepas HSV-1: McIntyre y HF; cepas HSV-2: G y MS) y negativas. No se observaron interferencias con las siguientes sustancias:

- (1) A concentraciones del 7% w/v o v/v: Abreva® (docosanol 10%), Balneol® Hygienic Cleansing Lotion, Carmex® Original Lip Balm (alcanfor 1,7%, mentol 0,7%), Desitin® (óxido de cinc 40%), Douche (CVS Pharmacy® Disposable), dentífrico con flúor (Crest®, fluoruro de sodio 0,243%), K-Y® Brand Jelly, Lanacane® (cloruro de bencetonio 0,2%, benzocaína 20%), Lip Clear® Lysine+® (óxido de cinc 1,2%), Miconazole 3 (CVS™ Yeast Infection Relief: miconazol nitrato 2%), enjuague bucal (Listerine® Original: eucalipto 0,092%, mentol 0,042%, salicilato de metilo 0,060%, timol 0,064%), Preparation H®, Hemorrhoidal Ointment (aceite mineral 14%, vaselina 74,9%, fenilefrina hidrocloreto 0,25%), Releev® (cloruro de benzalconio 0,13%), tioconazol, Vagisil® Regular Strength (benzocaína 5%, resorcinol 2%), Yeast Guard® Gel Treatment (Candida albicans, 27X HPUS; Candida parapsilosis, 27X HPUS; Pulsatilla, 27X HPUS), heces, líquido seminal, orina, sangre completa, Capa leucocitaria.
- (2) A concentraciones de: 60 µg/mL – moco (mucina, glándula submaxilar bovina tipo I-S); 1,25 mg/mL – almidón de maíz; 3,3 mg/mL – albúmina; 5 mg/mL – paracetamol, caseína, clorfenamina maleato; 7 mg/mL – aciclovir; 10 mg/mL – ácido acetilsalicílico, bromhidrato de dextrometorfano.

Se constató que la caseína a una concentración mayor de 5 mg/mL interfiere en el ensayo.

Cold-EEZE® Cold Remedy plus Sore Throat (zincum gluconicum 2X) se evaluó al 7% v/v y produjo resultados no válidos en todas las copias.



DNS-Amplifikationstest zum Nachweis von Herpes-Simplex-Virustyp 1 und Herpes-Simplex-Virustyp 2

REF 480650

IVD

Rx Only

VERWENDUNGSZWECK

Der am Alethia® Reader durchgeführte Alethia HSV 1&2 DNS-Amplifikationstest, ist ein qualitativer in-vitro-Diagnostiktest für den direkten Nachweis und die Differenzierung zwischen DNA von Herpes-Simplex-Virustyp 1 (HSV-1) und Herpes-Simplex-Virustyp 2 (HSV-2) in Proben aus kutanen und mukokutanen Läsionen männlicher und weiblicher Patienten, bei denen der Verdacht einer Herpesinfektion besteht.

Der Alethia HSV 1&2 Assay verwendet die Technologie der „Loop-mediated Isothermal DNA Amplification“ (LAMP) ^{1, 2}, um HSV-1 und HSV-2 durch gezielte Amplifikation spezifischer Genomabschnitte von Herpes-Simplex-Virus 1 und Herpes-Simplex-Virus 2 nachzuweisen. Die Ergebnisse des Alethia HSV 1&2 Assays helfen bei der Diagnose von HSV-Infektionen in symptomatischen Patienten.

Der Assay ist für den Einsatz in medizinischen Laboren, staatlichen Laboren oder Referenzlaboren vorgesehen. Der Test ist nicht für eine außerhalb des Labors durchgeführte „Point-of-Care-Diagnostik“ (am Krankenbett, Arztpraxis) geeignet.

WARNUNG: Für Liquor cerebrospinalis oder für die Diagnose einer HSV-Infektion des zentralen Nervensystems (ZNS) ist **der** Alethia HSV 1&2 Assay nicht von der FDA freigegeben. Der Test kann nicht für das pränatale Screening verwendet werden.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DES TESTS

Der Alethia HSV 1&2 Assay basiert auf der Technologie der „Loop-mediated Isothermal Amplification“ (LAMP) ^{1, 2}. In zwei getrennten Testansätzen werden jeweils spezifische Genomabschnitte von HSV-1 und HSV-2 amplifiziert. Die Zielsequenz von HSV-1 ist ein 208 Basenpaare (bp) großes Stück des Gens HSV-1-Glykoprotein-G (US4). Zum Nachweis des HSV-2 dient eine 189 bp große Sequenz des Gens HSV-2-Glykoprotein-G (US4).

Bei der „Loop-mediated Isothermal Amplification“ werden spezielle Primer verwendet, um eine spezifische und kontinuierliche isotherme DNS-Amplifikation zu erzielen. Ein Nebenprodukt der Amplifikation ist Magnesiumpyrophosphat, das einen weißen Niederschlag bildet, wodurch eine trübe Reaktionslösung entsteht. Die Absorption- der Reaktionslösung wird vom Meridian Alethia-Inkubator/-Lesegerät überwacht. Die durch den Niederschlag von Magnesiumpyrophosphat erzeugte Trübung der Reaktionslösung deutet auf die Anwesenheit der Ziel-DNS hin. Die Abwesenheit von Ziel-DNS bewirkt keine signifikante Änderung der Absorption des Probenmaterials.

Das Alethia HSV 1&2-Kit enthält den Alethia Probenvorbereitungsapparat III (SMP PREP III), Alethia HSV 1-Analysegefäße, Alethia HSV 2-Analysegefäße, Mineralöl, Hitzebehandlungsröhrchen und 50-µL-Transferpipetten. Der zur Probenverdünnung und -vorbereitung verwendete Alethia SMP PREP III ist mit einer Tris-gepufferten Lösung gefüllt, die mit Formalin behandelte *E. coli* enthält, die DNS von *Staphylococcus aureus* beinhalten. Das Alethia HSV 1-Analysegefäß besteht aus zwei Kammern, die jeweils eine Kugel aus lyophilisiertem Amplifikationsreagenz enthalten: einer TEST-Kammer mit HSV-1-spezifischen Primern und einer KONTROLL-Kammer mit *S. aureus*-spezifischen Primern. Das Alethia HSV 2-Analysegefäß besteht aus zwei Kammern, die jeweils eine Kugel aus lyophilisiertem Amplifikationsreagenz enthalten: einer TEST-Kammer mit HSV-2-spezifischen Primern und einer KONTROLL-Kammer mit *S. aureus*-spezifischen Primern. Zusammen funktionieren die *S. aureus*-DNS im Probenvorbereitungsapparat SMP PREP III und die *S. aureus*-spezifischen Primer in der KONTROLL-Kammer im Analysegefäß als interne Kontrolle für den Assay. Während der Probenvorbereitung wird jede Patientenprobe in den Probenvorbereitungsapparat III gegeben und so vor der Amplifikation mit der *S. aureus*-DNS kombiniert. Die Zugabe von der *S. aureus*-DNS zur Patientenprobe ermöglicht die parallele Verarbeitung von Ziel-DNS und Kontroll-DNS durch Amplifikation und Detektion. Die Amplifikationsinhibition, die Qualität der Reagenzien und die Effizienz der Probenverarbeitung werden von der internen Kontrolle überwacht. Die Kontroll-*S. aureus*-Zielsequenz muss amplifiziert und in der endgültigen Reaktion auswertbar sein, oder der Test wird als ungültig erachtet und die Patientenergebnisse werden verworfen.

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

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

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

BIOLOGISCHE PRINZIPIEN

Das Herpes-Simplex-Virus verursacht chronische, rezidivierende Infektionen und virale Meningitis bei Erwachsenen und Kindern. Eine Infektion mit Herpes-Simplex-Virustyp 1 (HSV-1) ist relativ häufig, mit einer gesamten Seroprävalenz von circa 54% der Bevölkerung der Vereinigten Staaten.³ Herpes-Simplex-Virustyp 2 (HSV-2) ist die primäre Ursache von Genitalherpes. Es wird geschätzt, dass 50 Millionen Menschen in den USA und >400 Millionen Menschen weltweit mit HSV-2-Genitalherpes oder etwa 1 von 5 Menschen infiziert sind.^{4, 5} Obwohl sowohl HSV-1 oder HSV-2 orale oder genitale Infektionen auszulösen vermögen, ist HSV-1 in der Regel mit oralen Läsionen und HSV-2 in der Regel mit genitalen Läsionen verbunden. Allerdings steigt die Häufigkeit der genitalen HSV-1-Infektion.^{3, 6} Eine HSV-Übertragung auf Neugeborene kann während der Geburt auftreten und verursacht Symptome, die von einer disseminierten Erkrankung (ZNS und viszerale Organe) bis hin zur Infektion der Haut, Augen und Mund reichen.⁷

Eine HSV-Infektion kann mit Mikroskopie, Zellkultur, molekularen und serologische Methoden diagnostiziert werden;⁸ dabei sind eine Zellkultur und PCR die bevorzugten diagnostischen Methoden, die auch von den „Centers for Disease Control (CDC)“ empfohlen werden.⁴ Die Sensitivität der Virenkultur ist aufgrund der begrenzten Menge lebensfähiger Viren gering, insbesondere bei wiederkehrenden oder heilenden Läsionen.⁴ Der HSV-Typ kann nicht direkt aus der Virenkultur bestimmt werden, sondern erfordert zusätzliche Typisierungsmethoden (z. B. ELVIS).⁸ NAAT-Methoden sind empfindlicher als die Kultur, bieten die Möglichkeit, zwischen HSV-Arten zu unterscheiden, und liefern schnellere Ergebnisse.⁸

REAGENZIEN/ENTHALTENE MATERIALIEN

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

1. **Alethia-Probenvorbereitungsapparat III (SMP PREP III) (item# 2792-02):** Tris-gepufferte Lösung mit Formalin-behandelten *E. coli*, die *S. aureus*-DNS beinhalten; die Lösung enthält Natriumazid (0,09%) als Konservierungsmittel.
2. **Alethia HSV-1-Analysegefäß (item# 2865):** Gefäß mit zwei Kammern, das lyophilisierte Amplifikationsreagenzien (DNS-Polymerase, Deoxynucleotidtriphosphate) und entweder HSV-1-spezifische Primer (TEST-Kammer) oder *S. aureus*-spezifische Primer (KONTROLL-Kammer) enthält.
3. **Alethia HSV-2-Analysegefäß (item# 2870):** Gefäß mit zwei Kammern, das lyophilisierte Amplifikationsreagenzien (DNS-Polymerase, Deoxynucleotidtriphosphate) und entweder HSV-2-spezifische Primer (TEST-Kammer) oder *S. aureus*-spezifische Primer (KONTROLL-Kammer) enthält. **Das Alethia HSV 2-Analysegefäß ist visuell durch ein orangefarbenes Band auf der Verschlusslasche des Analysegefäßes gekennzeichnet.**
4. **Mineralöl (Flasche mit Tropfspitze) (item# 14298-01)**
5. **Alethia-Hitzebehandlungsröhrchen (item# 2335)**
6. **Transferpipetten (item# 11523A)**

SEPARAT GELIEFERTE MATERIALIEN

Alethia Externes HSV 1&2-Kontroll-Kit, Bestellnummer: 479960

BENÖTIGTE, ABER NICHT ENTHALTENE MATERIALIEN

1. Einweg-Latexhandschuhe, ungepudert
2. DNase/RNase-freie, aerosolbeständige Pipettenspitzen
3. Virales Transportmedium (2-3 mL): MicroTest™ M4®, MicroTest™ M4RT®, MicroTest™ M6™, UniTranz-RT™ Transportsystem, Copan UTM™ Viruskollektion, HealthLink® UTM oder identisches Transportmedium*, BD Universal Viral Transport Medium (UVT), ViraTrans™ VTM, Hardy Diagnostics VTM.
* HealthLink UTM ist äquivalent zu Quest V-C-M Medium

NICHT MITGELIEFERTE AUSTÜSTUNG

1. Heizblock zur Erhitzung auf 95 °C
2. Digitalthermometer mit max-/min-Temperaturspeicher (z.B. wasserdichtes/stoßfestes Thermometer, wie-Traceable® Lollipop™)
3. Vortex-Mixer
4. Intervall-Stoppuhr
5. 50 µL-Mikropipette
6. Alethia Lesegerät, Bestellnummer von Meridian Bioscience, Inc.: 610189

VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Alle Reagenzien sind ausschließlich in der In-vitro-Diagnostik einzusetzen.
2. Virale Transportmedien, die Proteininstabilisatoren wie MicroTest™ M5® und Kalzium-Alginat-Tupfer enthalten, sind für die Alethia HSV 1&2-Probensammlung und den Transport nicht geeignet.
3. Keine Probenvorbereitungsapparate oder Analysegefäße unterschiedlicher Chargen verwenden. Die Hitzebehandlungsröhrchen sind austauschbar, sofern sie innerhalb des angegebenen Verfallsdatums verwendet werden.
4. Befolgen Sie bei den Untersuchungen die Biosicherheitsstufe 2 und eine gute Laborpraxis.⁹ Behandeln Sie alle Proben und gebrauchte Testsysteme so als könnten sie infektiöse Erreger übertragen. In den Bereichen, in denen die Proben und Reagenzien der Kits bearbeitet werden, darf weder gegessen, noch getrunken oder geraucht werden.
5. Bei der Handhabung der Proben sind Einweghandschuhe zu tragen. Nach der Arbeit sind die Hände gründlich zu waschen.
6. Qualitätskontrollprogramme für Laboratorien, die molekulare Tests durchführen, einschließlich richtiger Gebrauch und Pflege der Ausrüstung, sollten angewendet werden.¹⁰
7. Die Alethia HSV 1&2-Analysegefäße enthalten lyophilisierte Reagenzien. Der Schutzbeutel darf erst dann geöffnet werden, wenn der Assay durchgeführt wird.
8. Die Alethia HSV 1&2-Analysegefäße sind mit einer Verschlusslasche ausgestattet, um eine Kontamination des Testbereichs mit dem Amplifikationsprodukt zu verhindern. Analysegefäße mit defekter Verschlusslasche NICHT verwenden.
9. Gebrauchte Alethia HSV 1&2-Analysegefäße sofort nach Gebrauch entsorgen und die Verschlusslasche sorgfältig einrasten lassen. Nach der Verwendung das Analysegefäß NICHT öffnen. Das Öffnen des Gefäßes nach der Amplifikation kann zu einer Kontamination des Testbereichs mit dem Amplifikationsprodukt führen.
10. Jeder schwerwiegende Vorfall, der in Verbindung mit dem Gerät aufgetreten ist, sollte Meridian Bioscience, Inc., 3471 River Hills Drive, Cincinnati, Ohio 45244 USA oder dem technischen Kundendienst unter 1 800.343.3858 und der zuständigen Behörde des EU-Mitgliedstaates, in dem der Arzt und/oder der Patient ansässig ist, gemeldet werden.
11. WICHTIG: Weitere Sicherheits- und Gefahrenhinweise sind im SDB enthalten.

GEFAHREN UND SICHERHEITSAANGABEN

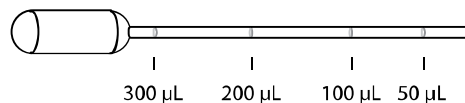
Es gibt keine bekannten Gefahren die mit diesem Produkt verbunden sind.

HALTBARKEIT UND LAGERUNG

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

HINWEISE ZUR DURCHFÜHRUNG

Die im Alethia HSV 1&2-Kit enthaltene Transferpipette ist einzeln verpackt und kann 50 µL abgeben. Die Pipette ist unten dargestellt.



VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Stellen Sie sicher, dass Kitreagenzien vor Gebrauch Raumtemperatur (19-30 °C) erreicht haben. Werden die Reagenzien vor Gebrauch nicht auf Raumtemperatur gebracht, kann dies zu falschen Ergebnissen führen.

PROBENNAHME UND VORBEREITUNG

Probentyp: Humane kutane und mukokutane Läsionsabstrichproben in viralen Transportmedien. Die folgenden viralen Transportmedien sind für die Verwendung zulässig: MicroTest™ M4®, MicroTest™ M4RT®, MicroTest™ M6™, UniTranz-RT™ Transportsystem, Copan UTM™ Viruskollektion, HealthLink® UTM oder identisches Transportmedium*, BD Universal Viral Transport Medium (UVT), ViraTrans™ VTM, Hardy Diagnostics VTM.

* HealthLink UTM ist äquivalent zu Quest V-C-M Medium

HINWEIS: Virale Transportmedien mit Proteininstabilisatoren, z. B. MicroTest™ M5® und Kalzium-Alginat-Tupfer sind als Probentypen nicht für die Analyse geeignet.

Probennahme: Die Gewinnung von kutanen und mukokutanen Läsionsabstrichen sollte im Einklang mit den Richtlinien der Einrichtung zur Gewinnung von klinischen Proben für die Kultivierung von Herpes-Simplex-Viren erfolgen.

Platzieren Sie den/die Abstriche in einem viralen Transportmedium. Proben sollten nach der Entnahme und beim Transport zum Labor gekühlt (2-8 °C) gelagert werden. Proben sollten so bald wie möglich getestet werden, können aber unter Umständen unter Kühlung (2-8 °C) bis zu 7 Tage vor dem Test gelagert werden. Die Proben nicht einfrieren. Nicht bei Raumtemperatur lagern.

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 Alethia™ –Benutzerhandbuch.

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

1. Vortexen Sie den abgenommenen Abstrich ca. 45–60 Sekunden im Transportmedium.
2. Übertragen Sie mit der Transferpipette 50 µL des Abstrichmediums in einen Alethia SMP PREP III. Entsorgen Sie die Transferpipette. Beschriften Sie die SMP PREP III mit der Probenkennzeichnung.
3. Verschließen Sie den SMP PREP III wieder und vortexieren Sie ihn ca. 10 Sekunden lang.
4. Entfernen Sie die Spitzenkappe vom SMP PREP III, und drücken Sie den gesamten Inhalt des SMP PREP III in ein Hitzebehandlungsröhrchen. Beschriften Sie das Röhrchen mit der Probenkennzeichnung.
5. Wiederholen Sie die Probenvorbereitungsschritte für alle zu verarbeitenden Proben. Verarbeitete Proben können vor der Hitzebehandlung bis zu 2 Stunden bei Raumtemperatur (19–30 °C) aufbewahrt werden.
6. Erhitzen Sie jedes Hitzebehandlungsröhrchen 10 ± 2 Minuten lang in einem Trockenbad/Heizblock bei 95 ± 5 °C. Überwachen Sie den Hitzebehandlungsschritt mit dem Digitalthermometer und der Intervall-Stoppuhr.
7. Nehmen Sie jedes Hitzebehandlungsröhrchen aus dem Trockenbad/Heizblock. Wärmebehandelte Proben können bis zu 15 Minuten vor dem Test bei Raumtemperatur (19–30 °C) aufbewahrt werden.

HINWEIS: Die Menge der Probe am Ende der Probenvorbereitung ist ausreichend, um beide Alethia HSV-1- und HSV-2-Tests zu befüllen.

TESTDURCHFÜHRUNG

HINWEIS: In einem Durchlauf können im Alethia™ Inkubator/ Lesegerät maximal 5 Proben für HSV 1 und HSV 2 verarbeitet werden. **HSV 2-Analysegefäße sind visuell durch ein orangefarbenes Band auf der Verschlusslasche des Analysegefäßes gekennzeichnet**

1. Vortexen Sie die hitzebehandelten Proben etwa 10 Sekunden lang.
2. Verwenden Sie jeweils 1 Alethia HSV-1-Analysegefäß und 1 Alethia HSV 2-Analysegefäß pro Probe. Entfernen Sie die Analysegefäße aus ihrem 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. Das Gefäß auf einer ebenen Fläche oder einem passenden Gestell platzieren.
3. Übertragen Sie jeweils mit einer neuen Mikropipette 50 µL der Probe in die TEST- (Links, weiße Kugel) und in die KONTROLL-Kammer (Rechts, gelbe Kugel) der HSV-1 und HSV-2-Analysegefäße. Mischen Sie die Reaktionen nicht mit der Pipette. Vermeiden Sie Luftblasen im Reaktionsgemisch.
4. Fügen Sie jeweils 1 Tropfen Mineralöl zur TEST- und KONTROLL-Kammer der Alethia-HSV-1- und HSV 2-Analysegefäße hinzu. Schließen Sie die Alethia-Analysegefäße und fixieren Sie die Verschlusslasche sorgfältig.
5. Klopfen Sie das Gefäß leicht auf die Arbeitsfläche auf oder schwenken Sie es, um Luftblasen zu entfernen. Überprüfen Sie bei jedem Analysegefäß sorgfältig, ob die KONTROLL-/TEST-Kugeln vollständig aufgelöst sind, ob Luftblasen im Röhrchen sind oder ob sich Flüssigkeit am Deckel befindet. Falls die Kugeln nicht vollständig gelöst sind, Luftblasen oder Flüssigkeit am Deckel zu erkennen sind, klopfen Sie das Gefäß vorsichtig auf die Arbeitsfläche und wiederholen Sie die Sichtkontrolle. Die Amplifikation und Detektion sollte innerhalb von 15 Minuten initiiert werden.
6. Wiederholen Sie die Schritte des TESTVERFAHRENS für alle zu testenden Proben.
7. Geben Sie jedes Alethia Analysegefäß in das Alethia™-Gerät und starten Sie den Lauf. Die Ergebnisse werden am Ende des Laufs angezeigt.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Proben-ID	Ausgegebenes Ergebnis	Interpretation
Patientenprobe	POSITIV	HSV-1-Analysegefäß: Probe enthält HSV-1-Ziel-DNS. HSV-2-Analysegefäß: Probe enthält HSV-2-Ziel-DNS.
	NEGATIV	HSV-1-Analysegefäß: Keine HSV 1-Ziel-DNS erkannt. HSV-2-Analysegefäß: Keine HSV 2-Ziel-DNS erkannt.
	UNGÜLTIG	Kein angezeigtes Ergebnis. Wiederholen Sie den Test unter Verwendung der originalen Patientenprobe. Inhibitorische Patientenprobe, unsachgemäße Probenvorbereitung, Reagenzversagen, Instrumentenversagen oder interner Kontrollfehler.
Positivkontrolle	POSITIV	Gültiges positives Kontrollergebnis. Reagenzien, die zum Zeitpunkt der Verwendung aktiv sind, funktionieren mit dem, Alethia korrekt.
	NEGATIV	Falsches Kontrollergebnis. Wiederholen Sie als ersten Schritt die Kontrolltests, um die Fehlerquelle zu ermitteln. Lassen sich auch bei wiederholten Tests die erwarteten Reaktionen nicht erzielen, rufen Sie bitte den Technischen Support von Meridian Bioscience an (USA): (001) 800-343-3858 oder wenden Sie sich an Ihren zuständigen Distributor.
	UNGÜLTIG	Kein angezeigtes Ergebnis. Wiederholen Sie als ersten Schritt die Kontrolltests, um die Fehlerquelle zu ermitteln. Lassen sich auch bei wiederholten Tests die erwarteten Reaktionen nicht erzielen, rufen Sie bitte den Technischen Support von Meridian Bioscience an (USA): (001) 800-343-3858 oder wenden Sie sich an Ihren zuständigen Distributor. Falsche Probenvorbereitung, Reagenzversagen, Instrumentenversagen oder interner Kontrollfehler.
Negativkontrolle	POSITIV	Falsches Kontrollergebnis. Wiederholen Sie als ersten Schritt die Kontrolltests, um die Fehlerquelle zu ermitteln. Lassen sich auch bei wiederholten Tests die erwarteten Reaktionen nicht erzielen, rufen Sie bitte den Technischen Support von Meridian Bioscience an (USA): (001) 800-343-3858 oder wenden Sie sich an Ihren zuständigen Distributor.
	NEGATIV	Gültiges negatives Kontrollergebnis. Reagenzien, die zum Zeitpunkt der Verwendung aktiv sind, funktionieren mit dem, Alethia korrekt.
	UNGÜLTIG	Kein angezeigtes Ergebnis. Wiederholen Sie als ersten Schritt die Kontrolltests, um die Fehlerquelle zu ermitteln. Lassen sich auch bei wiederholten Tests die erwarteten Reaktionen nicht erzielen, rufen Sie bitte den Technischen Support von Meridian Bioscience an (USA): (001) 800-343-3858 oder wenden Sie sich an Ihren zuständigen Distributor. Falsche Probenvorbereitung, Reagenzversagen, Instrumentenversagen oder interner Kontrollfehler.
LEERE Vertiefung	KEINES	Kein Alethia-Analysegefäß in der Vertiefung des Alethia Geräts. ODER Die Auswertung des vorhandenen Alethia-Analysegefäßes ist aufgrund fehlerhafter Probenvorbereitung, verunreinigtem Gefäß oder falsch aufgestelltem Gefäß beeinträchtigt. Wiederholen Sie den Test unter Verwendung der ursprünglichen Proben.

QUALITÄTSKONTROLLE

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

1. Jedes Gefäß enthält eine interne Kontrolle, die die Amplifikationsinhibition, Qualität der Reagenzien und die Effizienz der Probenverarbeitung überwacht. Die DNS der internen Kontrolle ist im Reagenz des SMP PREP III vorhanden und wird in allen Verfahrensschritten mit verarbeitet. Die Primer für die Amplifikation der internen Kontroll-DNS befinden sich in der Kontrollkammer des Alethia-Analysegefäßes.
2. Der Hitzebehandlungsschritt wird mit einem externen Thermometer und einer Intervall-Stoppuhr überwacht. Verwenden Sie den max-/min-Temperaturspeicher des Thermometers, um sicherzustellen, dass eine Temperatur von 95 ± 5 C beibehalten wird. Verwenden Sie die Intervall-Stoppuhr, um sicherzustellen, dass die Dauer der Hitzebehandlung 10 ± 2 Minuten beträgt.
3. Die Regeln der guten Laborpraxis empfehlen den Einsatz von Kontrollmaterialien. Anwender sollten die entsprechenden bundesstaatlichen, staatlichen und kommunalen Richtlinien zur Mitführung von externen Qualitätskontrollen befolgen.
4. **Die externen Kontrollreagenzien für Alethia HSV 1&2 Assay** sind separat erhältlich (Bestellnr. 479960). Es wird empfohlen, die Reaktivität jeder neuen Charge und jeder neuen Lieferung des Alethia HSV 1&2 Assays bei Empfang oder vor Gebrauch zu überprüfen. Externe Kontrolltests sind danach gemäß bundesstaatlichen, staatlichen und kommunalen Richtlinien sowie der zulassungsbehördlichen Auflagen durchzuführen. Das Alethia HSV 1&2-Testkit sollte nicht für Tests an Patientenproben verwendet werden, wenn die externen Kontrollen nicht die richtigen Ergebnisse erzeugen.
5. Für jedes externe Kontrollreagenz muss ein separates Analysegefäß verwendet werden.

ERWARTETE WERTE

Die Prävalenz von HSV-1 und HSV-2 wurde 2014–2015 in klinischen Studien basierend auf dem Alter des Patienten und nach anatomischer Position der Läsion berechnet. Die allgemeine Inzidenz während der Studie lag bei 20,5 % (237/1155) für HSV-1 und bei 19,4 % (224/1156) für HSV-2. Spezifische Prävalenzdaten sind unten angegeben.

Kombinierte Studie – kutane Prävalenz nach anatomischer Lage der Probe (N=306)						
Quelle	HSV 1			HSV 2		
	Gesamtzahl	Insgesamt positiv	Prävalenz	Gesamtzahl	Insgesamt positiv	Prävalenz
Genital – Penis	92	7	7,6%	92	28	30,4%
Hautläsion	214	47	22,0%	214	27	12,6%
Kombinierte Studie – mukokutane Prävalenz nach anatomischer Lage der Probe						
Quelle	HSV-1 (N=849)			HSV-2 (N=850)		
	Gesamtzahl	Insgesamt positiv	Prävalenz	Gesamtzahl	Insgesamt positiv	Prävalenz
Anorektal	47 (1*)	7	14,9%	46 (2*)	9	19,6%
Genital – Vaginal/Zervikal	624 (2*)	112	17,9%	626	158	25,2%
Nasal	18	9	50,0%	18	0	0,0%
Okulär	20	0	0,0%	20	0	0,0%
Orale Läsion	135	54	40,0%	135	2	1,5%
Urethral	5	1	20,0%	5	0	0,0%

* Anzahl der Proben mit ungültigen Alethia-Ergebnissen, die nicht geklärt werden konnten und die deshalb aus der Analyse ausgeschlossen wurden.

Kombinierte Studie – kutane Prävalenz nach Alter (N=306)						
Alter	HSV-1 (N=306)			HSV-2 (N=306)		
	Gesamtzahl	Insgesamt positiv	Prävalenz	Gesamtzahl	Insgesamt positiv	Prävalenz
≤ 5 Jahre	38	12	31,6%	38	1	2,6%
6 bis 11 Jahre	14	7	50,0%	14	1	7,1%
12 bis 21 Jahre	51	14	27,5%	51	4	7,8%
22 bis 59 Jahre	166	18	10,8%	166	36	21,7%
≥ 60 Jahre	37	3	8,1%	37	13	35,1%
Nicht zur Verfügung gestellt	0	0	0,0%	0	0	0,0%
Kombinierte Studie – mukokutane Prävalenz nach Alter						
Alter	HSV-1 (N=849)			HSV-2 (N=850)		
	Gesamtzahl	Insgesamt positiv	Prävalenz	Gesamtzahl	Insgesamt positiv	Prävalenz
≤ 5 Jahre	47	8	17,0%	47	0	0,0%
6 bis 11 Jahre	12	0	0,0%	12	0	0,0%
12 bis 21 Jahre	174 (1*)	46	26,4%	175	42	24,0%
22 bis 59 Jahre	550 (1*)	111	20,2%	551	116	21,1%
≥ 60 Jahre	63 (1*)	18	28,6%	63 (1*)	11	17,5%
Nicht zur Verfügung gestellt	3	0	0,0%	2 (1*)	0	0,0%

* Anzahl der Proben mit ungültigen Alethia-Ergebnissen, die nicht geklärt werden konnten und die deshalb aus der Analyse ausgeschlossen wurden.

EINSCHRÄNKUNGEN

- Die Leistung des Alethia HSV 1&2 Assays wurde nur mit prospektiven männlichen und weiblichen, kutanen und mukokutanen Läsionsproben überprüft. Die Leistung mit anderen Probentypen (geforene Proben oder Liquor) wurde nicht überprüft.
- Der Assay ist nicht für das pränatale Screening vorgesehen.
- Eine Medikation mit dem Wirkstoff Zinkgluconat liefert mit dem Alethia HSV 1&2 Assays ungültige Ergebnisse bei 7 % V/V. Niedrigere Konzentrationen wurden nicht getestet. Die Wirkung von Zinkgluconat auf die Alethia HSV 1&2-Testergebnisse wurde nicht mit klinischen Proben getestet.
- Es wurde festgestellt, dass Kasein in Konzentrationen über 5 mg/mL den Alethia HSV 1&2-Assay beeinträchtigt.
- Aufgrund von bestätigten inakzeptablen Ergebnissen wird eine gekühlte Lagerung (2-8 °C) von SMP PREP III verarbeiteten Proben für eine nachfolgende Testung mit dem Alethia HSV 1&2 DNS-Amplifikationstest nicht als geeignet erachtet.
- Negative Ergebnisse schließen eine Infektion nicht aus und sollten nicht als einzige Grundlage für die Behandlung und für andere Entscheidungen im Patientenmanagement herangezogen werden. Dieses Produkt kann nur mit dem Alethia™ Instrument verwendet werden.
- Beim Alethia HSV 1&2 Assay handelt es sich um einen qualitativen Assay, der keine quantitativen Ergebnisse oder Informationen zur Belastung mit den Organismen liefert.
- Die Detektion von Nukleinsäuren hängt von der einwandfreien Probennahme sowie der Handhabung, dem Transport, der Lagerung und der Vorbereitung ab. Fehler in einem der genannten Schritte kann zu falschen Ergebnissen führen.
- Die Nukleinsäuren des Organismus können unabhängig von der Lebensfähigkeit des Organismus *in vivo* fortbestehen. Der Alethia HSV 1&2 Assay unterscheidet nicht zwischen lebensfähigen und nicht-lebensfähigen Organismen.
- Wie bei allen anderen diagnostischen Tests auf molekularer Grundlage können (A) falsch-negative Ergebnisse infolge der Präsenz von Inhibitoren, Mutationen oder Polymorphismen innerhalb der HSV Zielsequenz, technischen Fehlern, Vertauschen der Proben und geringer Organismenanzahl in der klinischen Probe entstehen; (B) falsch-positive Ergebnisse können infolge der Präsenz einer Kreuzkontamination mit Zielorganismen, deren Nukleinsäuren oder dem amplifizierten Produkt sowie von nicht-spezifischen Signalen entstehen.

LEISTUNGSMERKMALE

Die Leistungsmerkmale der Alethia HSV 1&2 DNS-Amplifikationstests wurden in klinischen Studien zwischen Oktober 2014 und März 2015 in sieben unabhängigen, klinischen Teststandorten bestätigt, die vier geografisch unterschiedliche Regionen in den USA repräsentieren. Leistungsmerkmale des Assays wurden mit der Referenzmethode ELVIS® HSV ID und dem D³ Typisierungstestsystem verglichen.

Enthaltene Proben sind frische kutane und mukokutane Läsionsabstrichproben von Patienten mit Verdacht auf eine Infektion mit Herpes-Simplex-Virus Typ 1 (HSV-1) oder Typ 2 (HSV-2). Proben, die als kutan eingestuft wurden, umfassten Haut- und genitale Läsionen – Penis. Proben, die als mukokutan eingestuft wurden, umfassten anorektale, genital-vaginale/zervikale, nasale, okuläre, orale und urethrale Positionen.

Insgesamt 1.158 geeignete Restmengen von identifizierungsfreien Läsionsabstrichproben von symptomatischen männlichen und weiblichen Patienten wurden ausgewertet. Die Proben wurden von Patienten im Alter von 1 Tag bis 89 Jahren gesammelt. Von den 1.158 geeigneten Proben ergaben 1.156 ein gültiges ELVIS-Signal. Das ELVIS HSV ID und D³ Typing Test System konnte nicht HSV-1 nachweisen, wenn HSV-2 zuerst in koinfizierten Proben nachgewiesen wurde. Deshalb wurden Proben, die mit ELVIS HSV-2 positiv getestet wurden aus der Berechnung für die HSV-1 Leistungsanalyse entfernt. Einhunderteinundachtzig (181) Proben wurden nach ELVIS als HSV-2-positiv identifiziert und aus der HSV-1-Datenanalyse entfernt. Zusätzlich ergab eine Probe mit dem Alethia HSV 1&2 DNS-Amplifikationstest zunächst ein ungültiges Signal und konnte nicht mehr nachgetestet werden und wurde aus der HSV-1 Leistungsanalyse ausgeschlossen. Deshalb wurden insgesamt 974 Probenergebnisse in die Leistungsanalyse von HSV-1 eingeschlossen. Von den 1.156 Proben die eine gültiges ELVIS Signal zeigten, ergab eine Probe mit dem Alethia HSV 1&2 DNS-Amplifikationstest zunächst ein ungültiges Signal und konnte nicht mehr nachgetestet werden und wurde deshalb aus der Leistungsanalyse für HSV-2 ausgeschlossen. Also wurden insgesamt 1.155 Proben in die Leistungsanalyse von HSV-2 eingeschlossen. Die Tabellen fassen die Leistung des Alethia HSV 1&2 DNS-Amplifikationstests für alle kombinierten Standorte zusammen.

Insgesamt wurden 723 (74,3%) weibliche und 247 (25,3%) männliche Proben auf HSV-1 getestet und insgesamt 873 (75,6%) weibliche und 277 (24,0%) männliche Proben wurden auf HSV-2 getestet. Es gab vier (4) auf HSV-1 (0,4%) und fünf (5) auf HSV-2 getestete Proben mit unbekanntem Geschlecht (0,4%). Es wird nicht erwartet, dass das Geschlecht einen Einfluss auf das Testergebnis hat.

Standorte (zusammengefasst): HSV-1 Kutan (N=264)

		Referenzmethode			Alethia	Leistung			
		Pos	Neg	Gesamt	INV ^c				95% CI
Alethia HSV 1&2	Pos	48	6 ^a	54	0 (0)	Sensitivität	48/51	94.1%	84.1-98.0%
	Neg	3 ^b	207	210	0 (0)	Spezifität	207/213	97.2%	94.0-98.7%
	Gesamt	51	213	264	0 (0)				

^a 6/6 Proben wurden durch einen alternativen, FDA-zugelassenen Molekulartest als HSV-1-positiv identifiziert.

^b 1/3 Proben wurden durch einen alternativen, FDA-zugelassenen Molekulartest als HSV-1-negativ identifiziert.

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

Standorte (zusammengefasst): HSV-1 Mukokutan (N=710)

		Referenzmethode			Alethia	Leistung			
		Pos	Neg	Gesamt	INV ^d				95% CI
Alethia HSV 1&2	Pos	152	28 ^b	180	0 (1)	Sensitivität	152/160	95.0%	90.5-97.5%
	Neg	8 ^c	522	530	0 (5)	Spezifität	522/550	94.9%	92.7-96.5%
	Gesamt	160	550	710	0 (6) ^a				

^a Es gab zunächst sechs INV Proben mit Alethia. Fünf waren in den der Wiederholung negativ (ELVIS HSV-1 negativ) und eine Probe war nach Wiederholung mit dem Alethia HSV-1 Assay positiv (ELVIS HSV-1 positiv).

^b 19/28 Proben wurden durch einen alternativen, FDA-zugelassenen Molekulartest als HSV-1-positiv identifiziert; 3 Proben konnten nicht getestet werden.

^c 7/8 Proben wurden durch einen alternativen, FDA-zugelassenen Molekulartest als HSV-1-negativ identifiziert; 1 Probe konnte nicht getestet werden.

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

Standorte (zusammengefasst): HSV-2 Kutan (N=306)

		Referenzmethode			Alethia	Leistung			
		Pos	Neg	Gesamt	INV ^c				95% CI
Alethia HSV 1&2	Pos	42	13 ^b	55	0 (0)	Sensitivität	42/42	100%	91.6-100.0%
	Neg	0	251	251	0 (1)	Spezifität	251/264	95.1%	91.8-97.1%
	Gesamt	42	264	306	0 (1) ^a				

^a Es gab zunächst eine INV-Probe mit Alethia. Die Probe wurde nachgetestet und war mit Alethia negativ (ELVIS negativ).

^b 8/13 Proben wurden durch einen alternativen, FDA-zugelassenen Molekulartest als HSV-2-positiv identifiziert; 1 Probe konnte nicht getestet werden.

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

Standorte (zusammengefasst): HSV-2 Mukokutan (N=849)

		Referenzmethode			Alethia	Leistung			
		Pos	Neg	Gesamt	INV ^d				95% CI
Alethia HSV 1&2	Pos	137	31 ^b	168	0 (0)	Sensitivität	137/139	98.6%	94.9-99.6%
	Neg	2 ^c	679	681	0 (1)	Spezifität	679/710	95.6%	93.9-96.9%
	Gesamt	139	710	849	0 (1) ^a				

^a Es gab zunächst eine INV-Probe mit Alethia. Die Probe wurde nachgetestet und war mit Alethia negativ (ELVIS negativ).
^b 24/31 Proben wurden durch einen alternativen, FDA-zugelassenen Molekulartest als HSV-2-positiv identifiziert; 4 Proben konnten nicht getestet werden.
^c 1/2 Proben wurden durch einen alternativen, FDA-zugelassenen Molekulartest als HSV-2-negativ identifiziert.
^d Zunächst ungültige Ergebnisse werden in Klammern angegeben. Die auch nach Wiederholung verbliebene Anzahl an ungültigen Proben, steht vor der Klammer.

ANALYTISCHE SENSITIVITÄT

Die analytische Empfindlichkeit oder Nachweisgrenze (LoD) wurden unter Verwendung von jeweils zwei Stämmen von HSV-1 und HSV-2 bestimmt. Die LoD wurde unter Verwendung von mindestens 60 Replikaten und anhand einer angegebenen Wahrscheinlichkeit (z.B. 95%, von denen 57/60 Replikate positiv sind) des Erhalts einer positiven Reaktion bestimmt.

HSV-Stamm	LoD (TCID ₅₀ /mL)
HSV-1 HF (VR-260)	7,20 x 10 ³
HSV-1 McIntyre (VR-539)	9,89 x 10 ⁴
HSV-2 G (VR-734)	1,20 x 10 ³
HSV-2 MS (VR-540)	1,60 x 10 ³

Die endgültige angegebene Test-LoD beträgt 9,89 × 10⁴ TCID₅₀/mL für HSV-1 und 1,60 × 10³ TCID₅₀/mL für HSV-2.

Zusätzlich wurden zwanzig (20) klinische HSV-1- und zwanzig (20) HSV-2-Proben aus einer Vielzahl von anatomischen Positionen (d.h., oral, genital, anorektal etc.) für die Test-LoD für HSV-1 (9,89 × 10⁴ TCID₅₀/mL) und HSV-2 (1,60 × 10³ TCID₅₀/mL) ausgewertet. Alle klinischen Proben wurden durch den Alethia HSV 1&2-Assay an der LoD oder niedriger nachgewiesen, außer einer HSV-1-Probe, die bei 7,20 × 10⁷ TCID₅₀/mL nachgewiesen wurde.

REPRODUZIERBARKEIT

Von drei der sieben teilnehmenden Studienzentren wurden Reproduzierbarkeitsstudien durchgeführt. Verschlüsselte Paneele von achtzehn (18) Proben wurden den teilnehmenden Labors übergeben. Die Proben waren innerhalb jedes Panels nach dem Zufallsprinzip gereiht, um die Probenidentität zu maskieren. Die Paneele enthielten künstliche HSV-1 (Stamm-HF)- und HSV-2 (Stamm-MS)-Proben, die als schwach positive Proben hergestellt wurden (HSV-1: 2,16 × 10⁴ TCID₅₀/mL oder HSV-2: 4,80 × 10³ TCID₅₀/mL), schwach positive Proben (HSV-1: 1,08 × 10⁴ TCID₅₀/mL oder HSV-2: 2,40 × 10³ TCID₅₀/mL) oder Negative, hergestellte HSV-Proben (HSV-1 in der Nähe der Grenze der Detektierbarkeit: 308 TCID₅₀/mL, HSV-1 stark negativ: 29,7 TCID₅₀/mL; HSV-2 in der Nähe der Grenze der Detektierbarkeit: 24 TCID₅₀/mL, HSV-2 stark negativ: 2,2 TCID₅₀/mL). Das Panel umfasste auch zwei HSV-1- und HSV-2-negative Proben und eine Positiv- und Negativkontrolle. Die Tests wurden am selben Tag von verschiedenen Bedienern in jeder Einrichtung (Intra-Assay-Variabilität) fünf Tage lang (Inter-Assay-Variabilität) durchgeführt. In dieser Studie wurden drei Chargen von Alethia HSV 1&2 und fünf Alethia™ --Instrumente eingesetzt. An jedem Testtag wurden die Positiv- und Negativkontrollen getestet. Die Ergebnisse sind in der nachstehenden Tabelle dargestellt:

Zusammenfassung der Reproduzierbarkeitsstudie für HSV-1								
Probentyp	Standort 1		Standort 2		Standort 3		Gesamt	
	Übereinstimmung in Prozent		Übereinstimmung in Prozent		Übereinstimmung in Prozent		Übereinstimmung in Prozent	
HSV-1 Mäßig positiv	30/30	100,0%	30/30	100,0%	30/30	100,0%	90/90	100,0%
HSV-1 Schwach positiv	30/30	100,0%	30/30	100,0%	30/30	100,0%	90/90	100,0%
HSV-1 & HSV-2 In der Nähe der Grenze der Detektierbarkeit	20/30	66,7%	26/30	86,7%	20/30	66,7%	66/90	73,3%
HSV-1 & HSV-2 Stark negativ	29/30	96,7%	30/30	100,0%	29/30	96,7%	88/90	97,8%
HSV-1 Negativ	60/60	100,0%	60/60	100,0%	60/60	100,0%	180/180	100,0%
Negativkontrolle	10/10	100,0%	10/10	100,0%	10/10	100,0%	30/30	100,0%
Positivkontrolle	10/10	100,0%	10/10	100,0%	10/10	100,0%	30/30	100,0%

Zusammenfassung der Reproduzierbarkeitsstudie für HSV-2								
Probentyp	Standort 1		Standort 2		Standort 3		Gesamt	
	Übereinstimmung in Prozent		Übereinstimmung in Prozent		Übereinstimmung in Prozent		Übereinstimmung in Prozent	
HSV-2 Mäßig positiv	30/30	100,0%	30/30	100,0%	30/30	100,0%	90/90	100,0%
HSV-2 Schwach positiv	30/30	100,0%	30/30	100,0%	30/30	100,0%	90/90	100,0%
HSV-1 & HSV-2 In der Nähe der Grenze der Detektierbarkeit	25/30	83,3%	29/30	96,7%	25/30	83,3%	79/90	87,8%
HSV-1 & HSV-2 Stark negativ	29/30	96,7%	30/30	100,0%	29/30	96,7%	88/90	97,8%
HSV-2 Negativ	60/60	100,0%	60/60	100,0%	60/60	100,0%	180/180	100,0%
Negativkontrolle	10/10	100,0%	10/10	100,0%	10/10	100,0%	30/30	100,0%
Positivkontrolle	10/10	100,0%	10/10	100,0%	10/10	100,0%	30/30	100,0%

STUDIEN ZUR KREUZREAKTIVITÄT

Kreuzreaktionsstudien verwendeten positive (HSV-1-Stamm HF und HSV-2-Stamm MS) und negative Proben mit Bakterien und Pilzen mit einer minimalen Konzentration von $1,0 \times 10^6$ CFU/mL ($1,0 \times 10^6$ Kopien/mL inokuliert, wenn Genom-DNS verwendet wurde) oder Virus mit einem Minimum von $1,0 \times 10^5$ TCID₅₀/mL ($1,0 \times 10^6$ Kopien/mL, wenn Genom-DNS oder -RNS verwendet wurde). Keiner der folgenden Organismen oder deren genetisches Material reagierte mit dem Alethia HSV 1&2 Assay:

Acinetobacter calcoaceticus, *Acinetobacter lwoffii*, *Bacteroides fragilis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella pertussis*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida lusitanae*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* (ESBL), *Fusobacterium nucleatum*, *Gardnerella vaginalis*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae* (Type A), *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus acidophilus*, *Legionella pneumophila*, *Mobiluncus curtisii*, *Mobiluncus mulieris*, *Moraxella catarrhalis*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma orale*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma salivarium*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Prevotella melaninogenica*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus salivarius*, *Toxoplasma gondii*, *Treponema pallidum*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, Adenovirus, Coronavirus, Coxsackievirus, Zytomegalovirus, Echovirus, Enterovirus, Epstein-Barr-Virus, Influenza-A-Virus, Influenza-B-Virus, Hepatitis-B-Virus, Hepatitis-C-Virus, Humanes Herpesvirus 6, Humanes Herpesvirus 7, Humanes Herpesvirus 8, Humanes Immundefizienz-Virus 1, Humanes Metapneumovirus, Humanes Papillomvirus, Masernvirus, Mumpsvirus, Parainfluenzavirus, Respiratorische-Synzytial-Viren, Rötelnvirus, Varicella-Zoster-Virus.

Menschliche genomische DNS hatte bis zu $1,0 \times 10^6$ Kopien/mL keinen Einfluss auf die Reaktion. Zusätzlich wurde keine kompetitive Inhibierung zwischen den oben aufgelisteten Organismen und HSV-1 und HSV-2 im Alethia HSV-1&2 Test beobachtet.

STÖRSUBSTANZEN-TESTS

Die Störsubstanzen-Tests wurden mit der am Schlimmsten möglichen auftretenden Konzentration von chemischen und biologischen Substanzen durchgeführt, die direkt in künstlich positive (HSV-1-Stämme: McIntyre und HF; HSV-2-Stämme: G und MS) und negative Proben eingeführt wurden. Es wurde keine Störung bei den folgenden Substanzen beobachtet:

- (1) Bei Konzentrationen von 7% M/V oder V/V: Abreva® (10% Docosanol), Balneol® Hygienische Reinigungslotion, Carmex® Original Lippenbalsam (1,7% Kampfer, 0,7% Menthol), Desitin® (40% Zinkoxid), Duschgel (CVS Pharmacy® Einweg), Fluorid-Zahnpasta (Crest®, 0,243% Natriumfluorid), K-Y® Brand Jelly (Gleitmittel), Lanacane® (0,2% Benzethoniumchlorid, 20% Benzocain), Lip Clear® Lysine+® (1,2% Zinkoxid), Miconazole 3 (CVS™ Antimykotikum: 2% Miconazol-Nitrat), Mundspülung (Listerine® Original: 0,092% Eukalyptol, 0,042% Menthol, 0,060% Methylsalizylat, 0,064% Thymol), Preparation H® Hämorrhoidensalbe (14% Mineralöl, 74,9% Vaseline, 0,25% Phenylephrin-Hydrochlorid), Releev® (0,13% Benzalkoniumchlorid), Tioconazol, Vagisil® Normale Stärke (5% Benzocaine, 2% Resorcinol), Yeast Guard® Gelsalbe (*Candida albicans*, 27X HPUS; *Candida parapsilosis*, 27X HPUS; Pulsatilla, 27X HPUS), Stuhl, Samenflüssigkeit, Urin, Vollblut, Leukozytenfilm.
- (2) Bei Konzentrationen von: 60 µg/mL – Schleim (Mucin, bovine Submaxillardrüse Typ I-S); 1,25 mg/mL – Maisstärke; 3,3 mg/mL – Albumin; 5 mg/mL – Acetaminophen, Kasein, Chlorpheniramin-Maleat; 7 mg/mL – Aciclovir; 10 mg/mL – Acetylsalicylsäure, Dextromethorphan-Hydrobromid.

Bei Kasein in Konzentrationen über 5 mg/mL wurde festgestellt, dass es den Test beeinträchtigt.

Medizin gegen Erkältungen und Halsschmerzen (Cold-EEZE®) (Zinkgluconat 2X) wurde mit 7% V/V getestet und ergab ungünstige Ergebnisse bei allen Wiederholungen.

REFERENCES

1. Nagamine K, Hase T, Notoni T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplifications using loop primers. *Mol Cell Probes* 2002;16:223-29.
2. Mori Y, Kitao M, Tomita N, Notoni T. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantitating template DNA. *J Biochem Biophys* 2004;59:145-47.
3. Bradely H, Markowitz L, Gibson T, McQuillan M. Seroprevalence of herpes simplex virus Types 1 and 2 – United States, 1999-2010. *J Infect Dis* 2014; 209:325-333.
4. Centers for Disease Control and Prevention, *Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2010*. Morbidity and Mortality Weekly Report, 2010: 59(RR-1220-25).
5. Looker KJ, Margaret AS, Turner KM, Vickerman P, Gottlieb SL, Newman LM. Global estimates of prevalent and incident herpes simplex virus type 2 infections in 2012. *PLoS ONE* 2015; 10(1): e114989. doi:10.1371/journal.pone.0114989.
6. Bernstein DI, Bellamy AR, Hook EW 3rd, Levin MJ, Wald A, Ewell MG, et al. Epidemiology, clinical presentation, and antibody response to primary infection with herpes simplex virus type 1 and type 2 in young women. *Clin Infect Dis* 2013; 56(3):344-351.
7. Kimberlin DW, Baley J. Guidance on management of asymptomatic neonates born to women with active genital herpes lesions. *American Academy of Pediatrics, Pediatrics* 2013;131(2):e635-e646.
8. Anderson NW, Buchan BW, Ledebore NA. Light microscopy, culture, molecular, and serologic methods for detection of herpes simplex virus. *J Clin Microbiol* 2014;52(1):2-8.
9. US Department of Health and Human Services PHS/CDC/NIH. Biosafety in microbiology and biomedical laboratories, Washington DC: US Government Printing Office, 2007.
10. CLSI: MM3-A2 Molecular diagnostic methods for infectious disease; approved guideline, 2nd ed. Wayne PA: Clinical Laboratory Standards Institute, 2006.



SN11028

REV. 02/26

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

INTERNATIONAL SYMBOL USAGE

You may see one or more of these symbols on the labeling/package of this product:

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

	Use By / Utilizzare entro / Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis	CONTROL +	Positive control / Controllo positivo / Contrôle positif / Control positivo / Positive Kontrolle
LOT	Batch Code / Codice del lotto / Code du lot / Código de lote / Chargenbezeichnung	CONTROL -	Negative control / Controllo negativo / Contrôle négatif / Control negativo / Negative Kontrolle
IVD	In vitro diagnostic medical device / Dispositivo medico-diagnostico in vitro / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / In-Vitro-Diagnostikum	EC REP	Authorized Representative in the European Community / Rappresentante Autorizzato nella Comunità Europea / Mandataire dans la Communauté européenne / Representante autorizado en la Comunidad Europea / Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft
	Meridian products carrying the European Conformity (CE) mark fulfill the requirements of Directive 98/79/EC or the Regulation 2017/746 on in-vitro diagnostic medical devices / I prodotti Meridian recanti il marchio di Conformità Europea (CE) 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 Probenzubereitung, 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		Cautions, consult accompanying documents / Attenzione, vedere le istruzioni per l'uso / Attention voir notice d'instructions / Atención, ver instrucciones de uso / Achtung, Begleitdokumente beachten
SN	Serial number / Numero di serie / Numéro de série / Número de serie / Seriennummer	STERILE EO	Sterilization by ethylene oxide / Sterilizzazione con ossido di etilene / Stérilisation par oxyde d'éthylène / Esterilizado por óxido de etileno / Sterilisation durch Ethylenoxid
	Contains sufficient for <n> tests / Contenuto sufficiente per <n> saggi / Contenu suffisant pour <n> tests / Contenido suficiente para <n> ensayos / Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen	BUF RXN	Reaction Buffer / Tampone di reazione / Solution de réaction tamponnée / Tampón de Reacción / Reaktionspuffer
	Temperature limitation / Limiti di temperatura / Limites de température / Limite de temperatura / Temperaturbegrenzung		ETL Registered Mark Certified / Marchio di certificazione registrato a livello nazionale / Certifié Conforme ETL / Marca de Certificación Registrada Nacional / ETL Konform beglaubigt
	Female / Femminile / De sexe féminin / Hembra / Frau		Recycle – do not dispose of as general waste / Riciclare – non eliminare come rifiuto generico / Recycler – ne pas jeter dans une poubelle / Recicle – no desecho como basura general / Recycling- dieses Produkt nicht über den Hausmüll entsorgen
	Single Use Only / Prodotto Monouso / A usage unique / Para Un Solo Uso / nur für die einmalige Anwendung	TEST	Test Device / Dispositivo test / Dispositif de test / Dispositivo de Prueba / Testgerät
	Date of manufacture / Data di fabbricazione / Date de fabrication / Fecha de fabricación / Herstellungsdatum	HT TUBE	Heat Treatment Tube / Provetta per il Trattamento termico / Tube pour le traitement thermique / Tubo de tratamiento de calor / Röhrrchen zur Hitzebearbeitung
	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 / Probenzubereitung
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.