



*380273-C

Deutsch

REF 978000

Positivkontrolle Mal (PC Mal)^{a,c}: 1 x 1,0 mL
 Negativkontrolle Mal (NC Mal) 3 x 0,5 mL
 30 µL Tropper 5 x 12 Tropfer

Loopamp™ MALARIA Pf

Detection Kit

ZWECKBESTIMMUNG

Das Loopamp™ MALARIA Pf Detection Kit ist ein qualitatives *In-vitro*-Diagnostikum zum Nachweis der *Plasmodium falciparum*-DNA, die aus Humanblutproben von Patienten mit Verdacht auf eine Malaria-Infektion gewonnen wird. Das Kit hilft bei der Diagnose einer *Plasmodium falciparum*-Infektion und ist für die Verwendung in professionellen Labors und Krankenhäusern durch entsprechend geschultes Personal vorgesehen. Das Ergebnis kann entweder mit einem automatischen Turbidimeter oder visuell unter UV-Bestrahlung interpretiert werden.

TESTPRINZIP

Dieses Produkt basiert auf dem von der Eiken Chemical Co., Ltd. entwickelten Nukleinsäure-Amplifikationsverfahren „Loop-mediated isothermal amplification“ (LAMP).

Die LAMP-Methode zeichnet sich durch folgende Merkmale aus: (1) Es wird nur ein Enzym benötigt, und die Amplifikationsreaktion läuft unter isothermen Bedingungen ab;^{1),2)} (2) sie hat eine extrem hohe Spezifität aufgrund der Verwendung von vier Primern, die sechs verschiedene Regionen auf der Ziel-DNA erkennen; (3) sie hat eine hohe Amplifikationseffizienz und kann eine hohe Konzentration an amplifiziertem Produkt in kurzer Zeit produzieren, was einen visuellen oder automatisierten Nachweis ermöglicht.^{3),4)}

Die *P. falciparum* (Pf)-spezifischen Primer sind für den Nachweis der mitochondrialen DNA von Pf konzipiert. Die Alignment-Analyse hat bestätigt, dass die DNA-Ziel-Sequenzen spezifisch für die Pf-Sequenz sind.

Die aus den Blutproben extrahierte Test-DNA-Lösung wird in ein Reaktionsgefäß gegeben. Die strangversetzende DNA-Polymerase, Desoxyribonukleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP und dTTP), Calcein, Reaktionspuffer und Malaria-Pf-spezifische Primer werden in getrockneter Form in der Verschlusskappe des Reaktionsgefäßes aufbewahrt. Dieses getrocknete LAMP-Reagenz (Malaria Pf Nachweisreagenz (dMAL Pf)) löst sich auf, wenn die DNA-Lösung hinzugefügt wird. Das Reaktionsgefäß wird dann bei 65,0 °C inkubiert und die DNA wird durch die strangversetzende DNA-Polymerase in der LAMP-Reaktion amplifiziert.

Der Nachweis von amplifizierten Produkten basiert auf der Trübung von Magnesiumpyrophosphat (einem weißen Präzipitat, das als Nebenprodukt der DNA-Amplifikation entsteht).³⁾ Alternativ kann auch ein visueller Nachweis unter UV-Licht verwendet werden. Vor der DNA-Amplifikation befindet sich das Calcein im Reagenz im gequollenen Zustand da es an Mangan-Ionen gebunden ist. Zu Beginn der DNA-Amplifikation konkurrieren die erzeugten Pyrophosphat-Ionen mit den Mangan-Ionen um die Bindungsstellen, wodurch das Calcein fluoreszierend wird.⁴⁾

TESTBESTANDTEILE

Die Reagenzien sind bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Datum haltbar, vorausgesetzt, der Behälter bleibt ungeöffnet bei einer Lagertemperatur von 2–30 °C. Bei Beachtung dieser Verfahrensanweisungen sind die Reagenzien auch nach dem Öffnen des Behälters stabil.

Reagenz zum Nachweis von Malaria Pf (dMAL Pf) 2 x 48 Röhrchen

Die folgenden Reagenzien in getrockneter Form sind in jedem Reaktionsgefäß enthalten:

Bst DNA-Polymerase^a
 Desoxyribonukleosidtriphosphate
 Magnesiumsulfat
 Calcein
 Manganchlorid
 Primer^b

^a: Die aus *geo Bacillus stearothermophilus* stammende *Bst* DNA-Polymerase ist eine strangversetzende DNA-Polymerase ohne 5'→3'-Exonukleaseaktivität.

^b: Primer für die mitochondriale DNA von Pf, gereinigt aus synthetisierten Oligonukleotiden durch HPLC.

^c: Die PC Mal enthält ein Produkt, das aus der *In-vitro*-Amplifikation eines künstlichen Gens aus der mitochondrialen DNA von Pf stammt (GenBank-Nr. M76611).

Die Abkürzungen der folgenden Reagenzien, ihre Chargennummer und der Hersteller (EKN) sind wie folgt auf den Behältern aufgedruckt:

Reagenzien	Beschriftung am Röhrchen	Deckelcode
Positivkontrolle Mal	PC Mal Lot No., EKN	PC Mal
Negativkontrolle Mal	NC Mal Lot No., EKN	NC Mal

*Informationen zur Metrologischen Rückverfolgbarkeit

Die Positivkontrolle wird aus *Plasmodium falciparum* Honduras-1 (GenBank-Nr. M76611) hergestellt, da es keinen internationalen Standard für *Plasmodium*-DNA gibt. Die Plasmid-DNA, die die Zielregion der genomischen DNA von *Plasmodium falciparum* Honduras-1 enthält, diente als Vorlage für die Amplifikation des PC MAL-DNA-Fragments. Das Fragment wird mit der photospektrometrischen Analyse quantifiziert, und die DNA-Konzentration von PC Mal wird auf 2000 Kopien/µl eingestellt.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- (1) Nur zum Gebrauch in der *In-Vitro*-Diagnostik.
- (2) Dieses Produkt ist nur für den Nachweis der DNA von Pf-Parasiten in Humanblutproben bestimmt. Nicht für andere Zwecke verwenden.
- (3) Bei Verwendung dieses Produkts immer diese Serviceanleitung beachten.
- (4) Reagenzien nicht einfrieren.
- (5) Keine abgelaufenen Reagenzien verwenden.
- (6) Reagenzien unterschiedlicher Chargen nicht mischen.
- (7) Reagenzien nicht nachfüllen.
- (8) Die Leistung des Loopamp™ MALARIA Pf Detection Kit hängt von der Kompetenz des Anwenders und der Einhaltung der Verfahrensanweisungen ab. Die Tests sollten von entsprechend geschultem Personal unter strikter Einhaltung der mitgelieferten Anweisungen durchgeführt werden.
- (9) Hitze, Feuchtigkeit und Licht können das dMAL Pf zersetzen. Daher nur die erforderliche Anzahl Reaktionsgefäße (Anzahl Proben + Anzahl Kontrollen) entnehmen und den Aluminiumbeutel sofort wieder verschließen.
- (10) Trockenmittel im Aluminiumbeutel belassen. Hohe Feuchtigkeit kann das getrocknete LAMP-Reagenz in den Reaktionsgefäßen zersetzen.
- (11) Benutzerhandbuch lesen und vor Beginn des Verfahrens vergewissern, dass die erforderlichen Geräte (Turbidimeter oder Inkubator) verfügbar sind.
- (12) Blutproben stellen ein potenzielles Infektionsrisiko dar. Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen anwenden, um die biologische Gefährdung zu minimieren.⁵⁾
- (13) PC Mal und NC Mal enthalten geringe Mengen an Natriumazid als Konservierungsmittel. Da Natriumazid als giftig eingestuft ist, jeglichen Kontakt mit Augen, Mund oder Haut vermeiden.
- (14) Bei versehentlichem Kontakt von Reagenzien mit Augen, Mund oder Haut die betroffene Stelle sofort mit reichlich Wasser abspülen und, falls notwendig, einen Arzt konsultieren.
- (15) PC Mal nicht verdünnen oder den Proben beifügen. Stattdessen PC Mal nur wie in dieser Packungsbeilage beschrieben verwenden, um eine DNA-Kontamination zu vermeiden.
- (16) PC Mal und alle positiven Blutproben getrennt von den anderen Kit-Reagenzien aufbewahren.
- (17) Die Verschlusskappe jedes Reaktionsgefäßes enthält das dMAL Pf in getrockneter Form. Verschlussinnenseite nicht berühren.

- (18) Reaktionsgefäße vor Verwendung sorgfältig auf Risse oder Kratzer prüfen. Beschädigte Gefäße können falsche Ergebnisse liefern und zu DNA-Kontamination von Inkubator und Arbeitsbereich führen.
- (19) Reaktionsgefäße vor Ende der LAMP-Reaktion keinem UV-Licht aussetzen. Längere UV-Lichtbestrahlung kann die Gefäße beschädigen und zu falschen Ergebnissen führen.
- (20) Bei Verwendung von UV-Licht für die optische Fluoreszenzbeurteilung nicht direkt in die UV-Lichtquelle schauen. Schon ein kurzer Blick in das UV-Licht kann die Augen reizen und konjunktivitisähnliche Symptome hervorrufen. Bei direktem Blickkontakt mit dem UV-Licht sollte eine Glasscheibe verwendet oder eine Schutzbrille bzw. Augenmaske getragen werden.
- (21) Im Benutzerhandbuch des Inkubators nachschlagen. Bei Verwendung von HumaLoop M oder Real-Time Turbidimeter HumaTurb C+A die Reaktionsgefäße vorsichtig aus dem Inkubator entnehmen, um Verbrennungen zu vermeiden.
- (22) PC Mal nicht als Positivkontrolle für das Loopamp™ MALARIA Pan Detection Kit und das Loopamp™ MALARIA Pv Detection Kit verwenden. Keine PC aus anderen Kits als Positivkontrolle für dieses Kit verwenden.

ABFALLENTSORGUNG

- (1) Röhrrchen nicht nach der DNA-Amplifikation öffnen. Verschlusskappe geschlossen halten und benutzte Röhrrchen als medizinische Abfälle mittels Verbrennung oder doppelt verpackt in verschleißbaren Plastikbeuteln entsorgen.
- (2) Reaktionsgefäße niemals autoklavieren oder wiederverwenden, da anderenfalls Amplifikate dispergieren und zu Kontamination führen würden.
- (3) Das Hauptmaterial der Reaktionsgefäße und Reagenzröhrrchen ist PP, des Reaktionsgefäßhalters PET, des Aluminiumbeutel Aluminium und des Kit-Koffers Papier.
- (4) Andere Reagenzien, Behälter oder Laborutensilien gemäß lokalen Vorschriften entsorgen.

PROBENGEWINNUNG

- (1) Blutproben sollten sofort nach der Entnahme verwendet werden.
- (2) Blut in einem vom LAMP-Amplifikationsraum getrennten Raum entnehmen. Bei der Blutentnahme können Aerosole entstehen, die die Pf-DNA enthalten und eine Kontamination verursachen.
- (3) EDTA und Citrat NICHT als Antikoagulantien für die Blutentnahme verwenden, wenn das Ergebnis mittels Fluoreszenz abgelesen werden soll. Stattdessen wird die Verwendung von Heparin als Antikoagulant empfohlen.

ERFORDERLICHE MATERIALIEN, NICHT IM KIT ENTHALTEN

- Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit (optional)
- HumaHeat (optional)

Für optischen Fluoreszenznachweis

(Für HumaLoop M)

- HumaLoop M

(Für Inkubator mit UV-Licht)

- Inkubator (Temperaturgenauigkeit: $\pm 0,5$ °C; mit heißer Haube)
- Thermoblock
- UV-Licht oder blaues LED-Licht (Wellenlänge: 240–260 nm und 350–370 nm)
- Schutzbrille oder eine UV-blockierende Augenmaske (optional)

Für Echtzeit-Trübungsmessung

- HumaTurb C+A

Zum Mischen von Reagenzien und Proben

- Mikropipetten (10–100 μ L oder 20–200 μ L) und Pipettenspitzen mit Filter
- Zentrifuge für Mikroreaktionsgefäße (optional)
- Zentrifuge für acht verbundene Röhrrchen (optional)
- HuMax ITA, Mikrozentrifuge (optional)

HERSTELLUNG DER DNA-PROBENLÖSUNG

Um die DNA aus Blutproben zu extrahieren, werden die PURE-Methode und die Boil & Spin-Methode (Erhitzen-und-Abzentrifugieren-Methode) empfohlen. Weitere Informationen sind in der neuesten Version des „Manual of Standard Operating Procedures for malaria LAMP“ (SOP) zu finden.

Bei der PURE-Methode ist auf die folgenden kritischen Punkte zu achten.

- **Proben** : Nicht-antikoagulierendes/heparinisierendes Vollblut oder getrockneter Blutfleck
- **Probenvolumen** : 30 μ L (Vollblut) oder 6-mm-Blutfleckstanze (getrockneter Blutfleck)
- **Zusatzstoff** : 30 μ L einer 334-mM-NaCl-Lösung (nicht im Lieferumfang des Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit) vor dem Erhitzen in das Heizgefäß zugeben
- **Erwärmen** : Für 5 Minuten bei 75 °C

REAGENZVORBEREITUNG

(1) Reagenz zum Nachweis von Malaria Pf

Die erforderliche Anzahl von Röhrrchen aus dem Aluminiumbeutel entnehmen und in das Rack stellen. (Summe der Proben und Kontrollen).

Hinweis: Nach Entnahme der benötigten Röhrrchen den Aluminiumbeutel mit den unbenutzten Röhrrchen sofort wieder verschließen.

(2) Negativkontrolle Mal (NC Mal)

Röhrrchen anschnippen (oder abzentrifugieren), um den Inhalt auf dem Boden des Röhrrchens zu sammeln. 30 μ L der NC Mal in das Heizgefäß pipettieren, das im Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit enthalten ist. Zur Verarbeitung der NC Mal die SOP beachten (im Folgenden wird extrahierte NC Mal als „Negativkontrolllösung“ bezeichnet).

Hinweis: Bei jedem Lauf sollte eine Negativkontrolllösung verwendet werden.

(3) Positivkontrolle Mal (PC Mal)

Röhrrchen anschnippen (oder abzentrifugieren), um den Inhalt auf dem Boden des Röhrrchens zu sammeln.

Hinweis: Die PC Mal sollte bei jedem Lauf verwendet werden.

MESSVERFAHREN

Mischen von Reagenzien und Proben

- (1) HumaLoop M oder Real-Time Turbidimeter HumaTurb C+A einschalten.
- (2) 30 μ L der extrahierten DNA-Lösung unter Verwendung des Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit in ein Reaktionsgefäß geben und die Verschlusskappe schließen.
- (3) 30 μ L der Negativkontrolllösung unter Verwendung des Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit in ein Reaktionsgefäß geben und die Verschlusskappe schließen.
- (4) 30 μ L der PC Mal mit einer Pipette oder dem mitgelieferten Tropfer in ein Reaktionsgefäß geben und Verschlusskappe schließen.
- (5) Alle Reaktionsgefäße anschnippen (oder abzentrifugieren), um die Lösung auf dem Boden der Gefäße aufzufangen.

Hinweis: Nur wenn sich der Flüssigkeitsstand mittig der beiden Linien auf einem Reaktionsgefäß befindet, wurden 30 μ L pipettiert.

- (6) Die getrockneten Reagenzien durch Umdrehen der Reaktionsgefäße und Sammeln der DNA-Lösung in der Verschlusskappe rekonstituieren. Zur Rekonstitution der getrockneten Reagenzien die Reaktionsgefäße 2 Minuten verkehrt herum lagern.
- (7) Zum Mischen des Inhalts die Reaktionsgefäße fünfmal umdrehen. Vollständige Auflösung der getrockneten Reagenzien in der Verschlusskappe prüfen.
- (8) Alle Reaktionsgefäße anschnippen (oder abzentrifugieren), um die Lösung auf dem Boden der Gefäße aufzufangen.

Amplifikation

Für optischen Fluoreszenznachweis

(Für HumaLoop M)

- (1) Überprüfen, ob die Temperatur des HumaLoop M 65,0 °C beträgt.
- (2) Reaktionsgefäße in den HumaLoop M einsetzen und die grüne Taste drücken, um die LAMP-Reaktion zu starten (40 Minuten bei 65,0 °C). Einzelheiten zur Bedienung des HumaLoop M sind im Benutzerhandbuch des HumaLoop M zu finden.
- (3) Fertigstellung der Polymerase-Inaktivierung bestätigen (wird vom HumaLoop M automatisch abgeschlossen). Alle Reaktionsgefäße aus dem HumaLoop M entnehmen.

(Für Inkubator mit UV-Licht)

- (1) Die Temperatur des Inkubators auf 65,0 °C einstellen (wobei die Temperatur der heißen Haube auf 10 °C über der Reaktionstemperatur oder so nahe wie möglich an diesem Wert

eingestellt werden sollte – Temperaturgenauigkeit: $\pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$).
Warten, bis der eingestellte Temperaturwert angezeigt wird.

- (2) Reaktionsgefäße einsetzen und anschließend die Amplifikationsreaktion starten (40 Minuten bei $65,0\text{ }^{\circ}\text{C}$).
- (3) Nach 40 Minuten die Polymerase mittels dem Thermoblock (5 Minuten bei $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder 2 Minuten bei $95\text{ }^{\circ}\text{C}$) inaktivieren, um die Reaktion zu beenden.

Für die Echtzeit-Trübungsmessung mit HumaTurb C+A (siehe Verfabrensablaufdiagramm)

- (1) Real-Time Turbidimeter HumaTurb C+A für den Nachweis mit diesem Produkt konfigurieren.
- (2) Prüfen, ob die angezeigte Temperatur $65,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ erreicht (Turbidimeter sollte vor Gebrauch 20 Minuten vorgeheizt werden).
- (3) Reaktionsgefäße einsetzen und Messung starten.
- (4) Turbidimeter-Anzeige auf einen Trübungsanstieg der Positiv- und Negativkontrollen prüfen. Steigt die Trübung in der Positivkontrolle an, in der Negativkontrolle jedoch nicht, läuft die Amplifikationsreaktion korrekt ab (Abb. 1). Wenn dies nicht der Fall ist, verläuft die Amplifikationsreaktion möglicherweise nicht ordnungsgemäß. In einem solchen Fall sind die betroffenen Proben erneut zu testen.
- (5) Fertigstellung der Polymerase-Inaktivierung bestätigen (wird vom Turbidimeter automatisch abgeschlossen). Alle Reaktionsgefäße aus dem Real-Time Turbidimeter HumaTurb C+A entnehmen und ungeöffnet entsorgen.

Amplifikationsplots mit Malaria Pf Nachweisreagenz

(Analysegerät : Real-Time Turbidimeter HumaTurb C+A)

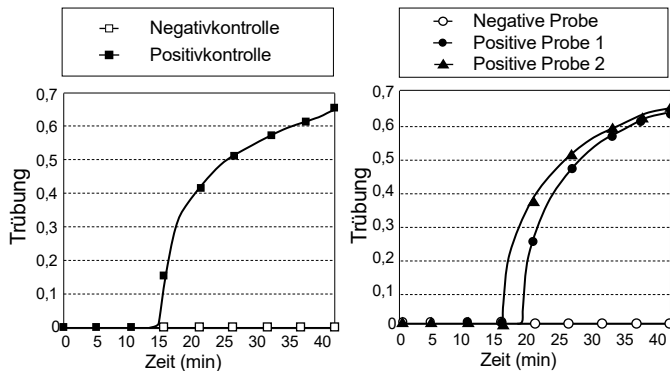


Abb. 1 : Amplifikationsplots für Kontrollen. Abb. 2 : Amplifikationsplots für Proben.

VERFAHRENSHINWEISE

- (1) Die LAMP-Reaktion ist sehr empfindlich, und jede Kontamination mit selbst kleinen Mengen des amplifizierten Produkts könnte zu falsch-positiven Ergebnissen führen.
- (2) Die Bereiche für die Probenvorbereitung und für die Amplifikation trennen.
- (3) Arbeitsplätze vor und nach dem Testen mit $> 0,5\%$ Natriumhypochloritlösung reinigen.
- (4) Alle notwendigen Maßnahmen zur Kontaminationsvermeidung treffen, insbesondere Handschuhwechsel nach Blutprobenübertragung oder bei Kontakt der Handschuhe mit der DNA-Lösung.
- (5) Beim Umgang mit diesem Produkt mikrobielle Kontamination und Nuklease-Kontamination vermeiden. Schon eine geringe Kontamination des Reaktionsgefäßes durch Schweiß oder Speichel kann die DNA zersetzen und ein falsches Ergebnis verursachen.
- (6) Des Weiteren beim Durchführen der DNA-Extraktion die SOP durchlesen.
- (7) Die DNA-Lösung sollte idealerweise sofort nach der Herstellung verwendet werden. Wenn dies nicht möglich ist, kann die DNA-Lösung bei Raumtemperatur gelagert und innerhalb von 72 Stunden verwendet werden.
- (8) **(Für HumaLoop M oder einen anderen Inkubator mit UV-Licht)**
Wenn Bläschen vorhanden sind, die Röhrchen anschnippen (oder abzentrifugieren), um die Bläschen zu entfernen.
(Für Real-Time Turbidimeter HumaTurb C+A)
Da Bläschen in der Reaktionslösung die Trübungsmessung beeinträchtigen und zu einem falschen Ergebnis führen können, sollte Bläschenbildung beim Mischen von Reagenz und

Probenlösung vermieden werden. Wenn Bläschen auftreten, das Röhrchen drehen oder anschnippen, um sie zu lösen.

- (9) Das dMal Pf sollte vollständig aufgelöst sein. Nicht aufgelöste Bestandteile können die Leistung beeinträchtigen, z. B. in Form einer verminderten Sensitivität. Die Röhrchen insbesondere 2 Minuten lang auf dem Kopf stehend lagern.
- (10) Die PC Mal enthält eine hohe Kopienzahl der Kontroll-DNA. Jegliche Kontamination anderer Proben mit der PC Mal vermeiden. Die Proben und die Negativkontrolllösung dispensieren und vor dem Dispensieren der PC Mal alle Reaktionsgefäße verschließen.
- (11) Zum Sammeln der Bestandteile auf dem Boden des Gefäßes das Gefäß mit PC Mal vor dem Öffnen abzentrifugieren oder vorsichtig anschnippen. Gefäß unmittelbar nach dem Dispensieren der PC Mal verschließen.
- (12) Reaktionsgefäße nach Beginn oder Abschluss der LAMP-Reaktion niemals öffnen. Insbesondere ist darauf zu achten, dass die Reaktionsgefäße beim Entladen aus dem Inkubator nicht versehentlich aufgehen.
- (13) Bei Verwendung des HumaLoop M oder des Real-Time Turbidimeter HumaTurb C+A wird die Polymerase-Inaktivierung automatisch durchgeführt.
- (14) Bei anderen Inkubatoren ist bei einem optischen Fluoreszenznachweis vor der Messwerterfassung eine Polymerase-Inaktivierung (5 Minuten bei $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder 2 Minuten bei $95\text{ }^{\circ}\text{C}$) durchzuführen, um falsche Ergebnisse zu vermeiden.
- (15) Amplifikate in den Röhrchen nicht zur Elektrophorese oder für andere Anwendungen wiederverwenden.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Für optischen Fluoreszenznachweis

(Für HumaLoop M)

Jedes Reaktionsgefäß in die Fluoreszenz-Detektionseinheit stellen, bestrahlen und von der Seite beobachten.

(Für Inkubator mit UV-Licht)

Den Boden jedes Reaktionsgefäßes bestrahlen und von der Seite durch eine Schutzbrille oder eine UV-blockierende Augenmaske beobachten.

Für einen gültigen Lauf müssen die folgenden Ergebnisse erzielt werden, wenn sie zum angegebenen Zeitpunkt abgelesen werden:

- Positivkontrolle: Emission von grünem Fluoreszenzlicht
- Negativkontrolle: keine Emission von Fluoreszenzlicht.

Falls eine der Kontrollen ungültig ist, sollten alle Proben der Testserie als ungültig gemeldet und die Proben erneut gemessen werden.

Nach erfolgter Bestätigung der Gültigkeit der Testserie sind die Proben wie folgt zu beurteilen:

- Positive Probe: Emission von grünem Fluoreszenzlicht.
- Negative Probe: keine Emission von Fluoreszenzlicht.

Für die Echtzeit-Trübungsmessung mit HumaTurb C+A

Nachdem bestätigt wurde, dass die Trübung in der Positivkontrolle zunimmt, in der Negativkontrolle jedoch nicht, sind die Proben nach den folgenden Kriterien (Abb. 1 und 2) zu bewerten.

- Positiv: leichter Trübungsanstieg zu beobachten
- Negativ: kein Trübungsanstieg zu beobachten

Anmerkungen:

- (1) Die Minimum-Nachweisempfindlichkeit des Loopamp™ MALARIA Pf Detection Kit liegt bei 12,5 Kopien pro Test. Im Falle eines negativen Testergebnisses sollten Patienten mit anhaltenden oder sich verschlimmernden Symptomen für einen erneuten Test in Betracht gezogen werden, und andere mögliche Ursachen der Symptome sollten ebenfalls in Betracht gezogen und untersucht werden. Darüber hinaus ist der LAMP-Test hochempfindlich und kann eine geringe Parasitämie nachweisen, die nicht die unmittelbare Ursache für die auftretenden Symptome ist. Daher sollte der klinische Zustand des Patienten immer berücksichtigt werden, wenn eine endgültige Diagnose gestellt und die Behandlung festgelegt wird.
- (2) Obwohl Primer auf eine bestimmte Genregion mit einer relativ geringen Anzahl von Variationen ausgerichtet sind, kann *Plasmodium falciparum* möglicherweise weitere Variationen in dieser Region erwerben und weniger empfindlich auf dieses Produkt reagieren. Deshalb kann eine Pf-Infektion trotz negativen Tests nicht immer ausgeschlossen werden.

(3) Dies ist ein Kit für den qualitativen Nachweis. Es ist nicht für die quantitative Bestimmung konzipiert. Daher korreliert die Intensität des beobachteten Fluoreszenzlichts oder die Anstiegszeit der vom Real-Time Turbidimeter HumaTurb C+A gemessenen Trübung nicht mit der Menge an Template-DNA.

INTERFERENZEN

Unsere internen Studien ergaben, dass die Trübungsmessung durch die Anwesenheit von Heparin-Na (2.600 Einheiten/dL), Heparin-Li (2.600 Einheiten/dL), EDTA-2Na (300 mg/dL), EDTA-2K (380 mg/dL), EDTA-3K (340 mg/dL), Natriumcitrat (7,6 %), freiem Bilirubin (66,3 mg/dL), konjugiertem Bilirubin (67,0 mg/dL), Chylus (Formazintrübung: 5.433) und hämolysiertem Hämoglobin (1.567 mg/dL) nicht beeinflusst war. EDTA kann zu falsch-positiven Ergebnissen führen, wenn das Ergebnis mittels Fluoreszenz gemessen wird.

Was die Medikamente betrifft, so haben unsere internen Studien gezeigt, dass die Messung nicht durch die Anwesenheit von Proguanil (0,6 µg/mL), Chloroquin (1,1 µg/mL), Chinin (26,7 µg/mL), Doxycyclinhydrochlorid (10,0 µg/mL), Mefloquin (4,7 µg/mL), Primaquin (0,5 µg/mL), Artemisinin (2,6 µg/mL), Loxoprofen-Natrium (17,7 µg/mL), Paracetamol (9,0 µg/mL), Isoniazid (23,3 µg/mL), Ethambutol (5,7 µg/mL), Rifampicin (26,6 µg/mL), Pyrazinamid (116,7 µg/mL), Clarithromycin (12,4 µg/mL), Streptomycin (133,3 µg/mL), Cefotaxim-Natrium (333,3 µg/mL) und Levofloxacin (7,5 µg/mL) beeinflusst wird.

LEISTUNGSDATEN

(1) Genauigkeit

Beim Testen der folgenden Proben:

- Negative Probe (Konzentration: 0 Kopie/Test)
- Positive Probe 1 (100 Kopien/Test)
- Positive Probe 2 (1.000 Kopien/Test)

Die negative Probe sollte negativ getestet und die positiven Proben 1 und 2 positiv getestet werden.

(2) Reproduzierbarkeit innerhalb einer Testserie

Beim Testen von fünf negativen und fünf positiven Proben gleichzeitig sollten die negativen Proben durchgehend negativ getestet und die positiven Proben durchgehend positiv getestet werden.

(3) Nachweisgrenze

12,5 Kopien/Test

(4) Kreuzreaktivität

Das Messsystem wurde positiv getestet auf *Plasmodium falciparum* und negativ auf andere Pathogene, wie in der folgenden Tabelle angegeben:

Gattung <i>Plasmodium</i>	
<i>Plasmodium falciparum</i>	Positiv
<i>Plasmodium vivax</i>	Negativ
<i>Plasmodium ovale</i>	Negativ
<i>Plasmodium malariae</i>	Negativ
<i>Plasmodium knowlesi</i>	Negativ
Andere Krankheitserreger	
<i>Trypanosoma brucei</i>	Negativ
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Negativ
<i>Leishmania donovani</i>	Negativ
<i>Leishmania chagasi</i>	Negativ
<i>Toxoplasma gondii</i>	Negativ
<i>Entamoeba histolytica</i>	Negativ
<i>Giardia intestinalis</i>	Negativ
<i>Theileria parva</i>	Negativ
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Negativ
Andere	
Humane genomische DNA	Negativ

(5) Informationen zu einem Kalibrator

Beim Leistungstest für dieses Produkt wurde die Plasmid-DNA verwendet, die die mitochondriale DNA von Pf als Kalibrator verwendet.

(6) Klinische Leistung

Malaria wird durch bestimmte Parasiten der Gattung *Plasmodium* verursacht, die durch die Stiche infizierter Moskitos übertragen werden. Nachdem sie sich einige Zeit in der Leber entwickelt haben, werden Parasiten im Blutstadium freigesetzt, die in die roten Blutkörperchen eindringen, diese bei der anschließenden Vermehrung lysieren und Symptome wie Fieber verursachen. Der LAMP-Test weist die DNA von Parasiten im Blutstadium nach.

Der Malaria-LAMP-Test wurde in Blutproben evaluiert, die zur Untersuchung auf Malaria in ein Speziallabor geschickt wurden. Nach der Standardmikroskopie wurden die Proben anonymisiert, die DNA wurde mit der PURE-Methode aus den Blutproben gewonnen und mit dem Malaria-LAMP unter Verwendung von Pf-spezifischen Primern mit zwei verschiedenen Auslesemethoden getestet. Schließlich wurde die nested-PCR als Referenzmethode verwendet. Es wurden insgesamt 705 Malaria-LAMP-Tests mit der nested-PCR als Referenzmethode verglichen. Davon stammten 56 von Patienten, die durch Mikroskopie als positiv eingestuft wurden. Die Sensitivität und Spezifität der Malaria-Pf-spezifischen Primer betrug 98,4 % bzw. 98,1 %.⁶⁾

Malaria LAMP vs. nested-PCR	
Diagnostische Sensitivität	98,4 % (91,4-100,0)
Diagnostische Spezifität	98,1 % (96,8-99,0)
Positiver prädiktiver Wert	83,8 %
Negativer prädiktiver Wert	99,8 %
Wahrscheinlichkeitsverhältnis + (Sensitivität/(1-Spezifität))	51,79
Wahrscheinlichkeitsverhältnis - ((1-Sensitivität)/Spezifität)	0,0163

Malaria LAMP vs. Mikroskopie	
Diagnostische Sensitivität	100,0 % (93,2-100,0)
Diagnostische Spezifität	96,6 % (94,9-97,9)
Positiver prädiktiver Wert	70,3 %
Negativer prädiktiver Wert	100,0 %
Wahrscheinlichkeitsverhältnis + (Sensitivität/(1-Spezifität))	29,41
Wahrscheinlichkeitsverhältnis - ((1-Sensitivität)/Spezifität)	0,0000

BESTELLINFORMATIONEN

Produktnummer	Produktbezeichnung	Wirksame Bestandteile
978000	Loopamp™ MALARIA Pf Detection Kit	96 Tests
962000	HumaLoop M	1 Haupteinheit 1 Fluoreszenz-Detektionseinheit
970000	Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit	90 Tests
963200	HumaTurb C+A	1 Kontrollgerät 1 Amplifikationsgerät
964000	HumaHeat Incubator	Thermoblock
980000	HuMax ITA	Mikrozentrifuge

HINWEIS

Bitte melden Sie jegliche schwerwiegenden Zwischenfälle, die im Zusammenhang mit dem Gerät auftreten, dem Hersteller oder der zuständigen Behörde des Mitgliedsstaates, in dem sich der Benutzer und/oder der Patient aufhält.

LITERATUR

- 1) Notomi T., et al.: Nucleic Acids Research 28, No. 12, e63 (2000)
- 2) Nagamine K., et al.: Clin. Chem. 47, No. 9, 1742-1743 (2001)
- 3) Mori Y., et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 289, No. 1, 150-154 (2001)
- 4) Tomita N., et al.: Nat. Protoc. 3, No. 5, 877-882 (2008)
- 5) The guideline for the bio-safety and bio-hazard (by the Japanese Society for Bacteriology): Japanese Journal of Bacteriology 54, No. 3, 667-715 (1999)
- 6) Spencer D. Polley, et al. J Infect Dis. 208(4), 637-644 (2013)

Ablaufdiagramm

Vorgehensweise für Echtzeit-Trübungsmessung

Vorbereitung der Probenlösung

DNA-Probenlösungen vorbereiten, indem die DNA aus gewonnenen Blutproben extrahiert wird.

Reagenzvorbereitung

Die erforderliche Anzahl von Reaktionsgefäßen des dMAL Pf nehmen.

(Für Proben, Negativ- und Positivkontrollen)

Mischen von Reagenz und Probenlösung

30 µL der Proben- oder Kontrolllösung in jedes Reaktionsgefäß geben.

Negativkontrolllösung als Negativkontrolle verwenden.
PC Mal als Positivkontrolle verwenden.
(Positivkontrolle zuletzt vorbereiten.)

Reaktionsgefäße umdrehen, um die Lösung in der Verschlusskappe zu sammeln. Die Röhrchen 2 Minuten lang auf dem Kopf stehend lagern.

Reaktionsgefäße zum Mischen des Inhalts fünf Mal umdrehen und anschließend abzentrifugieren.

(Bläschenbildung vermeiden.)

Amplifikation

Reaktionsgefäße in den Reaktionsblock des Turbidimeters einsetzen.

Reaktion gemäß Gebrauchsanweisung des Turbidimeters starten und die Trübung messen und beurteilen (40 Minuten bei 65,0 °C).

Abschluss der Polymerase-Inaktivierung (5 Minuten bei 80 °C oder 2 Minuten bei 95 °C) bestätigen. Alle Reaktionsgefäße aus dem Turbidimeter entnehmen und ungeöffnet entsorgen. Dabei darauf achten, die Gefäße nicht zu beschädigen.

TABELLE DER SYMBOLE

REF Katalognummer	In Serviceanleitung nachschlagen	Verfallsdatum
IVD Medizinprodukt für In-vitro-Diagnostik	Hersteller	Temperaturbegrenzung
LOT Chargennummer	Inhalt ausreichend für <n> Tests	Bevollmächtigter Vertreter in der Europäischen Gemeinschaft



Importeur



HUMAN Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH

Max-Planck-Ring 21, 65205 Wiesbaden, Germany



EIKEN CHEMICAL CO., LTD.

4-19-9 Taito, Taito-ku, Tokyo, 110-8408 JAPAN
<https://www.eiken.co.jp/en/>