



380270-A

English

REF 977000

Loopamp™ MALARIA Pan Detection Kit

INTENDED USE

The Loopamp™ MALARIA Pan Detection Kit is a qualitative *in vitro* diagnostic test for the detection of *Plasmodium* DNA extracted from human blood samples.

TEST PRINCIPLES

This product is based on the nucleic acid amplification method, LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification), developed by Eiken Chemical Co., Ltd.

The LAMP method has the following characteristics: (1) Only one polymerase enzyme is required and the amplification reaction proceeds under isothermal conditions;^{1,2)} (2) it has an extremely high specificity because of the use of four primers recognizing six distinct regions on the target; (3) it has a high amplification efficiency and can produce a high concentration of amplified product in a short time, which makes visual or automated detection possible.^{3,4)}

The Malaria Pan (genus)-specific primers provided with this product have been designed to detect the mitochondrial DNA of the four most widespread *Plasmodium* species causing malaria (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* and *P. malariae*). The targeted DNA sequences have been confirmed by alignment analysis to have well-conserved base sequence in all these *Plasmodium* species.

The test DNA solution extracted from blood samples is dispensed into a reaction tube. The strand displacement DNA polymerase, deoxynucleotide triphosphates (dATP, dCTP, dGTP and dTTP), calcein, reaction buffers and Malaria Pan (genus)-specific primers are stored in dried form in the cap of the reaction tube. These dried LAMP reagents (Malaria Pan detection reagents (dMAL Pan)) dissolve when the DNA solution is added. The reaction tube is then incubated at 65.0°C and the DNA is amplified by the strand displacement DNA polymerase in accordance with the LAMP reaction.

The detection of amplified products is based on turbidity of magnesium pyrophosphate (a white precipitate produced as a by-product of DNA amplification).³⁾ Alternatively, visual detection under UV light may be used. Before the DNA amplification, calcein contained in the reagent is in the quenched state as it is bound to manganese ions. At the start of the DNA amplification, the pyrophosphate ions that are generated out-compete the manganese ions for binding sites, and thus the calcein becomes fluorescent.⁴⁾

CONTENTS OF THE KIT

Reagents are stable until the date on the label assuming the container remains unopened at a storage temperature of 2 – 30°C.

Malaria Pan detection reagent (dMAL Pan).....2 x 48 tubes

The following reagents in dried form are contained in each reaction tube:

- Bst* DNA polymerase¹
- Deoxynucleotide triphosphates
- Magnesium sulfate
- Calcein
- Manganese chloride
- Primers²

Positive control Mal (PC Mal)³ 1 x 1.0 mL

Negative control Mal (NC Mal)..... 3 x 0.5 mL

30µL dropper..... 5 x 12 droppers

*1: *Bst* DNA polymerase derived from *Bacillus stearothermophilus* is a strand displacement DNA polymerase that lacks 5'→3' exonuclease activity.

*2: Primers designed for the mitochondrial DNA of *Plasmodium* parasites, purified from synthesized oligonucleotides by HPLC.

*3: PC Mal contains a product resulting from *in vitro* amplification of an

artificial gene designed from the mitochondrial DNA of *Plasmodium falciparum* (GenBank No.M76611).

The abbreviations of names of the following reagents, their Lot No. and the manufacturer (EKN), are printed on the containers.

Reagents	Labelling on the tube	Code on the cap
Positive control Mal	PC Mal Lot No., EKN	PC Mal
Negative control Mal	NC Mal Lot No., EKN	NC Mal

WARNINGS AND PRECAUTIONS

- (1) For *in vitro* diagnostic use only.
- (2) This product is designed only for the detection of DNA of *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* and *P. ovale* parasites in blood samples of human origin. Do not use for other purposes.
- (3) When using this product, always follow this Instructions for Use.
- (4) Do not freeze the reagents.
- (5) Do not use any expired reagent.
- (6) Do not mix reagents from different Lots.
- (7) Do not replenish any reagent.
- (8) Performance of the Loopamp™ MALARIA Pan Detection Kit is dependent on operator proficiency and adherence to procedural directions. Testing should be performed by properly trained personnel strictly according to the instructions provided.
- (9) Exposure to heat, humidity and light may cause deterioration of the dMAL Pan. Remove only the required number of reaction tubes (sum of samples and controls) and re-seal the aluminium pouch immediately.
- (10) Do not remove the desiccant from the aluminium pouch. High humidity can cause deterioration of the dried LAMP reagent in the reaction tubes.
- (11) Read the instruction manual and ensure required equipment (turbidimeter or incubator) is available before commencing the procedure.
- (12) Blood samples pose a potential risk for infection. Use universal precautions to minimize biohazard.⁵⁾
- (13) PC Mal and NC Mal contain a small amount of sodium azide as preservative. Sodium azide is classified as toxic. Avoid any contact with eyes, mouth, or skin.
- (14) In case of accidental contact of any reagent with eyes, mouth, or skin, immediately rinse the affected site with running water and seek medical advice.
- (15) Do not dilute or add the PC Mal to the samples. Use the PC Mal only as described in this package insert in order to avoid DNA contamination.
- (16) Store the PC Mal and any positive blood samples separately from the other kit reagents.
- (17) The cap of each reaction tube contains dMAL Pan in dried form. Do not touch the inside of the cap.
- (18) Before using the reaction tubes, check carefully to see if they have any cracks or scratches. Damaged tubes might give false results and lead to DNA contamination of the incubator and work area.
- (19) Do not expose reaction tubes to UV light before the end of the LAMP reaction. Prolonged exposure to UV light might damage the tubes and lead to false results.
- (20) When a UV light is used for visual fluorescence judgment, do not stare directly at UV light. Since UV light is harmful to the eyes, even watching for a short period may irritate eyes and cause symptoms similar to conjunctivitis. Use a glass screen or wear protective goggles/glasses/face mask whenever looking directly at the UV light.
- (21) Refer to the manual of the incubator. When the HumaLoop M or the Real-Time Turbidimeter HumaTurb C+A is used, be careful when removing the reaction tubes from the incubator to avoid burns.
- (22) Do not use PC Mal as positive control for Loopamp™ MALARIA Pf Detection Kit, Loopamp™ MALARIA Pv Detection Kit and Loopamp™ MALARIA Pan/Pf Detection Kit. Do not use PC of other kits as positive control for this kit.

WASTE DISPOSAL

- (1) Do not open the tubes after DNA amplification. Leave the cap closed and dispose the used tubes as medical waste by incineration or after double bagging with sealable plastic bags.

- (2) Never autoclave or reuse the reaction tubes. Amplified products will disperse and cause contamination.
- (3) The main material for the reaction tubes and reagent tubes is PP; for the reaction tube tray, PET; for the aluminium pouch, aluminium; and for the kit case, paper.
- (4) Dispose of any other reagent, container, or lab ware in accordance with local regulations.

SPECIMEN COLLECTION

- (1) Blood samples should be used immediately after collection.
- (2) Collect blood in a separate room from the LAMP amplification room. Aerosols containing *Plasmodium* DNA can be generated during blood collection and may cause contamination.
- (3) DO NOT USE EDTA and Citrate as anticoagulant for blood collection if the result is to be read by fluorescence. The use of heparin as anticoagulant is recommended.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

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

For visual fluorescence detection

(For HumaLoop M)

- HumaLoop M

(For other incubator using UV light)

- Incubator (temperature accuracy: $\pm 0.5^\circ\text{C}$; with hot bonnet)
- Heating block
- UV light or Blue LED light (wavelength: 240 to 260 nm, and 350 to 370 nm)
- Goggles/glasses or other UV-blocking eye mask

For real-time turbidity detection

- HumaTurb C+A

For reagent and sample mixing

- Micropipettes (10 to 100 μL , and 20 to 200 μL) and pipette tips with filter
- Centrifuge for micro-tubes (optional)
- Centrifuge for eight connected tubes (optional)
- HuMax ITA (optional)

PREPARATION OF SAMPLE DNA SOLUTION

To extract the DNA from blood samples, boil & spin and PURE method are recommended. The standard operating procedures (SOP) of both methods are provided at

<https://www.finddx.org/wp-content/uploads/2016/04/SOP-LAMP-Malaria-Aug2012.pdf>

Pay attention to the following critical points for PURE method.

- **Samples : Blood samples collected by finger prick, collected in heparin tubes or whole blood dried on filter paper**
- **Sample volume : 30 μL (fresh blood or blood with heparin) or 6-mm blood spot punch (dried blood spot)**
- **Additive : Add 30 μL of 334mM NaCl solution (not included in the Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit) to the heating tube before heating**
- **Heating : For 5 minutes at 75°C**

PREPARATION OF REAGENTS

(1) Malaria Pan detection reagent

Remove the required number of tubes from the aluminium pouch and put them in the provided rack (sum of samples and controls).

Note: After removing the required tubes, reseal the aluminium pouch with any unused tubes immediately.

(2) Negative control Mal (NC Mal)

Flick (or spin) down the tube before using, in order to collect the content at the bottom of the tube.

Note: NC Mal should be used with every run.

(3) Positive control Mal (PC Mal)

Flick (or spin) down the tube before using, in order to collect the content at the bottom of the tube.

Note: PC Mal should be used with every run.

MEASUREMENT PROCEDURE

Reagent and sample mixing

- (1) Turn on the HumaLoop M or the Real-Time Turbidimeter HumaTurb C+A.
- (2) Dispense 30 μL of extracted DNA solution into a reaction tube using the pipette and close the cap.

- (3) Dispense 30 μL of NC Mal into a reaction tube using the pipette or dropper, and close the cap.
- (4) Dispense 30 μL of PC Mal into a reaction tube using the pipette or dropper, and close the cap.
- (5) Flick (or spin) down all tubes to collect the solution at the bottom of the tubes.

Note: When using the PURE device make sure the liquid level is closer to the upper line of the two lines on a reaction tube to ensure that the correct volume has been dispensed.

- (6) Reconstitute the dried reagents in the cap by inverting the reaction tubes and collecting the DNA solution in the cap. Leave the tubes standing upside down for 2 minutes to reconstitute the dried reagents.
- (7) Invert the reaction tubes 5 times to mix the contents. Make sure that the dried reagents in the cap are fully dissolved (the solution should have a slight orange colour).
- (8) Flick (or spin) down all tubes to collect the solution at the bottom of the tubes.

Amplification

For visual fluorescence detection

(For HumaLoop M)

- (1) Check that the temperature of the HumaLoop M is 65.0°C.
- (2) Load the reaction tubes into the HumaLoop M and press the green button to start the LAMP reaction (40 minutes at 65.0°C). See the HumaLoop M instruction manual for details on how to operate the incubator.
- (3) Confirm the completion of polymerase inactivation (automatically completed by the HumaLoop M). Take all reaction tubes from the HumaLoop M.

(For other incubator using UV light)

- (1) Set the temperature of the incubator to 65.0°C (with hot bonnet temperature set to 10°C above the reaction temperature or as near to this figure as possible – temperature accuracy: $\pm 0.5^\circ\text{C}$). Wait until the displayed temperature reaches the set value.
- (2) Load the reaction tubes and then start amplification reaction (for 40 minutes at 65.0°C).
- (3) 40 minutes later, inactivate the polymerase using the heating block (for 5 minutes at 80°C, or for 2 minutes at 95°C) to terminate the reaction.

For real-time turbidity detection with HumaTurb C+A (see Flow chart of the procedure)

- (1) Configure the Real-Time Turbidimeter HumaTurb C+A for detection with this product.
- (2) Check if the displayed temperature reaches 65.0°C (allow the turbidimeter to warm up for 20 minutes before use).
- (3) Insert the reaction tubes and start measurement.
- (4) Watch the display of the turbidimeter to check the positive and negative controls for any increase in turbidity. If the turbidity increases in the positive but not in the negative control solution, amplification reaction is proceeding properly (Fig1). If this is not the case, amplification reaction may be proceeding in a wrong way. In such a case, retest affected samples from reagent preparation.
- (5) Confirm the completion of polymerase inactivation (automatically completed by the turbidimeter). Take all reaction tubes from the HumaTurb C+A and discard them without opening.

Amplification plots by Malaria Pan detection reagent

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

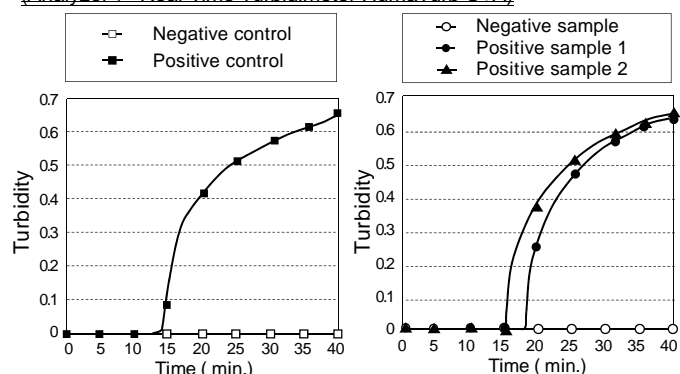


Fig1 : Amplification plots for controls

Fig2 : Amplification plots for samples

PROCEDURAL NOTES

- (1) The LAMP reaction is very sensitive and a contamination with small

amounts of amplified product might lead to false positive results.

- (2) Separate the sample preparation and the amplification areas.
- (3) Clean benches with over 0.5% sodium hypochlorite before and after performing the test.
- (4) Change gloves after transferring the blood or if the gloves come in contact with the DNA solution.
- (5) When handling this product, avoid microbial contamination and nuclease contamination. Even a small amount of contamination of the reaction tube from sweat or saliva may decompose the DNA and cause a false result.
- (6) Furthermore, read the SOP⁶⁾ when performing DNA extraction.
- (7) The DNA solution should ideally be used immediately after preparation.
- (8) **(For HumaLoop M or other incubator using UV light)**
If bubbles are present, flick the tubes to release them.
(For Real-Time Turbidimeter HumaTurb C+A)
Since bubbles in reaction solution may interfere with turbidity measurement and cause a false result, avoid forming any bubble when mixing reagent and sample solution. If bubbles occur, spin or flick the tube to release them.
- (9) dMAL Pan should be fully dissolved. Any undissolved portion may influence the performance, such as causing a decrease in sensitivity.
- (10) The PC Mal contains a high copy number of control DNA. Avoid any contamination of other samples with the PC Mal. Dispense the samples and the NC Mal and close all reaction tubes before dispensing the PC Mal.
- (11) Flick (or spin) down the PC Mal tube before opening it, in order to collect the content at the bottom of the tube. Close the tube immediately after dispensing the PC Mal.
- (12) Never open the reaction tubes once the LAMP reaction has started or after completion. Be particularly careful when unloading the reaction tubes from the incubator to avoid opening the tubes accidentally.
- (13) When the HumaLoop M or the Real-Time Turbidimeter HumaTurb C+A is used, polymerase inactivation is automatically performed.
- (14) For other incubators, when visual fluorescence judgment is chosen, inactivate the polymerase (for 5 minutes at 80°C, or for 2 minutes at 95°C) before reading, or false results will be caused.
- (15) Do not reuse any amplified product in the tubes for electrophoresis or other applications.

INTERPRETATION OF RESULTS

For visual fluorescence detection

(For HumaLoop M)

Set each reaction tube into the Fluorescence Detection Unit, irradiate and observe the tube from the side.

(For other incubator using UV light)

Irradiate the bottom of each reaction tube and observe from the side through goggles or other UV-protective eye mask.

For a valid run, the following results must be obtained when read at the specified time:

- Positive control: Green fluorescent light is emitted.
- Negative control: No fluorescent light is emitted.

If any control is invalid, all samples in the run should be reported as invalid and the samples should be retested.

After confirming that the run is valid, evaluate samples as follows:

- Positive sample: Green fluorescent light is emitted.
- Negative sample: No fluorescent light is emitted.

For real-time turbidity detection with HumaTurb C+A

After confirming that the turbidity increases in the positive control but not in the negative control solution, evaluate samples in accordance with the following criteria (Fig 1 and 2).

- Positive: Some increase is observed in turbidity.
- Negative: No increase is observed in turbidity.

Notes:

- (1) The minimum detection sensitivities of the MALARIA Pan Detection Kit are 5.0 copies per test, respectively. In the case of a negative test result, patients with any persisting or worsening symptoms should be considered for retesting and other possible causes of symptoms should also be considered and investigated. The LAMP assay is highly sensitive and may detect low-level parasitaemia that are not the direct cause of the presenting symptoms. The patient's clinical condition should always be taken into account when making a final diagnosis and determining management.
- (2) Although the primers have been designed to target a region containing a relatively small number of variations, it is conceivable that

Plasmodium infections may occur with variations in this region that are not well detected by this product. Therefore, a negative test does not always rule out an infection by *Plasmodium* species.

- (3) This product is a kit for a qualitative detection; it is not designed for a quantitative measurement. The intensity of the fluorescent light observed or the rise time of turbidity measured by the Real-Time Turbidimeter does not correlate with the concentration of template DNA.

INTERFERING SUBSTANCES

Our in-house studies have revealed that the turbidimetry measurement was not affected by the presence of EDTA (6.0 nmol/test), free bilirubin (1.2 µg/test), conjugated bilirubin (1.2 µg/test), chyle (formazine turbidity:14,400), hemolytic hemoglobin (3.4 µg/test) and human genomic DNA (1.2 µg/test). EDTA may cause false positive results when the result is read by fluorescence.

With regard to drugs, our in-house studies have revealed that the measurement was not affected by the presence of isoniazid (840 ng/test), ethambutol (204 ng/test), rifampicin (958 ng/test), pyrazinamide (4.2 µg/test), acetaminophen (322 ng/test), loxoprofen sodium (637 ng/test), cefotaxime sodium (12 µg/test), levofloxacin (270 ng/test), atovaquone (1.59 µg/test), proguanil (20 ng/test), chloroquine (40 ng/test), quinine (960 ng/test), doxycycline hydrochloride (360 ng/test), mefloquine (168 ng/test), primaquine (18 ng /test) and artemisinin (93 ng/test).

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

(1) Sensitivity and accuracy

In testing the following samples:

- Negative sample (concentration: 0 copy/test)
- Positive sample 1 (100 copies/test)
- Positive sample 2 (1,000 copies/test);

The negative sample shall test negative and the positive samples 1 and 2 shall test positive.

(2) Within-run reproducibility

In testing five negative and five positive samples simultaneously, the negative samples shall test negative throughout and the positive samples shall test positive throughout.

(3) Limit of detection

5.0 copies/test

(4) Cross-reactivity

The measurement system tested positive for *Plasmodium* species and negative for other pathogens, as detailed in the table below:

<i>Plasmodium</i> genus	
<i>Plasmodium falciparum</i>	Positive
<i>Plasmodium vivax</i>	Positive
<i>Plasmodium ovale</i>	Positive
<i>Plasmodium malariae</i>	Positive
Other pathogens	
<i>Trypanosoma brucei</i>	Negative
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Negative
<i>Leishmania donovani</i>	Negative
<i>Schistosoma mansoni</i>	Negative
<i>Theileria parva</i>	Negative
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Negative
Influenza A virus	Negative
Human immunodeficiency virus	Negative

(5) Information about a calibrator

The performance test for this product used plasmid DNA containing the mitochondrial DNA of *Plasmodium falciparum* as a calibrator.

(6) Clinical performance

Malaria is caused by certain parasites of the *Plasmodium* genus, which are transmitted via the bites of infected mosquitoes. After a period of development in the liver, blood stage parasites are released. The blood-stage parasites enter red blood cells, lysing the cells during subsequent reproduction and causing symptoms including fever. The LAMP assay detects DNA from blood-stage parasites.

The Malaria LAMP was evaluated in blood samples sent for malaria testing in a specialist laboratory. Following standard microscopy, samples were anonymised, DNA was extracted from the blood samples using the PURE[®] method and tested by the Malaria LAMP kit using Malaria Pan (genus)-specific primers, with two different read-out methods. Finally, nested PCR was deployed as a reference method. 705 Malaria LAMP tests, of which 56 were from patients positive by

microscopy, were compared to the nested PCR as a reference method. Sensitivity and specificity of the Malaria Pan (genus)-specific primers were 97.0% and 99.2%, respectively.

	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	PPV*	NPV*
Malaria LAMP vs nested PCR	97.0%	99.2%	92.9%	99.7%
Malaria LAMP vs microscopy	100.0%	97.8%	80.0%	100.0%
	89.6 – 99.6	98.2 – 99.7		
	93.6 – 100.0	96.4 – 98.8		

*positive and negative predictive values

ORDERING INFORMATION

Product Code	Product Name	Contents
977000	Loopamp™ MALARIA Pan Detection Kit	96 tests
962000	HumaLoop M	1 Main Unit 1 Fluorescence Detection Unit
970000	Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit	90 tests
963200	HumaTurb C+A	1 Control Unit 1 Amplification Unit
964000	HumaHeat	Heating block
980000	HuMax ITA	Bench-top centrifuge

REFERENCES

- 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) <https://www.finddx.org/wp-content/uploads/2016/04/SOP-LAMP-Malaria-Aug2012.pdf>

Flow chart

Operation procedure for real-time turbidity detection

Preparation of sample solution

Prepare sample DNA solutions by extracting DNA from collected blood samples.

Reagent preparation

Take the required number of reaction tubes of dMAL Pan.

(For samples, negative and positive controls)

Mixing of reagent and sample solution

Transfer 30 µL of sample or control solution into each reaction tube.

Use NC Mal as negative control.
Use PC Mal as positive control.
(The positive control should be prepared at last.)

Invert the reaction tubes to collect the solution in the cap. Leave the tubes standing upside down for 2 minutes.

Invert the reaction tubes 5 times to mix the contents and then spin them down.

(Avoid making any bubbles.)

Amplification

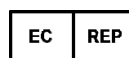
Load the reaction tubes onto the reaction block of the turbidimeter.

As directed in the instructions for use of the turbidimeter, start reaction and measure and evaluate the turbidity (for 40 minutes at 65.0°C).

Confirm the completion of polymerase inactivation (for 5 minutes at 80°C, or for 2 minutes at 95°C). Take all reaction tubes from the turbidimeter and discard them without opening. Be careful not to damage the tubes.



Exclusive distributor



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

Date of Issue: October 1, 2018



Français

REF 977000

Loopamp™ MALARIA Pan

Detection Kit

UTILISATION PRÉVUE

Le Loopamp™ MALARIA Pan Detection Kit est un test qualitatif de diagnostic *in vitro* pour la détection de l'ADN de *Plasmodium* extrait de prélèvements sanguins.

PRINCIPE DU TEST

Le test est basé sur la méthode d'amplification d'acide nucléaire LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification ; amplification isotherme induite par boucle) développée par Eiken Chemical Co., Ltd.

La méthode LAMP possède les caractéristiques suivantes : (1) Une seule enzyme est requise et la réaction d'amplification se fait sous des conditions isothermiques ;^(1),2) (2) Elle présente une spécificité très élevée par son utilisation de quatre amorces reconnaissant six régions distinctes de la cible ; (3) Elle présente une amplification à très haut rendement et permet une amplification en un temps court, et (4) Elle génère une quantité très élevée de produits d'amplification par le biais duquel une simple détection visuelle devient possible.^(3),4)

Les amorces spécifiques "Malaria Pan (genus)" fournies dans ce produit ont été construites pour détecter l'ADN mitochondrial des quatre souches pathogènes les plus répandues du paludisme (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* et *P. malariae*). Les séquences cibles d'ADN ont été confirmées par l'analyse d'alignement comme étant bien conservées chez ces souches de *Plasmodium*.

La solution d'ADN à tester, extrait d'un spécimen de sang, est transférée dans un tube à réaction. L'ADN polymérase à déplacement de brin, les désoxynucléotide triphosphatés (dATP, dCTP, dGTP et dTTP), la calcéine, les tampons de réactions et les amorces spécifiques Malaria Pan (genus) sont conservés sous forme sèche dans le bouchon des tubes de réaction. Le réactif LAMP à l'état sec (réactif de détection du Malaria Pan (dMAL Pan)) sera dissout par l'ajout de la solution d'ADN. Le tube de réaction est incubé à 65,0°C et l'ADN est amplifié suivant la réaction LAMP à l'aide de l'ADN polymérase à déplacement de brin.

La détection du produit d'amplification est fondée sur la mesure de la turbidité d'un sous-produit, le pyrophosphate de magnésium (précipité blanc).⁽³⁾ Une évaluation visuelle sous irradiation UV à la place de mesure de turbidité est également possible. La calcéine contenue dans le réactif LAMP est libérée durant l'amplification, ce qui produit une lumière fluorescente détectable à l'œil nu.⁽⁴⁾ Avant la réaction d'amplification de l'ADN, la calcéine contenue dans le réactif est éteinte car les ions de manganèse lui sont liés ; une fois la réaction de LAMP démarrée, les ions pyrophosphate qui sont générés prennent la place des ions manganèse sur les sites de liaison, et la calcéine devient fluorescente.⁽⁴⁾

CONTENU DU KIT

Les réactifs sont stables jusqu'à la date figurant sur l'étiquette, sous réserve que le container n'ait pas été ouvert et qu'il ait été conservé à une température de 2 à 30°C.

Réactif de détection du Malaria Pan (dMAL Pan).....2 x 48 tubes

Les réactifs suivants sont contenus à l'état sec dans chaque tube à réaction.

Bst ADN polymérase *1
Déoxynucléotide triphosphates
Sulfate de magnésium
Calcéine
Chlorure de manganèse
Amorces *2

Contrôle positif Mal (PC Mal) *3.....1 x 1,0 mL

Contrôle négatif Mal (NC Mal)3 x 0,5 mL

Compte-goutte 30µL5 x 12 compte-goutte

*1: La *Bst* DNA polymérase dérivée du *Bacillus stearothermophilus* est une polymérase à déplacement de brin d'ADN qui est dépourvu d'activité exonucléase 5'→3'.

*2: Amorces pour l'ADN mitochondrial de parasites *Plasmodium*, purifiés par HPLC à partir d'oligonucléotides de synthèse.

*3: PC Mal contient un produit résultant d'une amplification *in vitro* d'un gène artificiel conçu à partir de l'ADN mitochondrial du *Plasmodium falciparum* (GenBank No.M76611).

Les abréviations des noms des réactifs suivants, leur numéro de lot, ainsi que le code du fabricant (EKN), sont imprimées sur les boîtiers comme indiqué ci-dessous.

Réactifs	Étiquetage sur le tube	Code sur le bouchon
Contrôle positif Mal	PC Mal	PC
	Lot No., EKN	Mal
Contrôle négatif Mal	NC Mal	NC
	Lot No., EKN	Mal

MISES EN GARDE ET PRÉCAUTIONS

- Usage à des fins de diagnostic *in vitro* uniquement.
- Ce produit est réservé à la détection d'ADN des parasites *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* et *P. ovale* dans des spécimens de sang humain. Ne pas l'utiliser à d'autres fins.
- Respecter toujours ces instructions d'utilisation lors de l'utilisation de ce produit.
- Ne pas congeler les réactifs.
- Ne jamais utiliser un réactif périmé.
- Ne pas mélanger les kits provenant de Lots différents.
- Ne pas rajouter de réactif pour re-remplir.
- La performance du Loopamp™ MALARIA Pan Detection Kit dépend de la compétence de l'opérateur et du respect du mode d'emploi. Les tests doivent être effectués par un personnel dûment formé.
- L'exposition à la chaleur, à l'humidité et à la lumière peut détériorer le dMAL Pan. Sortir le nombre de tubes nécessaires (nombre de spécimens et témoins) de l'emballage juste avant son utilisation, puis refermer la pochette en aluminium immédiatement.
- Ne pas enlever le dessiccant du sachet en aluminium. Une forte humidité peut détériorer le réactif LAMP se trouvant dans les tubes.
- Lire le manuel d'utilisation et s'assurer de la disponibilité des équipements (turbidimètre ou incubateur) avant l'emploi du kit.
- Les spécimens de sang présentent un risque potentiel d'infection. Prendre toutes mesures préventives nécessaires pour éviter tout danger biologique potentiel.⁽⁵⁾
- PC Mal et NC Mal contiennent tous deux une petite quantité d'azote de sodium comme agent de conservation. L'azote de sodium est classé toxique. Éviter tout contact avec les yeux, la bouche ou la peau.
- Lors d'un contact accidentel d'un des réactifs avec les yeux, la bouche ou la peau, rincer immédiatement et abondamment la partie affectée avec de l'eau, et se référer à un service médicalement compétent si nécessaire.
- Ne pas diluer ou ajouter du PC Mal aux spécimens. Afin d'éviter une contamination de l'ADN, utiliser le PC Mal seulement comme il est indiqué dans cette notice.
- Conserver le PC Mal et tout spécimen sanguin à l'écart des autres réactifs du kit.
- Le bouchon de chaque tube de réaction contient du dMAL Pan sous forme sèche. Ne pas toucher la partie interne du bouchon.
- Avant l'utilisation des tubes de réaction, vérifier avec soin la présence de fissure ou de rayures. Les tubes abîmés peuvent fausser les résultats et provoquer une contamination de l'incubateur ou de l'espace de travail par de l'ADN.
- Ne pas exposer les tubes à la lumière UV avant la fin de la réaction de LAMP. Une exposition prolongée des tubes à la lumière UV peut endommager les tubes et peut fausser les résultats.
- Lors de l'utilisation lumière à UV pour l'évaluation de la fluorescence, ne pas fixer directement la source de lumière UV. La lumière UV étant nocive pour les yeux. La regarder, même pendant un temps court, pourrait irriter les yeux et provoquer des symptômes similaires à la conjonctivite. Utiliser des plaques d'écrans en verre, des lunettes ou des visières protectrices lorsqu'on doit regarder directement une lumière UV.
- Se référer au manuel de l'incubateur. Lors de l'utilisation du HumaLoop M ou du Real-Time Turbidimeter HumaTurb C+A, faire attention à ne pas se brûler en retirant les tubes de réactions des appareils.
- Ne pas utiliser le PC Mal comme contrôle positif pour Loopamp™ MALARIA Pan/Pf Detection Kit, Loopamp™ MALARIA Pv Detection Kit ou du Loopamp™ MALARIA Pf Detection Kit. Ne pas utiliser le PC d'un autre kits comme contrôle positif pour ce kit.

ÉLIMINATION DES DÉCHETS

- Ne pas ouvrir les tubes après amplification de l'ADN. Laisser le bouchon fermé et jeter les tubes comme déchet médical à incinérer ou sac double scellé.
- Ne jamais passer à l'autoclave ou réutiliser les tubes de réaction au risque de disperser les produits et provoquer une contamination.

- (3) Le matériau principal des tubes de réaction, des tubes de réactifs et du compte-goutte de 30µL est PP ; Le plateau à tubes est en PET ; la pochette en aluminium est en aluminium ; la boîte du kit est en papier.
- (4) Éliminer tout réactif non utilisé, boîtier ou matériel de laboratoire conformément à la réglementation locale.

PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

- (1) Utiliser les spécimens sanguins immédiatement après leur prélèvement.
- (2) Prélever le sang dans une salle séparée de celle pour effectuer l'amplification LAMP. Les aérosols contenant de l'ADN de *Plasmodium* peuvent être produits durant le prélèvement sanguin, ce qui peut provoquer une contamination.
- (3) NE PAS UTILISER D' EDTA ou de Citrate comme anticoagulant lors du prélèvement sanguin si la lecture du résultat doit se faire par fluorescence. Il est recommandé d'utiliser de l'héparine comme anticoagulant.

MATÉRIELS NÉCESSAIRES NON FOURNIS

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

Pour la détection visuelle de fluorescence

(Pour le HumaLoop M)

- HumaLoop M

(Autres incubateurs avec lumière UV)

- Incubateur (précision de température : $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, avec couvercle chauffant)
- Bloc chauffant
- Lumière UV ou lumière LED BLEU (longueur d'onde : 240 à 260 nm et 350 à 370 nm)
- Lunettes ou visière de protection

Détection de turbidité en temps réel

- HumaTurb C+A

Mélange et préparation des réactifs et des spécimens

- Pipettes (de 10 à 100 µL, et de 20 à 200 µL), cônes filtrés pour pipettes
- Centrifugeuse pour microtubes (optionnel)
- Centrifugeuse avec rotor pour barrettes de 8 tubes (optionnel)
- HuMax ITA (optionnel)

PRÉPARATION DE LA SOLUTION D'ADN ÉCHANTILLONS

Il est recommandé d'extraire l'ADN par la méthode "Bouillir et centrifuger" ou par la méthode PURE. Les procédures opératoires standards de ces deux méthodes se trouvent à : <https://www.finddx.org/wp-content/uploads/2016/04/SOP-LAMP-Malaria-Aug2012.pdf>

Une attention particulière est demandée sur les points critiques suivants de la méthode PURE.

- **Les échantillons : Du sang prélevé au bout du doigt dans un tube hépariné, ou du sang total séché sur papier filtre**
- **Volume d'échantillon : 30µL (sang frais ou hépariné) ou confetti de 6 mm de sang séché sur papier filtre**
- **Additif : Ajouter 30µL de solution de NaCl à 334mM (non fourni dans le kit d'extraction Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit) au tube de chauffage avant de chauffer**
- **Chauffage : Pendant 5 minutes à 75°C**

PRÉPARATION DES RÉACTIFS

(1) Réactifs de détection de la Malaria Pan

Sortir de la pochette en aluminium le nombre de tubes requis, puis les placer dans le rack fourni (nombre de spécimens et contrôles).

Remarque : Après avoir sorti le nombre de tubes nécessaire, refermer immédiatement la pochette en aluminium contenant les tubes restants.

(2) Contrôle négatif Mal (NC Mal)

Avant utilisation, secouer le tube d'un mouvement sec ou le centrifuger pour collecter le contenu du fond du tube.

Remarque : le NC Mal doit être utilisé à chaque opération.

(3) Contrôle positif Mal (PC Mal)

Avant utilisation, secouer le tube d'un mouvement sec ou le centrifuger pour collecter le contenu du fond du tube.

Remarque : le PC Mal doit être utilisé à chaque opération.

PROCÉDURE DE MESURE

Préparation des réactifs et des spécimens

- (1) Allumer la HumaLoop M ou le Real-Time Turbidimeter HumaTurb C+A.
- (2) Transférer 30 µL de solution d'échantillon d'ADN dans un tube à réaction à l'aide d'une pipette, puis refermer le bouchon.
- (3) Transférer 30 µL de NC Mal dans un tube à réaction à l'aide d'une pipette ou compte-goutte, puis refermer le bouchon.
- (4) Transférer 30 µL de PC Mal dans un tube à réaction à l'aide d'une

pipette ou compte-goutte, puis refermer le bouchon.

- (5) Secouer le tube d'un mouvement sec ou le centrifuger pour collecter la solution se trouvant au fond du tube.

Remarque : s'assurer que le niveau du liquide se situe au milieu de deux traits du tube à réaction pour vérifier que le volume transféré par le pipetage est correct.

- (6) Reconstituer les réactifs à l'état sec qui se trouve dans le bouchon en inversant le tube afin de collecter la solution d'ADN. Laisser le tube inversé pendant 2 minutes pour reconstituer les réactifs à l'état sec.
- (7) Mélanger le contenu du tube par 5 inversions. S'assurer que les réactifs à l'état sec est complètement dissout (la solution doit être d'une couleur légèrement orangée).
- (8) Secouer le tube d'un mouvement sec ou le centrifuger pour collecter la solution se trouvant au fond du tube.

Amplification

Pour une détection visuelle de fluorescence

(Pour le HumaLoop M)

- (1) Vérifier que la température de la HumaLoop M est à 65,0°C.
- (2) Disposer les tubes dans l'incubateur HumaLoop M et appuyer sur le bouton vert pour démarrer la réaction de LAMP (40 minutes à 65,0°C). Voir le manuel d'utilisation du HumaLoop M pour les détails sur l'opération de l'incubateur.
- (3) Vérifier que l'inactivation de la polymérase est complète (complétée automatiquement par le HumaLoop M). Sortir tous les tubes à réaction du HumaLoop M.

(Pour d'autres incubateurs avec lumière UV)

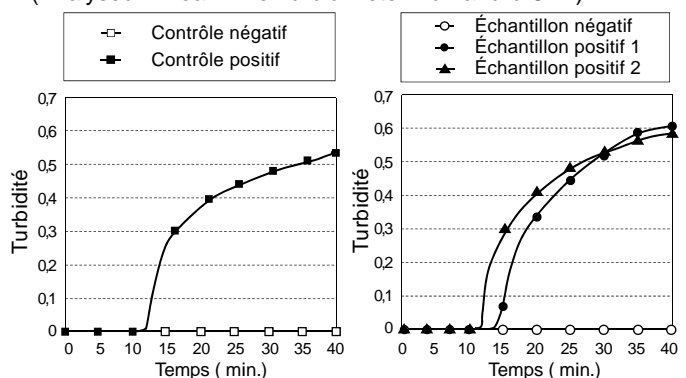
- (1) Régler la température de l'incubateur à 65,0°C (avec la température du couvercle chauffant réglée 10°C au-dessus de la température de réaction. Précision de température : $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$). Attendre que la température affichée ait atteint la valeur du réglage.
- (2) Charger les tubes à réaction dans l'appareil, puis démarrer la réaction d'amplification (40 minutes à 65,0°C).
- (3) Après les 40 minutes, inactiver la polymérase à l'aide du bloc chauffant (5 minutes à 80°C ou 2 minutes à 95°C) pour terminer la réaction.

Détection de turbidité en temps réel HumaTurb C+A (voir diagramme de la procédure)

- (1) Configurer le Real-Time Turbidimeter HumaTurb C+A pour une détection avec le kit (à moins que l'appareil soit déjà réglé).
- (2) Vérifier que la température indiquée atteint les 65,0°C (préchauffer le turbidimètre pendant 20 minutes avant utilisation).
- (3) Insérer les tubes de réaction, puis démarrer la mesure.
- (4) Surveiller l'affichage du turbidimètre pour vérifier si les témoins positifs et négatifs augmentent ou non. Si la turbidité augmente uniquement chez le témoin positif alors que le témoin négatif ne change pas, la réaction d'amplification se passe correctement (Fig1). Dans tout autre cas de figure, il peut y avoir une erreur dans la réaction d'amplification : si tel est le cas, réexaminer les spécimens affectés depuis la préparation des réactifs.
- (5) Vérifier que l'inactivation de la polymérase est complète (complétée automatiquement par le turbidimètre). Sortir tous les tubes de réaction du HumaTurb C+A et les jeter sans les ouvrir.

Courbes avec les réactifs de détection Malaria Pan

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



NOTES SUR LA PROCÉDURE

- (1) La réaction de LAMP est très sensible et une contamination par une quantité infime de produit d'amplification peut provoquer un résultat faussement positif.
- (2) Séparer la zone de préparation de la zone de test LAMP.
- (3) Nettoyer la paillasse avec une solution d'hypochlorite supérieure à 0,5% avant et après le test.
- (4) Changer de gants après avoir transféré le sang ou si les gants ont touché la solution d'ADN.

- (5) Éviter toute contamination parasitologique ou contamination par la nucléase lors de la manipulation du produit. Une quantité, même infime, de DNase transmise aux tubes par la sueur ou par la salive pourrait décomposer l'ADN et fausser les résultats.
- (6) Il est aussi important de lire attentivement la SOP⁶⁾ lors de l'utilisation.
- (7) Idéalement, la solution d'ADN devrait être utilisée immédiatement après sa préparation.
- (8) **(Pour le HumaLoop M ou autre incubateur avec lumière UV)**
Si des bulles sont présentes, secouer le tube d'un coup sec vers le bas pour les éliminer.
- (Pour le Real-Time Turbidimeter HumaTurb C+A)**
Essayer de ne pas générer de bulles lors de la préparation des réactifs et des solutions de spécimens, car les bulles peuvent interférer aux mesures de turbidité. Si la présence de bulles est observée, centrifuger pour les éliminer.
- (9) Le dMAL Pan doit être complètement dissout. Toutes portions non dissoutes peuvent influencer sur la performance et provoquer une perte de sensibilité.
- (10) Le PC Mal contient un grand nombre de copies d'ADN de contrôle. Éviter toute contamination d'autres spécimens par le PC Mal. Transférer les spécimens et le NC Mal, puis refermer tous les tubes à réaction avant le pipetage du PC Mal.
- (11) Secouer le tube de PC Mal d'un mouvement sec ou le centrifuger avant son ouverture pour collecter la solution se trouvant au fond du tube. Refermer le tube immédiatement après avoir transféré le PC Mal.
- (12) Ne jamais ouvrir un tube à réaction une fois la réaction de LAMP démarrée, même une fois la réaction terminée. Une attention particulière est requise en sortant les tubes de l'incubateur pour éviter toute ouverture accidentelle.
- (13) Lors de l'utilisation la HumaLoop M ou d'un Real-time Turbidimeter HumaTurb C+A, l'inactivation de la polymérase se fait automatiquement par l'appareil.
- (14) Pour les autres incubateurs, inactiver la polymérase (5 minutes à 80°C ou 2 minutes à 95°C) avant lecture, faute de quoi les résultats peuvent être faussés.
- (15) Ne pas réutiliser produits d'amplification des tubes pour l'électrophorèse ou autres.

L'INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Détection visuelle de fluorescence

(Pour le HumaLoop M)

Installer chaque tube à réaction dans l'Unité de Détection de Fluorescence, irradier et observer le tube par le côté.

(Autres incubateurs avec lumière UV)

Irradier le fond de chaque tube de réaction et observer par le côté à travers des lunettes ou un d'autres équipements protecteurs.

Pour qu'un test soit valide, les résultats obtenus doivent être comme suit :

- Contrôle Positif : émission d'une fluorescence verte.
- Contrôle Négatif : pas de fluorescence émise.

Si un des contrôles n'est pas valide, tous les spécimens testés doivent être mentionnés comme non valide et les spécimens doivent être réexaminés.

Après confirmation de la validité du test effectué, évaluer les spécimens comme suit :

- Contrôle Positif : émission d'une fluorescence verte.
- Contrôle Négatif : pas de fluorescence émise.

Détection à l'aide d'un turbidimètre à temps réel HumaTurb C+A

Après avoir vérifié que la turbidité de la solution témoin positif augmente, mais pas celle de la solution témoin négatif, procéder à l'évaluation des spécimens en fonction des critères suivants (Fig 1 et 2).

- Positif : une augmentation de turbidité est observée.
- Négatif : pas d'augmentation de turbidité observée.

Remarques :

- (1) La sensibilité minimale de détection du MALARIA Pan Detection Kit est de 5,0 copies par test. Dans le cas d'un résultat négatif chez un patient présentant une persistance ou une aggravation des symptômes, considérer de répéter le test, tout en recherchant d'autres causes aux symptômes. Les tests LAMP sont d'une très grande sensibilité, capable de détecter une parasitémie faible qui ne serait pas la cause directe des symptômes présentés. Toujours tenir compte du tableau clinique du patient pour établir le diagnostic final pour définir la prise en charge de la maladie.
- (2) Bien que les amorces aient été construites pour avoir comme cible une région comportant relativement peu de variations, il est concevable que des infections au *Plasmodium* avec des variations

pour ces régions ne seront pas forcément détectables par ce kit. Ainsi, un résultat négatif n'exclut pas de façon absolue une présence de *Plasmodium*.

- (3) Ce produit est un kit pour une détection qualitative, il n'a pas été conçu pour une mesure quantitative. L'intensité de fluorescence observée ou une augmentation de turbidité mesurée par le Real-Time Turbidimeter ne corréleront pas avec la quantité d'ADN matrice.

SUBSTANCE POUVANT INTERFÉRER

Une étude interne a montré que les mesures par turbidimètre ne sont pas affectées par la présence d'EDTA (6,0 nmol/test), de bilirubine libre (1,2 µg/test), de bilirubine conjuguée (1,2 µg/ test), du chyle (turbidité à la formazine :14 400), d'hémoglobine hémolytique (3,4 µg/ test), et d'ADN génomique humain (1,2 µg/ test). L'EDTA peut provoquer des faux positifs lors des lectures de fluorescence.

Pour les médicaments, une étude interne a montré que les mesures ne sont pas affectées par la présence de : Isoniazide (840 ng/test), Ethambutol (204 ng/test), Rifampicine (958 ng/test), Pyrazinamide (4,2 µg/test), Acétaminophen (322 ng/test), Loxoprofen sodium (637 ng/test), Cefotaxime sodique (12 µg/test), Levofloxacin (270 ng/test), Atovaquone (1,59 µg/test), Proguanil (20 ng/test), Chloroquine (40 ng/test), Quinine (960 ng/test), Doxycycline chlorhydrique (360 ng/test), Méfloquine (168 ng/test), Primaquine (18 ng /test), et Artémisinine (93 ng/test).

CARACTÉRISTIQUES DES PERFORMANCES

(1) Sensibilité et précision

En testant les spécimens suivants :

- Spécimen Négatif (concentration : 0 équivalent génome/test)
- Spécimen Positif 1 (100 équivalents génome/test)
- Spécimen Positif 2 (1 000 équivalents génome/test),

Les spécimens négatifs doivent être négatifs et les spécimens positifs 1 et 2 doivent être positifs.

(2) Reproductibilité pendant le même test

En testant simultanément 5 spécimens positifs et négatifs, les spécimens négatifs doivent rester négatifs et ceux positifs doivent rester positifs tout au long de la procédure.

(3) Limite de détection

5,0 copies/test

(4) Réactions croisées

Le tableau ci-après détaille les résultats des tests qui ont été positifs pour les espèces *Plasmodium* et négatifs pour d'autres pathogènes.

Genre <i>Plasmodium</i>	
<i>Plasmodium falciparum</i>	Positif
<i>Plasmodium vivax</i>	Positif
<i>Plasmodium ovale</i>	Positif
<i>Plasmodium malariae</i>	Positif
Autres pathogènes	
<i>Trypanosoma brucei</i>	Négatif
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Négatif
<i>Leishmania donovani</i>	Négatif
<i>Schistosoma mansoni</i>	Négatif
<i>Theileria parva</i>	Négatif
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Négatif
Influenza A virus	Négatif
Human immunodeficiency virus	Négatif

(5) Information sur le calibrateur

Le test de performance du produit a été effectué avec comme calibrateur l'ADN plasmidique contenant l'ADN mitochondrial du *Plasmodium falciparum*.

(6) Performance clinique

Le paludisme est causé par certains parasites du genre *Plasmodium* qui sont transmis par des piqûres de moustiques. Après une phase de développement dans le foie, les parasites atteignent le milieu sanguin. Les parasites en phase sanguine envahissent les hématies et les lysent durant la phase de reproduction, induisant des symptômes tels que la fièvre. Le test LAMP détecte l'ADN des parasites de la phase sanguine.

Le test LAMP pour le paludisme a été évalué sur des spécimens de sang envoyés dans un centre spécialisé. Après un examen microscopique, les spécimens ont été anonymisés et l'ADN a été extrait du sang par la méthode PURE[®] pour être testé par le kit LAMP pour le paludisme qui utilise parallèlement des amorces spécifiques pour le genre *Plasmodium*, avec deux méthodes de lecture différentes. Enfin, une PCR nichée a été effectuée comme méthode de référence. Les résultats de 705 tests LAMP pour le paludisme,

dont 56 provenant de patients positifs à l'examen microscopique, ont été comparés aux résultats de la PCR nichée de référence. La sensibilité et la spécificité du LAMP Malaria Pan étaient respectivement de 97,0% et 99,2%.

	Sensibilité (95% CI)	Spécificité (95% CI)	VPP*	VPN*
LAMP paludisme vs nested PCR	97,0% 89,6-99,6	99,2% 98,2-99,7	92,9%	99,7%
LAMP paludisme vs microscopie	100,0% 93,6-100,0	97,8% 96,4-98,8	80,0%	100,0%

* valeurs prédictives positives et négatives

RÉFÉRENCES DE COMMANDE

Code produit	Nom du produit	Contenu
977000	Loopamp™ MALARIA Pan Detection Kit	96 tests
962000	HumaLoop M	1 unité Principale 1 unité d'évaluation Visuelle de Fluorescence
970000	Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit	90 tests
963200	HumaTurb C+A	1 unité de Contrôle 1 unité d'amplification
980000	HuMax ITA	Centrifugeuse de Paillasse
964000	HumaHeat	Bloc Chauffant

RÉFÉRENCES

- 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) La ligne directrice pour la biosécurité et le bio-risque (par la Société Japonaise de Bactériologie): Japanese Journal of Bacteriology 54, No. 3, 667–715 (1999)
- 6) <https://www.finddx.org/wp-content/uploads/2016/04/SOP-LAMP-Malaria-Aug2012.pdf>

DIAGRAMME

Procédure opératoire pour une détection au turbidimètre à temps réel

Préparation des solutions des spécimens

Préparer les solutions de spécimens par extraction d'ADN du sang prélevé.

Préparation des réactifs

Prendre le nombre de tubes de dMAL Pan nécessaire.

(Pour les spécimens et les témoins positif et négatif)

Mélange du réactif et de la solution d'échantillon

Transférer 30 µL de solution du spécimen ou de témoin dans chaque tube.

Utiliser le NC Mal comme témoin négatif.
Utiliser le PC Mal comme témoin positif.
(le témoin positif doit être préparé en dernier)

Retourner le tube de réaction pour récupérer la solution dans le bouchon. Laisser le tube retourné pendant 2 minutes.

Mélanger le contenu des tubes par 5 inversions, puis collecter par centrifugation.

(Éviter les bulles.)

Amplification

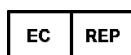
Disposer les tubes dans le bloc de réaction du turbidimètre.

Démarrer la réaction, mesurer et évaluer la turbidité (40 minutes à 65,0°C) comme indiqué dans le manuel d'utilisation du turbidimètre.

Vérifier que l'inactivation de la polymérase est complète (5 minutes à 80°C ou 2 minutes à 95°C). Sortir tous les tubes du turbidimètre et les jeter sans les ouvrir. Attention à ne pas abimer les tubes.



Distributeur exclusif



**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

Révisé le 1er octobre 2018



Español

REF 977000

Loopamp™ MALARIA Pan

Detection Kit

USO PREVISTO

El Loopamp™ MALARIA Pan Detection Kit es un método de prueba diagnóstica cualitativa *in vitro* para la detección de ADN de *Plasmodium* extraído de muestras de sangre humana.

PRINCIPIOS DE LA PRUEBA

Este producto aplica el método de amplificación de ácidos nucleicos, LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification), desarrollado por Eiken Chemical Co., Ltd.

El método LAMP presenta las siguientes características: (1) Solo se necesita una enzima de polimerasa para activar la reacción de amplificación isotérmica; ^{1,2)} (2) esta técnica es altamente específica gracias a los cuatro cebadores que reconocen seis regiones distintas del blanco; (3) ofrece una gran eficiencia de amplificación, que realiza rápidamente y es capaz de generar una gran cantidad de producto amplificado visualizable a simple vista. ^{3,4)}

Los cebadores específicos para la especie Malaria Pan suministrados con este producto han sido diseñados para detectar el ADN mitocondrial de las cuatro especies de *Plasmodium* más extendidas causantes de malaria (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*). Las secuencias de ADN objetivo han sido confirmadas mediante análisis de alineamiento para tener una secuencia base bien conservada en todas estas especies de *Plasmodium*.

La solución de ADN extraída de las muestras de sangre se dispensa en un tubo de reacción. La ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de cadena, los trifosfatos deoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), la calceína, los amortiguadores de reacción y los cebadores específicos para la Malaria Pan se almacenan en polvo en el tapón del tubo de reacción. Estos reactivos LAMP en polvo (reactivos de detección de Malaria Pan (dMAL Pan)) se disuelven al añadir la solución de ADN. El tubo de reacción se incuba a 65,0°C y el ADN se amplifica por la ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de cadena de acuerdo con la reacción LAMP.

La detección de productos amplificados se basa en una medición turbidimétrica de pirofosfato de magnesio (un precipitado blanco subproducto de la reacción de amplificación de ADN).⁵⁾ También se puede recurrir a la detección visual con luz UV. Antes de la amplificación de ADN, la calceína contenida en el reactivo se encuentra "apagada" debido a la proliferación de iones de manganeso; sin embargo, cuando comienza la amplificación de ADN, los iones de pirofosfato se unen a los iones de manganeso y la calceína de vuelve fluorescente.⁴⁾

CONTENIDO DEL KIT

Sin abrir, los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, sin abrir y a una temperatura entre 2 – 30°C.

Reactivo de detección de Malaria Pan (dMAL Pan)..... 2 x 48 tubos

Cada tubo de reacción contiene los siguientes reactivos en polvo:

ADN polimerasa *Bst*¹⁾

Trifosfatos deoxinucleótidos

Sulfato manganésico

Calceína

Cloruro de manganeso

Cebadores²⁾

Control positivo Mal (PC Mal)³⁾ 1 x 1,0 mL

Control negativo Mal (NC Mal) 3 x 0,5 mL

Cuentagotas de 30 µL 5 x 12 cuentagotas

*1: La ADN polimerasa *Bst* derivada de *Bacillus stearothermophilus* es una ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de cadena que no presenta actividad exonucleasa 5'→3'.

*2: Los cebadores diseñados para el ADN mitocondrial de parásitos de *Plasmodium*, con purificación de oligonucleótidos sintetizados por HPLC.

*3: PC Mal contiene un producto resultante de una amplificación *in vitro* de un gen artificial específico para el ADN mitocondrial de parásitos de *Plasmodium falciparum* (GenBank No. M76611).

Las abreviaciones de los nombres de los siguientes reactivos, su número de lote y el fabricante (EKN) figuran en los recipientes.

Reactivos	Etiqueta en el tubo	Código en la tapa
Control positivo Mal	PC Mal N.º lote., EKN	PC Mal
Control negativo Mal	NC Mal N.º lote., EKN	NC Mal

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- (1) Solo para diagnóstico *in vitro*.
- (2) Este producto está diseñado únicamente para la detección de ADN de parásitos *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale* en muestras de sangre de origen humano. No debe utilizarse para otros propósitos.
- (3) Cuando utilice este producto, siga siempre las instrucciones de uso.
- (4) No congele los reactivos.
- (5) No utilice reactivos caducados.
- (6) No mezcle reactivos de lotes distintos.
- (7) No rellene ningún reactivo.
- (8) El rendimiento del Loopamp™ MALARIA Pan Detection Kit depende de la competencia del operario y del cumplimiento de las presentes instrucciones. Las pruebas solo deben ser realizadas por personal debidamente capacitado.
- (9) La exposición al calor, a la humedad y a la luz puede deteriorar el dMAL Pan. Retire solo el número necesario de tubos de reacción (número de muestras y controles) y cierre inmediatamente la bolsa de aluminio.
- (10) No retire el desecante de la bolsa de aluminio. Un elevado nivel de humedad podría deteriorar el reactivo LAMP en polvo de los tubos de reacción.
- (11) Antes de comenzar el procedimiento, lea el manual de instrucciones y compruebe el correcto funcionamiento del equipo (turbidímetro o incubadora).
- (12) Las muestras de sangre suponen un potencial riesgo de infección. Respete las precauciones universales para evitar la exposición al riesgo biológico.⁵⁾
- (13) PC Mal y NC Mal contienen una pequeña cantidad de azida sódica como conservante. La azida sódica es considerada tóxica. Evite el contacto con los ojos, la boca o la piel.
- (14) En caso de contacto accidental de cualquier reactivo con los ojos, la boca o la piel, aclare inmediatamente la zona afectada con agua abundante y, en caso necesario, consulte a un médico.
- (15) No diluya ni añada el PC Mal a las muestras. Utilice el PC Mal siguiendo las indicaciones del presente prospecto para evitar la contaminación de ADN.
- (16) Guarde el PC Mal y cualquier muestra positiva de sangre por separado de otros reactivos.
- (17) La tapa de cada tubo de reacción contiene dMAL Pan en polvo. No toque el interior de la tapa.
- (18) Antes de utilizar los tubos de reacción, compruebe que no presenten grietas ni arañazos. Los tubos deteriorados pueden dar resultados falsos y contaminar el ADN de la incubadora y del área de trabajo.
- (19) No exponga los tubos de reacción a una fuente de luz ultravioleta antes de terminarse la reacción LAMP. La exposición prolongada a la luz UV puede deteriorar los tubos y dar resultados falsos.
- (20) Si utiliza luz UV para evaluación visual de fluorescencia, no mire directamente a la luz UV. La luz UV es perjudicial para los ojos y mirarla incluso por un periodo breve puede irritarlos y causar síntomas similares a la conjuntivitis. Utilice una pantalla de vidrio, o lleve gafas o una máscara de protección ocular cuando tenga que mirar directamente a luz UV.
- (21) Consulte el manual de la incubadora. Cuando utilice la HumaLoop M o el turbidímetro en tiempo real Humaturb C+A, tenga cuidado al retirar los tubos de reacción de la incubadora para evitar posibles quemaduras.
- (22) No usar PC Mal como un control positivo para Loopamp™ MALARIA Pf Detection Kit, Loopamp™ MALARIA Pv Detection Kit o Loopamp™ MALARIA Pan/Pf Detection Kit. No usar PC de otro kits como un control positivo para este kit.

ELIMINACIÓN DE RESIDUOS

- (1) No abra los tubos después de la amplificación de ADN. Mantenga el la tapa cerrada y elimine los tubos usados como residuos médicos por incineración o introdúzcalos en una bolsa doble plástica sellada.
- (2) No esterilice con autoclave ni reutilice los tubos de reacción, ya que los productos amplificados se dispersarían y provocarían una contaminación.
- (3) El material principal para los tubos de reacción y los tubos de reactivos es el PP; la bandeja de los tubos de reacción es de PET; la bolsa de aluminio es de aluminio; y el estuche es de papel.
- (4) Deseche cualquier otro reactivo, recipiente o material de laboratorio

usados de acuerdo con la normativa local.

RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

- (1) Las muestras de sangre se deben utilizar inmediatamente después de ser tomadas.
- (2) Tome las muestras de sangre en una habitación separada de la sala de amplificación LAMP. Durante la toma de sangre se pueden generar aerosoles que contienen ADN *Plasmodium* y pueden causar una contaminación.
- (3) NO USE EDTA ni citrato como anticoagulantes para la toma de sangre si el resultado debe ser leído con fluorescencia. Conviene utilizar heparina como anticoagulante.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

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

Para detección visual de fluorescencia

(Para incubadora HumaLoop M)

- HumaLoop M

(Para otra incubadora con luz UV)

- Incubadora (precisión de temperatura: $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$; con cubierta térmica)
- Bloque térmico
- Luz UV o Luz LED Azul(longitud de onda: 240 a 260 nm y 350 a 370 nm)
- Gafas, máscara o cualquier material de protección ocular para rayos UV.

Para detección de turbidez en tiempo real

- HumaTurb C+A

Para mezcla de reactivo y muestra

- Micropipetas (10 a 100 μL , y 20 a 200 μL) y puntas de pipeta con filtro
- Centrifugadora para microtubos (opcional)
- Centrifugadora para ocho tubos conectados (opcional)
- HuMax ITA (opcional)

PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE ADN DE MUESTRA

Para extraer el ADN de muestras de sangre, conviene utilizar el método de ebullición y centrifugación, y el método PURE. Los procedimientos operativos estándar (SOP, por sus siglas en inglés) de ambos métodos se describen en

<https://www.finddx.org/wp-content/uploads/2016/04/SOP-LAMP-Malaria-Aug2012.pdf>

Hay que prestar mucha atención a los siguientes puntos críticos del método PURE.

- **Muestras:** Muestras de sangre tomadas mediante pinchazo en el dedo y guardadas en tubos con heparina o sangre seca en papel de filtro
- **Volumen de la muestra:** 30 μL (sangre fresca o sangre con heparina) o sacabocado de sangre de 6-mm (mancha de sangre seca)
- **Aditivos:** Añadir 30 μL de solución 334mM NaCl (no incluido en el kit de extracción de Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit) para tubo térmico antes de calentar
- **Calentamiento:** 5 minutos a 75°C

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

(1) Reactivo de detección de Malaria Pan

Retire de la bolsa de aluminio el número necesario de tubos de reacción y póngalos en el rack suministrado (número de muestras y controles).

Nota: tras retirar los tubos necesarios, cierre inmediatamente la bolsa con los tubos que no utilice.

(2) Control negativo Mal (NC Mal)

Agite bien el tubo (centrifugar) para recuperar el contenido del fondo del tubo.

Nota: NC Mal se debe utilizar en cada prueba.

(3) Control positivo Mal (PC Mal)

Agite bien el tubo (centrifugar) para recuperar el contenido del fondo del tubo.

Nota: PC Mal se debe utilizar en cada prueba.

PROCEDIMIENTO DE MEDICIÓN

Mezcla de reactivo y muestra

- (1) Encienda la HumaLoop M o el turbidímetro en tiempo real HumaTurb C+A.
- (2) Dispense 30 μL de la solución de ADN extraída en un tubo de reacción utilizando la pipeta y cierre el tapón.
- (3) Dispense 30 μL de NC Mal en un tubo de reacción utilizando la pipeta o cuentagotas y cierre el tapón
- (4) Dispense 30 μL de PC Mal en un tubo de reacción utilizando la pipeta o cuentagotas y cierre la tapa.
- (5) Agite bien los tubos (centrifugar) para recuperar el contenido del fondo

de los tubos.

Nota: cuando utilice el equipo PURE compruebe que el nivel de líquido se acerca a la línea superior de las dos líneas del tubo de reacción para asegurarse de haber dispensado el volumen adecuado

- (6) Reconstituya los reactivos en polvo del tapón invirtiendo los tubos de reacción y con la solución de ADN de la tapa. Deje los tubos boca abajo durante 2 minutos para reconstituir los reactivos en polvo.
- (7) Invierta los tubos de reacción 5 veces para mezclar el contenido. Asegúrese de que los reactivos en polvo de la tapa estén bien disueltos (la solución debe tener un leve color anaranjado).
- (8) Agite bien los tubos (centrifugar) para recuperar el contenido del fondo de los tubos.

Amplificación

Para detección visual de fluorescencia

(Para HumaLoop M)

- (1) Compruebe que la temperatura mostrada en la HumaLoop M es 65,0°C.
- (2) Coloque los tubos de reacción en la HumaLoop M y pulse el botón verde para lanzar la reacción LAMP (40 minutos a 65,0°C). Consulte el manual de instrucciones de la HumaLoop M para más detalles sobre el funcionamiento de la incubadora.
- (3) Confirme la finalización de la inactivación de la polimerasa (automáticamente completada por la HumaLoop M). Retire todos los tubos de reacción de la HumaLoop M.

(Para otra incubadora con luz UV)

- (1) Ajuste la temperatura de la incubadora a 65,0°C (temperatura de la cubierta térmica a 10°C por encima de la temperatura de reacción o lo más próxima posible; precisión de temperatura: $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$). Espere hasta que la temperatura mostrada alcance el valor predefinido.
- (2) Coloque los tubos de reacción y lance la reacción de amplificación (40 minutos a 65,0°C).
- (3) 40 minutos después, inactive la polimerasa con el bloque térmico (5 minutos a 80°C o 2 minutos a 95°C) para terminar la reacción.

Para la detección de turbidez en tiempo real HumaTurb C+A (ver Diagrama del procedimiento)

- (1) Si aún no está bien configurado, ajuste el turbidímetro en tiempo real HumaTurb C+A para la detección con este producto.
- (2) Compruebe que la temperatura visualizada alcanza 65,0°C (deje calentar el turbidímetro 20 minutos antes de utilizarlo).
- (3) Coloque los tubos de reacción y lance la medición.
- (4) Compruebe en la pantalla del turbidímetro los controles positivo y negativo para cada aumento de turbidez. Si la turbidez aumenta en el positivo, pero no en la solución de control negativo, significa que la reacción de amplificación se realiza correctamente (Fig1). Si no es así, la reacción de amplificación no se está realizando adecuadamente. En tal caso, vuelva a comprobar las muestras afectadas desde la preparación del reactivo.
- (5) Confirme la finalización de la inactivación de la polimerasa (automáticamente completada por el turbidímetro). Tome todos los tubos de reacción del turbidímetro y deséchelos sin abrirlos.

Diagramas de amplificación de reactivo de detección de Malaria Pan

(Analizador : turbidímetro en tiempo real HumaTurb C+A)

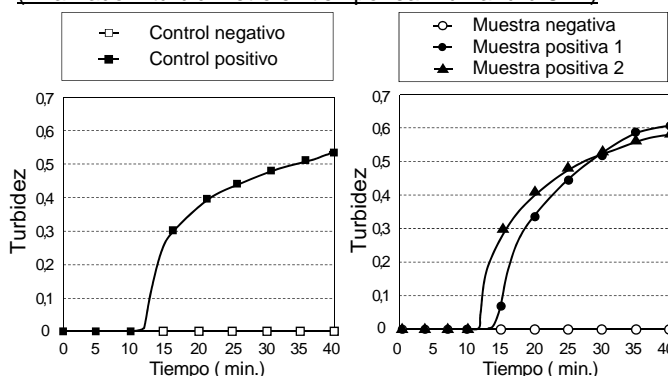


Fig1 : Diagramas de amplificación para controles

Fig2 : Diagramas de amplificación para muestras

NOTAS SOBRE PROCEDIMIENTO

- (1) La reacción LAMP es muy sensible y la contaminación con pequeñas cantidades de producto amplificado puede dar falsos resultados positivos.
- (2) Separe la preparación de la muestra de las áreas de amplificación.
- (3) Limpie las superficies de trabajo con hipoclorito de sodio al 0,5 % mínimo antes y después de realizar la prueba.
- (4) Cambie los guantes después de transferir la sangre o si toca con ellos la solución de ADN.

- (5) Al manejar este producto, evite la contaminación parasitológica y de nucleasas. Hasta una pequeña cantidad de contaminación del tubo de reacción a partir del sudor o la saliva al tubo de reacción puede descomponer el ADN y dar resultados falsos.
- (6) Lea el SOP⁶⁾ cuando vaya a realizar una extracción de ADN.
- (7) Conviene utilizar la solución de ADN inmediatamente después de su preparación.
- (8) **(Para HumaLoop M u otra incubadora con luz UV)**
Si aparecen burbujas, agite los tubos para eliminarlas.
(Para el turbidímetro en tiempo real HumaTurb C+A)
Las burbujas en la solución de reacción pueden interferir con la medición de turbidez y dar resultados falsos, por lo que se debe evitar la aparición de burbujas al mezclar el reactivo y la solución de muestra. Si aparecen burbujas, agite o centrifugue los tubos para eliminarlas.
- (9) dMAL Pan debería estar completamente disuelto. Cualquier porción sin disolver puede alterar los resultados, por ejemplo, disminuyendo la sensibilidad.
- (10) El PC Mal contiene un elevado número de copias de ADN. Evite toda contaminación de otras muestras con el PC Mal. Dispense las muestras y el NC Mal y cierre todos los tubos de reacción antes de dispensar el PC Mal.
- (11) Agite bien (centrifugar) el tubo de PC Mal antes de abrirlo para recuperar el contenido del fondo del tubo. Cierre el tubo inmediatamente después de dispensar el PC Mal.
- (12) No abra nunca los tubos de reacción una vez comenzada la reacción LAMP o tras su finalización. Preste mucha atención al retirar los tubos de reacción de la incubadora y que no se abran accidentalmente.
- (13) Con la HumaLoop M o el turbidímetro en tiempo real HumaTurb C+A, se realiza automáticamente la inactivación de polimerasa.
- (14) Para otras incubadoras, una vez seleccionada la fluorescencia visual, inactive la polimerasa (5 minutos a 80°C o 2 minutos a 95°C) antes de evaluar; de lo contrario, se podrían alterar los resultados.
- (15) No reutilice ningún producto amplificado en los tubos para electroforesis u otras aplicaciones.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Para detección visual de fluorescencia

(Para HumaLoop M)

Coloque cada tubo de reacción en la unidad de detección de fluorescencia, irradie y observe el tubo por un lado.

(Para otra incubadora con luz UV)

Irradie la base de cada tubo de reacción desde un lado utilizando gafas o un equipo de protección UV adecuado.

Para que la ejecución de una prueba sea válida, hay que obtener los siguientes resultados:

- Control Positivo: Se emite una luz verde fluorescente.
- Control Negativo: No se emite una luz verde fluorescente.

Si ningún control es válido, todas las muestras deben ser consideradas inválidas y habrá que volver a comprobar las muestras.

Una vez que se confirma que la ejecución de la prueba es válida, evalúe las muestras como se indica a continuación:

- Muestra Positiva: Se emite una luz verde fluorescente.
- Muestra Negativa: No se emite una luz verde fluorescente.

Para detección de turbidez en tiempo real HumaTurb C+A

Una vez que se confirma que la turbidez aumenta en de control positivo, pero no en la solución de control negativo, evalúe las muestras de acuerdo con los siguientes criterios (Fig1 y 2).

- Positivo: Se observa cierto aumento de la turbidez.
- Negativo: No se observa aumento de la turbidez.

Notas :

- (1) La sensibilidad de detección mínima de MALARIA Pan Detection Kit es de 5,0 copias por prueba respectivamente. En caso de un resultado de prueba negativo, se deberán repetir las pruebas a los pacientes con persistencia o empeoramiento de los síntomas y habrá que considerar e investigar otras posibles causas de tales síntomas. El ensayo LAMP es altamente sensible y puede detectar hasta los niveles más bajos de parasitemia que no son la causa directa de los síntomas manifestados. El estado clínico del paciente debe ser siempre considerado a la hora de realizar un diagnóstico final y determinar el tratamiento médico adecuado.
- (2) Aunque los cebadores se han diseñado para una región con pocas variaciones, las infecciones por *Plasmodium* podrían tener más variaciones en esta región y reducirse así la sensibilidad de este producto. Por tanto, una prueba negativa no siempre permite descartar una infección por *Plasmodium*.
- (3) Este producto es un kit para una detección cualitativa; no está diseñado para una medición cuantitativa. La intensidad de la luz fluorescente observada o el aumento de la turbidez medido con el

turbidímetro en tiempo real no se corresponden con el número de matrices de ADN.

SUSTANCIAS INTERFERENTES

Nuestros estudios internos han revelado que la medición de turbidimetría no se vio afectada por la presencia de EDTA (6,0 nmol/prueba), bilirrubina libre (1,2 µg/prueba), bilirrubina conjugada (1,2 µg/prueba), quilo (turbidez de formacina: 14.400) y hemoglobina hemolítica (3,4 µg/prueba) y ADN genómico humano (1,2 µg/prueba). EDTA puede dar falsos resultados positivos cuando el resultado es leído mediante fluorescencia.

Respecto a los fármacos, nuestros estudios internos han revelado que dicha medición no se vio afectada por la presencia de Isoniazida (840 ng/prueba), Etambutol (204 ng/prueba), Rifampicina (958 ng/prueba), Pirazinamida (4,2 µg/prueba), Acetaminofén (322 ng/prueba), Loxoprofeno sódico (637 ng/prueba), Cefotaxima sódica (12 µg/prueba), Levofloxacina (270 ng/prueba), Atovaquona (1,59 µg/prueba), Proguanil (20 ng/prueba), Cloroquina (40 ng/prueba), Quinina (960 ng/prueba), Clorhidrato de doxiciclina (360 ng/prueba), Mefloquina (168 ng/prueba), Primaquina (18 ng/prueba) y Artemisinina (93 ng/prueba).

CARACTERÍSTICAS DE RESULTADOS

(1) Sensibilidad y precisión

Al realizar la prueba de las siguientes muestras:

- Muestra Negativa (concentración: 0 copia/prueba)
- Muestra Positiva 1 (100 copias/prueba)
- Muestra Positiva 2 (1.000 copias/prueba);

La muestra negativa debe dar negativo y las muestras positivas 1 y 2 deben dar positivo.

(2) Reproducibilidad del método

Al probar cinco muestras negativas y positivas simultáneamente, la muestra negativa debe dar negativo y la muestra positiva debe dar positivo.

(3) Límite de detección

5,0 copias/prueba

(4) Reactividad cruzada

El sistema de medición da resultados positivos para todas las especies de *Plasmodium* y negativos para otros patógenos como se describe en la siguiente tabla:

Genre <i>Plasmodium</i>	
<i>Plasmodium falciparum</i>	Positivo
<i>Plasmodium vivax</i>	Positivo
<i>Plasmodium ovale</i>	Positivo
<i>Plasmodium malariae</i>	Positivo
Otros patógenos	
<i>Trypanosoma brucei</i>	Negativo
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Negativo
<i>Leishmania donovani</i>	Negativo
<i>Schistosoma mansoni</i>	Negativo
<i>Theileria parva</i>	Negativo
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Negativo
Virus de la gripe A	Negativo
Virus de inmunodeficiencia humana	Negativo

(5) Información sobre el calibrador

En la prueba de rendimiento para este producto se utilizó ADN plasmídico con ADN mitocondrial de *Plasmodium falciparum* como calibrador.

(6) Desempeño clínico

La malaria es una enfermedad producida por parásitos del género *Plasmodium* y transmitida por la picadura de mosquitos infectados. Tras madurar en el hígado, se liberan más parásitos en el torrente sanguíneo que infectan los glóbulos rojos, donde se reproducen para salir e infectar más células y aparecen entonces los primeros síntomas, como la fiebre. El ensayo LAMP detecta el ADN de los parásitos en sangre.

El LAMP para malaria fue evaluado en muestras de sangre enviadas para pruebas de malaria en un laboratorio especializado. Siguiendo el protocolo estándar para microscopía, todas las muestras fueron anónimas, el ADN se extrajo de las muestras de sangre utilizando el método PURE⁶⁾ y se probaron con el kit LAMP para malaria utilizando cebadores específicos para *Plasmodium* simultáneamente, con dos métodos diferentes de lectura. Por último, se realizó PCR anidada como estándar de oro. 705 pruebas LAMP de malaria, 56 de las cuales asociadas a pacientes con microscopía positiva comparadas con la PCR anidada como estándar de referencia. La sensibilidad y la especificidad de LAMP Malaria Pan fueron de 97,0 % y 99,2 % respectivamente.

	Sensibilidad (95% CI)	Especificidad (95% CI)	VPP*	VPN*
Malaria LAMP vs la PCR anidada	97,0%	99,2%	92,9%	99,7%
Malaria LAMP vs microscopio	100,0%	97,8%	80,0%	100,0%

*valores predictivos positivos y negativos

INFORMACIÓN DE PEDIDOS

Código de producto	Nombre de producto	Contenido
977000	Loopamp™ MALARIA Pan Detection Kit	96 pruebas
962000	HumaLoop M	1 Unidad Principal 1 Unidad de Control Visual de Fluorescencia
970000	Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit	90 Pruebas
963200	HumaTurb C+A	1 Unidad de Control 1 Unidad de Amplificación
980000	Humax ITA	Centrífugas de Sobremesa
964000	HumaHeat	Bloque Térmico

BIBLIOGRAFÍA

- 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) La directriz para la bioseguridad y el riesgo biológico (por la Sociedad Japonesa de Bacteriología): Japanese Journal of Bacteriology 54, No. 3, 667–715 (1999)
- 6) <https://www.finndx.org/wp-content/uploads/2016/04/SOP-LAMP-Malaria-Aug2012.pdf>

DIAGRAMA

Principios de funcionamiento para la detección de turbidez en tiempo real

Preparación de la solución de muestra

Prepare soluciones de ADN de muestra extrayendo ADN de las muestras de sangre tomadas.

Preparación del reactivo

Tome el número necesario de tubos de reacción de dMAL Pan.

(para muestras, controles negativos y positivos)

Mezcla del reactivo y la solución de la muestra

Vierta 30 µL de muestra o solución de control en cada tubo de reacción.

Utilice NC Mal como control negativo.
Utilice PC Mal como control positivo.
(El control positivo se debe preparar al final)

Invierta los tubos de reacción para tomar la solución del tapón. Deje los tubos boca abajo durante 2 minutos.

Invierta los tubos de reacción 5 veces para mezclar el contenido y centrifúgelos.

(Evite la formación de burbujas)

Amplificación

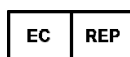
Coloque los tubos de reacción en el bloque de reacción del turbidímetro.

Como se indica en las instrucciones de uso del turbidímetro, lance la reacción y mida y evalúe la turbidez (40 minutos a 65,0°C).

Confirme la finalización de la inactivación de polimerasa (5 minutos a 80°C o 2 minutos a 95°C). Tome todos los tubos de reacción del turbidímetro y deséchelos sin abrirlos. Tenga mucho cuidado de no dañar los tubos.



Distribuidor exclusivo



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

Fecha de revisión: 1 de octubre de 2018



Deutsch

REF 977000

Loopamp™ MALARIA Pan

Detection Kit

VERWENDUNGSZWECK

Das Loopamp™ MALARIA Pan Detection Kit ist ein qualitativer, *In-vitro* diagnostischer Test für den Nachweis von *Plasmodium* DNA in menschlichem Blut.

TEST PRINZIP

Dieses Produkt basiert auf einer Loop-vermittelten Amplifikation (LAMP) von Nukleinsäuren, die von Eiken Chemical Co., Ltd. entwickelt wurde.

Die LAMP Methode hat folgende Eigenschaften: (1) Die Amplifikationsreaktion läuft unter isothermalen Bedingungen ab, bei der nur ein Enzym benötigt wird;^{1,2)} (2) Durch die Verwendung von vier Primerpaaren, die sechs verschiedene Regionen auf der Ziel-DNA erkennen, wird eine sehr hohe Spezifität erreicht; (3) Die Amplifikation findet in einer kurzen Zeit mit einer sehr hohen Effizienz statt und der visuelle oder automatisierte Nachweis wird durch die Herstellung großer Mengen des amplifizierten Produktes ermöglicht.^{3),4)}

Die Malaria Pan (Genus) Primer in diesem Produkt erkennen Abschnitte auf der mitochondrialen DNA der vier am weitesten verbreiteten *Plasmodium* Spezies, die Malaria verursachen (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* und *P. malariae*). Die ausgesuchten DNA Sequenzen wurden durch Übereinstimmungsanalysen als hochkonservierte Regionen in diesen *Plasmodien* Spezies identifiziert.

Die DNA Lösung, die aus Blut extrahiert wurde, wird in ein Reaktionsröhrchen gegeben. Die Strang-Displacement DNA Polymerase, Desoxynukleotidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP und dTTP), Calcein und Malaria Pan oder spezifische Primer liegen getrocknet im Deckel des Reaktionsröhrchens vor. Diese getrockneten LAMP Reagenzien (Malaria Pan Detektionsreagenz, dMAL Pan) werden gelöst, wenn die DNA Lösung dazugegeben wird. Die Reaktion wird bei 65,0°C inkubiert und die DNA durch Katalyse der Strang-Displacement DNA Polymerase während der LAMP Reaktion amplifiziert.

Der Nachweis der amplifizierten Produkte basiert auf Trübungsmessung des Nebenproduktes Magnesiumpyrophosphat (weißes Präzipitat).³⁾ Anstelle der Trübungsmessung kann der Test auch visuell unter UV Licht ausgewertet werden. Vor der Reaktion liegt Calcein im Reagenz, bedingt durch die Bindung von Manganionen, im gehemmten Zustand vor. Nach Start der LAMP Reaktion werden Pyrophosphationen gebildet, welche die Manganionen binden und das Calcein kann fluoreszieren.⁴⁾

KITBESTANDTEILE

Die Reagenzien sind bis zum angegebenen Datum auf dem Etikett stabil, wenn die Testbox ungeöffnet bei einer Temperatur von 2-30°C gelagert wird.

Malaria Pan Detektionsreagenz (dMAL Pan) 2 x 48 Röhrchen

Die folgenden Bestandteile sind in jedem Röhrchen in getrockneter Form vorhanden:

- Bst DNA Polymerase¹
- Desoxynucleotidtriphosphate
- Magnesiumsulfat
- Calcein
- Manganchlorid
- Primer²

Positivkontrolle Mal (PC Mal)³⁾..... 1 x 1,0 mL
 Negativkontrolle Mal (NC Mal)..... 3 x 0,5 mL
 30 µL Pipette..... 5 x 12 Pipetten

*1: Bst DNA Polymerase aus *Bacillus stearothermophilus* ist eine Strang-Displacement DNA Polymerase, der die 5'→3' Exonucleaseaktivität fehlt.

*2: Primer wurden zum Nachweis der mitochondrialen DNA von *Plasmodium* Parasiten hergestellt und aus synthetisierten

Oligonukleotiden mittels HPLC aufgereinigt.

*3: PC Mal enthält ein Produkt, das durch *in vitro* Amplifikation eines artifiziiellen Gens der mitochondrialen *Plasmodium falciparum* DNA (GenBank No. M76611) hergestellt wurde.

Die Abkürzungen der Namen folgender Reagenzien, die Lot Nummer und der Hersteller (EKN) sind auf die Boxen gedruckt. Die Reagenzbezeichnung ist Teil des Codes auf dem Deckel.

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

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- (1) Nur für den Gebrauch in der *In-vitro* Diagnostik.
- (2) Dieses Produkt wurde nur für den Nachweis der DNA von *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* und *P. ovale* Parasiten in menschlichem Blut hergestellt. Nicht für andere Zwecke verwenden.
- (3) Immer die Gebrauchsanweisung beachten, wenn das Produkt verwendet wird.
- (4) Reagenzien nicht einfrieren.
- (5) Keine abgelaufenen Reagenzien verwenden.
- (6) Unterschiedliche Lots nicht mischen.
- (7) Reagenzien nicht wieder auffüllen.
- (8) Die Testleistung des Loopamp™ MALARIA Pan Detection Kit ist von den Fähigkeiten des Anwenders und dem Beachten der Gebrauchsanweisung abhängig. Der Test sollte nur von geschultem Personal durchgeführt werden.
- (9) Licht- und Hitzeexposition könnten dMAL Pan unbrauchbar machen. Nur die benötigte Anzahl der Reaktionsröhrchen entnehmen (Anzahl der Proben und Kontrollen) und den Aluminiumbeutel unmittelbar danach wieder verschließen.
- (10) Das Trockenmittel nicht aus dem Aluminiumbeutel entfernen. Hohe Feuchtigkeit kann zum Verderben des getrockneten LAMP Reagenz in den Reaktionsröhrchen führen.
- (11) Gebrauchsanweisung lesen und vor Beginn des Testes sicherstellen, dass die benötigten Geräte (Real-Time Turbidimeter oder Inkubator etc.) vorhanden sind.
- (12) Blutproben stellen ein potenzielles Risiko für Infektionen dar und müssen entsprechend behandelt werden, um Biogefährdung zu vermeiden.⁵⁾
- (13) PC Mal und NC Mal enthalten geringe Mengen Natriumazid als Konservierungsmittel. Natriumazid wird als toxisch eingestuft. Kontakt mit Augen, Mund oder Haut vermeiden.
- (14) Bei Kontakt von Augen, Mund und Haut mit Reagenzien sofort mit viel Wasser abspülen. Wenn notwendig, medizinische Hilfe in Anspruch nehmen.
- (15) PC Mal nicht zur Patientenprobe geben oder damit verdünnen. PC Mal nur so verwenden, wie es in der Gebrauchsanweisung steht, um DNA Kontaminationen zu vermeiden.
- (16) PC Mal und positive Blutproben getrennt von anderen Kitkomponenten aufbewahren.
- (17) Der Deckel jedes Reaktionsröhrchens enthält dMAL Pan in getrockneter Form. Die Innenseite des Deckels nicht berühren.
- (18) Vor Verwendung der Reaktionsröhrchen prüfen, ob es Brüche oder Kratzer aufweist. Beschädigte Röhrchen können zu falschen Ergebnissen und DNA Kontaminationen im Inkubator oder des Arbeitsbereiches führen.
- (19) Die Reaktionsröhrchen nicht dem UV Licht vor Ende der LAMP Reaktion aussetzen. Dies kann zu Beschädigungen des Röhrchens oder falschen Ergebnissen führen.
- (20) Wird ein UV Licht für den visuellen Nachweis verwendet, nicht direkt in das UV Licht sehen. Eine kurze Exposition mit UV Licht ist für Augen schädlich und kann schon nach kurzer Zeit zu Augenirritationen und Symptomen ähnlich einer Konjunktivitis führen. Glasschirme, Brillen oder Augenmasken verwenden, wenn direkt in das UV Licht gesehen wird.
- (21) Vor Verwendung die Gebrauchsanweisung für den Inkubator lesen. Wenn HumaLoop M oder HumaTurb C+A verwendet werden, die Reaktionsröhrchen vorsichtig aus dem Inkubator nehmen, um Verbrennungen zu vermeiden.

- (22) PC Mal nicht als Positivkontrolle für das Loopamp™ MALARIA Pan/Pf Detection Kit, Loopamp™ MALARIA Pv Detection Kit oder Loopamp™ MALARIA Pf Detection Kit verwenden. Positivkontrolle von anderen Kits nicht als Positivkontrolle für dieses Kit verwenden.

ABFALLENTSORGUNG

- (1) Die Röhrchen nicht nach der DNA Amplifikation öffnen. Das Röhrchen geschlossen lassen und als medizinischen Abfall in zwei übereinander gezogene, verschlossene Plastikbeutel entsorgen.
- (2) Reaktionsröhrchen niemals autoklavieren und wieder verwenden. Die Röhrchen würden auslaufen und Kontaminationen verursachen.
- (3) Die Reaktionsröhrchen und die Reagenzienröhrchen bestehen aus PP, der Reagenzienständer aus PET, der Beutel aus Aluminium und die Kitbox aus Papier.
- (4) Verwendete Reagenzien, Labormaterial und Boxen nach den lokalen Bestimmungen entsorgen.

PROBENENTNAHME

- (1) Blutproben sollten unmittelbar nach Probengewinnung verwendet werden.
- (2) Blut in einem separaten, von der LAMP Reaktion abgetrennten Raum abnehmen. Aerosole, die während der Probengewinnung entstehen und *Plasmodium* DNA enthalten, können Kontaminationen verursachen.
- (3) KEIN EDTA und Citrat als Antikoagulanzen bei der Blutentnahme verwenden, wenn das Ergebnis mittels visuellen Fluoreszenznachweis generiert wird. Die Verwendung von Heparin als Antikoagulanzen wird empfohlen.

BENÖTIGTES MATERIAL, NICHT ENTHALTEN

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

Für den visuellen Fluoreszenznachweis

(Mit HumaLoop M)

- HumaLoop M

(Für andere Inkubatoren mit UV Licht)

- Inkubator (Temperaturgenauigkeit: $\pm 0,5^\circ\text{C}$; mit Heizdeckel)
- Heizblock
- UV Licht oder blaues LED Licht (Wellenlänge: 240-260 nm und 350-370 nm)
- Brille und Augenschutzmaske

Für den Nachweis mit dem Real-Time Turbidimeter

- HumaTurb C+A

Zum Mischen von Reagenz und Probe

- Mikropipetten (10-100 μL und 20-200 μL) und Filterspitzen
- Zentrifuge für PCR Röhrchen (optional)
- Zentrifuge für acht verbundene Röhrchen (optional)
- HuMax ITA (optional)

HERSTELLUNG DER DNA LÖSUNG

Um DNA aus Blut zu extrahieren, werden die Kochen & Zentrifugieren sowie die PURE Methode empfohlen. Die Standardarbeitsanweisungen für beide Methoden sind auf der folgenden Internetseite zu finden:

<https://www.finddx.org/wp-content/uploads/2016/04/SOP-LAMP-Malaria-Aug2012.pdf>

Für die PURE Methode folgende kritische Punkte beachten:

- **Proben: Blutproben, die durch Stechen in die Fingerbeere (Fingerprick), erhalten wurden, in Heparinröhrchen aufgenommen wurden oder Vollblut, das auf Filterpapier getropft wurde**
- **Probenvolumen: 30 μL (frisches Blut oder Blut mit Heparin) oder 6-mm Blutstropfenstanze (getrockneter Blutstropfen)**
- **Zusätze: 30 μL 334mM NaCl Lösung (nicht im Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit enthalten) zum Lyseröhrchen vor Erhitzen zugeben**
- **Erhitzen: Für 5 Min. bei 75°C**

VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

(1) Malaria Pan Detektionsreagenz

Die benötigte Anzahl Röhrchen aus dem Aluminiumbeutel entnehmen und in den mitgelieferten Röhrchenständer stellen (Anzahl der Proben und Kontrollen).

Beachte: Nach Entnahme der benötigten Röhrchen den Aluminiumbeutel mit den nicht benötigten Röhrchen sofort verschließen.

(2) Negativkontrolle Mal (NC Mal)

Vor Verwendung Röhrchen anzentrifugieren, damit sich der Inhalt

auf dem Boden des Röhrchens sammelt.

Beachte: Eine Negativkontrolle sollte bei jeder LAMP Reaktion gemessen werden.

(3) Positivkontrolle Mal (PC Mal)

Vor Verwendung Röhrchen anzentrifugieren, damit sich der Inhalt auf dem Boden des Röhrchens sammelt.

Beachte: PC Mal sollte bei jeder LAMP Reaktion gemessen werden.

MESSMETHODE

Mischen von Reagenzien und Probe

- (1) Den HumaLoop M oder den Real-Time Turbidimeter HumaTurb C+A einschalten.
- (2) 30 μL der extrahierten DNA Lösung in das Reaktionsröhrchen geben und das Röhrchen verschließen.
- (3) 30 μL NC Mal mit der Pipette oder der delieferten Pipette in ein Reaktionsröhrchen geben und das Röhrchen verschließen.
- (4) 30 μL PC Mal mit der Pipette oder der delieferten Pipette in ein Reaktionsröhrchen geben und das Röhrchen verschließen.
- (5) Alle Röhrchen anzentrifugieren, damit die Lösungen auf den Boden des Röhrchens gesammelt werden.

Beachte: Bei Verwendung des Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit sicherstellen, dass sich der Flüssigkeitsstand näher an der oberen Linie des Reaktionsröhrchens befindet.

- (6) Die getrockneten Reagenzien im Deckel durch Invertieren des Reaktionsröhrchens lösen und die DNA Lösung im Deckel sammeln. Die Röhrchen umgekehrt für 2 Minuten stehenlassen, damit die getrockneten Reagenzien gelöst werden.
- (7) Die Reaktionsröhrchen fünfmal invertieren, um die Bestandteile zu mischen. Sicherstellen, dass die getrockneten Reagenzien im Deckel vollständig gemischt werden (die Lösung sollte eine orange Farbe haben).
- (8) Alle Röhrchen anzentrifugieren, damit die Lösungen auf den Boden der Röhrchen gelangen.

Amplifikation

Für den visuellen Fluoreszenznachweis

(Mit HumaLoop M)

- (1) Überprüfen, dass die Temperatur des HumaLoop M 65,0°C erreicht hat.
- (2) Die Reaktionsröhrchen in den HumaLoop M stellen und den grünen Schalter betätigen, um die LAMP Reaktion zu starten (40 Min. bei 65,0°C). Die Gebrauchsanweisung für den HumaLoop M befolgen.
- (3) Überprüfen, ob die Inaktivierung der Polymerase stattgefunden hat (erfolgt automatisch beim HumaLoop M). Alle Reaktionsröhrchen aus dem HumaLoop M nehmen.

(Für andere Inkubatoren und UV Licht)

- (1) Die Temperatur des Inkubators (mit Heizdeckel; Temperaturgenauigkeit: $\pm 0,5^\circ\text{C}$) auf 65,0°C einstellen. (Mit einem beheizbaren Deckel sollte die Temperatur ca. 10°C über der Reaktionstemperatur eingestellt werden). Warten bis die eingestellte Temperatur erreicht ist und auf dem Display angezeigt wird.
- (2) Alle Reaktionsröhrchen in den Inkubator stellen und die Amplifikationsreaktion starten (40 Min. bei 65,0°C).
- (3) Nach Ablauf der 40 Min. Inkubationszeit, die Polymerase durch Erhitzen für 5 Min. bei 80°C oder 2 Min. bei 95°C inaktivieren.

Für den Nachweis mit Real-Time Turbidimeter HumaTurb C+A (siehe Methodenübersicht)

- (1) Den Real-Time Turbidimeter HumaTurb C+A für den Mal Pan Nachweis konfigurieren.
- (2) Überprüfen, dass die Temperatur von 65,0°C erreicht ist. (Turbidimeter 20 Min. vor Gebrauch vorwärmen).
- (3) Die Reaktionsröhrchen in den HumaTurb C+A stellen und Messung starten.
- (4) Während der Inkubation überprüfen, ob die Trübung der Positivkontrolle zunimmt. Diese wird auf dem Display angezeigt. Wenn die Trübung in PC Mal zunimmt, aber nicht die von NC Mal, verläuft die Amplifikationsreaktion erwartungsgemäß (Fig1). Ist dies nicht der Fall, läuft die Amplifikationsreaktion nicht richtig. Den Test ab Vorbereitung der Reagenzien mit den betroffenen Proben wiederholen.
- (5) Überprüfen der Inaktivierung der Polymerase (erfolgt automatisch durch den Turbidimeter). Alle Reaktionsröhrchen aus dem HumaTurb C+A nehmen, ohne sie zu öffnen.

Amplifikationsplots Malaria Pan Detektionsreagenz

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

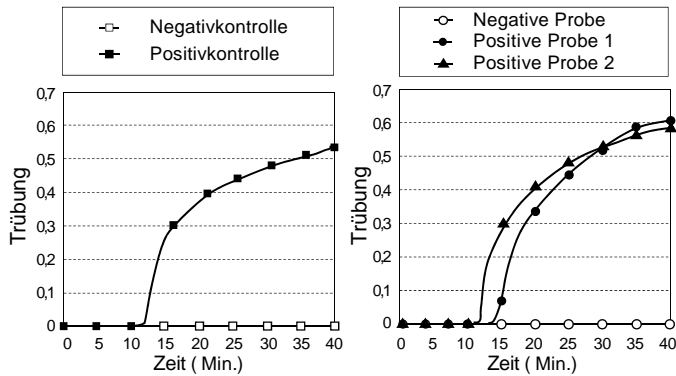


Fig1:Amplifikationsplots Kontrollen

Fig2:Amplifikationsplots Proben

HINWEISE

- (1) Die LAMP Reaktion ist sehr sensitiv und Kontaminationen mit kleinen Mengen des amplifizierten Produktes können zu falsch positiven Ergebnissen führen.
- (2) Probengewinnung räumlich von der LAMP Reaktion trennen.
- (3) Alle Arbeitsbereiche vor und nach Durchführung des Testes mit > 0,5% Natriumhypochloridlösung behandeln.
- (4) Handschuhe nach Transfer des Blutes oder nach Kontakt mit der DNA Lösung wechseln.
- (5) Bei Verwendung dieses Produktes parasitologische Kontaminationen und Kontaminationen mit Nukleasen vermeiden. Der Transfer von kleinen Mengen DNase aus Schweiß oder Speichel in die Reaktionsröhrchen kann falsche Ergebnisse verursachen.
- (6) Vor Verwendung die SOP[®] lesen.
- (7) Die DNA Lösung sollte idealerweise unmittelbar nach der Präparation verwendet werden.
- (8) **(Für HumaLoop M oder andere Inkubatoren mit UV Licht)** Wenn Blasen erkennbar sind, Röhrchen mit dem Finger anschnippen.
(Für Real-Time Turbidimeter HumaTurb C+A) Blasen in der Reaktionslösung können mit der Trübung interferieren und zu falschen Ergebnissen führen. Deshalb Blasenbildung beim Mischen der DNA Lösung und der Reagenzien vermeiden. Treten dennoch Blasen auf, Röhrchen mit dem Finger anschnippen.
- (9) dMAL Pan sollte vollständig gelöst sein. Ungelöstes Material beeinflusst die Testleistung und kann eine geringere Sensitivität zur Folge haben.
- (10) PC Mal enthält eine große Menge Kontroll-DNA. Jegliche Kontamination der PC Mal mit anderen Proben vermeiden. Proben und NC Mal in die Reaktionsröhrchen geben und alle Röhrchen gut verschließen, bevor PC Mal verwendet wird.
- (11) Vor dem Öffnen, PC Mal zentrifugieren, damit sich die Flüssigkeit auf den Boden des Röhrchens sammelt. Das Röhrchen sofort nach Aufteilung von PC Mal verschließen.
- (12) Reaktionsröhrchen niemals nach Start oder Beendigung der LAMP Reaktion öffnen. Besonders vorsichtig sein, wenn die Röhrchen aus dem Inkubator genommen werden, um unbeabsichtigtes Öffnen zu vermeiden.
- (13) Werden HumaLoop M oder der Real-Time Turbidimeter HumaTurb C+A verwendet, wird die Polymerase automatisch inaktiviert.
- (14) Für den visuellen Fluoreszenznachweis mit Inkubatoren und anderen UV Lampen, Polymerase für 5 Min. bei 80°C oder 2 Min. bei 95°C inaktivieren. Anderenfalls können falsche Ergebnisse entstehen.
- (15) Das amplifizierte Produkt nicht für Gelelektrophorese und andere Applikationen verwenden.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Für den visuellen Fluoreszenznachweis

(Mit HumaLoop M)

Das Reaktionsröhrchen in den Röhrchenständer der Fluoreszenzdetektionseinheit stellen, UV Lampe einschalten und das Röhrchen von der Seite betrachten.

(Für andere Inkubatoren mit UV Licht)

UV Licht einschalten und den Boden jedes Röhrchens von der Seite mit Schutzbrille oder anderen schützendem Equipment betrachten.

Für eine gültige LAMP Reaktion sollten die folgenden Ergebnisse erhalten werden:

- Nega Positivkontrolle: Grünes Fluoreszenzlicht wird ausgestrahlt.
- Negativkontrolle: Kein Fluoreszenzlicht wird ausgestrahlt.

Wenn eine Kontrolle ungültig ist, sollten alle Proben als ungültig beurteilt und erneut getestet werden. Nach Bestätigung einer gültigen LAMP-Reaktion sollten die Proben

wie folgt beurteilt werden:

- Positive Probe: Grünes Fluoreszenzlicht wird ausgestrahlt.
- Negative Probe: Kein Fluoreszenzlicht wird ausgestrahlt.

Für den Nachweis mit Real-Time Turbidimeter HumaTurb C+A

Nach Bestätigung der Trübungszunahme in der Positivkontrolle (aber nicht in der Negativkontrolle), sollten die Proben nach folgenden Kriterien beurteilt werden (Fig 1 und 2):

- Positiv: Zunahme der Trübung.
- Negativ: Keine Zunahme der Trübung.

Beachte:

- (1) Die minimale Detektionssensitivität des MALARIA Pan Kits ist 5,0 Kopien/Test. Bei einem negativen Testergebnis bei Patienten mit persistierenden Symptomen, die für eine Infektion mit Malaria sprechen oder bei Verschlechterung der Symptomatik, sollte erneut getestet werden. Jedoch müssen auch andere Ursachen für die verschlechterte Symptomatik in Betracht gezogen werden. Der LAMP Assay ist hoch sensitiv und kann niedrige Konzentrationen bei Parasitämien nachweisen, die nicht in direktem Zusammenhang mit den Symptomen des Patienten stehen. Für die letztendliche Diagnose und bei der Festlegung der Therapie sollten immer alle klinischen Umstände einbezogen werden.
- (2) Obwohl die Primer für eine Region mit sehr wenigen Variationen hergestellt wurden, ist es denkbar, dass Infektionen mit Pan stattfinden können, die Variationen in der Zielregion aufweisen, die diese Produkt nicht detektiert. Deshalb schließt ein negatives Testergebnis eine Infektion mit Pan nicht aus.
- (3) Dieses Produkt wurde für den qualitativen Nachweis entwickelt und nicht für quantitative Messungen. Die Intensität der Fluoreszenz oder die Zunahme der Trübung über die Zeit, die mit dem Real-Time Turbidimeter gemessen wird, korreliert nicht mit der Konzentration der Template DNA.

INTERFERIERENDE SUBSTANZEN

Interne Untersuchungen haben gezeigt, dass die Messungen durch folgende Substanzen nicht beeinflusst werden: EDTA (6,0 nmol/Test), freies Bilirubin (1,2 µg/Test), konjugiertes Bilirubin (1,2 µg/Test), Darmlympe (Formazin Trübung:14.400), hämolytisches Hämoglobin (3,4 µg/Test) und humane genomische DNA (1,2 µg/Test). EDTA kann falsch-positive Ergebnisse verursachen, wenn die Ergebnisse durch visuellen Fluoreszenznachweis erhalten werden.

Interne Untersuchungen zum Einfluss von Medikamenten haben gezeigt, dass die Messungen durch folgende Substanzen nicht beeinflusst werden: Isoniazid (840 ng/Test), Ethambutol (204 ng/Test), Rifampicin (958 ng/Test), Pyrazinamid (4,2 µg/Test), AcetaMin.ophen (322 ng/Test), Loxoprofen natrium (637 ng/Test), Cefotaxim natrium (12 µg/Test), Levofloxacin (270 ng/Test), Atovaquon (1,59 µg/Test), Proguanil (20ng/Test), Chloroquine (40 ng/Test), Quinine (960 ng/Test), Doxycyclinehydrochlorid (360 ng/Test), Mefloquin (168 ng/Test), Primaquin (18 ng/Test) und Artemisinin (93 ng/Test).

LEISTUNGSDATEN

(1) Sensitivität und Genauigkeit

Folgende Proben wurden getestet:

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

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

(2) Intra-Assay Reproduzierbarkeit

5 negative und 5 positive Proben wurden gleichzeitig getestet. Die negativen Proben wurden negativ, die positiven Proben wurden positiv getestet.

(3) Nachweisgrenze

5,0 Kopien/Test

(4) Kreuzreaktivität

Das Messsystem testete positiv für *Plasmodium* und negativ für alle anderen Pathogene, wie in der folgenden Tabelle angegeben:

Gattung <i>Plasmodium</i>	
<i>Plasmodium falciparum</i>	Positiv
<i>Plasmodium vivax</i>	Positiv
<i>Plasmodium ovale</i>	Positiv
<i>Plasmodium malariae</i>	Positiv
Andere Pathogene	
<i>Trypanosoma brucei</i>	Negativ
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Negativ
<i>Leishmania donovani</i>	Negativ
<i>Schistosoma mansoni</i>	Negativ
<i>Theileria parva</i>	Negativ
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Negativ
Influenza A virus	Negativ
Human immunodeficiency virus	Negativ

(5) Informationen zum Kalibrator

Für die Erhebung der Leistungsdaten des Testes wurde eine Plasmid-DNA verwendet, die mitochondriale DNA von *Plasmodium falciparum* als Kalibrator enthält.

(6) Klinische Leistung

Malaria wird durch verschiedene Parasiten verursacht, die zum Genus *Plasmodium* gehören und über Bisse von infizierten Moskitos übertragen werden. Nach einem Entwicklungszyklus in der Leber werden die Parasiten ins Blut abgegeben. Dort lysieren die Plasmodien Zellen während ihrer Reproduktion und verursachen Symptome inkl Fieber.

Der Malaria LAMP Assay weist *Plasmodium* im Blut nach und wurde mit Blutproben evaluiert, die zur Malariatestung in ein Speziallabor gebracht wurden. Nach der Standardmikroskopie wurden die Proben anonymisiert. DNA wurde mit dem Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit extrahiert und anschließend mit dem LAMP Malaria Pan mit zwei unterschiedlichen Auslesemethoden getestet. Als Goldstandard wurde nested PCR verwendet. 705 Malaria LAMP Tests, von denen 56 in der Mikroskopie positiv waren, wurden mit den Ergebnissen der nested PCR als Referenzstandard verglichen. Die Sensitivität und Spezifität des LAMP Malaria Pan wurde mit 97,0% und 99,2% angegeben.

	Sensitivität (95% CI)	Spezifität (95% CI)	PPW*	NPW*
Malaria LAMP vs nested PCR	97,0%	99,2%	92,9%	99,7%
Malaria LAMP vs Microskopie	100,0%	97,8%	80,0%	100,0%

* positive und negative prädiktive Werte

BESTELLINFORMATIONEN

Bestellnr.	Produktname	Inhalt
977000	Loopamp™ MALARIA Pan Detection Kit	96 Tests
962000	HumaLoop M	1 Inkubationseinheit 1 Fluoreszenzdetektionseinheit
970000	Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit	90 Tests
963200	HumaTurb C+A	1 Kontrolleinheit 1 Amplifikationseinheit
980000	HuMax ITA	Tischzentrifuge
964000	HumaHeat	Heizblock

REFERENZEN

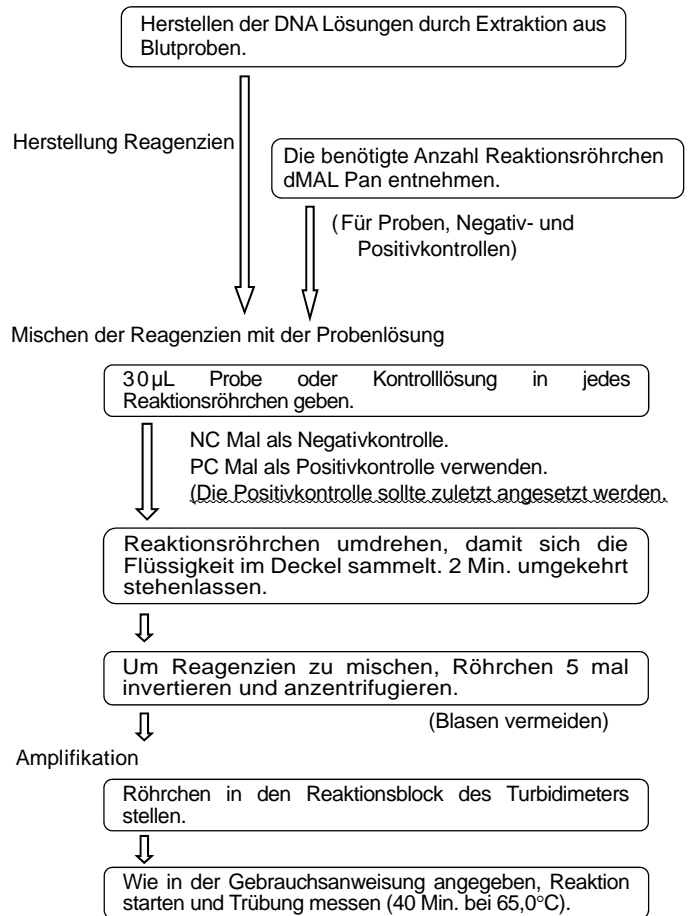
- 1) Notomi T., et al.: Nucleic Acids Research 28, No. 12, e63 (2000)
- 2) NagaMin.e K., et al.: Clin. Chem. 47, No. 9, 1742–1743 (2001)
- 3) Mori Y., et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 289, No. 1, 150–154 (2001)
- 4) Tomita N., et al.: Nat. Protoc. 3, No. 5, 877–882 (2008)
- 5) Die Leitlinie für die Bio-Sicherheit und Bio-Hazard (von der Japanischen Gesellschaft für Bakteriologie): Japanese Journal of Bacteriology 54, No. 3, 667–715 (1999)

6) <https://www.finddx.org/wp-content/uploads/2016/04/SOP-LAMP-Malaria-Aug2012.pdf>

Methodenübersicht

Durchführung mit Real-Time Turbidimeter

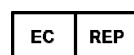
Herstellung der Probenlösung



Überprüfen, ob die Polymerase vollständig inaktiviert wurde (5 Min. bei 80°C oder 2 Min. bei 95°C). Alle Reaktionsröhrchen aus dem Real-Time Turbidimeter nehmen, ohne sie zu öffnen. Röhrchen nicht beschädigen.



Exklusiver Distributor



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

Revisionsdatum: 1. Oktober, 2018