



Notice d'utilisation

Notice disponible sur notre site web <https://www.eiken.co.jp/en/ifu>

RCSF disponible sur EUDAMED

Human

Diagnostics Worldwide

380236-D

Français

REF 972000

Loopamp™ MTBC Detection Kit

DESTINATION

Le Loopamp™ MTBC Detection Kit est un test de diagnostic qualitatif in vitro permettant de détecter l'ADN du complexe *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) extrait des expectorations de patients présentant tout symptôme indiquant une infection par le CMTB. Le kit aide au diagnostic de l'infection par le CMTB et est destiné à être utilisé dans les laboratoires professionnels et les hôpitaux par un personnel dûment formé. Le résultat peut être interprété soit par un turbidimètre automatisé, soit visuellement sous irradiation UV.

PRINCIPE DU TEST

Ce produit est basé sur la méthode d'amplification des acides nucléiques, LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification), développée par Eiken Chemical Co., Ltd.

Les caractéristiques de la méthode LAMP sont les suivantes : (1) une seule enzyme est nécessaire, la réaction d'amplification se déroule dans des conditions isothermes^{1),2)} ; (2) elle présente une spécificité extrêmement élevée en raison de l'utilisation de quatre amorces reconnaissant six régions distinctes sur la cible ; (3) elle présente une efficacité d'amplification élevée et peut produire une concentration élevée de produit amplifié en peu de temps, ce qui rend possible une détection visuelle ou automatisée.^{3),4)}

Les amorces fournies avec ce produit ont été conçues dans la région de la sous-unité B (*gyrB*) de l'ADN gyrase et de la séquence d'insertion (IS) *IS6110* de l'ADN génomique du CMTB. L'analyse de l'alignement des séquences de bases sélectionnées du CMTB et des mycobactéries non tuberculeuses a confirmé que cette séquence possède une séquence de bases bien conservée dans le CMTB.

L'ADN des expectorations non traitées ou des expectorations traitées au NALC-NaOH est extrait à l'aide du Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit (vendu séparément). Ensuite, la solution d'ADN est versée dans un tube de réaction. L'ADN polymérase à déplacement de brin, les désoxynucléotides triphosphates (dATP, dCTP, dGTP et dTTP), la calcéine, les tampons de réaction et les amorces spécifiques au CMTB sont ensuite conservés sous forme séchée dans le bouchon du tube de réaction. Ce réactif LAMP séché (réactif de détection du CMTB (dMTB)) est dissous lorsque la solution d'ADN est ajoutée. Ensuite, le tube de réaction est incubé à 67,0 °C et l'ADN est amplifié par catalyse par l'ADN polymérase à déplacement de brin selon la réaction LAMP.

La détection des produits amplifiés est basée sur la mesure de la turbidité d'un sous-produit, le pyrophosphate de magnésium (précipité blanc).³⁾ Alternativement, à la place de la mesure de la turbidité, une évaluation visuelle sous irradiation UV peut être utilisée. Avant la réaction, la calcéine dans le réactif est à l'état éteint en raison des ions manganèse qui lui sont liés ; cependant, une fois que la réaction LAMP commence, des ions pyrophosphate sont générés et détachent les ions manganèse. La calcéine devient alors fluorescente.⁴⁾

CONTENU DU KIT

Les réactifs sont stables jusqu'à la date indiquée sur l'étiquette tant que le récipient n'est pas ouvert et qu'il est stocké à une température de stockage de 2-30 °C. Les réactifs sont également confirmés stables après ouverture du récipient si ces instructions de procédure sont respectées.

Réactif de détection du CMTB 2 x 48 tubes

Les réactifs suivants, sous forme séchée, sont contenus dans chaque tube de réaction.

- Bst* DNA polymérase ^{a)}
- Désoxynucléotide triphosphates
- Sulfate de magnésium
- Calcéine
- Chlorure de manganèse
- Amorces ^{b)}

Contrôle positif MTB (PC MTB) ^{c)} 1 x 0,4 ml

Contrôle négatif MTB (NC MTB) 3 x 0,5 ml

Compte-gouttes 30 µl 1 x 18 compte-gouttes

- a) La *Bst* DNA polymérase dérivée de *Bacillus stearothermophilus* est un ADN polymérase à déplacement de brin qui manque d'activité exonucléase 5'→3'.
- b) Amorces conçues dans la région *gyrB* et IS de l'ADN génomique du CMTB, purifiées à partir des oligonucléotides synthétisés par HPLC.
- c) Le PC MTB contient un produit résultant de l'amplification in vitro d'un ADN génomique matrice provenant de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (GenBank n° NC_000962).

Les abréviations des réactifs suivants et le numéro de lot ainsi que le fabricant (EKN) sont imprimés sur les récipients comme indiqué ci-dessous :

Réactifs	Étiquetage sur le tube	Code sur le bouchon
Contrôle positif MTB	PC MTB N° de lot, EKN	PC MTB
Contrôle négatif MTB	NC MTB N° de lot, EKN	NC MTB

*Informations sur la traçabilité métrologique

Le contrôle positif est dérivé du produit d'amplification de l'ADN génomique provenant de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (GenBank n° NC_000962). La région spécifique de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, qui est la cible d'intérêt, sert de modèle pour l'amplification du fragment d'ADN de PC MTB. Ce fragment est quantifié à l'aide de la spectrophotométrie et sa concentration d'ADN est ajustée à 1000 copies/µl.

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

- (1) Utilisation pour le diagnostic in vitro seulement.
- (2) Ce produit est conçu uniquement pour le diagnostic clinique du CMTB à partir d'échantillons d'expectorations d'origine humaine. Ne pas l'utiliser à d'autres fins.
- (3) Lors de l'utilisation de ce produit, toujours suivre cette notice.
- (4) Ne pas congeler les réactifs.
- (5) Ne pas utiliser de réactif périmé.
- (6) Ne pas mélanger des lots différents.
- (7) Ne pas remplir les réactifs.
- (8) Les performances du Loopamp™ MTBC Detection Kit dépendent de la compétence de l'opérateur et du respect des instructions de procédure. Les tests doivent être effectués par du personnel formé en conséquence en suivant strictement les instructions fournies.
- (9) Retirer le nombre requis de tubes de réaction de l'emballage avant de les utiliser et refermer immédiatement la pochette en aluminium.
- (10) Ne pas retirer le dessiccateur de la pochette en aluminium. Un taux d'humidité élevé peut détériorer le réactif LAMP séché dans les tubes de réaction.
- (11) L'exposition à la chaleur, à l'humidité et à la lumière peut détériorer le dMTB. Ainsi, ne retirer que le nombre requis de tubes de réaction (somme des échantillons et des contrôles) et refermer immédiatement la pochette en aluminium.
- (12) Lire le manuel d'instructions et s'assurer que l'équipement requis (turbidimètre ou incubateur) est disponible avant de commencer la procédure.
- (13) Les échantillons d'expectorations présentent un risque potentiel d'infection. Prendre toutes les mesures préventives nécessaires pour éviter les risques biologiques.⁵⁾
- (14) Le PC MTB et le NC MTB contiennent une petite quantité d'azide de sodium comme conservateur. L'azide de sodium étant classé comme toxique, éviter tout contact avec les yeux, la bouche ou la peau.
- (15) En cas de contact accidentel d'un réactif avec les yeux, la bouche ou la peau, rincer immédiatement la région concernée à l'eau courante et consulter un médecin.
- (16) Ne pas diluer ou ajouter le PC MTB aux échantillons. N'utiliser le PC MTB que de la manière décrite dans cette notice pour éviter toute contamination de l'ADN.
- (17) Conserver le PC MTB et tout échantillon d'expectorations positif séparément des autres réactifs du kit.
- (18) Le bouchon de chaque tube de réaction contient le dMTB sous forme séchée. Ne pas toucher l'intérieur du bouchon.
- (19) Avant d'utiliser les tubes de réaction, vérifier soigneusement qu'ils

ne présentent pas de fissures ou de rayures. Des tubes endommagés peuvent donner de faux résultats et entraîner une contamination de l'incubateur et de la zone de travail par l'ADN.

- (20) Ne pas exposer les tubes de réaction à la lumière UV avant la fin de la réaction LAMP. Une exposition prolongée à la lumière UV peut endommager les tubes et entraîner de faux résultats.
- (21) Lorsque la lumière UV est utilisée pour évaluer visuellement la fluorescence, ne pas la fixer directement. La lumière UV étant nocive pour les yeux, la regarder même pendant une courte période peut irriter les yeux et provoquer des symptômes similaires à ceux de la conjonctivite. Utiliser plutôt un écran en verre ou porter des lunettes de protection ou un masque oculaire anti-UV lorsque vous regardez directement la lumière UV.
- (22) Se référer au manuel de l'incubateur. Lorsque le HumaLoop T ou le turbidimètre en temps réel HumaTurb C+A est utilisé, retirer soigneusement les tubes de réaction de l'incubateur pour éviter les brûlures.

ÉLIMINATION DES DÉCHETS

- (1) Ne pas ouvrir les tubes après amplification de l'ADN. Laisser le bouchon fermé et éliminer les tubes usagés comme des déchets médicaux par incinération ou après double ensachage avec des sacs plastiques scellables.
- (2) ~~Ne jamais autoclaver ou réutiliser les tubes de réaction~~, car les produits amplifiés se disperseront et provoqueront une contamination.
- (3) Le matériau principal des tubes de réaction et des tubes de réactif est le PP ; pour le plateau des tubes de réaction, le PET ; pour la pochette en aluminium, l'aluminium et pour l'emballage du kit, le papier.
- (4) Éliminer tout réactif, récipient ou matériel de laboratoire usagé conformément aux réglementations locales.

PRÉLÈVEMENT D'ÉCHANTILLONS

- (1) Utiliser la partie la plus purulente de l'échantillon d'expectorations.
- (2) Les échantillons d'expectorations doivent être utilisés immédiatement après leur prélèvement.
- (3) Prélever les expectorations dans une pièce séparée de la salle d'amplification LAMP. Des aérosols contenant l'ADN du CMTB peuvent être générés lors de la collecte d'expectorations et peuvent entraîner une contamination.

MATÉRIELS REQUIS MAIS NON FOURNIS

- Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit
- Pipette-60 Set

Pour la détection visuelle de la fluorescence

- (pour HumaLoop T)
- HumaLoop T

(pour les autres incubateurs utilisant la lumière UV)

- Incubateur (précision de la température : $\pm 0,5$ °C ; avec bonnet chaud)
- HumaHeat ou autre bloc chauffant
- Lumière UV ou lumière LED bleue (longueur d'onde : 240-260 nm et 350-370 nm)
- Lunettes de protection ou masque oculaire anti-UV (facultatif)

Pour la détection de la turbidité en temps réel

- HumaTurb C+A
- HumaHeat ou autre bloc chauffant

Pour le mélange des réactifs et des échantillons

- Centrifugeuse pour microtubes (facultatif)
- Centrifugeuse pour huit tubes connectés (facultatif)
- HuMax ITA, micro-centrifugeuse (facultatif)

PRÉPARATION DES RÉACTIFS

(1) Réactif de détection du CMTB

Retirer le nombre requis de tubes de la pochette en aluminium et les placer sur le portoir (somme des échantillons et des contrôles).

Remarque : après avoir retiré les tubes nécessaires, refermer immédiatement la pochette en aluminium avec les tubes non utilisés.

(2) Contrôle négatif MTB (NC MTB)

Agiter (ou centrifuger) le tube pour recueillir le contenu au fond du tube. Pipetter 60 μ l du NC MTB dans le tube chauffant fourni dans le Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit. Suivre la notice d'utilisation pour traiter le NC MTB (le NC MTB extrait est appelé ci-après « solution de contrôle négatif »).

Remarque : un contrôle négatif doit être utilisé à chaque fois.

(3) Contrôle positif MTB (PC MTB)

Agiter (ou centrifuger) le tube pour recueillir le contenu au fond du tube.

Remarque : le PC MTB doit être utilisé à chaque fois.

PROCÉDURE DE MESURE

Extraction de l'ADN

Pour extraire l'ADN de l'échantillon d'expectorations de 60 μ l, suivre les instructions du Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit (vendu séparément). Verser 60 μ l d'échantillon d'expectorations dans le tube chauffant et le placer dans le HumaHeat ou le bloc chauffant préchauffé à 90 °C. Dans la mesure du possible, utiliser les expectorations les plus purulentes.

Mélange des réactifs et des échantillons

(1) Mettre en marche le HumaLoop T ou le turbidimètre en temps réel HumaTurb C+A.

(2) Déposer 30 μ l de la solution d'échantillon dans un tube de réaction à l'aide du Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit et fermer le tube avec le bouchon.

Remarque : le volume entre les deux lignes du tube de réaction correspond à environ 30 μ l.

(3) Distribuer 30 μ l de la solution de contrôle négatif dans un tube de réaction à l'aide du Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit et fermer le tube avec le bouchon.

Remarque : le volume entre les deux lignes du tube de réaction correspond à environ 30 μ l.

(4) Déposer 30 μ l du PC MTB dans un tube de réaction à l'aide du compte-gouttes fourni et fermer le tube avec le bouchon.

(5) Agiter (ou centrifuger) tous les tubes pour recueillir la solution au fond des tubes.

Remarque : veiller à ce que le niveau de liquide se trouve au milieu des deux lignes sur le tube de réaction afin de garantir 30 μ l de pipetage.

(6) Reconstituer les réactifs séchés dans le bouchon en retournant les tubes de réaction et en recueillant la solution d'ADN dans le bouchon. Laisser les tubes debout, tête en bas, pendant 2 minutes pour reconstituer les réactifs séchés.

(7) Retourner les tubes de réaction cinq fois pour mélanger le contenu. Faire attention à ce que les réactifs séchés dans le bouchon soient entièrement dissous.

(8) Agiter (ou centrifuger) tous les tubes pour recueillir la solution au fond des tubes.

Amplification

Pour la détection visuelle de la fluorescence

(pour HumaLoop T)

- (1) Vérifier que la température du HumaLoop T est de 67,0 °C.
- (2) Placer les tubes de réaction dans le HumaLoop T et appuyer sur le bouton vert pour démarrer la réaction LAMP (40 minutes à 67,0 °C). Se reporter au manuel d'instructions du HumaLoop T pour plus de détails sur le fonctionnement de l'incubateur.
- (3) Confirmer la fin de l'inactivation de la polymérase (automatiquement réalisée par le HumaLoop T). Retirer tous les tubes de réaction du HumaLoop T.

(pour les autres incubateurs utilisant la lumière UV)

- (1) Régler la température de l'incubateur sur 67,0 °C (avec la température du capot chauffant réglée 10 °C au-dessus de la température de réaction ou aussi près de cette valeur que possible. Précision de la température : $\pm 0,5$ °C).
- (2) Placer les tubes de réaction, puis démarrer la réaction d'amplification (pendant 40 minutes à 67,0 °C).
- (3) Après 40 minutes, inactiver la polymérase en utilisant le HumaHeat ou le bloc chauffant (pendant 5 minutes à 80 °C ou 2 minutes à 95 °C) pour terminer la réaction.

Pour la détection de la turbidité en temps réel avec HumaTurb C+A (voir le diagramme de la procédure)

- (1) Configurer le turbidimètre en temps réel HumaTurb C+A pour la détection avec ce produit.
- (2) Vérifier que la température affichée atteint 67,0 °C (laisser le turbidimètre se réchauffer pendant 20 minutes avant de l'utiliser).
- (3) Placer les tubes de réaction et commencer la mesure.
- (4) Surveiller l'affichage du turbidimètre et vérifier l'augmentation de la turbidité dans les contrôles positifs et pas dans les contrôles négatifs. Si la turbidité augmente dans le contrôle positif mais pas

dans le contrôle négatif, la réaction d'amplification se déroule correctement (Fig. 1). En revanche, si une autre situation se produit, la réaction d'amplification peut se dérouler de manière incorrecte. Dans ce cas, retester les échantillons concernés.

- (5) Confirmer la fin de l'inactivation de la polymérase (automatiquement réalisée par le turbidimètre). Retirer tous les tubes de réaction du turbidimètre en temps réel HumaTurb C+A et les jeter sans les ouvrir.

Graphiques d'amplification

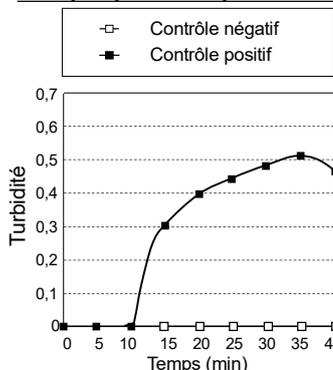


Fig. 1 : Graphique d'amplification pour les contrôles.

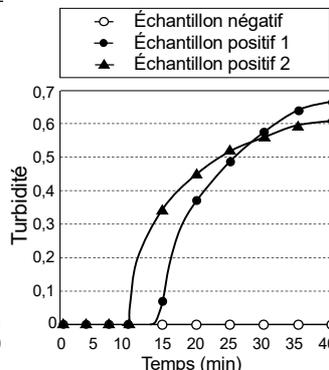


Fig. 2 : Graphique d'amplification pour les échantillons.

NOTES DE PROCÉDURE

- (1) La réaction LAMP est très sensible et toute contamination, même par de petites quantités du produit amplifié, peut entraîner des résultats faussement positifs.
- (2) Séparer les zones de prélèvement d'expectorations et de test LAMP.
- (3) Nettoyer les bancs avec plus de 0,5 % d'hypochlorite de sodium avant et après la réalisation du dosage.
- (4) Prendre toutes les mesures nécessaires pour éviter toute contamination et en particulier, changer de gants après avoir transféré les expectorations ou si les gants sont entrés en contact avec la solution d'ADN.
- (5) Lors de la manipulation de ce produit, éviter la contamination microbienne et la contamination par les nucléases. Même une petite quantité de DNase transmise par la sueur ou la salive dans le tube de réaction peut décomposer l'ADN et provoquer un faux résultat.
- (6) Ne pas utiliser d'échantillons d'expectorations contenant une grande quantité de sang, car cela peut affecter les mesures. Se référer au « Manual of Clinical Microbiology, 12th edition »⁶⁾ si un prétraitement de l'échantillon est nécessaire.
- (7) La solution d'ADN doit idéalement être utilisée immédiatement après sa préparation ; si cela est impossible, la solution d'ADN peut être conservée à température ambiante et utilisée dans les 72 heures.
- (8) Lors de la distribution de la solution dans le tube de réaction, éviter tout contact entre le bouchon d'injection fourni dans le Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit et la paroi interne des tubes de réaction. Tenir le porte-tubes à la verticale et remplir le tube jusqu'à ce que le niveau de la solution d'ADN soit entre les deux lignes (30 µl). Si le niveau est inapproprié (au-dessus de la ligne supérieure ou en dessous de la ligne inférieure), cela peut influencer la performance du test.
- (9) **(pour HumaLoop T ou un autre incubateur utilisant la lumière UV)**
Si des bulles sont présentes, tapoter (ou centrifuger) les tubes pour les libérer.
(pour le turbidimètre en temps réel HumaTurb C+A)
Comme les bulles dans la solution de réaction peuvent interférer avec la mesure de la turbidité et provoquer un faux résultat, éviter la formation de bulles lors du mélange du réactif et de la solution d'échantillon. S'il y a des bulles, centrifuger ou tapoter le tube pour les éliminer.
- (10) Le dMTB doit être entièrement dissous. Toute partie non dissoute peut influencer les performances, par exemple en diminuant la sensibilité. Maintenir en particulier les tubes debout tête à l'envers pendant 2 minutes.
- (11) Le PC MTB contient un nombre élevé de copies de l'ADN de contrôle. Éviter toute contamination d'autres échantillons avec le

PC MTB. Distribuer les échantillons et la solution de contrôle négatif et fermer tous les tubes de réaction avant de distribuer le PC MTB.

- (12) Agiter (ou centrifuger) le tube de PC MTB avant de l'ouvrir pour recueillir le contenu au fond du tube. Fermer le tube immédiatement après avoir distribué le PC MTB.
- (13) Lorsque le HumaLoop T ou le turbidimètre en temps réel HumaTurb C+A est utilisé, l'inactivation de la polymérase est effectuée automatiquement.
- (14) Pour les autres incubateurs, lorsque l'évaluation visuelle de la fluorescence est choisie, inactiver la polymérase (pendant 5 minutes à 80 °C ou 2 minutes à 95 °C) avant de la lire, ou les résultats seront faussés.
- (15) Pour les autres incubateurs, lorsque la lumière UV est utilisée, ne pas la fixer directement. Utiliser plutôt un panneau en verre ou porter des lunettes ou un masque oculaire lorsque vous regardez les rayons UV.
- (16) Ne jamais ouvrir les tubes de réaction une fois que la réaction LAMP a commencé ou après son achèvement. Faire particulièrement attention à ne pas ouvrir les tubes accidentellement lors du déchargement des tubes de réaction de l'incubateur.
- (17) Ne pas réutiliser les produits amplifiés dans les tubes pour l'électrophorèse ou pour d'autres applications.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Pour la détection visuelle de la fluorescence (pour HumaLoop T)

Placer chaque tube de réaction dans l'unité de détection de la fluorescence, irradier et observer le tube de côté.

(pour les autres incubateurs utilisant la lumière UV)

Irradier le fond de chaque tube de réaction et observer de côté à travers des lunettes ou un masque oculaire anti-UV.

Pour une exécution valide, les résultats suivants doivent être obtenus :

- Contrôle positif : une lumière fluorescente verte est émise.
- Contrôle négatif : aucune lumière fluorescente n'est émise.

Si l'un des contrôles n'est pas valide, tous les échantillons de la série doivent être signalés comme non valides et le test doit être réexécuté.

Après avoir confirmé que l'exécution est valide, évaluer les échantillons comme suit :

- Échantillon positif : une lumière fluorescente verte est émise.
- Échantillon négatif : aucune lumière fluorescente n'est émise.

Pour la détection de la turbidité en temps réel avec le HumaTurb C+A

Après avoir confirmé que la turbidité augmente dans le contrôle positif mais pas dans le contrôle négatif, évaluer les échantillons selon les critères suivants (Fig. 1 et 2).

- Échantillon positif : une certaine augmentation de la turbidité est observée.
- Échantillon négatif : aucune augmentation de la turbidité n'est observée.

Remarques :

- (1) La sensibilité minimale détectable de ce produit est de 0,38 génome équivalent par test. Même si le test est négatif, les patients présentant un symptôme persistant indiquant une infection par le CMTB doivent être réexaminés.
- (2) Bien que les amorces aient été conçues pour cibler une région contenant un nombre relativement faible de variations, le CMTB peut acquérir d'autres variations dans cette région et devenir moins sensible à ce produit. Ainsi, un test négatif n'exclut pas toujours une infection par le CMTB.
- (3) Les résultats des tests peuvent être affectés par le prélèvement et le transport des échantillons, la préparation des échantillons, les inhibiteurs et d'autres erreurs de procédure de laboratoire. Un test négatif n'exclut pas la présence du CMTB dans l'échantillon. Pour établir un diagnostic clinique, il faut tenir compte de l'état clinique du patient et de tous les autres résultats de laboratoire disponibles.
- (4) Ce produit est un kit pour la détection qualitative ; il n'est pas conçu pour la mesure quantitative. Par conséquent, l'intensité de la lumière fluorescente observée ou le temps d'augmentation de la

turbidité mesurée par le turbidimètre en temps réel HumaTurb C+A n'est pas lié à la concentration d'ADN matrice.

SUBSTANCES INTERFÉRENTES

Nos études internes ont révélé que la mesure n'était pas affectée par la présence de bilirubine libre (91,0 mg/dl), de bilirubine conjuguée (101,0 mg/dl), de chyle (turbidité de la formazine : 7300) et d'hémoglobine hémolytique (2475 mg/dl).

Concernant les médicaments, nos études internes ont révélé que la mesure n'était pas affectée par la présence d'isoniazide (100 µg/ml), d'éthambutol (20 µg/ml), de rifampicine (100 µg/ml), de pyrazinamide (500 µg/ml), de kanamycine (20 µg/ml) et de streptomycine (500 µg/ml).

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCES

1. Exactitude

Lors des tests des échantillons suivants :

- échantillon négatif (concentration : 0 génome équivalent/test)
- échantillon positif 1 (1,875 génomes équivalents/test)
- échantillon positif 2 (125 génomes équivalents/test)

L'échantillon négatif doit être négatif, tandis que les échantillons positifs 1 et 2 doivent être positifs.

2. Reproductibilité intra-cycle

Lors du test simultané de cinq échantillons négatifs et cinq échantillons positifs, les échantillons négatifs doivent être négatifs tout au long du test, tandis que les échantillons positifs doivent être positifs tout au long du test.

3. Limite de détection

0,38 génome équivalent/test.

4. Réactivité croisée

En ce qui concerne les mycobactéries non tuberculeuses (*Mycobacterium asiaticum*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium simiae*, *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium szulgai*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium gastri*, *Mycobacterium haemophilum*, *Mycobacterium malmoense*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium flavescens*) ($1,0 \times 10^4$ génomes équivalents par test) et les bactéries des maladies respiratoires (*Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycoplasma pneumoniae* (I), *Mycoplasma pneumoniae* (II)) ($1,0 \times 10^5$ génomes équivalents par test), le système de mesure a été testé négatif pour toutes les espèces bactériennes comme détaillé dans le tableau ci-dessous ; aucune réaction croisée n'a été observée.

5. Réactivité contre le CMTB

La réactivité contre *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, et *Mycobacterium africanum* a été confirmée.

6. Informations sur le calibrateur

Pour le test de performance de ce produit, l'ADN plasmidique contenant la région *gyrB* et IS de l'ADN génomique de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (GenBank n° NC_000962) a été utilisé comme calibrateur.

7. Performances cliniques

À ce jour, la tuberculose reste l'une des plus grandes infections au monde. Au niveau mondial, le nombre total estimé de nouveaux cas de tuberculose est d'environ 10 millions, et celui des frottis d'expectorations positifs d'environ 4,3 millions.⁷⁾ Au Japon, 24 760 patients ont été nouvellement enregistrés comme atteints de tuberculose en 2008, dont 2216 en sont décédés.⁸⁾

Ce produit a été examiné dans deux institutions médicales désignées pour les maladies infectieuses de classe 2 (institutions médicales désignées disposant de lits réservés aux patients atteints de tuberculose) pour ses performances dans le diagnostic des patients supposément atteints de tuberculose. Avec les kits PCR et TRC, tous deux déjà approuvés au Japon, ce kit a été utilisé pour tester des échantillons d'expectorations collectés pendant 2 jours (320 échantillons provenant de 160 sujets) et les résultats ont été comparés entre les kits. Les tests basés sur ce produit particulièrement comprenaient des évaluations pour la solution d'extrait d'ADN obtenue à partir d'expectorations non traitées (ci-après LAMP pour expectorations non traitées) et pour la solution d'extrait d'ADN obtenue à partir d'expectorations prétraitées par NALC-NaOH et par d'autres procédés (ci-après LAMP pour expectorations prétraitées).

Comme le montrent les tableaux ci-dessous, le taux de concordance global était favorable : LAMP pour expectorations non traitées vs. PCR : 91,5 % (291/318 sujets) ; LAMP pour expectorations prétraitées vs. PCR : 92,1 % (293/318) ; LAMP pour expectorations non traitées vs. TRC : 94,3 % (230/244) ; LAMP pour expectorations prétraitées vs. TRC : 93,0 % (227/244). En outre, les évaluations réalisées par détection de la turbidité en temps réel et par détection visuelle de la fluorescence concordait totalement, à l'exception d'un échantillon (cet échantillon était une expectoration sanglante et a donné un résultat faussement négatif lors de la détection visuelle de la fluorescence en raison de la perturbation par le sang). Ainsi, les deux types d'évaluation sont considérés comme identiques l'un à l'autre. Les tableaux ci-dessous présentent les résultats des tests obtenus par la détection de la turbidité en temps réel. Il est à noter que les résultats de la détection visuelle de la fluorescence par le HumaLoop T étaient les mêmes que ceux du turbidimètre en temps réel HumaTurb C+A.

LAMP		PCR	
		Positif	Négatif
Expectorations non traitées	Positif	196	7
	Négatif	20	95
Taux de concordance général		91,5 % (291/318)	
Sensibilité diagnostique		90,7 % (196/216)	
Spécificité diagnostique		93,1 % (95/102)	
Valeur prédictive positive		96,6 % (196/203)	
Valeur prédictive négative		82,6 % (95/115)	
Rapport de vraisemblance + (sensibilité/(1-spécificité))		13,1	
Rapport de vraisemblance - ((1-sensibilité)/spécificité)		0,0999	
LAMP		PCR	
		Positif	Négatif
Expectorations prétraitées	Positif	194	3
	Négatif	22	99
Taux de concordance général		92,1 % (293/318)	
Sensibilité diagnostique		89,8 % (194/216)	
Spécificité diagnostique		97,1 % (99/102)	
Valeur prédictive positive		98,5 % (194/197)	
Valeur prédictive négative		81,8 % (99/121)	
Rapport de vraisemblance + (sensibilité/(1-spécificité))		31,0	
Rapport de vraisemblance - ((1-sensibilité)/spécificité)		0,105	

LAMP		TRC	
		Positif	Négatif
Expectorations non traitées	Positif	163	5
	Négatif	9	67
Taux de concordance général		94,3 % (230/244)	
Sensibilité diagnostique		94,8 % (163/172)	
Spécificité diagnostique		93,1 % (67/72)	
Valeur prédictive positive		97,0 % (163/168)	
Valeur prédictive négative		88,2 % (67/76)	
Rapport de vraisemblance + (sensibilité/(1-spécificité))		13,9	
Rapport de vraisemblance - ((1-sensibilité)/spécificité)		0,0451	

LAMP		TRC	
		Positif	Négatif
Expectorations prétraitées	Positif	157	2
	Négatif	15	70
Taux de concordance général		93,0 % (227/244)	
Sensibilité diagnostique		91,3 % (157/172)	
Spécificité diagnostique		97,2 % (70/72)	
Valeur prédictive positive		98,7 % (157/159)	
Valeur prédictive négative		82,4 % (70/85)	
Rapport de vraisemblance + (sensibilité/(1-spécificité))		32,6	
Rapport de vraisemblance - ((1-sensibilité)/spécificité)		0,0895	

INFORMATIONS POUR COMMANDER

Code produit	Nom du produit	Contenu
972000	Loopamp™ MTBC Detection Kit	96 tests
980000	HuMax ITA	Micro-centrifugeuse
970000	Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit	90 tests
964000	Incubateur HumaHeat	Bloc chauffant
971000	Pipette-60 Set	1 pipette, 4 x 96 embouts
961000	HumaLoop T	1 unité principale 1 unité de détection de la fluorescence
963200	HumaTurb C+A	1 unité de contrôle 1 unité d'amplification

AVIS

Veuillez signaler tout incident grave survenu avec le dispositif au représentant autorisé, au fabricant et à l'autorité compétente de l'État membre dans lequel l'utilisateur et/ou le patient est établi.

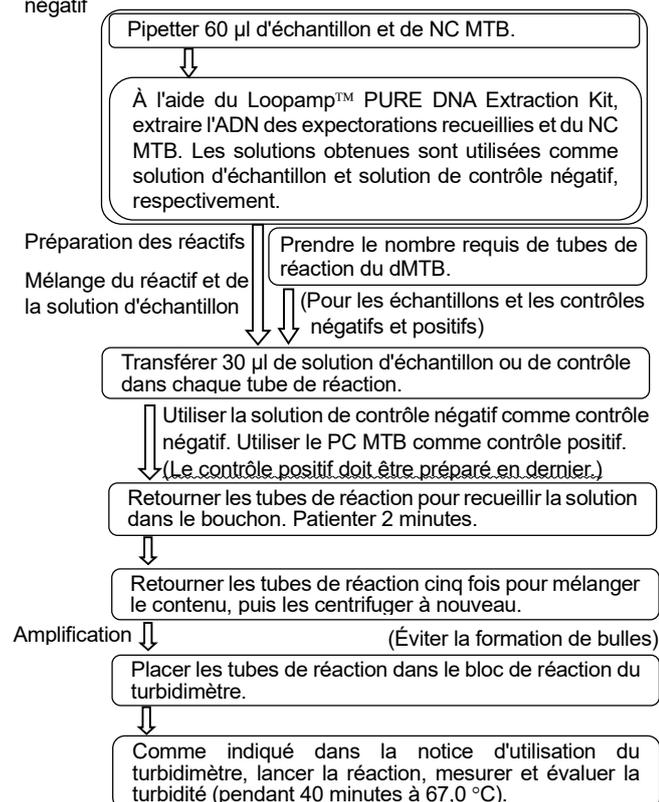
BIBLIOGRAPHIE

- 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) Isabella MGaby EP and Nicole P., et al.: Manual of Clinical Microbiology, 12th edition, ASM PRESS, 558–575 (2019)
- 7) WHO global TB database:
<https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/data>
<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/336069/9789240013131-eng.pdf>
- 8) Kekkaku No Tokei 2009 (Statistics of TB 2009): Japan Anti-Tuberculosis Association

Diagramme

Procédure opérationnelle pour la détection de la turbidité en temps réel

Préparation de la solution d'échantillon et de la solution de contrôle négatif



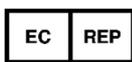
Confirmer la fin de l'inactivation de la polymérase (pendant 5 minutes à 80 °C ou 2 minutes à 95 °C). Retirer tous les tubes de réaction du turbidimètre et les jeter sans les ouvrir. Ne pas endommager les tubes.

TABLE DES SYMBOLES

REF	Référence du catalogue	Consulter la notice d'utilisation	Date d'expiration
IVD	Dispositif médical de diagnostic in vitro	Fabricant	Limitation de la température
LOT	Numéro de lot	Contenu suffisant pour <n> tests	Représentant autorisé dans la Communauté européenne



Importateur



HUMAN Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH

Max-Planck-Ring 21, 65205 Wiesbaden, Germany



EIKEN CHEMICAL CO., LTD.

4-19-9 Taito, Taito-ku, Tokyo, 110-8408 JAPAN

<https://www.eiken.co.jp/en>

*Date de révision : 2023-10-31