



REF 977000

Loopamp™ MALARIA Pan Detection Kit

* USO PREVISTO

Loopamp™ MALARIA Pan Detection Kit es una prueba de diagnóstico cualitativo *in vitro* para detectar el ADN de *Plasmodium* extraído de muestras de sangre humana en pacientes con sospecha de infección por malaria. El kit sirve de ayuda en el diagnóstico de la infección por malaria y está destinado a ser utilizado en laboratorios profesionales y hospitales por personal debidamente cualificado. El resultado puede interpretarse mediante un turbidímetro automático o visualmente bajo irradiación UV o LED azul.

* PRINCIPIOS DE LA PRUEBA

Este producto se basa en la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), un método de amplificación de ácidos nucleicos desarrollado por Eiken Chemical Co., Ltd.

Estas son las características del método de LAMP: (1) Solo necesita una enzima y la reacción de amplificación se produce en condiciones isotérmicas;^{1,2)} (2) tiene una especificidad extremadamente alta gracias al uso de cuatro cebadores que reconocen seis regiones distintas en la región de interés; (3) tiene una alta eficiencia de amplificación y puede producir una alta concentración de producto amplificado en poco tiempo, lo que hace posible la detección visual o automatizada.^{3,4)}

Los cebadores específicos para todas las especies causantes de la malaria que se suministran con este producto están diseñados para detectar el ADN mitocondrial de las cinco especies de *Plasmodium* más difundidas causantes de la malaria: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* y *P. knowlesi*. El análisis de alineación ha confirmado que las secuencias de ADN seleccionadas tienen una secuencia de bases bien conservada en todas estas especies de *Plasmodium*.

La solución problema de ADN extraído de las muestras de sangre se dispensa en un tubo de reacción. La ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de la hebra, los desoxinucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), la calceína, los tampones de reacción y los cebadores específicos para todas las especies causantes de la malaria se conservan en forma seca en la tapa del tubo de reacción. Este reactivo seco de LAMP (reactivo de detección Malaria Pan (dMAL Pan)) se disuelve cuando se añade la solución de ADN. A continuación, el tubo de reacción se incuba a 65,0 °C y el ADN es amplificado por la ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de la hebra en la reacción de LAMP.

La detección de los productos amplificados se basa en la turbidez del pirofosfato de magnesio (un precipitado de color blanco producido como subproducto de la amplificación del ADN).³⁾ Como alternativa, se puede recurrir a la detección visual con luz UV o luz LED azul. Antes de la amplificación del ADN, la calceína en el reactivo se encuentra inactiva, ya que está unida a iones manganeso. Al inicio de la amplificación del ADN, los iones pirofosfato generados desplazan a los iones manganeso de los sitios de unión, lo que hace que la calceína se vuelva fluorescente.⁴⁾

* CONTENIDO DEL KIT

Los reactivos son estables hasta la fecha que figura en la etiqueta, suponiendo que el envase permanezca sin abrir a una temperatura de conservación de 2–30 °C. Los reactivos son estables durante 90 días a 2–30 °C después de abrir el envase de aluminio.

Reactivo de detección Malaria Pan (dMAL Pan) ... 2 × 48 tubos
Cada uno de los tubos de reacción contiene los siguientes reactivos en forma seca:

ADN polimerasa de *Bst*^{a)}
Desoxinucleótidos trifosfato
Sulfato de magnesio
Calceína
Cloruro de manganeso
Cebadores^{b)}

Control positivo de Mal (PC Mal)^{c)} 1 × 1,0 mL
Control negativo de Mal (NC Mal) 3 × 0,5 mL
Cuentagotas de 30 µL 5 × 12 cuentagotas

- La ADN polimerasa de *Bst* obtenida a partir de *Bacillus stearothermophilus* es una ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de la hebra que carece de actividad exonucleasa en sentido 5'→3'.
- Cebadores diseñados para el ADN mitocondrial de los parásitos del género *Plasmodium*, purificados por HPLC a partir de oligonucleótidos sintéticos.
- PC Mal contiene un producto resultante de la amplificación *in vitro* de un gen artificial diseñado a partir del ADN mitocondrial de *Plasmodium falciparum* (GenBank N.º. M76611).

Las abreviaturas de los siguientes reactivos, el N.º de lote y el fabricante (EKN) figuran en los envases como se muestra en la tabla:

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

Información de trazabilidad metrológica

El control positivo se prepara a partir de *Plasmodium falciparum* Honduras-1 (GenBank n.º M76611), ya que no existe un estándar internacional para el ADN de *Plasmodium*. El ADN plasmídico que incluye la región diana del ADN genómico de *Plasmodium falciparum* Honduras-1 se utilizó como plantilla para amplificar el fragmento de ADN PC MAL. El fragmento se cuantifica con el análisis fotoespectrométrico, y la concentración de ADN de PC Mal se ajusta a 2000 copias/µL.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- Solo para uso en el diagnóstico *in vitro*.
- Este producto está diseñado únicamente para detectar el ADN de parásitos del género *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. knowlesi* en muestras de sangre humana. No utilizar para otros fines.
- Siga siempre estas instrucciones de uso al utilizar este producto.
- No congele los reactivos.
- No utilice reactivos caducados.
- No mezcle reactivos de diferentes lotes.
- No reponga ningún reactivo.
- La eficiencia de Loopamp™ MALARIA Pan Detection Kit depende de la destreza del operador y del cumplimiento de las instrucciones de uso. Las pruebas deben ser realizadas por personal debidamente cualificado y siguiendo estrictamente las instrucciones facilitadas.
- La exposición al calor, la humedad y la luz podría deteriorar dMAL Pan. Por lo tanto, retire solo el número necesario de tubos de reacción (total de muestras y controles) y vuelva a sellar la bolsa de aluminio inmediatamente.
- No retire el desecante de la bolsa de aluminio. Un exceso de humedad podría deteriorar el reactivo seco de LAMP en los tubos de reacción.
- Lea el manual de instrucciones y asegúrese de que dispone de los equipos necesarios (turbidímetro o incubadora) antes de comenzar el procedimiento.
- Las muestras de sangre conllevan un riesgo de infección. Por lo tanto, adopte las precauciones universales para minimizar el riesgo biológico.⁵⁾
- PC Mal y NC Mal contienen una pequeña cantidad de azida sódica como conservante. La azida sódica está clasificada como tóxica, por lo que debe evitar todo contacto con los ojos, la boca o la piel.
- En caso de contacto accidental de cualquiera de los reactivos con los ojos, la boca o la piel, enjuague inmediatamente la zona afectada con agua abundante y, si es necesario, acuda al médico.
- No diluya PC Mal ni lo añada a las muestras. Utilice PC Mal únicamente como se describe en este prospecto para evitar la contaminación con ADN.
- Conserve PC Mal y todas las muestras de sangre positivas separados de los demás reactivos del kit.

- (17) La tapa de cada uno de los tubos de reacción contiene dMAL Pan en forma seca. No toque el interior de la tapa.
- (18) Antes de utilizar los tubos de reacción, compruebe detenidamente si presentan grietas o arañazos. Los tubos dañados podrían dar resultados falsos y provocar la contaminación con ADN de la incubadora y de la zona de trabajo.
- (19) No exponga los tubos de reacción a la luz UV antes de la finalización de la reacción de LAMP. La exposición prolongada a la luz UV podría dañar los tubos y dar resultados falsos.
- (20) No mire directamente la luz UV cuando esta se utilice para la valoración de la fluorescencia a simple vista. Dado que la luz UV es perjudicial para la vista, incluso si se observa durante un breve periodo de tiempo, esta puede producir irritación ocular y síntomas similares a los de la conjuntivitis. Por lo tanto, utilice una pantalla de cristal, gafas de seguridad o una máscara ocular con protección UV siempre que mire directamente a la luz UV.
- (21) Consulte el manual de la incubadora. Cuando se utilice HumaLoop M o el turbidímetro en tiempo real HumaTurb C+A, tenga cuidado al sacar los tubos de reacción de la incubadora para evitar quemaduras.
- (22) No utilice PC Mal como control positivo para Loopamp™ MALARIA Pf Detection Kit ni Loopamp™ MALARIA Pv Detection Kit. No utilice los PC de otros kits como control positivo para este kit.

ELIMINACIÓN DE DESECHOS

- (1) No abra los tubos después de la amplificación del ADN. Deje la tapa cerrada y deseche los tubos usados con los residuos biológicos para su incineración o deséchelos mediante embolsado doble con bolsas de plástico sellables.
- (2) ~~Nunca esterilice en autoclave los tubos de reacción ni los reutilice~~, de lo contrario, los productos amplificados se dispersarán produciendo contaminación.
- (3) El material principal de los tubos de reacción y los tubos de reactivos es el PP; de la bandeja de los tubos de reacción, el PET; de la bolsa de aluminio, el aluminio; y del estuche del kit, el papel.
- (4) Deseche todos los demás reactivos, el envase o el material de laboratorio de acuerdo con la normativa local.

RECOGIDA DE MUESTRAS

- (1) Las muestras de sangre se deben utilizar inmediatamente después de su recogida.
- (2) Haga la recogida de muestras de sangre en una sala independiente de la sala de amplificación por LAMP. Durante la recogida de muestras de sangre es posible que se generen aerosoles que contengan ADN de *Plasmodium*, lo que podría provocar contaminación.
- (3) NO UTILICE EDTA ni citrato como anticoagulantes para la recogida de muestras de sangre si el resultado se va a leer por fluorescencia. En su lugar se recomienda utilizar heparina como anticoagulante.

MATERIALES REQUERIDOS, PERO NO INCLUIDOS

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

Para la detección de fluorescencia a simple vista

(Para HumaLoop M)

- HumaLoop M

* (Para otras incubadoras que utilicen luz UV o luz LED azul)

- Incubadora (exactitud de la temperatura: $\pm 0,5$ °C; con cubierta caliente)
- Termobloque
- Luz ultravioleta (longitud de onda: 240–260 nm y 350–370 nm) o luz LED azul
- Gafas de seguridad o máscara ocular con protección UV (opcional)

Para la detección de la turbidez en tiempo real

- HumaTurb C+A

Para la mezcla de reactivos y muestras

- Micropipetas (10–100 μ L o 20–200 μ L) y puntas de pipeta con filtro
- Centrifuga para microtubos (opcional)
- Centrifuga para ocho tubos conectados (opcional)
- HuMax ITA, microcentrifuga (opcional)

PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN PROBLEMA DE ADN

Para extraer el ADN de las muestras de sangre, se recomienda el método PURE y el método Boil & Spin. Para obtener más información, consulte la última versión del "Manual of Standard Operating

Procedures for malaria LAMP" (SOP).

Preste atención a los siguientes puntos clave del método PURE.

- **Muestras : sangre total no anticoagulada/heparinizada o mancha de sangre seca**
- **Volumen de muestra : 30 μ L (sangre total) o punción de 6 mm para obtener una mancha de sangre (mancha de sangre seca)**
- **Aditivo: añada 30 μ L de solución de NaCl 334 mM (no incluida en Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit) al tubo de calentamiento antes de calentar**
- **Calentamiento : durante 5 minutos a 75 °C**

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

(1) Reactivo de detección Malaria Pan

~~Retire el número necesario de tubos de la bolsa de aluminio y colóquelos en la gradilla (total de muestras y controles).~~

~~*Nota: Una vez haya retirado los tubos necesarios, vuelva a sellar inmediatamente la bolsa de aluminio que contiene los tubos sin usar.*~~

(2) Control negativo de Mal (NC Mal)

Golpetee o centrifugue el tubo para que el contenido se acumule en el fondo. Pipetee 30 μ L de NC Mal en el tubo de calentamiento suministrado en Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit. Haga el tratamiento del NC Mal (en adelante, el NC Mal extraído se denominará "solución de control negativo") siguiendo el SOP.

Nota: En cada serie analítica se debe utilizar una solución de control negativo.

(3) Control positivo de Mal (PC Mal)

Golpetee o centrifugue el tubo para que el contenido se acumule en el fondo.

Nota: PC Mal se debe usar en cada serie analítica.

PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

Mezcla de reactivos y muestras

- (1) Encienda HumaLoop M o el turbidímetro en tiempo real HumaTurb C+A.
- (2) Dispense 30 μ L de la solución de ADN extraído en un tubo de reacción utilizando Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit y cierre la tapa.
- (3) Dispense 30 μ L de la solución de control negativo en un tubo de reacción utilizando Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit y cierre la tapa.
- (4) Dispense 30 μ L de PC Mal en un tubo de reacción utilizando una pipeta o el cuentagotas suministrado y cierre la tapa.
- (5) Golpetee o centrifugue todos los tubos para que la solución se acumule en el fondo.

Nota: Asegúrese de que el nivel de líquido se encuentra entre las dos líneas del tubo de reacción para garantizar que se pipeteen 30 μ L.

- (6) Reconstituya los reactivos secos en la tapa invirtiendo los tubos de reacción y recogiendo la solución de ADN en la tapa. Deje los tubos boca abajo durante 2 minutos para reconstituir los reactivos secos.
- (7) Invierta los tubos de reacción cinco veces para mezclar el contenido. Asegúrese de que los reactivos secos en la tapa están completamente disueltos.
- (8) Golpetee o centrifugue todos los tubos para que la solución se acumule en el fondo.

Amplificación

Para la detección de fluorescencia a simple vista

(Para HumaLoop M)

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

* (Para otras incubadoras que utilicen luz UV o luz LED azul)

- (1) Fije la temperatura de la incubadora a 65,0 °C (con la temperatura de la cubierta caliente fijada a 10 °C por encima de la temperatura de reacción o lo más cerca posible de esta cifra; exactitud de la temperatura: $\pm 0,5$ °C). Espere hasta que la temperatura mostrada en la pantalla alcance el valor fijado.
- (2) Coloque los tubos de reacción y, a continuación, inicie la reacción de amplificación (durante 40 minutos a 65,0 °C).

- (3) Después de 40 minutos, inactive la polimerasa con el termobloque (durante 5 minutos a 80 °C o durante 2 minutos a 95 °C) para parar la reacción.

Para la detección de la turbidez en tiempo real con el HumaTurb C+A (véase el diagrama de flujo del procedimiento)

- (1) Configure el turbidímetro en tiempo real HumaTurb C+A para la detección con este producto.
- (2) Compruebe si la temperatura mostrada en la pantalla alcanza los 65,0 °C (deje que el turbidímetro se caliente durante 20 minutos antes de utilizarlo).
- (3) Coloque los tubos de reacción e inicie el análisis.
- (4) Observe la pantalla del turbidímetro para comprobar si los controles positivo y negativo presentan un aumento de la turbidez. Si la turbidez aumenta en el control positivo, pero no en el control negativo, la reacción de amplificación está teniendo lugar correctamente (Fig. 1). De lo contrario, la reacción de amplificación podría estar teniendo lugar de manera incorrecta. En ese caso, vuelva a analizar las muestras afectadas.
- (5) Confirme la finalización de la inactivación de la polimerasa (completada automáticamente por el turbidímetro). Retire todos los tubos de reacción del turbidímetro en tiempo real HumaTurb C+A y deséchelos sin abrirlos.

Gráficas de amplificación con el reactivo de detección Malaria Pan

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

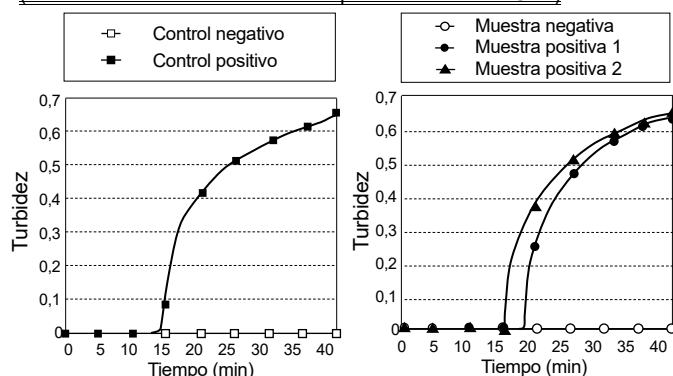


Fig. 1 : Gráficas de amplificación correspondientes a los controles. Fig. 2 : Gráficas de amplificación correspondientes a las muestras.

NOTAS SOBRE EL PROCEDIMIENTO

- (1) La reacción de LAMP es muy sensible y cualquier contaminante, incluso con pequeñas cantidades de producto amplificado, podría dar falsos positivos.
- (2) Separe la zona de preparación de muestras de la zona de amplificación.
- (3) Antes y después de realizar la prueba, limpie las mesas de trabajo con una solución de hipoclorito de sodio con una concentración de al menos un 0,5%.
- (4) Adopte todas las medidas necesarias para evitar la contaminación, en particular, cámbiese los guantes después de transferir la sangre o si los guantes entran en contacto con la solución de ADN.
- (5) Al manipular este producto, evite la contaminación con microbios y nucleasas. Incluso una pequeña cantidad de contaminantes en el tubo de reacción procedentes del sudor o la saliva podría descomponer el ADN y generar un resultado falso.
- (6) Asimismo, lea el SOP cuando realice la extracción de ADN.
- (7) Lo ideal es utilizar la solución de ADN inmediatamente después de su preparación, si no es posible, la solución de ADN se puede conservar a temperatura ambiente y usar en un plazo de 72 horas.
- * (8) **(Para HumaLoop M u otras incubadoras que utilicen luz UV o luz LED azul)**
Si hubiera burbujas, golpetee o centrifugue los tubos para eliminarlas.
(Para el turbidímetro en tiempo real HumaTurb C+A)
Puesto que las burbujas en la solución de reacción pueden interferir con la determinación de la turbidez y generar resultados falsos, evite la formación de burbujas al mezclar el reactivo y la solución problema. Si se forman burbujas, golpetee o centrifugue los tubos para eliminarlas.
- (9) dMAL Pan debe estar completamente disuelto. Toda porción no disuelta podría afectar a la calidad de los resultados, por ejemplo,

causando una disminución de la sensibilidad. En particular, mantenga los tubos en posición invertida durante 2 minutos.

- (10) PC Mal contiene un elevado número de copias de ADN de control. Evite la contaminación de otras muestras con PC Mal. Dispense la solución problema y la solución de control negativo y cierre todos los tubos de reacción antes de dispensar PC Mal.
- (11) Golpetee o centrifugue el tubo de PC Mal antes de abrirlo para que el contenido se acumule en el fondo. Cierre el tubo inmediatamente después de dispensar PC Mal.
- (12) Nunca abra los tubos de reacción una vez iniciada la reacción de LAMP o después de terminada. Tenga especial cuidado al sacar los tubos de reacción de la incubadora, para evitar abrirlos de manera accidental.
- (13) Cuando se utiliza el HumaLoop M o el turbidímetro en tiempo real HumaTurb C+A, la inactivación de la polimerasa se realiza automáticamente.
- (14) Si utiliza otra incubadora y selecciona como criterio la fluorescencia a simple vista, inactive la polimerasa (durante 5 minutos a 80 °C o durante 2 minutos a 95 °C) antes de hacer la lectura. De lo contrario, se generarán resultados falsos.
- (15) No reutilice ningún producto amplificado en los tubos para electroforesis u otras aplicaciones.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Para la detección de fluorescencia a simple vista

(Para HumaLoop M)

Coloque cada uno de los tubos de reacción en la unidad de detección de fluorescencia y, a continuación, irradie y observe el tubo desde un lado.

*(Para otras incubadoras que utilicen luz UV o luz LED azul)

Irradie el fondo de cada uno de los tubos de reacción y observe desde un lado a través de gafas de seguridad o de una máscara ocular con protección UV.

Para que el análisis sea válido, se deben obtener los siguientes resultados cuando la lectura se hace en el tiempo especificado:

- Control positivo: se emite luz fluorescente verde
- Control negativo: no se emite luz fluorescente

Si alguno de los controles es inválido, todas las muestras de esa serie analítica se deben notificar como inválidas y se han de volver a analizar.

Una vez se haya confirmado que la serie analítica es válida, evalúe las muestras de la siguiente manera:

- Muestra positiva: se emite luz fluorescente verde.
- Muestra negativa: no se emite luz fluorescente.

Para la detección de la turbidez en tiempo real con el HumaTurb C+A

Una vez se haya confirmado que la turbidez aumenta en el control positivo, pero no en el control negativo, evalúe las muestras atendiendo a los siguientes criterios (Figs. 1 y 2):

- Positivo: se observa un cierto aumento de la turbidez.
- Negativo: no se observa un aumento de la turbidez.

Notas:

- (1) La sensibilidad mínima de detección de Loopamp™ MALARIA Pan Detection Kit es de 7,5 copias por prueba. Si la prueba da negativo, se debe considerar hacer otra prueba a los pacientes que presenten síntomas que persistan o empeoren, y también se debe considerar e investigar otras posibles causas de los síntomas. Además, el ensayo de LAMP es muy sensible y permite detectar una parasitemia de bajo grado que no es la causa directa de los síntomas de presentación. Por lo tanto, a la hora de establecer el diagnóstico final y determinar el tratamiento, siempre se debe tener en cuenta el estado clínico del paciente.
- (2) Aunque los cebadores se han diseñado para hibridarse con una región que contenga un número relativamente pequeño de variaciones, es posible que el ADN de *Plasmodium* adquiera variaciones adicionales en esta región y se vuelva menos sensible a este producto. Por lo tanto, que una prueba haya dado negativo no siempre permite descartar la infección por especies de *Plasmodium*.
- * (3) Los resultados analíticos se pueden ver afectados por factores como la recogida y el transporte de las muestras, la preparación de las muestras, la presencia de inhibidores y otros errores del procedimiento en el laboratorio. Un resultado negativo no descarta por completo la presencia de la especie *Plasmodium* en la muestra. Al hacer un diagnóstico clínico, es necesario tener en cuenta el

estado clínico del paciente y todos los demás resultados analíticos disponibles.

- (4) Este producto es un kit para detección cualitativa; no está diseñado para la determinación cuantitativa. Por lo tanto, la intensidad de la luz fluorescente observada o el tiempo de aumento de la turbidez determinado por el turbidímetro en tiempo real HumaTurb C+A no guarda relación con la concentración de ADN molde.

SUSTANCIAS INTERFERENTES

En nuestros estudios internos se observó que el análisis turbidimétrico no se ve afectado por la presencia de heparina-Na (2600 unidades/dL), heparina-Li (2600 unidades/dL), EDTA-2Na (300 mg/dL), EDTA-2K (380 mg/dL), EDTA-3K (340 mg/dL), citrato de sodio (7,6%), bilirrubina libre (66,3 mg/dL), bilirrubina conjugada (67,0 mg/dL), quilo (turbidez de la formazina: 5433) y hemoglobina hemolítica (1567 mg/dL). El EDTA puede causar falsos positivos cuando la lectura del resultado se hace por fluorescencia.

En cuanto a los fármacos, nuestros estudios internos revelaron que la determinación no se vio afectada por la presencia de proguanil (0,6 µg/mL), cloroquina (1,1 µg/mL), quinina (26,7 µg/mL), clorhidrato de doxiciclina (10,0 µg/mL), mefloquina (4,7 µg/mL), primaquina (0,5 µg/mL), artemisinina (2,6 µg/mL), loxoprofeno sódico (17,7 µg/mL), paracetamol (9,0 µg/mL), isoniazida (23,3 µg/mL), etambutol (5,7 µg/mL), rifampicina (26,6 µg/mL), pirazinamida (116,7 µg/mL), claritromicina (12,4 µg/mL), estreptomycin (133,3 µg/mL), cefotaxima sódica (333,3 µg/mL) y levofloxacina (7,5 µg/mL).

PARÁMETROS DE CALIDAD

(1) Exactitud

En los análisis de las siguientes muestras:

- Muestra negativa (concentración: 0 copias/prueba)
- Muestra positiva 1 (100 copias/prueba)
- Muestra positiva 2 (1000 copias/prueba)

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

(2) Reproducibilidad intraserial

Si se analizan simultáneamente cinco muestras negativas y cinco muestras positivas, las muestras negativas deben dar siempre negativo, mientras que las muestras positivas deben dar siempre positivo.

(3) Límite de detección

7,5 copias/prueba

(4) Reactividad cruzada

El sistema analítico dio positivo para las especies de *Plasmodium* y negativo para otros microorganismos patógenos, tal y como se detalla en la tabla siguiente:

Género <i>Plasmodium</i>	
<i>Plasmodium falciparum</i>	Positivo
<i>Plasmodium vivax</i>	Positivo
<i>Plasmodium ovale</i>	Positivo
<i>Plasmodium malariae</i>	Positivo
<i>Plasmodium knowlesi</i>	Positivo
Otros microorganismos patógenos	
<i>Trypanosoma brucei</i>	Negativo
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Negativo
<i>Leishmania donovani</i>	Negativo
<i>Leishmania chagasi</i>	Negativo
<i>Toxoplasma gondii</i>	Negativo
<i>Entamoeba histolytica</i>	Negativo
<i>Giardia intestinalis</i>	Negativo
<i>Theileria parva</i>	Negativo
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Negativo
Otros	
ADN genómico humano	Negativo

(5) Información sobre un calibrador

En la evaluación de los parámetros de calidad de este producto se utilizó como calibrador el ADN plasmídico que contiene ADN mitocondrial de *Plasmodium falciparum*.

(6) Calidad de los resultados clínicos

La malaria está causada por ciertos parásitos del género *Plasmodium* que se transmiten a través de las picaduras de mosquitos infectados. Después de desarrollarse en el hígado durante un tiempo, se liberan parásitos en estado sanguíneo, que

se introducen en los glóbulos rojos y los lisan durante su posterior reproducción, causando síntomas, entre ellos, la fiebre. El ensayo de LAMP permite detectar el ADN de parásitos en estado sanguíneo.

El producto se evaluó en muestras de sangre enviadas para la prueba de la malaria en un laboratorio especializado. Tras la microscopía estándar, se anonimizaron las muestras, se extrajo el ADN de las muestras de sangre con el método PURE y se analizó utilizando el producto con cebadores específicos para todas las especies causantes de la malaria, con dos métodos de lectura diferentes. Por último, se utilizó la PCR anidada como método de referencia. Un total de 705 ensayos, de los cuales 56 procedían de pacientes que habían dado positivo por microscopía, se compararon con la PCR anidada (método de referencia). La sensibilidad y la especificidad de los cebadores específicos para todas las especies causantes de la malaria fueron del 97,0 % y del 99,2 %, respectivamente.⁶⁾

LAMP frente a PCR anidada	
Sensibilidad diagnóstica	97,0 % (89,6-99,6)
Especificidad diagnóstica	99,2 % (98,2-99,7)
Valor predictivo positivo	92,9 %
Valor predictivo negativo	99,7 %
Coefficiente de probabilidad + (sensibilidad/(1-especificidad))	121,25
Coefficiente de probabilidad - ((1-sensibilidad)/especificidad)	0,0302

LAMP frente a microscopía	
Sensibilidad diagnóstica	100,0 % (93,6-100,0)
Especificidad diagnóstica	97,8 % (96,4-98,8)
Valor predictivo positivo	80,0 %
Valor predictivo negativo	100,0 %
Coefficiente de probabilidad + (sensibilidad/(1-especificidad))	45,45
Coefficiente de probabilidad - ((1-sensibilidad)/especificidad)	0,0000

INFORMACIÓN PARA PEDIDOS

Cód. del producto	Nombre del producto	Contenido
977000	Loopamp™ MALARIA Pan Detection Kit	96 pruebas
962000	HumaLoop M	1 unidad principal 1 unidad de detección de fluorescencia
970000	Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit	90 pruebas
963200	HumaTurb C+A	1 unidad de control 1 unidad de amplificación
964000	HumaHeat	Termobloque
980000	HuMax ITA	Microcentrífuga

AVISO

Cualquier incidente grave relacionado con el producto deberá comunicarse al fabricante y a la autoridad competente del Estado miembro en el que estén establecidos el usuario y/o el paciente.

REFERENCIAS

- 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) World Health Organization. Laboratory biosafety manual fourth edition: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240011311> (2020)
- 6) Spencer D. Polley., et al. J Infect Dis. 208(4), 637-644 (2013)

Diagrama de flujo

Procedimiento para la detección de la turbidez en tiempo

real

Preparación de la solución problema

Prepare las soluciones problema de ADN mediante extracción del ADN de las muestras de sangre recogidas.

Preparación de los reactivos

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

(Para las muestras, el control negativo y el control positivo)

Mezcla del reactivo y la solución problema

Transfiera 30 µL de solución problema o solución de control a cada uno de los tubos de reacción.

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

Invierta los tubos de reacción para recoger la solución en la tapa. Mantenga los tubos en posición invertida durante 2 minutos.



Invierta los tubos de reacción cinco veces para mezclar el contenido y a continuación centrifúquelos.

(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, inicie la reacción y, a continuación determine y evalúe la turbidez (durante 40 minutos a 65,0 °C).

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

TABLA DE SÍMBOLOS

REF Número de catálogo	 Consulte las instrucciones de uso	 Fecha de caducidad
IVD Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i>	 Fabricante	 Límite de temperatura
LOT Código del lote	 Contenido suficiente para <n> pruebas	 Representante autorizado en la Comunidad Europea

IVD  **0123**

Importador

EC **REP**

HUMAN Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH

Max-Planck-Ring 21 · 65205 Wiesbaden · Germany



EIKEN CHEMICAL CO., LTD.

*4-6 Kanda Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo, 101-0062 JAPAN

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

*Fecha de revisión: 2026-08-01