



REF 978000

Loopamp™ MALARIA Pf Detection Kit

*DESTINATION

Le Loopamp™ MALARIA Pf Detection Kit est un test de diagnostic qualitatif *in vitro* permettant de détecter l'ADN de *Plasmodium falciparum* extrait d'échantillons de sang humain chez les patients suspectés d'être infectés par le paludisme. Le kit aide au diagnostic de l'infection par le *Plasmodium falciparum* 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 ou sous lumière LED bleue.

*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 et 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 spécifiques de *P. falciparum* (Pf) sont conçues pour détecter l'ADN mitochondrial de Pf. L'analyse de l'alignement a confirmé que les séquences d'ADN ciblées sont spécifiques à la séquence de Pf.

La solution d'ADN de test extraite des échantillons sanguins est pipetée 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 Pf sont ensuite conservés sous forme séchée dans le bouchon du tube de réaction. Ce réactif LAMP séché (réactif de détection du Malaria Pf (dMAL Pf)) est dissout lorsque la solution d'ADN est ajoutée. Ensuite, le tube de réaction est incubé à 65,0 °C et l'ADN est amplifié par l'ADN polymérase à déplacement de brin selon la réaction LAMP.

La détection des produits amplifiés est basée sur la turbidité du pyrophosphate de magnésium (un précipité blanc généré comme sous-produit de l'amplification de l'ADN).⁽³⁾ Il est également possible d'utiliser la détection visuelle sous lumière UV ou sous lumière LED bleue. Avant l'amplification de l'ADN, la calcéine contenue dans le réactif est à l'état éteint, car elle est liée aux ions manganèse. Au début de l'amplification de l'ADN, les ions pyrophosphate générés rivalisent avec les ions manganèse pour les sites de liaison, rendant ainsi la calcéine 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 est stocké à une température de stockage de 2–30 °C. Les réactifs sont stables pendant 90 jours à 2–30 °C après ouverture de la pochette en aluminium.

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

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

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

Contrôle positif Mal (PC Mal)^{c)} 1 x 1,0 mL

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

Compte-gouttes 30 µL 5 x 12 compte-gouttes

- L'ADN polymérase *Bst* dérivée de *Bacillus stearothermophilus* est une ADN polymérase à déplacement de brin qui manque d'activité exonucléase 5'→3'.
- Amorces conçues pour l'ADN mitochondrial de Pf, purifiées à partir des oligonucléotides synthétisés par HPLC.
- Le PC Mal contient un produit résultant de l'amplification *in vitro* d'un gène artificiel conçu à partir de l'ADN mitochondrial de Pf (GenBank n° M76611).

Les abréviations des réactifs suivants, leur 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 Mal	PC Mal N° de lot, EKN	PC Mal
Contrôle négatif Mal	NC Mal N° de lot, EKN	NC Mal

Informations sur la traçabilité métrologique

Le contrôle positif est préparé à partir de *Plasmodium falciparum* Honduras-1 (GenBank n° M76611), car il n'existe pas de norme internationale pour l'ADN de *Plasmodium*. L'ADN plasmidique comprenant la région ciblée de l'ADN génomique de *Plasmodium falciparum* Honduras-1 a été utilisé comme modèle pour amplifier le fragment d'ADN PC MAL. Le fragment est quantifié à l'aide d'une analyse spectrophotométrique et la concentration d'ADN du PC Mal est ajustée à 2000 copies/µL.

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

- Utilisation pour le diagnostic *in vitro* seulement.
- Ce produit est uniquement conçu pour détecter l'ADN des parasites *Plasmodium falciparum* dans les échantillons de sang humain. Ne pas l'utiliser à d'autres fins.
- Lors de l'utilisation de ce produit, toujours suivre cette notice.
- Ne pas congeler les réactifs.
- Ne pas utiliser de réactif périmé.
- Ne pas mélanger des réactifs provenant de lots différents.
- Ne pas remplir les réactifs.
- Les performances du Loopamp™ MALARIA Pf 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.
- L'exposition à la chaleur, à l'humidité et à la lumière peut détériorer le dMAL Pf. Ainsi, ne retirer que le nombre requis de tubes de réaction (somme des échantillons et des contrôles) et refermer immédiatement la pochette en aluminium.
- 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.
- Lire le manuel d'instructions et s'assurer que l'équipement requis (turbidimètre ou incubateur) est disponible avant de commencer la procédure.
- Les échantillons sanguins présentent un risque d'infection. Ainsi, respecter les précautions universelles pour minimiser les risques biologiques.⁽⁵⁾
- Le PC Mal et le NC Mal 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.
- 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.
- Ne pas diluer ou ajouter le PC Mal aux échantillons. N'utiliser le PC Mal que de la manière décrite dans cette notice pour éviter toute contamination de l'ADN.
- Conserver le PC Mal et tout échantillon sanguin positif séparément des autres réactifs du kit.
- Le bouchon de chaque tube de réaction contient le dMAL Pf sous

forme séchée. Ne pas toucher l'intérieur du bouchon.

- (18) 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.
- (19) 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.
- (20) 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.
- (21) Se référer au manuel de l'incubateur. Lorsque le HumaLoop M ou le turbidimètre en temps réel HumaTurb C+A est utilisé, retirer soigneusement les tubes de réaction de l'incubateur pour éviter les brûlures.
- (22) Ne pas utiliser le PC Mal comme contrôle positif pour le Loopamp™ MALARIA Pan Detection Kit et le Loopamp™ MALARIA Pv Detection Kit. Ne pas utiliser le contrôle positif d'autres kits comme contrôle positif pour ce kit.

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 autre réactif, récipient ou matériel de laboratoire conformément aux réglementations locales.

PRÉLÈVEMENT D'ÉCHANTILLONS

- (1) Les échantillons de sang doivent être utilisés immédiatement après leur prélèvement.
- (2) Prélever le sang dans une pièce séparée de la salle d'amplification LAMP. Des aérosols contenant l'ADN de Pf peuvent être générés lors de la collecte de sang et peuvent entraîner une contamination.
- (3) NE PAS UTILISER D'EDTA et de citrate comme anticoagulants pour le prélèvement sanguin si le résultat doit être lu par fluorescence. L'utilisation d'héparine comme anticoagulant est recommandée à la place.

MATÉRIELS REQUIS MAIS NON FOURNIS

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

Pour la détection visuelle de la fluorescence (Pour HumaLoop M)

- HumaLoop M

* (Pour un autre incubateur utilisant la lumière UV ou la lumière LED bleue)

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

Pour la détection de la turbidité en temps réel

- HumaTurb C+A

Pour le mélange des réactifs et des échantillons

- Micropipettes (10–100 µL ou 20–200 µL) et embouts de pipette avec filtre
- Centrifugeuse pour microtubes (facultatif)
- Centrifugeuse pour huit tubes connectés (facultatif)
- HuMax ITA, micro-centrifugeuse (facultatif)

PRÉPARATION DE LA SOLUTION D'ADN

Pour extraire l'ADN des échantillons sanguins, la méthode PURE et la méthode Boil & Spin sont recommandées. Pour plus d'informations, se référer à la dernière version du « Manual of Standard Operating Procedures for malaria LAMP » (SOP).

Faire attention aux points critiques suivants pour la méthode PURE :

- **Échantillons** : sang total non anticoagulé/hépariné ou tache de sang séchée
- **Volume de l'échantillon** : 30 µL (sang total) ou poinçon pour tache de sang de 6 mm (tache de sang séchée)
- **Additif** : ajouter 30 µL de solution de NaCl 334 mM (non incluse dans le Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit) au tube chauffant avant de chauffer
- **Chauffage** : pendant 5 minutes à 75 °C

PRÉPARATION DES RÉACTIFS

(1) Réactif de détection du Malaria Pf

~~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 Mal (NC Mal)

Secouer le tube d'un coup sec (ou le centrifuger rapidement) pour recueillir le contenu au fond du tube. Pipetter 30 µL du NC Mal dans le tube chauffant fourni dans le Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit. Suivre la SOP pour traiter le NC Mal (ci-après le NC Mal extrait est appelé « solution de contrôle négatif »).

Remarque : une solution de contrôle négatif doit être utilisée pour chaque série d'analyse.

(3) Contrôle positif Mal (PC Mal)

Secouer le tube d'un coup sec (ou le centrifuger rapidement) pour recueillir le contenu au fond du tube.

Remarque : le PC Mal doit être utilisé pour chaque série d'analyse.

PROCÉDURE DE MESURE

Mélange des réactifs et des échantillons

- (1) Mettre en marche le HumaLoop M ou le turbidimètre en temps réel HumaTurb C+A.
- (2) Transférer 30 µL de la solution d'extraction d'ADN dans un tube de réaction à l'aide du Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit et fermer le tube avec le bouchon.
- (3) Transférer 30 µL 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.
- (4) Transférer 30 µL du PC Mal dans un tube de réaction à l'aide d'une pipette ou du compte-gouttes fourni et fermer le tube avec le bouchon.
- (5) Secouer tous les tubes d'un coup sec (ou les centrifuger rapidement) 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 µL 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) Secouer tous les tubes d'un coup sec (ou les centrifuger rapidement) pour recueillir la solution au fond des tubes.

Amplification

Pour la détection visuelle de la fluorescence

(Pour HumaLoop M)

- (1) Vérifier que la température du HumaLoop M est de 65,0 °C.
- (2) Placer les tubes de réaction dans le HumaLoop M et appuyer sur le bouton vert pour démarrer la réaction LAMP (40 minutes à 65,0 °C). Se reporter au manuel d'instructions du HumaLoop M 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 M). Retirer tous les tubes de réaction du HumaLoop M.

*** (Pour un incubateur utilisant la lumière UV ou la lumière LED bleue)**

- (1) Régler la température de l'incubateur à 65,0 °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). Attendre que la température affichée atteigne la valeur réglée.
- (2) Placer les tubes de réaction, puis démarrer la réaction d'amplification (pendant 40 minutes à 65,0 °C).
- (3) Après 40 minutes, inactiver la polymérase en utilisant 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 65,0 °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 si une augmentation de la turbidité est observée dans les contrôles positifs et négatifs. Si la turbidité augmente dans le contrôle positif mais pas dans le contrôle négatif, la réaction d'amplification se déroule correctement (Fig. 1). Si ce n'est pas le cas, la réaction d'amplification peut se dérouler dans le mauvais sens. 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 par le réactif de détection du Malaria Pf

(Analyseur : turbidimètre en temps réel HumaTurb C+A)

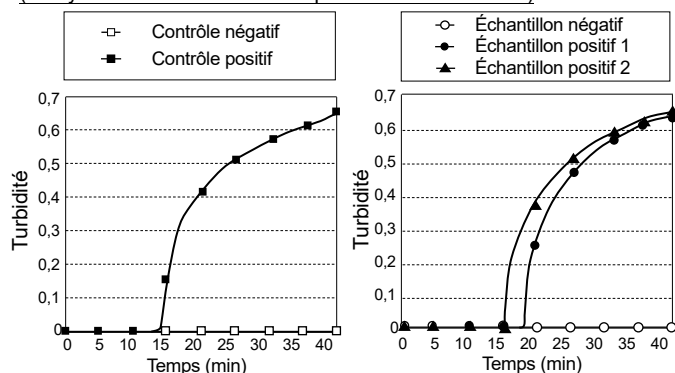


Fig. 1 : Graphique d'amplification pour les contrôles.

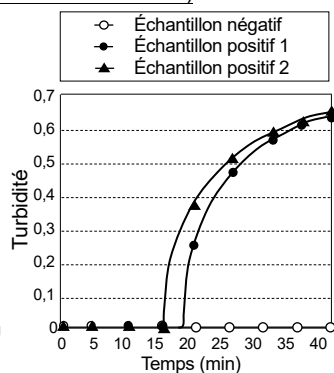


Fig. 2 : Graphique d'amplification pour les échantillons.

NOTES DE PROCÉDURE

- (1) La réaction LAMP est très sensible et toute contamination, même par de petites quantités de produit amplifié, peut entraîner des résultats faussement positifs.
- (2) Séparer les zones de préparation des échantillons et d'amplification.
- (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, en particulier, changer de gants après avoir transféré le sang 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 faible contamination du tube de réaction par la sueur ou la salive peut décomposer l'ADN et provoquer un faux résultat.
- (6) En outre, lire la SOP lors de la réalisation d'une extraction d'ADN.
- (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) (Pour HumaLoop M ou un autre incubateur utilisant la lumière UV ou la lumière LED bleue)**
Si des bulles sont présentes, secouer les tubes d'un coup sec (ou les centrifuger rapidement) pour les éliminer.

(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. Si des bulles apparaissent, secouer le tube d'un coup sec ou le centrifuger rapidement pour les éliminer.

- (9) Le dMAL Pf 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.
- (10) Le PC Mal contient un nombre élevé de copies de l'ADN de contrôle. Éviter toute contamination d'autres échantillons avec le PC Mal. Pipetter les échantillons et la solution de contrôle négatif et fermer tous les tubes de réaction avant de distribuer le PC Mal.
- (11) Secouer le tube PC Mal d'un coup sec (ou le centrifuger rapidement) avant de l'ouvrir pour recueillir le contenu au fond du tube. Fermer le tube immédiatement après avoir distribué le PC Mal.
- (12) 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 retrait des tubes de réaction de l'incubateur.
- (13) Lorsque le HumaLoop M 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 la lecture, ou les résultats seront faussés.
- (15) 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 M)

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

*** (Pour un autre incubateur utilisant la lumière UV ou la lumière LED bleue)**

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 lorsqu'ils sont lus à l'heure spécifiée :

- 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 doivent être retestés.

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 de détection du Loopamp™ MALARIA Pf Detection Kit est de 12,5 copies par test. En cas de résultat négatif, il convient d'envisager un nouveau test pour les patients dont les symptômes persistent ou s'aggravent et d'envisager et de rechercher d'autres causes possibles de symptômes. En outre, le test LAMP est très sensible et peut détecter une faible parasitémie qui n'est pas la cause directe des symptômes présentés. Il faut donc toujours tenir compte de l'état clinique du patient pour poser un diagnostic définitif et déterminer la prise en charge.
- (2) Bien que les amorces aient été conçues pour cibler une région contenant un nombre relativement faible de variations, le *Plasmodium falciparum* 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 Pf.

* (3) Les résultats des tests peuvent être affectés par certains facteurs tels que le prélèvement et le transport des échantillons, la préparation des échantillons, la présence d'inhibiteurs et d'autres erreurs de procédure de laboratoire. Un résultat négatif n'exclut pas complètement la présence de *Plasmodium falciparum* dans l'échantillon. Lors du diagnostic clinique, il est essentiel de tenir compte de l'état clinique du patient et de tous les autres résultats de laboratoire disponibles.

(4) Ce kit est destiné à la détection qualitative ; il n'est pas conçu pour une 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 liée à la concentration d'ADN matrice.

SUBSTANCES INTERFÉRENTES

Nos études internes ont révélé que la mesure de la turbidité n'était pas affectée par la présence d'héparine-Na (2600 unités/dL), d'héparine-Li (2600 unités/dL), d'EDTA-2Na (300 mg/dL), d'EDTA-2K (380 mg/dL), d'EDTA-3K (340 mg/dL), de citrate de sodium (7,6 %), de bilirubine libre (66,3 mg/dL), de bilirubine conjuguée (67,0 mg/dL), de chyle (turbidité de la formazine : 5433), et d'hémoglobine hémolytique (1567 mg/dL). L'EDTA peut provoquer des résultats faussement positifs lorsque le résultat est lu par fluorescence.

Concernant les médicaments, nos études internes ont révélé que la mesure n'était pas affectée par la présence de proguanil (0,6 µg/mL), de chloroquine (1,1 µg/mL), de quinine (26,7 µg/mL), de chlorhydrate de doxycycline (10,0 µg/mL), de méfloquine (4,7 µg/mL), de primaquine (0,5 µg/mL), d'artémisinine (2,6 µg/mL), de sodium de loxoprofène (17,7 µg/mL), d'acétaminophène (9,0 µg/mL), d'isoniazide (23,3 µg/mL), d'éthambutol (5,7 µg/mL), de rifampicine (26,6 µg/mL), de pyrazinamide (116,7 µg/mL), de clarithromycine (12,4 µg/mL), de streptomycine (133,3 µg/mL), de céfotaxime sodique (333,3 µg/mL) et de lévofloxacine (7,5 µg/mL).

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCES

(1) Exactitude

Lors des tests des échantillons suivants :

- Échantillon négatif (concentration : 0 copie/test)
- Échantillon positif 1 (100 copies/test)
- Échantillon positif 2 (1000 copies/test)

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

(2) Reproductibilité au sein d'une série

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

12,5 copies/test

(4) Réactivité croisée

Le système de mesure a été testé positif pour le *Plasmodium falciparum* et négatif pour d'autres agents pathogènes, comme détaillé dans le tableau ci-dessous :

Genre <i>Plasmodium</i>	
<i>Plasmodium falciparum</i>	Positif
<i>Plasmodium vivax</i>	Négatif
<i>Plasmodium ovale</i>	Négatif
<i>Plasmodium malariae</i>	Négatif
<i>Plasmodium knowlesi</i>	Négatif
Autres agents pathogènes	
<i>Trypanosoma brucei</i>	Négatif
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Négatif
<i>Leishmania donovani</i>	Négatif
<i>Leishmania chagasi</i>	Négatif
<i>Toxoplasma gondii</i>	Négatif
<i>Entamoeba histolytica</i>	Négatif
<i>Giardia intestinalis</i>	Négatif
<i>Theileria parva</i>	Négatif
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Négatif
Autre	
ADN génomique humain	Négatif

(5) Informations sur le calibrateur

Pour le test de performance de ce produit, l'ADN plasmidique contenant l'ADN mitochondrial de Pf a été utilisé comme calibrateur.

(6) Performances cliniques

Le paludisme est causé par certains parasites du genre *Plasmodium*, transmis par la piqûre de moustiques infectés. Après s'être développés dans le foie pendant un certain temps, les parasites au stade sanguin sont libérés. Ils pénètrent dans les globules rouges, les lysent lors de leur reproduction ultérieure et provoquent des symptômes, notamment de la fièvre. Le test LAMP détecte l'ADN des parasites au stade sanguin.

Le produit a été évalué sur des échantillons de sang envoyés pour le dépistage du paludisme dans un laboratoire spécialisé. Après une microscopie standard, les échantillons ont été anonymisés, l'ADN a été extrait des échantillons sanguins à l'aide de la méthode PURE et analysé à l'aide du produit en utilisant des amorces spécifiques au Pf, avec deux méthodes de lecture différentes. Enfin, la PCR nichée a été utilisée comme méthode de référence. Un total de 705 tests, dont 56 provenaient de patients déclarés positifs par microscopie, ont été comparés à la PCR nichée comme méthode de référence. La sensibilité et la spécificité des amorces spécifiques au genre Pf étaient respectivement de 98,4 % et 98,1 %.⁽⁶⁾

LAMP vs. PCR nichée	
Sensibilité diagnostique	98,4 % (91,4-100,0)
Spécificité diagnostique	98,1 % (96,8-99,0)
Valeur prédictive positive	83,8 %
Valeur prédictive négative	99,8 %
Rapport de vraisemblance + (sensibilité/(1-spécificité))	51,79
Rapport de vraisemblance - ((1-sensibilité)/spécificité)	0,0163

LAMP vs. microscopie	
Sensibilité diagnostique	100,0 % (93,2-100,0)
Spécificité diagnostique	96,6 % (94,9-97,9)
Valeur prédictive positive	70,3 %
Valeur prédictive négative	100,0 %
Rapport de vraisemblance + (sensibilité/(1-spécificité))	29,41
Rapport de vraisemblance - ((1-sensibilité)/spécificité)	0,0000

INFORMATIONS POUR COMMANDER

Code produit	Nom du produit	Contenu
978000	Loopamp™ MALARIA Pf Detection Kit	96 tests
962000	HumaLoop M	1 unité principale 1 unité de détection de la fluorescence
970000	Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit	90 tests
963200	HumaTurb C+A	1 unité de contrôle 1 unité d'amplification
964000	HumaHeat	Bloc chauffant
980000	HuMax ITA	Micro-centrifugeuse

AVIS

Tout incident grave survenu en lien avec le dispositif fait l'objet d'une notification 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) 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)

Diagramme

Procédure opérationnelle pour la détection de la turbidité en temps réel

Préparation de la solution d'échantillon

Préparer des solutions d'échantillons d'ADN en extrayant l'ADN des échantillons de sang collectés.

Préparation des réactifs

Prendre le nombre requis de tubes de réaction du dMAL Pf.

(Pour les échantillons et les contrôles négatifs et positifs)

Mélange du réactif et de la solution d'échantillon

Transférer 30 µL d'échantillon ou de contrôle dans chaque tube de réaction.

Utiliser la solution de contrôle négatif comme contrôle négatif.
Utiliser le PC Mal comme contrôle positif.
(Le contrôle positif doit être préparé en dernier.)

Retourner les tubes de réaction pour recueillir la solution dans le bouchon. Laisser les tubes debout, la tête en bas, pendant 2 minutes.

Retourner les tubes de réaction cinq fois pour mélanger le contenu, puis les centrifuger.

(Éviter la formation de bulles.)

Amplification

Placer les tubes de réaction dans le bloc de réaction du turbidimètre.

Comme indiqué dans la notice d'utilisation du turbidimètre, lancer la réaction, mesurer et évaluer la turbidité (pendant 40 minutes à 65,0 °C).

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.

TABLEAU 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 EC REP

IVD  **0123**

Importateur

EC **REP**

HUMAN Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH

Max-Planck-Ring 21, 65205 Wiesbaden, Allemagne



EIKEN CHEMICAL CO., LTD.

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

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

*Date de révision : 2026-08-01