



Instructions for Use

380236-B

English

REF 972000

Human
Diagnostics Worldwide

Loopamp™ MTBC Detection Kit

INTENDED USE

The Loopamp™ MTBC Detection Kit is a qualitative *in vitro* diagnostic test for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) DNA extracted from sputum in patients with any symptom indicative of MTBC infection.

TEST PRINCIPLES

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

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

The primers provided with this product have been designed in the *gyrB* and IS region of the MTBC genome DNA. This region has been confirmed by alignment analysis of selected base sequences of MTBC and nontuberculous mycobacteria to have a relatively well-preserved base sequence in MTBC.

DNA from untreated sputum or NALC-NaOH treated sputum is extracted using the Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit (available for sale separately). The DNA solution is then dispensed into a reaction tube. The strand displacement DNA polymerase, deoxynucleotide triphosphates (dATP, dCTP, dGTP and dTTP), calcine and MTBC-specific primers are stored in dried form in the cap of the reaction tube. This dried LAMP reagent (MTBC detection reagent (dMTB)) is reconstituted when adding the DNA solution. The reaction tube is then incubated at 67.0°C and the DNA is amplified through catalysis by the strand displacement DNA polymerase in accordance with LAMP reaction.

The detection of amplified products is based on turbidity measurement of a by-product, magnesium pyrophosphate (white precipitate).⁽³⁾ Also, visual judgment under UV irradiation may be used instead of turbidity measurement. During amplification the calcine contained in the dried LAMP reagent is released, generating fluorescence light that can be detected by eye.⁽⁴⁾ Before reaction, calcine contained in the reagent is in the quenched state due to bound manganese ions bound thereto; however, once the LAMP reaction is started, pyrophosphate ions are generated and bind out the manganese ions, and calcine becomes fluorescent.⁽⁴⁾

CONTENTS OF THE KIT

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

MTBC detection reagent.....2 X 48 tubes

The following ingredients in dried form are contained in each reaction tube.

Bst DNA polymerase¹

Deoxynucleotide triphosphates

Magnesium sulfate

Calcein

Manganese chloride

Primers²

Positive control MTB (PC MTB)³.....1 X 0.4 mL

Negative control MTB (NC MTB).....3 X 0.5 mL

30 µL dropper.....1 X 18 droppers

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

*2: Primers designed in the DNA gyrase subunit B (*gyrB*) and Insertion sequence *IS6110* (IS) region of the MTBC genome

DNA, purified from synthesized oligonucleotides by HPLC.

*3: PC MTB contains a product resulting from *in vitro* amplification of a template genome DNA of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (GenBank No. NC_000962) origin.

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

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

WARNINGS AND PRECAUTIONS

- (1) For *in vitro* diagnostic use only.
- (2) This product is designed only for clinical diagnosis of MTBC from sputum samples of human origin. Do not use for other purposes.
- (3) When using this product, always follow this package insert.
- (4) Do not freeze the reagents.
- (5) Do not use any expired reagent.
- (6) Do not mix different lots.
- (7) Do not replenish any reagent.
- (8) Performance of the Loopamp™ MTBC Detection Kit is dependent on operator proficiency and adherence to procedural directions. Testing should be performed by properly trained personnel.
- (9) Remove the required number of reaction tubes from the packaging just before use and seal the aluminium pouch immediately.
- (10) Do not remove the desiccant from the aluminium pouch. High level of humidity may deteriorate the dried LAMP reagent in the reaction tubes.
- (11) Exposure to heat and light might deteriorate the dMTB. Remove only the required number of reaction tubes (number of samples + number of controls) and seal any unused tubes immediately.
- (12) Read the instruction manual of equipment involved incubator before use.
- (13) Sputum samples pose a potential risk for infection. Take all necessary preventive measures to avoid biohazard.⁽⁵⁾
- (14) PC MTB and NC MTB both contain a small amount of sodium azide as preservative. Sodium azide is classified as toxic. Avoid any contact with eyes, mouth, or skin.
- (15) In case of accidental contact of any reagent with eyes, mouth, or skin, immediately rinse the affected site with plenty of water and, if necessary, seek medical advice.
- (16) Do not dilute or add the PC MTB to the samples. Use the PC MTB only as described in this package insert in order to avoid DNA contamination.
- (17) Store the PC MTB positive control and any positive sputum samples separately from the other kit reagents.
- (18) The cap of each reaction tube contains dMTB in the dried form. Do not touch the inside of the cap.
- (19) Before using the reaction tubes, check carefully to see if they have any cracks or scratches. Damaged tubes might give false results and lead to DNA contamination of the incubator and work area.
- (20) Do not expose reaction tubes to UV light before the end of the LAMP reaction. Prolonged exposure to UV light might damage the tubes and lead to false results.
- (21) When a UV lamp is used for visual fluorescence judgment, do not stare directly at UV light. Since UV light is harmful to the eyes, even watching for a short period would irritate eyes and cause symptoms similar to conjunctivitis. Use a glass screen or wear goggles or a protective eye mask whenever looking directly at the UV lamp.
- (22) Refer to the manual of the incubator. When HumaLoop T or the real-time turbidimeter HumaTurb C are used, be careful in removing the reaction tube from the incubator to avoid burns.

WASTE DISPOSAL

- (1) Do not open the tubes after DNA amplification. Leave the cap closed and dispose of the used tubes as medical waste by

- incineration or after double bagging with sealable plastic bags.
- (2) Never autoclave or re-use the reaction tubes, else amplified products will disperse and cause contamination.
 - (3) The main material for the reaction tubes, reagent tubes, and 30µL dropper is PP; for the reaction tube tray it is PET; for the aluminium pouch it is aluminium; for the kit case it is paper.
 - (4) Dispose of any used reagent, container, or lab ware in accordance with local regulations.

SPECIMEN COLLECTION

- (1) Use the most purulent part of the sputum sample.
- (2) Sputum samples should be used immediately after collection.
- (3) Collect sputum in a separate room from the LAMP amplification room. Aerosols containing MTBC DNA can be generated during sputum collection and may cause contamination.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

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

For Visual fluorescence detection

(For HumaLoop T)

- HumaLoop T

(For other incubator using UV lamp)

- Incubator (temperature accuracy: $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$; with hot bonnet)
- Heating block
- UV lamp (wavelength: 240 to 260 nm, and 350 to 370 nm)
- Goggles and a protective eye mask

For Real-time turbidity detection

- HumaTurb C
- Centrifuge for eight connected tubes

PREPARATION OF REAGENTS

1) MTBC detection reagent

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

Note: After removing the necessary tubes, seal any unused tubes in the original aluminium pouch immediately.

2) Negative control MTB (NC MTB)

Flick down (Spin down) the tube before use to collect the content in the bottom of the tube. Pipette 60 µL of NC MTB into the Heating Tube provided in Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit. Follow the instruction for use of the Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit to process the NC.

Note: A negative control should be included in every LAMP run.

3) Positive control MTB (PC MTB)

Flick down (Spin down) the tube before use in order to collect the content in the bottom of the tube.

Note: PC MTB should be measured every time.

MEASUREMENT PROCEDURE

DNA Extraction

To extract the DNA from a sputum sample, follow the instruction for the Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit (sold separately). Dispense 60 µL of sputum sample into the Heating Tube, and load the Heating Tube into the heating block pre-heated at 90°C . Use the most purulent sputum whenever possible.

Reagent and Sample Mixing

- (1) Turn on the incubator HumaLoop T or the real-time turbidimeter.
- (2) Dispense 30 µL of sample solution into a reaction tube using the Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit, and close the cap.

Note: The volume between the two lines on the reaction tube corresponds to approx 30µL.

- (3) Dispense 30 µL of NC MTB into a reaction tube using the Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit and close the cap.

Note: The volume between the two lines on the reaction tube corresponds to approx 30µL.

- (4) Dispense 30 µL of PC MTB into a reaction tube using the dropper provided, and close the cap.

- (5) Flick down (Spin down) all tubes to collect the solution to the bottom of the tubes.

Note: Make sure the liquid level is in the middle of the two lines on a reaction tube to ensure 30 µL of pipetting.

- (6) Reconstitute the dried reagent in the cap by inverting the reaction tubes and collecting the DNA solution in the cap. Leave

the tubes standing upside down for 2 minutes to reconstitute the dried reagent.

- (7) Invert the reaction tubes five times to mix the content. Make sure that the dried reagent in the cap is fully dissolved.
- (8) Flick down (Spin down) all tubes to collect the solution to the bottom of the tubes.

Amplification

For Visual fluorescence detection

(For HumaLoop T)

- (1) Check that the temperature on the incubator is 67.0°C .
- (2) Load the reaction tubes into the HumaLoop T incubator and press the green button to start the LAMP reaction (40 minutes at 67.0°C). See the HumaLoop T instruction manual for details on how to operate the incubator.
- (3) Confirm the completion of polymerase inactivation (automatically completed by the HumaLoop T). Take all reaction tubes from the HumaLoop T.

(For other incubator using UV lamp)

- (1) Set the temperature of the incubator (with hot bonnet; temperature accuracy: $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$) at 67.0°C . Wait until the temperature displayed reaches the set value.
- (2) Load the reaction tubes, and then start amplification reaction (for 40 minutes at 67.0°C).
- (3) Forty minutes later, inactivate the polymerase using the heating block (for 5 minutes at 80°C , or for 2 minutes at 95°C) to terminate the reaction.

For Real-time turbidity detection with HumaTurb C (see Flow chart of procedure)

- (1) Configure the real-time turbidimeter HumaTurb C for detection with this product.
- (2) Check if the temperature displayed reaches 67.0°C (Allow the turbidimeter to warm up for 20 minutes before use).
- (3) Load the reaction tubes, and start measurement.
- (4) Watch the display of the turbidimeter to check the positive and negative controls for any increase in turbidity. If the turbidity increases in PC MTB but doesn't in the negative control solution, amplification reaction is proceeding properly (Fig1). If any other situation occurs, however, amplification reaction may be proceeding in a wrong way. In such a case, restart testing from reagent preparation.
- (5) Confirm the completion of polymerase inactivation (automatically completed by the turbidimeter). Take all reaction tubes from the turbidimeter and discard them without opening.

Amplification plots

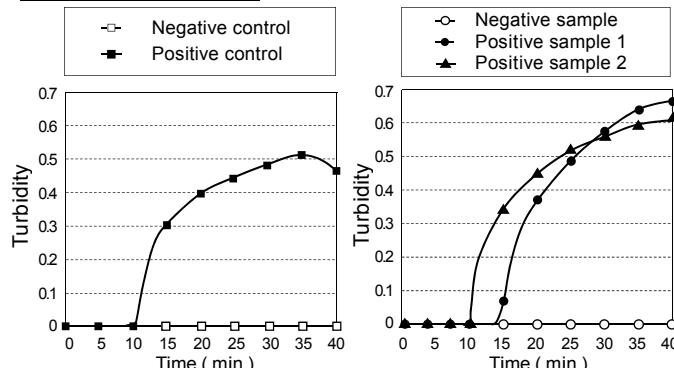


Fig1 : Amplification plots for controls

Fig2 : Amplification plots for samples

PROCEDURAL NOTES

- (1) Clean benches with over 0.5% sodium hypochlorite before performing the test.
- (2) The LAMP reaction is very sensitive, and contamination with small amounts of amplified product might lead to false positive results.
- (3) Separate the sputum collection and the LAMP testing areas.
- (4) Take all measures necessary to avoid contamination, in particular change gloves after transferring the sputum or if the gloves come into contact with the DNA solution.
- (5) When handling this product, avoid microbial contamination and nuclease contamination. Even a small amount of DNase transmitted from sweat or saliva to the reaction tube might

- decompose DNA and cause false result.
- (6) Do not use sputum samples containing a large amount of blood since this may affect measurements.
 - (7) The DNA solution should ideally be used immediately after preparation. If it is impossible, the DNA solution can be stored at room temperature and used within 72 hours.
 - (8) When dispensing the solution into the reaction tube, avoid contact between the Injection Cap on the Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit and the inner wall of reaction tubes. Hold the tube rack upright and fill the tube until the level of DNA solution is between the two lines (30 µL).
 - (9) **(For HumaLoop T or other incubator using UV lamp)**
If bubbles are present, flick down the tubes to get rid of them.
(For Real-time turbidimeter HumaTurb C)
Since bubbles in reaction solution will interfere with turbidity measurement and cause false judgment, try not to cause any bubble when mixing reagent and sample solution. If bubbles are present, spin down to get rid of the bubbles.
 - (10) dMTB should be fully dissolved. Any undissolved portion may influence performance, such as causing a decrease in sensitivity.
 - (11) The PC MTB contains high copy number control DNA. Avoid any contamination of other samples with the PC MTB. Dispense the samples and the NC MTB and close all reaction tubes before dispensing the PC MTB.
 - (12) Flick down (Spin down) the PC MTB tube before opening it, in order to collect the content at the bottom of the tube. Close the tube immediately after dispensing the PC MTB.
 - (13) When the HumaLoop T incubator or the real-time turbidimeter HumaTurb C is used, polymerase inactivation is automatically performed.
 - (14) Never open the reaction tubes once the LAMP reaction has started or after completion. Be particularly careful when unloading the reaction tubes from the incubator to avoid opening the tubes accidentally.
 - (15) Do not reuse any amplified product in the tubes for electrophoresis or other applications.
 - (16) For other real-time turbidimeters or incubators, when visual fluorescence judgment is chosen, inactivate the polymerase (for 5 minutes at 80°C, or for 2 minutes at 95°C) before judgment, or false judgment will be caused.
 - (17) For the real-time turbidimeter or other incubator, when a UV lamp is used, do not stare directly at UV light. Use a glass board or wear goggles or a protective eye mask whenever looking at the lamp.

INTERPRETATION OF RESULTS

For Visual fluorescence detection

(For HumaLoop T)

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

(For other incubator using UV lamp)

Irradiate the bottom of each reaction tube from the side through goggles or any other protective equipment.

For a valid run, the following results must be obtained:

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

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

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

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

For Real-time turbidity detection with HumaTurb C

After confirming that the turbidity increases with PC MTB but doesn't in the negative control solution, evaluate samples in accordance with the following criteria (Fig 1 and 2).

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

Notes:

- (1) The minimum detectable sensitivity of this product is 0.38 genomes equivalent per test. Even with a negative test, patients with any persisting symptom indicative of infection by MTBC should undergo re-examination.
- (2) Although the primers have been designed to target a region containing a relatively small number of variations, MTBC may

possibly acquire further variations in this region and become less sensitive to this product. Therefore, a negative test does not always rule out infection by MTBC.

- (3) Test results may be affected by specimen collection and transport, specimen preparation, inhibitors, and other laboratory procedural errors. A negative test does not exclude the presence of MTBC from the specimen. In making a clinical diagnosis, take into account the patient's clinical condition and all other available laboratory results.
- (4) This product is a kit for qualitative detection; it is not designed for quantitative measurement. The intensity of fluorescent light observed or the rise time of turbidity measured by the real-time turbidimeter does not correlate with the number of template DNA.

INTERFERING SUBSTANCES

Our in-house studies have revealed that measurement was not affected by the presence of free bilirubin (91.0 mg/dL), conjugated bilirubin (101.0 mg/dL), chyle (formazine turbidity: 7,300), and hemolytic hemoglobin (2,475 mg/dL).

With regard to drugs, our in-house studies have revealed that measurement was not affected by the presence of isoniazid (100 µg/mL), ethambutol (20 µg/mL), rifampicin (100 µg/mL), pyrazinamide (500 µg/mL), kanamycin (20 µg/mL), and streptomycin (500 µg/mL).

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

1. Sensitivity and Accuracy

In testing the following samples:

- negative sample (concentration: 0 genome equivalent/test)
- positive sample 1 (1.875 genomes equivalent/test)
- positive sample 2 (125 genomes equivalent/test);

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

2. Within-run Reproducibility

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

3. Limit of Detection

0.38 genomes equivalent/test

4. Cross-reactivity

As for nontuberculous mycobacteria and respiratory disease bacteria, the measurement system tested negative for all bacterial species as detailed in the table below; no cross-reaction occurred.

Nontuberculous mycobacteria	
<i>Mycobacterium asiaticum</i>	Negative
<i>Mycobacterium kansasii</i>	Negative
<i>Mycobacterium marinum</i>	Negative
<i>Mycobacterium simiae</i>	Negative
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	Negative
<i>Mycobacterium szulgai</i>	Negative
<i>Mycobacterium gordoneae</i>	Negative
<i>Mycobacterium xenopi</i>	Negative
<i>Mycobacterium avium</i>	Negative
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	Negative
<i>Mycobacterium gastri</i>	Negative
<i>Mycobacterium haemophilum</i>	Negative
<i>Mycobacterium malmoense</i>	Negative
<i>Mycobacterium chelonae</i>	Negative
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	Negative
<i>Mycobacterium flavescens</i>	Negative
Respiratory disease bacteria	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Negative
<i>Staphylococcus aureus</i>	Negative
<i>Haemophilus influenzae</i>	Negative
<i>Moraxella catarrhalis</i>	Negative
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Negative
<i>Escherichia coli</i>	Negative
<i>Legionella pneumophila</i>	Negative
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Negative
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (I)	Negative
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (II)	Negative

5. Reactivity against MTBC

Reactivity against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum* was confirmed.

6. Information about a Calibrator

The performance test for this product used plasmid DNA containing the *gyrB* and IS region of the genome DNA of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (GenBank No. NC_000962) as a calibrator.

7. Clinical performance

Tuberculosis is still one of the world's largest infections. In the world, the total estimated number of new cases of tuberculosis is about 9.4 million, and that of sputum smear-positive is about 4.3 million (2008; data published by WHO).⁽⁶⁾ In Japan, 24,760 patients were newly registered as affected with tuberculosis in 2008, and 2,216 of them have died (Kekkaku No Tokei 2009 Statistics of TB 2009).⁽⁷⁾

This product was examined in two medical institutions designated for Class-2 infectious diseases (designated medical institutions that had beds exclusive for patients with tuberculosis) for performance in diagnosing patients suspected of tuberculosis. Along with PCR and TRC, both of which had already been approved in Japan, this kit was used to test samples of sputum collected for two days (320 samples from 160 subjects), and results were compared between kits. Note that testing based on this product included evaluations for DNA extract solution obtained from untreated sputum (hereinafter, referred to as LAMP for untreated sputum) and those for DNA extract solution obtained from sputum pretreated by NALC-NaOH and some other processes (hereinafter, referred to as LAMP for pretreated sputum).

As shown in the tables below, the overall concordance rate was favorable as follows: LAMP for untreated sputum vs. PCR: 91.5% (291/318 subjects); LAMP for pretreated sputum vs. PCR: 92.1% (293/318); LAMP for untreated sputum vs. TRC: 94.3% (230/244); LAMP for pretreated sputum vs. TRC: 93.0% (227/244). In addition, the evaluations made by real-time turbidity detection and those made by visual fluorescence detection were in complete agreement except for one sample. (This sample was bloody sputum and tested false negative in visual fluorescence detection because of disturbance by blood). So, we regard the two types of evaluations as identical with each other, and the tables show test results obtained by real-time turbidity detection. The results of the visual fluorescence detection by HumaLoop T were the same results by the real-time turbidimeter.

LAMP		PCR		Overall concordance rate
		Positive	Negative	
Untreated sputum	Positive	196	7	91.5% (291/318)
	Negative	20	95	
Pretreated sputum	Positive	194	3	92.1% (293/318)
	Negative	22	99	

LAMP		TRC		Overall concordance rate
		Positive	Negative	
Untreated sputum	Positive	163	5	94.3% (230/244)
	Negative	9	67	
Pretreated sputum	Positive	157	2	93.0% (227/244)
	Negative	15	70	

ORDERING INFORMATION

Product Code	Product Name	Contents
972000	Loopamp™ MTBC Detection Kit	96 tests
970000	Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit	90 tests
971000	Pipette-60 Set	1 pipette; 4 X 96 tips
961000	HumaLoop T	1 Main unit 1 Fluorescence Visual Check Unit
963200	HumaTurb C	1 Control unit 1 Amplification Unit

REFERENCES

- Notomi T., et al.: Nucleic Acids Research 28, No. 12, e63 (2000)
- Nagamine K., et al.: Clin. Chem. 47, No. 9, 1742–1743 (2001)
- Mori Y., et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 289, No. 1, 150–154 (2001)
- Tomita N., et al.: Nat. Protoc. 3, No. 5, 877–882 (2008)
- 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)
- WHO global TB database:

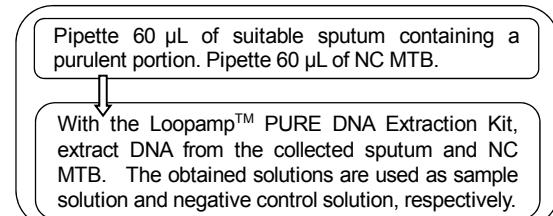
<http://www.who.int/tb/country/en/>
http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/update/a-1_summary.pdf
http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/update/a-3_summary.pdf

(7) Kekkaku No Tokei 2009 (Statistics of TB 2009): Japan Anti-Tuberculosis Associa

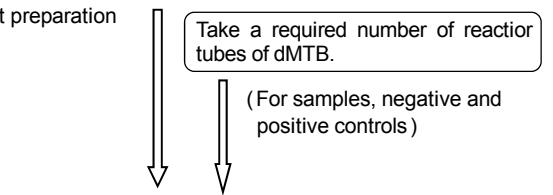
Flow chart

Operation procedure for Real-time turbidity detection

Preparation of sample solution and negative control solution



Reagent preparation



Take a required number of reactor tubes of dMTB.
(For samples, negative and positive controls)

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

Use the negative control solution as negative control.
Use PC MTB as positive control.
(The positive control should be prepared last.)

Invert the reaction tubes to collect the solution on the cap. Wait 2 minutes.

Invert the reaction tubes five times to mix the contents, and then spin them down.
(Avoid any bubbles.)

Amplification

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

As directed in the instruction for use of the turbidimeter, start reaction and measure and evaluate the turbidity (for 40 minutes at 67.0°C).

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

IVD

CE

Exclusive distributor

EC REP

HUMAN Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH,
Max-Planck-Ring 21 65205 Wiesbaden Germany



EIKEN CHEMICAL CO., LTD.
4-19-9, Taito, Taito-ku, Tokyo 110-8408, Japan

Date of Revision: October 1, 2019



Instructions d'utilisation

Human
Diagnostics Worldwide

Français

REF 972000

Loopamp™ MTBC Detection Kit

UTILISATION PRÉVUE

Le Loopamp™ MTBC Detection Kit est un test qualitatif de diagnostic *in vitro* pour la détection de l'ADN du complexe *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) extraites du crachat des patients présentant des symptômes d'infection au MTBC.

PRINCIPE DU TEST

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

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

Les amores fournies ont été construites dans les régions *gyrB* et IS de l'ADN du génome du MTBC. Ces régions ont été confirmées par l'analyse d'alignement sur des séquences sélectionnées du MTBC et d'autres mycobactéries comme étant des séquences d'oligonucléotides bien conservées chez le MTBC.

L'ADN provenant d'un crachat, traité au NALC-NaOH ou non, est extrait avec le Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit (vendu séparément). La solution de l'ADN sera transférée dans des tubes à réaction. L'ADN polymérase à déplacement de brin, les désoxynucléotides triphosphatés (dATP, dCTP, dGTP et dTTP), la calcéine et les amores spécifiques au MTBC sont stockés à l'état sec dans le bouchon du tube à réaction. Le réactif LAMP à l'état sec (réactif de détection du MTBC ; dMTB) est reconstitué par l'introduction de la solution d'ADN. Le tube à réaction est incubé à 67,0°C et l'ADN est amplifié suivant la réaction LAMP par catalyse à l'aide de l'ADN polymérase à déplacement de brin.

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

CONTENU DU KIT

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

Réactif de détection du MTBC 2 X 48 tubes

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

Bst DNA polymerase^{*}

Désoxynucléotides triphosphatés

Sulfate de magnésium

Calcéine

Chlorure de manganèse

Amores^{**}

Contrôle positif MTB (PC MTB)³ 1 X 0,4 mL

Contrôle négatif MTB (NC MTB) 3 X 0,5 mL

Compte-goutte 30 µL 1 X 18 compte-gouttes

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

*2: Amores codant pour la sous-unité B de l'ADN gyrase (*gyrB*) et dans la région de la séquence d'insertion IS6110 (IS) de l'ADN génomique du MTBC purifié à partir d'oligonucléotides de synthèse purifiés par HPLC.

*3: Le PC MTB contient un produit résultant d'une amplification *in vitro* d'une matrice ADN provenant du génome du *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (GenBank No. NC_000962).

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

Réactif	Étiquetage sur le tube	Code sur le bouchon
Contrôle positif	PC MTB	PC
MTBC	Lot No., EKN	MTB
Contrôle négatif	NC MTB	NC
MTBC	Lot No., EKN	MTB

MISES EN GARDE ET PRÉCAUTIONS

- Usage diagnostique *in vitro* uniquement.
- Ce produit est réservé aux diagnostics cliniques du MTBC sur des spécimens de prélèvements de crachats d'origine humaine. Ne pas l'utiliser à d'autres fins.
- Respecter toujours la notice lors de l'utilisation de ce produit.
- Ne pas congeler les réactifs.
- Ne jamais utiliser un réactif périme.
- Ne pas mélanger les kits provenant de lots différents.
- Ne pas rajouter de réactif pour du re-remplissage.
- La performance du Loopamp™ MTBC Detection Kit dépend de la compétence de l'opérateur et du respect du mode d'emploi. Les tests doivent être effectués par un personnel dûment formé.
- Sortir le nombre de tubes nécessaires de l'emballage juste avant son utilisation, puis refermer la pochette en aluminium immédiatement.
- Ne pas enlever le dessicant du sachet en aluminium. Une forte humidité peut détériorer le réactif LAMP se trouvant dans les tubes.
- L'exposition à la chaleur et à la lumière peut détériorer le dMTB. Sortir seulement le nombre de tubes nécessaires (nombre de spécimens + nombre de contrôles) puis refermer la pochette contenant les tubes restants.
- Lire le manuel d'utilisation des équipements concernés, notamment l'incubateur, avant l'emploi du kit.
- Les spécimens de crachats présentent un risque potentiel d'infection. Prendre toutes mesures préventives nécessaires pour éviter tout danger biologique potentiel.⁽⁵⁾
- Aussi bien le PC MTB que le NC MTB contiennent une petite quantité d'azoture de sodium comme agent de conservation. L'azoture de sodium est classé毒ique. Éviter tout contact avec les yeux, la bouche ou la peau.
- Lors d'un contact accidentel d'un des réactifs avec les yeux, la bouche ou la peau, rincer immédiatement et abondamment la partie affectée avec de l'eau, et se référer à un service médicallement compétent si nécessaire.
- Ne pas diluer ou ajouter du PC MTB aux spécimens. Afin d'éviter une contamination de l'ADN, utiliser le PC MTB seulement comme il est indiqué dans cette notice.
- Conserver le PC MTB (contrôle positif) et tout spécimen de crachat positif à l'écart des autres réactifs du kit.
- Le bouchon de chaque tube à réaction contient du dMTB sous forme sèche. Ne pas toucher la partie interne du bouchon.
- Avant l'utilisation des tubes à réaction, vérifier avec soin la présence de fissure ou de rayures. Les tubes abimés peuvent fausser les résultats et provoquer une contamination de l'incubateur ou de l'espace de travail par de l'ADN.
- Ne pas exposer les tubes à la lumière UV avant la fin de la réaction de LAMP. Une exposition prolongée des tubes à la lumière UV peut endommager les tubes et peut fausser les résultats.
- Lors de l'utilisation d'une lampe à UV pour l'évaluation de la fluorescence, ne pas fixer directement la source de lumière UV. La lumière UV étant nocive pour les yeux. La regarder, même pendant un temps court, pourrait irriter les yeux et provoquer des symptômes similaires à la conjonctivite. Utiliser des plaques d'écrans en verre, des lunettes ou des visières protectrices lorsqu'on doit regarder directement une lampe UV.
- Se référer au manuel de l'incubateur. Lors de l'utilisation du HumaLoop T ou d'un turbidimètre à temps réel HumaTurb C, faire attention à ne pas se brûler en retirant les tubes des appareils.

ÉLIMINATION DES DÉCHETS

- Ne pas ouvrir les tubes après amplification de l'ADN. Laisser le bouchon fermé et jeter les tubes comme déchet médical à

- incinérer ou en double sac pouvant être scellé.
- (2) Ne jamais passer à l'autoclave ou réutiliser les tubes à réaction au risque de disperser les produits et provoquer contamination.
 - (3) Le matériau principal des tubes à réaction, des tubes de réactifs et du compte-goutte de 30µL est le PP ; le plateau à tubes est en PET ; la pochette en aluminium est en aluminium ; la boîte du kit est en papier.
 - (4) Éliminer tout réactif non utilisé, boîtier ou matériel de laboratoire conformément à la réglementation locale.

PRÉLÈVEMENT D'ÉCHANTILLONS

- (1) Utiliser la partie la plus purulente du prélèvement de crachat.
- (2) Utiliser les crachats immédiatement après leur prélèvement.
- (3) Prélever les crachats dans une salle séparée de celle pour effectuer l'amplification LAMP. De l'aérosol contenant de l'ADN du MTBC peut être produit durant le prélèvement du crachat, ce qui peut provoquer une contamination.

MATÉRIELS NÉCESSAIRES NON FOURNIS

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

Pour la détection visuelle de fluorescence

(Pour le HumaLoop T)

- HumaLoop T

(Autres incubateurs avec lampe UV)

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

Détection de turbidité en temps réel

- HumaTurb C
- Centrifugeuse avec rotor pour barrettes de 8 tubes

PRÉPARATION DES RÉACTIFS

1) Réactif de détection du MTBC

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

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

2) Contrôle négatif MTB (NC MTB)

Secouer le tube d'un mouvement sec ou le centrifuger pour collecter la solution se trouvant au fond du tube. Placer 60µL de NC MTB dans le tube à chauffer fournis par le Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit. Suivre la notice d'utilisation du Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit pour traiter le NC.

Remarque : chaque amplification LAMP doit toujours comporter un contrôle négatif

3) Contrôle positif MTB (PC MTB)

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

Remarque : le PC MTB doit être mesuré à chaque opération.

PROCÉDURE DE MESURE

Extraction d'ADN

Pour extraire de l'ADN d'un prélèvement de crachat, suivre les instructions du Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit (vendu séparément). Utiliser la solution d'ADN obtenue pour l'amplification LAMP. Verser 60µL d'échantillon de crachat dans le tube à chauffer, puis placer le tube dans le bloc chauffant pré-chauffée à 90°C . Utiliser le crachat le plus purulent à chaque fois que cela est possible.

Préparation des réactifs et des spécimens

- (1) Allumer l'incubateur HumaLoop T ou le turbidimètre à temps réel.
- (2) Transférer 30 µL de solution du spécimen dans un tube à réaction à l'aide du Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit, puis refermer le bouchon.

Remarque : Le volume entre les deux traits sur le tube de réaction correspond approximativement à 30µL.

- (3) Transférer 30 µL de NC MTB dans un tube à réaction à l'aide du Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit, puis refermer le bouchon.

Remarque : Le volume entre les deux traits sur le tube de réaction correspond approximativement à 30µL.

- (4) Transférer 30 µL de PC MTB dans un tube à réaction à l'aide du Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit, puis refermer le bouchon.

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

Remarque : s'assurer que le niveau du liquide se situe au milieu de deux traits du tube à réaction pour vérifier que le pipetage a bien transféré 30µL.

- (6) Reconstituer le réactif à l'état sec qui se trouve dans le bouchon

en inversant le tube afin de collecter la solution d'ADN. Laisser le tube inversé pendant 2 minutes pour reconstituer le réactif à l'état sec.

- (7) Mélanger le contenu du tube par cinq inversions. S'assurer que le réactif à l'état sec est complètement dissout.
- (8) Secouer le tube d'un mouvement sec ou le centrifuger pour collecter la solution se trouvant au fond du tube.

Amplification

Pour une détection visuelle de fluorescence

(Pour le HumaLoop T)

- (1) Vérifier que la température de l'incubateur est à $67,0^{\circ}\text{C}$.
- (2) Charger les tubes dans l'incubateur HumaLoop T et appuyer sur le bouton vert pour démarrer la réaction de LAMP (40 minutes à $67,0^{\circ}\text{C}$). Voir le manuel d'utilisation du HumaLoop T pour les détails sur l'opération de l'incubateur.
- (3) Vérifier que l'inactivation de la polymérase est complète (complétée automatiquement par le HumaLoop T). Sortir tous les tubes à réaction du HumaLoop T.

(Autres incubateurs avec lampe UV)

- (1) Régler la température de l'incubateur (avec couvercle chauffant et une précision de température de $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$) à $67,0^{\circ}\text{C}$. Attendre que la température affichée ait atteint la valeur du réglage.
- (2) Charger les tubes à réaction dans l'appareil, puis démarrer la réaction d'amplification (40 minutes à $67,0^{\circ}\text{C}$).
- (3) Après les quarante minutes, inactiver la polymérase à l'aide du bloc chauffant (5 minutes à 80°C ou 2 minutes à 95°C) pour terminer la réaction.

Détection de turbidité en temps réel avec le HumaTurb C (voir diagramme)

- (1) Configurer le turbidimètre à temps réel HumaTurb C pour une détection avec ce produit.
- (2) Vérifier que la température indiquée atteint les $67,0^{\circ}\text{C}$ (préchauffer le turbidimètre pendant 20 minutes avant utilisation).
- (3) Charger les tubes à réaction, puis démarrer la mesure.
- (4) Surveiller l'affichage du turbidimètre pour vérifier si les contrôles positifs et négatifs augmentent ou non. Si la turbidité augmente uniquement chez le PC MTB alors que le contrôle négatif ne change pas, la réaction d'amplification se passe correctement (Fig1). Dans tout autre cas de figure, il peut y avoir une erreur dans la réaction d'amplification : si tel est le cas, recommencer le test depuis la préparation des réactifs.
- (5) Vérifier que l'inactivation de la polymérase est complète (complétée automatiquement par le turbidimètre). Sortir tous les tubes à réaction du turbidimètre et les jeter sans les ouvrir.

Courbes d'amplification

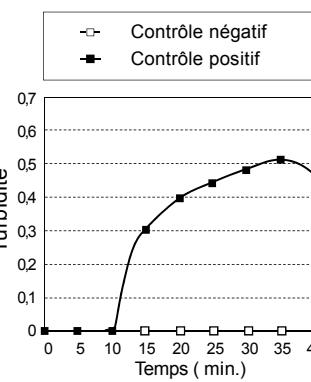


Fig1 : Courbe d'amplification des contrôles

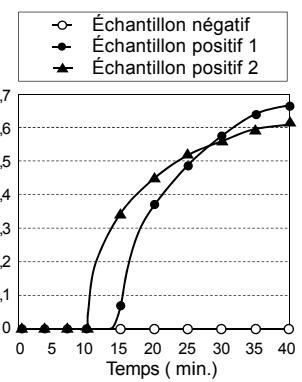


Fig2 : Courbe d'amplification des spécimens

NOTES SUR LA PROCÉDURE

- (1) Nettoyer la paillasse avec une 0,5% solution d'hypochlorite de sodium avant le test.
- (2) La réaction de LAMP est très sensible et une contamination par une quantité infime d'amplificateur peut provoquer un résultat faussement positif.
- (3) Séparer la zone de prélèvement du crachat de la zone de test LAMP.
- (4) Prendre toutes les mesures nécessaires pour éviter une contamination. En particulier, changer les gants après avoir transféré le crachat ou si les gants ont touché la solution d'ADN.
- (5) Éviter toute contamination microbienne ou contamination par le nucléase lors de la manipulation du produit. Une quantité, même infime, de DNase transmise aux tubes par la sueur ou par la salive pourrait décomposer l'ADN et fausser les résultats.
- (6) Ne pas utiliser de spécimens de crachat contenant quantité importante de sang qui peut affecter les résultats des mesures.

- (7) Idéalement, la solution d'ADN devrait être utilisée immédiatement après sa préparation. Dans l'impossibilité d'une utilisation immédiate, la solution d'ADN peut être conservée à température ambiante dans la limite de 72 heures avant utilisation.
- (8) Pendant le transfert de solution dans un tube à réaction, éviter tout contact entre les bouchons d'injection du Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit, ainsi que tout contact avec la paroi interne des tubes à réaction. Maintenir le rack dans sa position verticale et remplir le tube jusqu'à ce que le niveau de la solution d'ADN soit entre les deux traits marqués sur les tubes (30µL).
- (9) **(Pour le HumaLoop T ou autre incubateur avec lampe UV)**
Si des bulles sont présentes, secouer le tube d'un coup sec vers le bas pour les éliminer.
- (Pour les turbidimètres à temps réel HumaTurb C)**
Essayer de ne pas générer de bulles lors de la préparation des réactifs et des solutions de spécimens, car les bulles peuvent interférer aux mesures de turbidité. Si la présence de bulles est observée, centrifuger pour les éliminer.
- (10) Le dMTB doit être complètement dissout. Toutes portions non dissoutes peuvent influer sur la performance telles que provoquer une perte en sensibilité.
- (11) Le PC MTB contient un grand nombre de copies d'ADN de contrôle. Éviter toute contamination d'autres spécimens par le PC MTB. Transférer les spécimens et le NC MTB, puis fermer tous les tubes à réaction avant le pipetage du PC MTB.
- (12) Secouer le tube de PC MTB d'un mouvement sec ou le centrifuger avant son ouverture pour collecter la solution se trouvant au fond du tube. Refermer le tube immédiatement après avoir transféré le PC MTB.
- (13) Lors de l'utilisation de l' HumaLoop T ou du turbidimètre à temps réel HumaTurb C, l'appareil inactivera automatiquement la polymérase.
- (14) Ne jamais ouvrir un tube à réaction une fois la réaction de LAMP démarré, même une fois la réaction terminée. Une attention particulière est requise en sortant les tubes de l'incubateur pour éviter toute ouverture accidentelle des tubes.
- (15) Ne pas réutiliser les amplificats produits dans les tubes pour l'électrophorèse ou autre application.
- (16) Pour tout autres turbidimètres à temps réel ou incubateurs, inactiver la polymérase (5 minutes à 80°C ou 2 minutes à 95°C) avant d'évaluer visuellement la fluorescence, faute de quoi les résultats peuvent être faussés.
- (17) Lors de l'utilisation d'une lampe UV avec tout autres turbidimètres à temps réel ou incubateurs, ne pas fixer directement la lumière UV. Utiliser des lunettes ou une visière protectrice lorsqu'on doit regarder la lampe UV.

L'INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Détection visuelle de fluorescence

(Pour le HumaLoop T)

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

(Autres incubateurs avec lampe UV)

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

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

- Contrôle positif : émission d'une fluorescence verte.
- Contrôle négatif : pas de fluorescence émise.

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

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

- Contrôle positif : émission d'une fluorescence verte.
- Contrôle négatif : pas de fluorescence émise.

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

Après avoir vérifié que la turbidité augmente avec le PC MTB mais pas avec le NC MTB, procéder à l'évaluation des spécimens en fonction des critères suivants (Fig 1 et 2).

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

Remarques :

(1) La sensibilité minimale de détection de ce produit en équivalent-génome est de 0,38 par test. Un patient présentant un symptôme indicatif d'une infection au MTBC doit être réexaminié.

(2) Bien que les amorces aient été construites pour avoir comme cible une région comportant relativement peu de variations, le MTBC peut acquérir de nouvelles variations dans cette région et présenter une sensibilité moindre au test de ce produit. Ainsi, un résultat de test négatif n'exclut pas une infection par le MTBC.

(3) Les résultats des tests peuvent être affectés par la façon dont les spécimens sont prélevés et par leur transport, la préparation des spécimens, les inhibiteurs, et par des erreurs dans les procédures de laboratoire. Un résultat négatif n'exclut pas la présence du MTBC dans un spécimen : lors d'un diagnostic clinique, tenir compte de

l'état clinique du patient et des résultats d'autres tests de laboratoire.

(4) Ce produit est un kit de détection qualitative, et non pas une mesure quantitative. L'intensité de fluorescence observée ou une augmentation de turbidité mesurée par un turbidimètre à temps réel ne corrèlent pas avec le nombre d'ADN matrice.

SUBSTANCE POUVANT INTERFÉRER

Une étude interne a montré que les mesures ne sont pas affectées par la présence de bilirubine libre (91,0 mg/dL), de bilirubine conjuguée (101,0 mg/dL), de chyle (turbidité à la formazine : 7 300) et de l'hémoglobine hémolytique (2 475 mg/dL).

Pour les médicaments, une étude interne a montré que les mesures ne sont pas affectées par la présence d'isoniazide (100 µg/mL), d'ethambutol (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 DES PERFORMANCES

1. Sensibilité et précision

En testant les spécimens suivants :

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

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

2. Reproductibilité pendant le même test

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

3. Limite de détection

0,38 équivalents génome/test

4. Réactions croisées

Comme indiqué dans le tableau ci-après, le test a donné des résultats négatifs sur toutes les souches mycobactériennes non tuberculeuses et des maladies respiratoires : aucune réaction croisée n'a été observée.

Mycobactéries non tuberculeuses	
<i>Mycobacterium asiaticum</i>	Négatif
<i>Mycobacterium kansasii</i>	Négatif
<i>Mycobacterium marinum</i>	Négatif
<i>Mycobacterium simiae</i>	Négatif
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	Négatif
<i>Mycobacterium szulgai</i>	Négatif
<i>Mycobacterium gordoneae</i>	Négatif
<i>Mycobacterium xenopi</i>	Négatif
<i>Mycobacterium avium</i>	Négatif
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	Négatif
<i>Mycobacterium gastri</i>	Négatif
<i>Mycobacterium haemophilum</i>	Négatif
<i>Mycobacterium malmoense</i>	Négatif
<i>Mycobacterium chelonae</i>	Négatif
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	Négatif
<i>Mycobacterium flavescens</i>	Négatif
Bactéries des maladies respiratoires	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Négatif
<i>Staphylococcus aureus</i>	Négatif
<i>Haemophilus influenzae</i>	Négatif
<i>Moraxella catarrhalis</i>	Négatif
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Négatif
<i>Escherichia coli</i>	Négatif
<i>Legionella pneumophila</i>	Négatif
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Négatif
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (I)	Négatif
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (II)	Négatif

5. Réactivité contre le MTBC

Les réactivités sur le *Mycobacterium tuberculosis*, le *Mycobacterium bovis* et le *Mycobacterium africanum* ont été confirmées.

6. Information sur le calibrateur

Le test de performance du produit a été effectué avec comme calibrateur l'ADN plasmidique contenant les régions *gyrB* et *IS* de l'ADN génomique du *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (GenBank No. NC_000962).

7. Performance clinique

La tuberculose reste toujours l'une des infections les plus importantes du monde. Le nombre annuel de nouveaux cas dans le monde est estimé à environ 9,4 millions, et ceux avec frottis du crachat sont d'environ 4,3 millions (2008; données publiées par l'OMS).⁽⁶⁾ Au Japon, 24 760 nouveaux patients ont été enregistrés

comme ayant la tuberculose en 2008, et 2 216 d'entre eux sont décédés (Kekkaku No Tokei 2009 : Statistique de la TB 2009).⁽⁷⁾

Ce produit a été évalué par deux institutions médicales désignées pour les maladies infectieuses de classe 2 (institutions ayant des lits exclusivement réservés aux patients ayant la tuberculose) pour sa performance en matière de diagnostic des patients avec suspicion de tuberculose. En parallèle avec les kits PCR et TRC (Transcription Reverse transcription), tous deux approuvés au Japon, notre kit a été utilisé sur des crachats collectés sur deux jours (320 prélevements provenant de 160 patients), et les résultats ont été comparés entre les kits. Il est à noter que le test sur notre produit incluait une évaluation des solutions d'ADN extraits de crachats non traités (désignée ci-après "LAMP sur crachat non traité") et une évaluation pour les solutions d'ADN provenant des crachats préalablement traités au NALC-NaOH et quelques autres procédures de prétraitements (désignés ci-après "LAMP sur crachat prétraités").

Comme indiqué dans les tableaux ci-après, les taux de concordance totaux se sont avérés favorables : LAMP sur crachat non traité vs. PCR: 91,5% (291/318 sujets); LAMP sur crachat prétraités vs. PCR: 92,1% (293/318); LAMP sur crachat non traité vs. TRC: 94,3% (230/244); LAMP sur crachat prétraité vs. TRC: 93,0% (227/244). De plus, les résultats par détection de la turbidité en temps réel et ceux par la détection visuelle de la fluorescence concordaient totalement, à l'exception d'un seul spécimen (ce dernier étant un crachat avec beaucoup de sang, devenait faux-positif par la détection visuelle de fluorescence par une interférence due à la présence du sang). Les deux types de résultats ont été considérés comme étant identiques, et le tableau ci-dessous montre les résultats des Téts par la détection de turbidité en temps réel. Les résultats par détection visuelle de fluorescence utilisant le HumaLoop T étaient similaires à ceux par turbidimètre à temps réel.

LAMP		PCR		Taux de concordance totale
		Positif	Négatif	
Crachats non traités	Positif	196	7	91,5% (291/318)
	Négatif	20	95	
Crachats prétraités	Positif	194	3	92,1% (293/318)
	Négatif	22	99	

LAMP		TRC		Taux de concordance totale
		Positif	Négatif	
Crachats non traités	Positif	163	5	94,3% (230/244)
	Négatif	9	67	
Crachats prétraités	Positif	157	2	93,0% (227/244)
	Négatif	15	70	

RÉFÉRENCES DE COMMANDE

Code produit	Nom du produit	Contenu
972000	Loopamp™ MTBC Detection Kit	96 tests
970000	Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit	90 tests
971000	Pipette-60 Set	1 pipette; 4 X 96 cônes
961000	HumaLoop T	1 unité principale 1 unité d'évaluation visuelle de fluorescence
963200	HumaTurb C	1 unité de contrôle 1 unité d'amplification

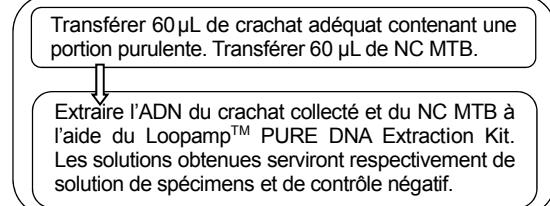
RÉFÉRENCES

- (1) Notomi T., et al.: Nucleic Acids Research 28, No. 12, e63 (2000)
- (2) Nagamine K., et al.: Clin. Chem. 47, No. 9, 1742–1743 (2001)
- (3) Mori Y., et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 289, No. 1, 150–154 (2001)
- (4) Tomita N., et al.: Nat. Protoc. 3, No. 5, 877–882 (2008)
- (5) Directives pour la sécurité et risque biologique (Société Japonaise de Bactériologie): Japanese Journal of Bacteriology 54, No. 3, 667–715 (1999)
- (6) WHO global TB database:
<http://www.who.int/tb/country/en/>
http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/update/a-1_summary.pdf
http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/update/a-3_summary.pdf
- (7) Kekkaku No Tokei 2009 (Statistics of TB 2009): Japan Anti-Tuberculosis Association

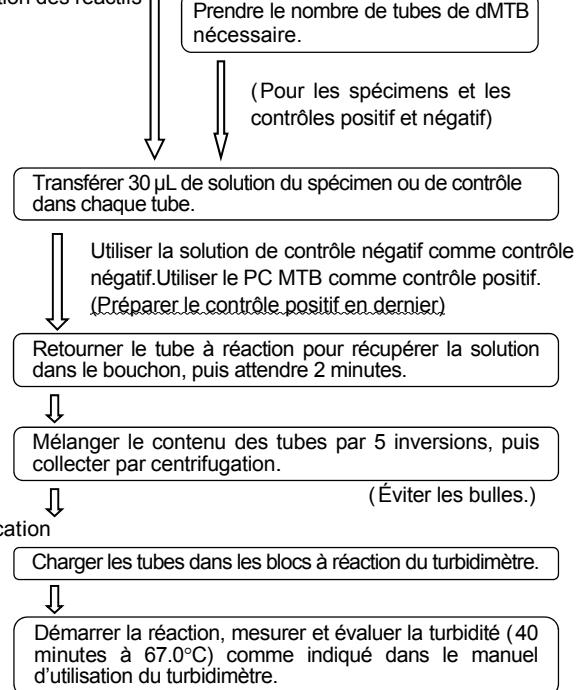
Diagramme

Procédure opératoire pour une détection au turbidimètre à temps réel

Préparation des solutions des spécimens et de contrôles négatifs



Préparation des réactifs



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



Distributeur exclusif

HUMAN Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH,
Max-Planck-Ring 21 65205 Wiesbaden Germany



EIKEN CHEMICAL CO., LTD.
4-19-9, Taito, Taito-ku, Tokyo 110-8408, Japan



Instrucciones de uso

Human
Diagnostics Worldwide

Español

REF 972000

Loopamp™ MTBC Detection Kit

USO PREVISTO

El Loopamp™ MTBC Detection kit es un dispositivo de diagnóstico para la detección cualitativa *in vitro* de ADN del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) en muestras de esputo de pacientes con síntomas indicativos de infección de MTBC.

PRINCIPIOS DE LA PRUEBA

Este producto aplica el método de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos (método LAMP) desarrollado por Eiken Chemical Co., Ltd.

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

Los cebadores suministrados con este producto han sido diseñados en el gen *gyrB* y la región IS del ADN del genoma de MTBC. Esta región ha sido confirmada mediante análisis de alineamiento de secuencias de MTBC y micobacterias no tuberculosas para tener una secuencia relativamente bien conservada de MTBC.

El ADN de esputos no tratados o esputos tratados con NALC-NaOH se extrae con el Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit (se vende por separado). Se dispensa entonces la solución de ADN en un tubo de reacción. La ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de cadena, los trifosfatos deoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), la calceína y los cebadores específicos de MTBC deben almacenarse en polvo dentro de la tapa del tubo de reacción. Este reactivo LAMP en polvo se reconstituye al añadir una solución ADN. El tubo de reacción se incuba a 67,0°C y el ADN se amplifica mediante catálisis por la ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de cadena según la reacción LAMP.

La detección de productos amplificados se basa en la medición por turbidez de un subproducto, pirofosfato de magnesio (precipitado blanco).⁽³⁾ También se puede visualizar con una fuente de luz ultravioleta. Durante la amplificación, se libera la calceína contenida en el reactivo LAMP en polvo, generando una luz fluorescente que se puede ver a simple vista.⁽⁴⁾ Antes de la reacción, la calceína contenida en el reactivo se encuentra "apagada" debido a la proliferación de iones de manganeso; sin embargo, cuando la reacción LAMP comienza, los iones de pirofosfato se unen a los iones de manganeso y la calceína de vuelve fluorescente.⁽⁴⁾

CONTENIDO DEL KIT

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

Reactivos de detección MTBC 2 X 48 tubos

Cada tubo de reacción contiene los siguientes ingredientes en polvo

- ADN polimerasa *Bst*¹
- Trifosfatos deoxinucleótidos
- Sulfato manganésico
- Calceína
- Cloruro de manganeso
- Cebadores²

Control positivo MTB (PC MTB)³ 1 X 0,4 mL

Control negativo MTB (NC MTB) 3 X 0,5 mL

Cuentagotas de 30 µL 1 X 18 cuentagotas

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

*2: cebadores diseñados en la subunidad B de la ADN girasa (*gyrB*) y la secuencia de inserción *IS6110* (IS) en el ADN del genoma de MTBC purificados con oligonucleótidos sintetizados por HPLC.

*3: PC MTB contiene un producto derivado de la amplificación *in vitro* de un ADN genómico de una muestra de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (GenBank No. NC_000962).

En los recipientes están impresas las abreviaciones de los nombres de los siguientes reactivos, el nº de lote y el nombre del fabricante (EKN).

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

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- (1) Sólo para diagnóstico *in vitro*.
- (2) Este producto está diseñado únicamente para diagnósticos clínicos de MTBC a partir de muestras de esputo de origen humano. No debe utilizarse para otros propósitos.
- (3) Cuando utilice este producto, siga siempre las instrucciones del prospecto.
- (4) No congele los reactivos.
- (5) No utilice reactivos caducados.
- (6) No mezcle lotes distintos.
- (7) No rellene ningún reactivo.
- (8) El rendimiento del Loopamp™ MTBC Detection Kit depende de la competencia del operario y del cumplimiento de las presentes instrucciones. Las pruebas sólo deben ser realizadas por personal debidamente capacitado.
- (9) Retire del embalaje el número necesario de tubos de reacción justo antes de utilizarlos y cierre inmediatamente la bolsa de aluminio.
- (10) No retire el desecante de la bolsa de aluminio. Un elevado nivel de humedad podría deteriorar el reactivo LAMP en polvo de los tubos de reacción.
- (11) La exposición al calor y a la luz puede deteriorar el dMTB. Retire únicamente el número necesario de tubos de reacción (número de muestras + número de controles) y cierre inmediatamente los tubos que no utilice.
- (12) Lea las instrucciones de la incubadora antes de utilizarla.
- (13) Las muestras de esputo son potencialmente infecciosas. Tome todas las medidas necesarias para evitar la exposición al riesgo biológico.⁽⁵⁾
- (14) Tanto el PC MTB como el NC MTB contienen una pequeña cantidad de azida sódica como conservante. La azida sódica es considerada tóxica. Evite el contacto con los ojos, la boca o la piel.
- (15) En caso de contacto accidental de cualquier reactivo con los ojos, la boca o la piel, aclare inmediatamente la zona afectada con agua abundante y, en caso necesario, consulte a un médico.
- (16) No diluya ni añada el PC MTB a las muestras. Utilice el PC MTB siguiendo las indicaciones del presente prospecto para evitar la contaminación de ADN.
- (17) Guarde el control positivo PC MTB y cualquier muestra positiva de esputo por separado de otros reactivos.
- (18) La tapa de cada tubo de reacción contiene dMTB en polvo. No toque el interior de la tapa.
- (19) Antes de utilizar los tubos de reacción, compruebe que no presenten grietas ni arañazos. Los tubos deteriorados pueden dar resultados falsos y contaminar el ADN de la incubadora y del área de trabajo.
- (20) No exponga los tubos de reacción a una fuente de luz ultravioleta antes de terminarse la reacción LAMP. La exposición prolongada a la luz UV puede deteriorar los tubos y dar resultados falsos.
- (21) Si utiliza una lámpara UV para evaluación visual de fluorescencia, no mire directamente a la luz UV. La luz ultravioleta es perjudicial para los ojos y mirarla incluso por un período breve puede irritarlos y causar síntomas similares a la conjuntivitis. Utilice una pantalla de vidrio, o lleve gafas o una máscara de protección ocular cuando tenga que mirar directamente a la lámpara UV.
- (22) Consulte el manual de la incubadora. Cuando utilice la HumaLoop T o el turbidímetro en tiempo real HumaTurb C, preste atención al retirar los tubos de reacción de la incubadora para no quemarse.

ELIMINACIÓN DE RESIDUOS

- (1) No abra los tubos después de la amplificación de ADN. Mantenga la tapa cerrada y elimine los tubos usados como residuos médicos por incineración o introduzcalos en una bolsa doble plástica sellada.
- (2) No esterilice con autoclave ni reutilice los tubos de reacción, ya que los productos amplificados se dispersarán y provocarán una contaminación.
- (3) El material principal para los tubos de reacción, los tubos de reactivos y el cuentagotas de 30 µL es PP; la bandeja de los tubos de reacción es de PET; la bolsa de aluminio es de aluminio; el estuche es de papel.
- (4) La eliminación de cualquier reactivo, recipiente o artículo de

laboratorio debe realizarse de acuerdo con la normativa local.

RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

- (1) Utilice la parte más purulenta de la muestra de esputo.
- (2) Las muestras de esputo se deben utilizar inmediatamente después de ser tomadas.
- (3) Guarde las muestras de esputo en una habitación separada de la sala de amplificación LAMP. Durante la toma de esputo se pueden generar aerosoles que contienen ADN de MTBC y pueden causar una contaminación.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

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

Para detección visual de fluorescencia

(Para HumaLoop T)

- HumaLoop T

(Para otra incubadora con lámpara UV)

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

Para detección de turbidez en tiempo real

- HumaTurb C
- Centrifugadora para ocho tubos conectados

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

1) Reactivo de detección de MTBC

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

Nota: tras retirar los tubos necesarios, cierre inmediatamente la bolsa de aluminio original con los tubos que no necesite.

2) Control negativo MTB (NC MTB)

Agite bien el tubo (centrifugar) antes de usarlo para recuperar el contenido del fondo del tubo. Pipetee 60 μL de NC MTB en el tubo térmico suministrado con el Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit. Siga las instrucciones de uso del Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit para preparar el NC.

Nota: se debe incluir un control negativo en cada prueba LAMP.

3) Control positivo MTB (PC MTB)

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

Nota: se debe medir el PC MTB cada vez.

PROCEDIMIENTO DE MEDICIÓN

Extracción de ADN

Para extraer el ADN de una muestra de esputo, sigas las instrucciones del Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit (se vende por separado). Dispense 60 μL de muestra de esputo en el tubo de reacción y cargue el tubo de reacción en el bloque térmico precalentado a 90°C . Utilice siempre que sea posible el esputo más purulento.

Mezcla de reactivo y muestra

- (1) Encienda la incubadora HumaLoop T o el turbidímetro en tiempo real.
- (2) Dispense 30 μL de solución de muestra en un tubo de reacción mediante el Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit y cierre la tapa.
Nota: el volumen entre las dos líneas en el tubo de reacción corresponde a 30 μL aprox.
- (3) Dispense 30 μL de NC MTB en un tubo de reacción mediante el Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit y cierre la tapa.
Nota: el volumen entre las dos líneas en el tubo de reacción corresponde a 30 μL aprox.
- (4) Dispense 30 μL de PC MTB en un tubo de reacción mediante el cuentagotas suministrado y cierre la tapa.
- (5) Agite bien todos los tubos (centrifugar) para recuperar la solución del fondo de los tubos.
Nota: asegúrese de que el nivel de líquido esté en medio de las dos líneas del tubo de reacción para garantizar un pipeteado de 30 μL .
- (6) Reconstituya el reactivo en polvo de la tapa invirtiendo los tubos de reacción y con la solución de ADN. Deje los tubos boca abajo durante 2 minutos para reconstituir el reactivo en polvo.
- (7) Invierte los tubos de reacción cinco veces para mezclar el contenido. Asegúrese de que el reactivo en polvo de la tapa está bien disuelto.
- (8) Agite bien los tubos (centrifugar) para recuperar el contenido del fondo de los tubos.

Amplificación

Para detección visual de fluorescencia

(Para HumaLoop T)

- (1) Compruebe que la temperatura de la incubadora sea $67,0^{\circ}\text{C}$.
- (2) Coloque los tubos de reacción en la incubadora HumaLoop T y pulse el botón verde para lanzar la reacción LAMP (40 minutos a $67,0^{\circ}\text{C}$). Consulte el manual de instrucciones de la HumaLoop T para más detalles sobre el funcionamiento de la incubadora.
- (3) Confirme la finalización de la inactivación de la polimerasa (automáticamente completada por la HumaLoop T). Tome todos los tubos de reacción de la HumaLoop T.

(Para otra incubadora con lámpara UV)

- (1) Ajuste la temperatura de la incubadora (con cubierta térmica; precisión de temperatura: $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$) a $67,0^{\circ}\text{C}$. Espere a que la temperatura visualizada alcance el valor definido.
- (2) Coloque los tubos de reacción y lance la reacción de amplificación (40 minutos a $67,0^{\circ}\text{C}$).
- (3) 40 minutos después, inactive la polimerasa con el bloque térmico (5 minutos a 80°C o 2 minutos a 95°C) para terminar la reacción.

Para la detección de turbidez en tiempo real con HumaTurb C (consulte el Diagrama)

- (1) Configure el turbidímetro en tiempo real HumaTurb C para la detección con este producto.
- (2) Compruebe que la temperatura visualizada alcanza $67,0^{\circ}\text{C}$ (deje calentar el turbidímetro 20 minutos antes de utilizarlo).
- (3) Coloque los tubos de reacción y lance la medición.
- (4) Compruebe en la pantalla del turbidímetro los controles positivo y negativo para cada aumento de turbidez. Si la turbidez aumenta en PC MTB pero no en la solución de control negativo significa que la reacción de amplificación se realiza correctamente (Fig1). Si no sucede esto, la reacción de amplificación puede no estar ocurriendo correctamente. En tal caso, vuelva a realizar la prueba desde la preparación del reactivo.
- (5) Confirme la finalización de la inactivación de la polimerasa (automáticamente completada por el turbidímetro). Tome todos los tubos de reacción del turbidímetro y deséchelos sin abrirlos.

Diagramas de amplificación

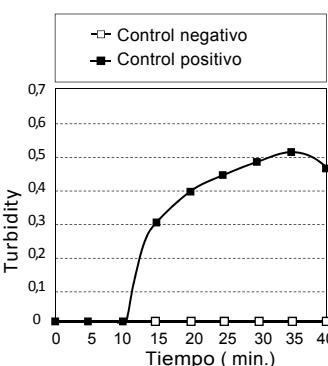


Fig1 : Diagramas de amplification para controles

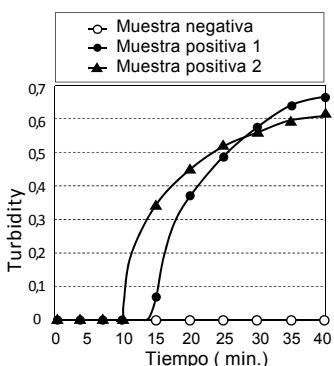


Fig2 : Diagramas de amplification para muestras

NOTAS SOBRE PROCEDIMIENTO

- (1) Limpie las superficies de trabajo con hipoclorito de sodio al 0,5 % mínimo antes de realizar la prueba.
- (2) La reacción LAMP es muy sensible y la contaminación con una pequeña cantidad de productos amplificados puede dar resultados falsos.
- (3) Separe la toma de esputo de las áreas de pruebas LAMP.
- (4) Tome todas las medidas necesarias para evitar la contaminación, en particular, cambie los guantes después de transferir el esputo o si toca con ellos la solución de ADN.
- (5) Al manejar este producto, evite la contaminación microbiana y de nucleasas. Hasta una pequeña cantidad de DNase transmitida a partir del sudor o la saliva al tubo de reacción puede descomponer el ADN y dar resultados falsos.
- (6) No utilice muestras de esputo con gran cantidad de sangre, ya que se pueden alterar las mediciones.
- (7) La solución de ADN se debería idealmente utilizar justo después de la preparación. Si no es posible, la solución de ADN se puede guardar a temperatura ambiente y utilizar dentro de las 72 horas siguientes.
- (8) Al dispensar la solución en el tubo de reacción, evite el contacto entre el inyector del Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit y las paredes interiores de los tubos de reacción. Mantenga recto el rack y llene el tubo hasta que el nivel de la solución de ADN figure entre las dos líneas (30 μL).

(9) (Para HumaLoop T u otra incubadora con lámpara UV)

Si aparecen burbujas, agite los tubos para eliminarlas.

(Para turbidímetro en tiempo real HumaTurb C)

Las burbujas en la solución de reacción pueden interferir con la medición de turbidez y dar resultados falsos, por lo que se debe

- evitar la aparición de burbujas al mezclar el reactivo y la solución de muestra. Si aparecen burbujas, centrifugue los tubos para eliminarlas.
- (10) dMTB debería estar completamente disuelto. Cualquier porción sin disolver puede alterar los resultados, por ejemplo, disminuyendo la sensibilidad.
- (11) El PC MTB contiene un elevado número de copias de ADN. Evite toda contaminación de otras muestras con el PC MTB. Dispense las muestras y el NC MTB y cierre todos los tubos de reacción antes de dispensar el PC MTB.
- (12) Agite bien (centrifugar) el tubo de PC MTB antes de abrirlo para recuperar el contenido del fondo del tubo. Cierre el tubo inmediatamente después de dispensar el PC MTB.
- (13) Si utiliza la incubadora HumaLoop T o el turbidímetro en tiempo real HumaTurb C, la inactivación de polimerasa es realizada automáticamente.
- (14) No abra nunca los tubos de reacción una vez comenzada la reacción LAMP o tras su finalización. Preste mucha atención al retirar los tubos de reacción de la incubadora y que no se abran accidentalmente.
- (15) No reutilice ningún producto amplificado en los tubos para electroforesis u otras aplicaciones.
- (16) Para otros turbidímetros en tiempo real o incubadoras, una vez seleccionada la fluorescencia visual, inactive la polimerasa (5 minutos a 80°C o 2 minutos a 95°C) antes de evaluar; de lo contrario, se podrían alterar los resultados.
- (17) Para el turbidímetro en tiempo real u otra incubadora, si se utiliza una lámpara UV, no mire directamente a la luz UV. Utilice una pantalla de vidrio, o lleve gafas o una máscara de protección ocular cuando tenga que mirar directamente a la lámpara.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Para detección visual de fluorescencia

(Para HumaLoop T)

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

(Para otra incubadora con lámpara UV)

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

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

- Control positivo: se emite una luz verde fluorescente.
 - Control negativo: no se emite una luz verde fluorescente.
- Si ningún control es válido, todas las muestras deben ser consideradas inválidas y habrá que repetir la prueba.
- Una vez que se confirma que la ejecución de la prueba es válida, evalúe las muestras como se indica a continuación:
- Muestra positiva: se emite una luz verde fluorescente.
 - Muestra negativa: no se emite una luz verde fluorescente.

Para detección de turbidez en tiempo real HumaTurb C

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

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

Notas:

- (1) La sensibilidad detectable mínima de este producto es de 0,38 equivalentes de genoma por prueba. Incluso con una prueba negativa, los pacientes con síntomas persistentes indicativos de infección por MTBC deben pasar una nueva revisión.
- (2) Aunque los cebadores se han diseñado para una región con pocas variaciones, el MTBC podría tener más variaciones en esta región y reducir su sensibilidad al producto. Por tanto, una prueba negativa no siempre permite descartar la infección por MTBC.
- (3) Los resultados de la prueba pueden verse alterados en el proceso de recolección y transporte de las muestras, la preparación de las muestras, los inhibidores y otros errores de procedimiento de laboratorio. Una prueba negativa no excluye la presencia de MTBC en la muestra. A la hora de realizar un diagnóstico clínico, hay que considerar el estado clínico del paciente y todos los resultados de laboratorio disponibles.
- (4) Este producto es un kit para detección cualitativa; no está diseñado para medición cuantitativa. La intensidad de la luz fluorescente observada o el aumento de la turbidez medido con el turbidímetro en tiempo real no se corresponden con el número de matrices de ADN.

SUSTANCIAS INTERFERENTES

Nuestros estudios internos han revelado que dicha medición no se vio afectada por la presencia de bilirrubina libre (91,0 mg/dL), bilirrubina conjugada (101,0 mg/dL), quilo (turbidez de formacina: 7.300) y

hemoglobina hemolítica (2.475 mg/dL).

Respecto a los fármacos, nuestros estudios internos han revelado que dicha medición no se vio afectada por la presencia de isoniazida (100 µg/mL), etambutol (20 µg/mL), rifampicina (100 µg/mL), pirazinamida (500 µg/mL), kanamicina (20 µg/mL) y estreptomicina (500 µg/mL).

CARACTERÍSTICAS DE RESULTADOS

1. Sensibilidad y precisión

Al realizar la prueba de las siguientes muestras:

- muestra negativa (concentración: 0 equivalente de genoma /prueba)
- muestra positiva 1 (1,875 equivalentes de genoma/prueba)
- muestra positiva 2 (125 equivalentes de genoma/prueba)

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

2. Reproducibilidad del método

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

3. Límite de detección

0,38 equivalentes de genoma /prueba

4. Reactividad cruzada

En cuanto a la micobacteria no tuberculosa y a la bacteria respiratoria, el sistema de medición da resultados negativos para todas las especies bacterianas como se describe en la siguiente tabla; no se produce reactividad cruzada.

Nontuberculosa mycobacteria	
<i>Mycobacterium avium</i>	Negativo
<i>Mycobacterium kansasii</i>	Negativo
<i>Mycobacterium marinum</i>	Negativo
<i>Mycobacterium simiae</i>	Negativo
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	Negativo
<i>Mycobacterium szulgai</i>	Negativo
<i>Mycobacterium gordonaiae</i>	Negativo
<i>Mycobacterium xenopi</i>	Negativo
<i>Mycobacterium avium</i>	Negativo
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	Negativo
<i>Mycobacterium gastri</i>	Negativo
<i>Mycobacterium haemophilum</i>	Negativo
<i>Mycobacterium malmoense</i>	Negativo
<i>Mycobacterium cheloneae</i>	Negativo
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	Negativo
<i>Mycobacterium flavescentis</i>	Negativo
Bacteria respiratoria	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Negativo
<i>Staphylococcus aureus</i>	Negativo
<i>Haemophilus influenzae</i>	Negativo
<i>Moraxella catarrhalis</i>	Negativo
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Negativo
<i>Escherichia coli</i>	Negativo
<i>Legionella pneumophila</i>	Negativo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Negativo
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (I)	Negativo
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (II)	Negativo
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (III)	Negativo

5. Reactividad ante MTBC

Reactividad ante *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, y *Mycobacterium africanum* confirmada.

6. Información sobre calibrador

En la prueba de rendimiento para este producto se utilizó ADN plasmídico con *gyrB* y región IS del genoma ADN de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (GenBank No. NC_000962) como calibrador.

7. Resultados clínicos

La tuberculosis sigue siendo una de las infecciones más extendidas en el mundo. El número total estimado de nuevos casos de tuberculosis ronda los 9,4 millones de personas en todo el mundo y el de enfermos con baciloscofa positiva del esputo alcanza los 4,3 millones (2008; datos publicados por la OMS).⁽⁶⁾ En Japón, se registraron 24.760 nuevos casos de tuberculosis en 2008, 2.216 de los cuales fallecieron (Kekkaku No Tokei 2009, Estadísticas de TB 2009).⁽⁷⁾

Este producto fue examinado en dos instituciones de atención médica especializadas en enfermedades infecciosas de Clase 2 (instituciones de atención médica designadas que disponen de camas exclusivas para pacientes con Tuberculosis) para realizar en pacientes con sospecha de tuberculosis. Junto con PCR y TRC,

ambos aprobados en Japón, este kit se utilizó para probar muestras de esputo recolectado durante dos días (320 muestras de 160 sujetos) y se compararon los resultados obtenidos con los distintos kits. Las pruebas realizadas con este producto incluían evaluaciones a partir de solución de extracto de ADN obtenido de esputo no tratado (en lo sucesivo, denominado LAMP para esputo no tratado) y a partir de solución de extracto de ADN obtenida de esputo pretratado con NALC-NaOH y otros procesos (en lo sucesivo, denominado LAMP para esputo pretratado).

Como indican las tablas a continuación, el porcentaje de concordancia global fue favorable: LAMP para esputo no tratado vs PCR: 91,5 % (291/318 sujetos); LAMP para esputo pretratado vs PCR: 92,1 % (293/318); LAMP para esputo no tratado vs TRC: 94,3 % (230/244); LAMP para esputo pretratado vs TRC: 93,0 % (227/244). Asimismo, las evaluaciones realizadas mediante detección de turbidez en tiempo real y las efectuadas mediante detección visual de fluorescencia coincidieron totalmente, salvo en una muestra. (Esta muestra fue esputo sanguinolento y dio falso negativo en la detección visual de fluorescencia debido a la alteración producida por la sangre). Por tanto, consideramos los dos tipos de evaluaciones idénticas y las tablas muestran los resultados de las pruebas obtenidos mediante los obtenidos con el turbidímetro en tiempo real.

LAMP		PCR		Porcentaje de concordancia
		Positivo	Negativo	
Esputo no tratado	Positivo	196	7	91,5% (291/318)
	Negativo	20	95	
Esputo pretratado	Positivo	194	3	92,1% (293/318)
	Negativo	22	99	

LAMP		TRC		Porcentaje de concordancia
		Positivo	Negativo	
Esputo no tratado	Positivo	163	5	94,3% (230/244)
	Negativo	9	67	
Esputo pretratado	Positivo	157	2	93,0% (227/244)
	Negativo	15	70	

INFORMACIÓN DE PEDIDOS

Código de producto	Nombre de producto	Contenido
972000	Loopamp™ MTBC Detection Kit	96 pruebas
970000	Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit	90 pruebas
971000	Pipette-60 Set	1 pipeta; 4 x 96 puntas
961000	HumaLoop T	1 unidad principal 1 Unidad de control visual de fluorescencia
963200	HumaTurb C	1 unidad principal 1 unidad de amplificación

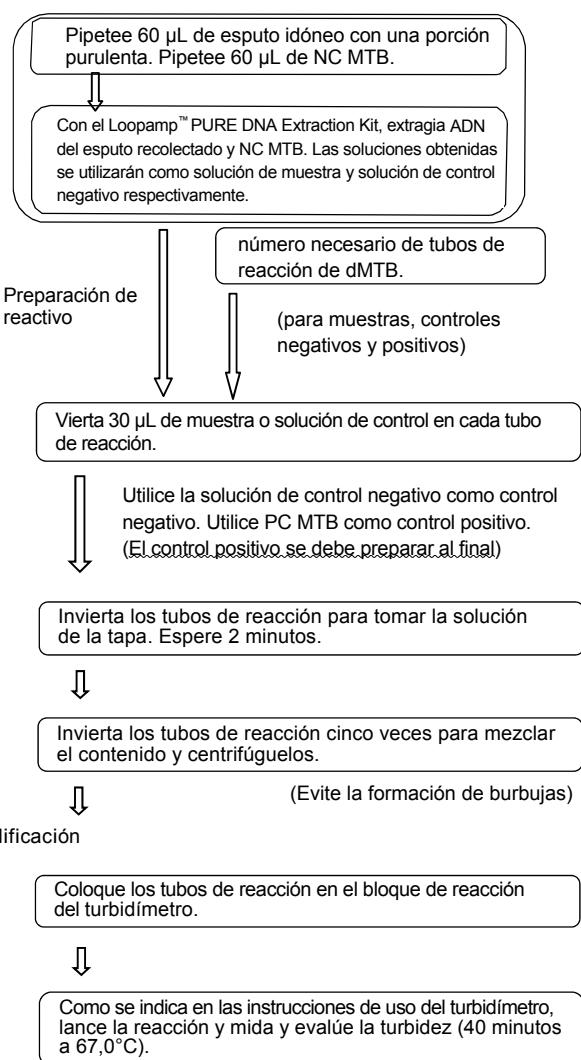
BIBLIOGRAFÍA

- (1) Notomi T., et al.: Nucleic Acids Research 28, No. 12, e63 (2000)
- (2) Nagamine K., et al.: Clin. Chem. 47, No. 9, 1742–1743 (2001)
- (3) Mori Y., et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 289, No. 1, 150–154 (2001)
- (4) Tomita N., et al.: Nat. Protoc. 3, No. 5, 877–882 (2008)
- (5) 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) WHO global TB database:
<http://www.who.int/tb/country/en/>
http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/update/a-1_summary.pdf
http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/update/a-3_summary.pdf
- (7) Kekkaku No Tokei 2009 (Statistics of TB 2009): Japan Anti-Tuberculosis Association

Diagrama

Principios de funcionamiento para la detección de turbidez en tiempo real

Preparación de la solución de muestra y la solución de control negativo



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



Distribuidor exclusivo



HUMAN Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH,
Max-Planck-Ring 21 65205 Wiesbaden Germany



EIKEN CHEMICAL CO., LTD.
4-19-9, Taito, Taito-ku, Tokyo 110-8408, Japan

Fecha de revisión: 1 de octubre de 2019



Gebrauchsanweisung

Human
Diagnostics Worldwide

Deutsch

REF 972000

Loopamp™ MTBC Detection Kit

VERWENDUNGSZWECK

Das Loopamp™ MTBC Detection Kit ist ein qualitativer In Vitro diagnostischer Test für den Nachweis von *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) DNA, die aus Sputum von Patienten mit Verdacht auf eine MTBC Infektion isoliert wurde.

TESTPRINZIP

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

Die Primer in diesem Produkt erkennen Abschnitte in der *gyrB* und IS Region im MTBC Genom. Diese Regionen wurden durch Übereinstimmungsanalysen der ausgewählten Nukleinsäuresequenz von MTBC und nichttuberkulösen Mykobakterien als gut konservierte Regionen in MTBC identifiziert.

Die DNA von unbehandeltem oder NALC-NaOH behandeltem Sputum wird mit dem Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit (separat erhältlich) extrahiert. Anschließend wird die DNA Lösung in ein Reaktionsröhrchen überführt. Die Strang-Displacement DNA Polymerase, die Nukleotidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP and dTTP), Calcein und MTBC spezifische Primer liegen getrocknet im Deckel des Reaktionsröhrchens vor. Diese getrockneten LAMP Reagenzien (MTBC Detektionsreagenz, dMTB) werden rekonstituiert, wenn die DNA Lösung dazugegeben wird. Die Reaktion wird bei 67°C inkubiert und die DNA durch die Katalyse mittels Strang-Displacement DNA Polymerase während der LAMP Reaktion amplifiziert. Der Nachweis der amplifizierten Produkte basiert auf Trübungsmessung des Nebenproduktes Magnesiumpyrophosphat (weißes Präzipitat)⁽³⁾.

Während der Amplifikation wird das im Calcein getrocknete LAMP Reagenz freigesetzt und das dabei entstehende Fluoreszenzlicht kann mit dem Auge detektiert werden.⁽⁴⁾ Vor der Reaktion ist das Calcein im getrockneten Reagenz, bedingt durch die Bindung von Manganionen, im gehemmten Zustand. Nach dem Start der LAMP Reaktion werden Pyrophosphationen gebildet, welche die Manganionen binden und das Calcein kann fluoreszieren.⁽⁴⁾

KITBESTANDTEILE

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

MTBC Detektionsreagenz 2 X 48 Röhrchen

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

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

Positivkontrolle MTB (PC MTB)³ 1 X 0.4 mL

Negativkontrolle MTB (NC MTB) 3 X 0.5 mL

30 µL Tropfkapillare 1 X 18 Stück

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

*2: Primer wurden zum Nachweis der DNA Gyrase Untereinheit B (*gyrB*) und der Insertionssequenz *IS6110* (IS) in der genomischen DNA von MTBC hergestellt und aus synthetisierten Oligonukleotiden mittels HPLC aufgereinigt.

*3: PC MTB enthält ein Produkt, das durch *in vitro* Amplifikation einer Template DNA aus dem Genom von *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (GenBank No. NC_000962) gewonnen wurde.

Die Abkürzungen der Namen folgender Reagenzien, die Lot Nummer und der Hersteller (EKN) sind auf die Boxen gedruckt und die Reagenzbezeichnungen befinden sich auf dem Deckelcode.

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

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- (1) Nur für den Gebrauch in der In Vitro Diagnostik.
- (2) Dieses Produkt wurde nur für die klinische Diagnose von MTBC aus Sputumproben menschlichen Ursprungs hergestellt. Nicht für andere Zwecke verwenden.
- (3) Immer die Gebrauchsanweisung beachten, wenn das Produkt verwendet wird.
- (4) Reagenzien nicht einfrieren.
- (5) Keine abgelaufenen Reagenzien verwenden.
- (6) Unterschiedliche Lots nicht mischen.
- (7) Reagenzien nicht wieder auffüllen.
- (8) Die Testleistung des Loopamp™ MTBC Detection Kit ist von den Fähigkeiten des Anwenders und dem Beachten der Gebrauchsanweisung abhängig. Der Test sollte nur von geschultem Personal durchgeführt werden.
- (9) Die benötigte Anzahl der Reaktionsröhrchen entnehmen und den Aluminiumbeutel sofort danach wieder verschließen.
- (10) Das Trockenmittel nicht aus dem Aluminiumbeutel entfernen. Hohe Feuchtigkeit kann das getrocknete LAMP Reagenz in den Reaktionsröhrchen verderben.
- (11) Licht- und Hitzeexposition können dMTB unbrauchbar machen. Nur die benötigte Anzahl von Reaktionsröhrchen (Anzahl der Proben +Kontrollen) entnehmen und nicht verwendete Röhrchen sofort wieder verschließen.
- (12) Vor Verwendung die Gebrauchsanweisung des Inkubators lesen.
- (13) Sputumproben sind potenziell infektiös und müssen entsprechend behandelt werden, um Biogefährdung zu vermeiden.⁽⁵⁾
- (14) PC MTB und NC MTB enthalten geringen Mengen von Natriumazid als Konservierungsmittel. Natriumazid wird als toxisch eingestuft. Kontakt mit Augen, Mund oder Haut vermeiden.
- (15) Bei Kontakt von Augen, Mund und Haut mit Reagenzien, sofort mit viel Wasser ausspülen. Wenn notwendig, medizinische Hilfe in Anspruch nehmen.
- (16) PC MTB nicht zur Patientenprobe geben oder damit verdünnen. PC MTB nur so verwenden, wie es in der Gebrauchsanweisung steht, um DNA Kontaminationen zu vermeiden.
- (17) PC MTB und positive Sputumproben getrennt von anderen Kitkomponenten aufbewahren.
- (18) Der Deckel jedes Reaktionsröhrchens enthält dMTB in getrockneter Form. Die Innenseite des Deckels nicht berühren.
- (19) Vor Verwendung der Reaktionsröhrchen prüfen, ob es Brüche oder Kratzer aufweist. Beschädigte Röhrchen können zu falschen Ergebnissen und DNA Kontaminationen im Inkubator oder des Arbeitsbereiches führen.
- (20) Die Reaktionsröhrchen nicht UV Licht vor Ende der LAMP Reaktion aussetzen. Dies kann zu Beschädigungen des Röhrchens oder falschen Ergebnissen führen.
- (21) Wird eine UV Lampe für den visuellen Nachweis verwendet, nicht direkt in das UV Licht sehen. Eine kurze Exposition mit UV Licht ist für Augen schädlich und kann schon nach kurzer Zeit zu Augenirritationen und Symptomen ähnlich einer Konjunktivitis führen. Glasschirme, Brillen oder Augenmasken verwenden, wenn direkt in die UV Lampe gesehen wird.
- (22) Vor Gebrauch, User Manual für den Inkubator lesen. Wenn HumaLoop T oder HumaTurb verwendet werden, die Reaktionsröhrchen vorsichtig aus dem Inkubator nehmen, um Verbrennungen zu vermeiden.

ABFALLENTSORGUNG

- (1) Röhrchen nicht nach der DNA Amplifikation öffnen. Das Röhrchen geschlossen lassen und als medizinischen Abfall in zwei übereinander gezogenen, verschlossenen Plastikbeuteln entsorgen.
- (2) Reaktionsröhrchen niemals autoklavieren und wieder verwenden. Die Röhrchen würden auslaufen und Kontaminationen verursachen.

- (3) Reaktionsröhren, Reagenzienröhren und die 30 µL Tropfpipetten bestehen aus PP, der Reagenzienständer aus PET, der Beutel aus Aluminium und die Kitbox aus Papier.
- (4) Verwendete Reagenzien, Labormaterial und Boxen nach den lokalen Bestimmungen entsorgen.

BENÖTIGTES MATERIAL, NICHT ENTHALTEN

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

Für den visuellen Fluoreszenznachweis

(Mit HumaLoop T)

- HumaLoop T

(Für andere Inkubatoren und UV Lampen)

- Inkubator (Temperaturgenauigkeit: ±0,5°C; mit Heizdeckel)
- Heizblock
- UV Lampe (Wellenlänge: 240- 260 nm und 350- 370 nm)
- Brille und Augenschutzmaske

Für den Nachweis mit dem Real-Time Turbidimeter

- Zentrifuge für acht verbunden Röhrchen

(Mit HumaTurb C)

- Real-Time Turbidimeter (nur zur Verwendung mit der LAMP Methode; Wellenlänge: 600-700 nm; Amplifikationstemperatur: 67,0°C)

VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

1) MTBC Detektionsreagenz

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

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

2) Negativkontrolle MTB (NC MTB)

Vor Verwendung Röhrchen anzentrifugieren, damit sich der Inhalt auf dem Boden des Röhrchens sammelt. 60 µL NC MTB in das Lyseröhrchen, das in dem Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit enthalten ist, pipettieren. Der Gebrauchsanweisung des Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit für die Aufarbeitung der NC folgen.

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

3) Positivkontrolle MTB (PC MTB)

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

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

MESSMETHODE

DNA Extraktion

Um DNA aus der Sputumprobe zu extrahieren, die Gebrauchsanweisung des Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit (separat erhältlich) beachten. Verzichtet werden 60 µL von Sputum Probe in das Heizrohr, und laden Sie das Heizrohr in den Heizblock bei 90°C vorgewärmt. Verwenden Sie die meisten eitrigen Auswurf, wann immer möglich.

Mischen von Reagenzien und Probe

- (1) Den Inkubator HumaLoop T oder Real-Time Turbidimeter HumaTurb C einschalten.
- (2) 30 µL der mit dem Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit gewonnenen DNA Lösung in das Reaktionsröhren pipettieren und das Röhrchen verschließen.

Beachte: Der Flüssigkeitsstand sollte zwischen den zwei Linien auf dem Reaktionsröhren liegen. Das entspricht ungefähr 30µL.

- (3) 30 µL der mit dem Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit gewonnenen NC MTB in ein Reaktionsröhren pipettieren und das Röhrchen verschließen.

Beachte: Der Flüssigkeitsstand sollte zwischen den zwei Linien auf dem Reaktionsröhren liegen. Das entspricht ungefähr 30µL.

- (4) 30 µLPC MTB mit dem the Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit in ein Reaktionsröhren geben und das Röhrchen verschließen.

- (5) Alle Röhrchen anzentrifugieren, um die Lösungen auf dem Boden des Röhrchens zu sammeln.

Beachte: Sicherstellen, dass der Flüssigkeitsstand zwischen den zwei Linien auf dem Reaktionsröhren liegt. Das entspricht ungefähr 30 µL.

- (6) Die getrockneten Reagenzien im Deckel durch Invertieren des Reaktionsröhrens lösen und die DNA Lösung im Deckel sammeln. Die Röhrchen umgekehrt für 2 Min. stehenlassen, damit die getrockneten Reagenzien in Lösung gebracht werden.
- (7) Die Reaktionsröhren fünfmal invertieren, um die Bestandteile zu mischen. Sicherstellen, dass die getrockneten Reagenzien im Deckel vollständig gelöst sind.
- (8) Alle Röhrchen anzentrifugieren oder Röhrchen mit dem Finger anschnippen, damit sich die Lösungen auf dem Boden der Röhrchen sammeln.

Amplifikation

Für den visuellen Fluoreszenznachweis

(Mit HumaLoop T)

- (1) Überprüfen, dass die Temperatur des Inkubators 67,0°C erreicht hat.
- (2) Die Reaktionsröhren in den HumaLoop stellen und den grünen Schalter betätigen, um die LAMP Reaktion zu starten (40 Min. Bei 67,0°C).
- (3) Überprüfen, dass die Inaktivierung der Polymerase stattgefunden Hat (erfolgt automatisch beim HumaLoop). Alle Reaktionsröhren aus dem HumaLoop nehmen.

(Für andere Inkubatoren und UV Lampen)

- (1) Die Temperatur des Inkubators (mit Heizdeckel; Temperaturgenauigkeit: ±0,5°C) auf 67,0°C einstellen. Warten, bis die Temperatur die gewünschte Temperatur erreicht hat.
- (2) Alle Reaktionsröhren in den Inkubator stellen und die Amplifikationsreaktion starten (40 Min. bei 67,0°C).
- (3) Nach Ablauf der 40 min Inkubationszeit, Polymerase durch Erhitzen für 5 Min. bei 80°C oder 2 Min. bei 95°C inaktivieren.

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

- (1) Real-Time Turbidimeter HumaTurb C für den MTBC Nachweis konfigurieren.
- (2) Überprüfen, dass die Temperatur 67°C erreicht hat (Den Turbidimeter 20 Min. vor Verwendung vorwärmen).
- (3) Die Reaktionsröhren in den Real-Time Turbidimeter stellen und die Messung starten.
- (4) Während der Inkubation überprüfen, ob die Trübung in PC MTBC zunimmt. Wenn die Trübung in PC MTBC zunimmt, aber nicht in NC MTBC, verläuft die Amplifikationsreaktion erwartungsgemäß (Fig1). Ist dies nicht der Fall, läuft die Amplifikationsreaktion nicht richtig. Den Test ab Vorbereitung der Reagenzien wiederholen.
- (5) Überprüfen der Inaktivierung der Polymerase (erfolgt automatisch durch den Turbidimeter). Alle Reaktionsröhren aus dem Real-Time Turbidimeter nehmen, ohne sie zu öffnen.

Amplifikationsplots

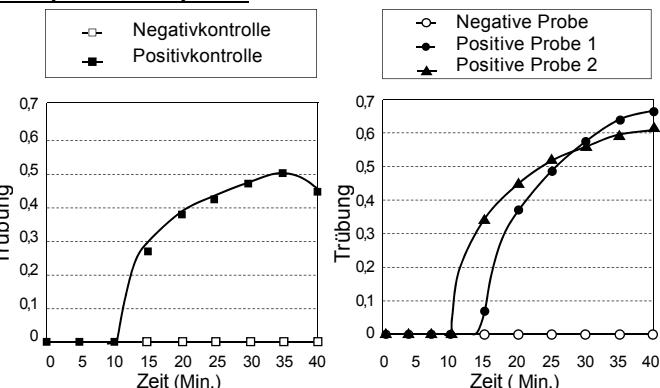


Fig1 : Amplifikationplots Kontrollen

Fig2 : Amplifikationplots Proben

HINWEISE

- (1) Alle Arbeitsbereiche vor Durchführung des Tests mit > 0,5% Natriumhypochloridlösung reinigen.
- (2) Die LAMP Reaktion ist sehr sensitive und Kontaminationen mit kleinen Mengen des amplifizierten Produktes können zu falsch positiven Ergebnissen führen.
- (3) Probengewinnung räumlich von der LAMP Reaktion trennen.
- (4) Alle Vorsichtsmaßnahmen ergreifen, um Kontaminationen zu vermeiden. Handschuhe nach dem Transfer des Sputum oder

nach Kontakt mit der DNA Lösung wechseln.

- (5) Bei Verwendung dieses Produktes, mikrobielle Kontaminationen und Kontaminationen mit Nukleasen vermeiden. Der Transfer von kleinen Mengen DNase aus Schweiß oder Speichel in die Reaktionsröhren kann falsche Ergebnisse verursachen.
- (6) Keine Sputumproben verwenden, die große Mengen Blut enthalten. Dies kann die Messungen beeinflussen.
- (7) Die DNA Lösung sollte idealerweise sofort nach der Präparation verwendet werden. Wenn dies nicht möglich ist, kann die DNA Lösung bei Raumtemperatur gelagert und innerhalb von 72h verwendet werden.
- (8) Wenn die DNA Lösung in das Reaktionsröhren pipettiert wird, Kontakt zwischen Injektionsvorrichtung des Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit und der inneren Wand des Reaktionsröhrengeschens vermeiden. Den Röhrchenständer aufrecht stellen und das Röhrchen so füllen, dass der Flüssigkeitsstand zwischen den zwei Linien (30 µL) liegt.
- (9) **(Für HumaLoop T oder andere Inkubatoren mit UV Lampen)**
Wenn Blasen erkennbar sind, mit dem Finger gegen das Röhrchen schnippen, bis diese verschwunden sind.
- (Für Real-Time Turbidimeter HumaTurb C)**
Blasen in der Reaktionslösung können mit der Trübung interferieren und zu falschen Ergebnissen führen. Deshalb Blasenbildung beim Mischen der DNA Lösung und der Reagenzien vermeiden. Treten dennoch Blasen auf, mit dem Finger gegen das Röhrchen schnippen.
- (10) DMTB sollte vollständig gelöst sein. Ungelöstes Material beeinflusst die Testleistung und kann eine geringere Sensitivität zur Folge haben.
- (11) PC MTB enthält eine große Menge Kontroll-DNA. Jegliche Kontamination der PC MTB mit anderen Proben vermeiden. Proben und NC MTB in die Reaktionsröhren geben und alle Röhrchen gut verschließen, bevor PC MTB verwendet wird.
- (12) Vor dem Öffnen PC MTB anzentrifugieren, damit sich die Flüssigkeit am Boden des Röhrchens sammelt. Röhrchen sofort verschließen.
- (13) Wenn HumaLoop T oder der Real-Time Turbidimeter HumaTurb C verwendet werden, wird die Polymerase automatisch inaktiviert.
- (14) Niemals die Reaktionsröhren nach Start oder Beendigung der LAMP Reaktion öffnen. Besonders vorsichtig sein, wenn die Röhrchen aus dem Inkubator genommen werden, um unbeabsichtigtes Öffnen zu vermeiden.
- (15) Das amplifizierte Produkt nicht für Gelektrophorese und andere Applikationen verwenden.
- (16) Für den visuellen Fluoreszenznachweis mit anderen Inkubatoren mit UV Lampen, Polymerase für 5 Min. bei 80°C oder 2 Min. bei 95°C inaktivieren. Andernfalls können falsche Ergebnisse entstehen.
- (17) Bei Verwendung einer UV Lampe, nicht direkt in das UV Licht sehen. Einen Glasschirm, Schutzbrille oder eine schützende Augenmaske verwenden.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Für den visuellen Fluoreszenznachweis

(Mit HumaLoop T)

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

(Für andere Inkubatoren mit UV Lampen)

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

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

- Positivkontrolle: Grünes Fluoreszenzlicht wird ausgestrahlt.
- Negativkontrolle: Es wird kein Fluoreszenzlicht ausgestrahlt.

Wenn eine Kontrolle ungültig ist, sollten alle Proben als ungültig beurteilt und die Messung wiederholt werden. Nach Bestätigung einer gültigen LAMP-Reaktion sollten die Proben wie folgt beurteilt werden:

- Positive Probe: Grünes Fluoreszenzlicht wird ausgestrahlt.
- Negative Probe: Es wird kein Fluoreszenzlicht ausgestrahlt.

Für den Nachweis mit Real-Time Turbidimeter HumaTurb C

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

- Positiv: Zunahme der Trübung.

- Negativ: Keine Zunahme der Trübung.

Beachte:

- (1) Die minimal detektierbare Sensitivität dieses Produktes sind 0.38 Genomäquivalente/Test. Bei einem negativen Testergebnis bei Patienten mit persistierenden Symptomen, die für eine Infektion mit MTBC sprechen, sollte erneut getestet werden.
- (2) Obwohl die Primer für eine Region mit sehr wenigen Variationen hergestellt wurden, könnten weitere Variationen bei MTBC auftreten, die zu einer geringeren Sensitivität dieses Testes führen könnten. Deshalb schließt ein negatives Testergebnis eine Infektion mit MTBC nicht aus.
- (3) Die Testergebnisse können durch die Qualität der Probenentnahme, Probenaufarbeitung, Inhibitoren und andere Fehler bei der Durchführung der Methode beeinflusst werden. Ein negatives Testergebnis schließt die Anwesenheit von MTBC in der Patientenprobe nicht aus. Für die klinische Diagnose müssen alle Labortests, die Verfassung des Patienten und die Symptomatik einbezogen werden.
- (4) Dieses Produkt wurde für den qualitativen Nachweis von MTBC entwickelt und nicht für quantitative Messungen. Die Fluoreszenzintensität, die mit der Trübung der Probe zunimmt, korreliert nicht mit der Menge von Template DNA.

INTERFERIERENDE SUBSTANZEN

Interne Untersuchungen haben gezeigt, dass die Messungen durch folgende Substanzen nicht beeinflusst werden: freies Bilirubin (91,0 mg/dL), konjugiertes Bilirubin (101,0 mg/dL), Darmlymph (Formazintrübung: 7.300) und hämolytisches Hämoglobin (2.475 mg/dL).

Interne Untersuchungen zum Einfluss von Medikamenten haben gezeigt, dass die Messungen durch folgende Medikamente nicht beeinflusst werden: Isoniazid (100 µg/mL), Ethambutol (20 µg/mL), Rifampicin (100 µg/mL), Pyrazinamid (500 µg/mL), Kanamycin (20 µg/mL), und Streptomycin (500 µg/mL).

LEISTUNGSDATEN

1. Sensitivität und Genauigkeit

Folgende Proben wurden getestet:

- Negative Probe (Konzentration: 0 Genomäquivalente/Test)
- Positive Probe 1 (1,875 Genomäquivalente/Test)
- Positive Probe 2 (125 Genomäquivalente/Test);

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

2. Intra-Assay Reproduzierbarkeit

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

3. Nachweigrenze

0,38 Genomäquivalente/Test

4. Kreuzreakтивität

Nichttuberkulöse Mykobakterien und Bakterien, die respiratorische Erkrankungen hervorrufen, wurden mit dem Testsystem negativ getestet. Darüber hinaus wurde keine Kreuzreaktivität mit allen Bakterien, die in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet sind, nachgewiesen.

Nichttuberkulöse Mykobakterien

<i>Mycobacterium asiaticum</i>	Negativ
<i>Mycobacterium kansasii</i>	Negativ
<i>Mycobacterium marinum</i>	Negativ
<i>Mycobacterium simiae</i>	Negativ
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	Negativ
<i>Mycobacterium szulgai</i>	Negativ
<i>Mycobacterium gordoneae</i>	Negativ
<i>Mycobacterium xenopi</i>	Negativ
<i>Mycobacterium avium</i>	Negativ
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	Negativ
<i>Mycobacterium gastri</i>	Negativ
<i>Mycobacterium haemophilum</i>	Negativ
<i>Mycobacterium malmoense</i>	Negativ
<i>Mycobacterium chelonae</i>	Negativ
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	Negativ
<i>Mycobacterium flavescens</i>	Negativ

Bakterien, die respiratorische Erkrankungen verursachen

<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Negativ
<i>Staphylococcus aureus</i>	Negativ
<i>Haemophilus influenzae</i>	Negativ
<i>Moraxella catarrhalis</i>	Negativ
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Negativ

<i>Escherichia coli</i>	Negativ
<i>Legionella pneumophila</i>	Negativ
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Negativ
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (I)	Negativ
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (II)	Negativ

5. Reaktivität gegen MTBC

Die Reaktivität gegen *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* und *Mycobacterium africanum* wurde bestätigt.

6. Informationen zum Kalibrator

Die Leistung dieses Testes wurde mit Plasmid-DNA als Kalibrator validiert, welche die *gyrB* und IS Region der genomischen DNA von *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (GenBank No. NC_000962) enthält.

7. Klinische Leistung

Tuberkulose ist immer noch eine der weltgrößten Infektionen. Die eschätzten Neuinfektionen von Tuberkulose liegen weltweit bei ca. 9,4 Mio. und Sputum-Abstrich positive bei 4,3. Mio. (2008, Daten publiziert von der WHO).⁽⁶⁾ In Japan wurden 2008 24.760 neue Fälle registriert von denen 2.216 starben (Kekkaku No Tokei 2009 Statistics of TB 2009).⁽⁷⁾

Dieses Produkt wurde in 2 medizinischen Einrichtungen mit Klasse 2 Infektionskrankheiten (Einrichtung nur mit Betten für Tuberkulosepatienten) auf seine Testleistung im Hinblick auf die Diagnose von Patienten mit Verdacht auf TB getestet. Neben PCR und TRC, beide Methoden sind in Japan bereits zugelassen, wurde das Kit verwendet, um Sputumproben, die über 2 Tage gesammelt wurden (320 Proben von 160 Patienten) zu untersuchen. Die Ergebnisse wurden mit denen der PCR und TRC verglichen. Zusätzlich wurde die DNA Extraktion von unbehandelten Sputumproben (LAMP mit unbehandeltem Sputum) und NALC-NaOH behandeltem Sputum und einigen anderen Prozessen (LAMP mit vorbehandeltem Sputum) im Zusammenhang mit diesem Kit evaluiert.

Wie in der Tabelle unten gezeigt, ist die Gesamt übereinstimmungs rate wie folgt: LAMP mit unbehandeltem Sputum vs. PCR: 91,5% (291/318 Patienten); LAMP mit vorbehandeltem Sputum vs. PCR: 92,1% (293/318); LAMP mit unbehandeltem Sputum vs. TRC: 94,3% (230/244); LAMP mit vorbehandeltem Sputum vs. TRC: 93,0% (227/244). Darüber hinaus stimmten die Ergebnisse, die mit dem Real-Time Turbidimeter erhalten wurden, mit denen des visuellen Fluoreszenznachweises, mit Ausnahme einer Probe, überein. (Diese Probe bestand aus blutigem Sputum und wurde mit dem visuellen Fluoreszenznachweis durch den Einfluss von Blut falsch negativ getestet). Deshalb wurde geschlussfolgert, dass die Testleistung beider Nachweismethoden identisch ist.

LAMP		PCR		Gesamt- übereinstimmungsrate
		Positiv	Negativ	
Unbehandeltes Sputum	Positiv	196	7	91,5% (291/318)
	Negativ	20	95	
Vorbehandeltes Sputum	Positiv	194	3	92,1% (293/318)
	Negativ	22	99	
LAMP		TRC		Gesamt- übereinstimmungsrate
		Positiv	Negativ	
Unbehandeltes Sputum	Positiv	163	5	94,3% (230/244)
	Negativ	9	67	
Vorbehandeltes Sputum	Positiv	157	2	93,0% (227/244)
	Negativ	15	70	

BESTELLINFORMATION

Bestellnr.	Produktname	Inhalt
972000	<i>Loopamp™ MTBC Detection Kit</i>	96 Tests
970000	<i>Loopamp™ PURE DNA Extraction Kit</i>	90 Tests
971000	Pipette-60 Set	1 Pipette; 4 X 96 Pipettenspitzen
961000	HumaLoop T	1 Inkubationseinheit 1 Fluoreszenzdetectionseinheit
963200	HumaTurb C	1 Kontrolleinheit 1 Amplifikationseinheit

REFERENZEN

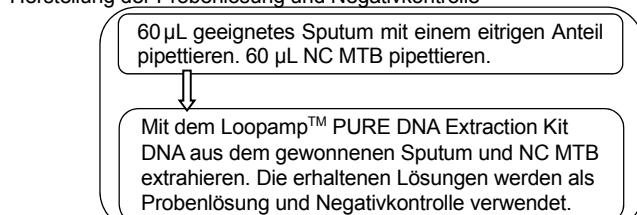
- Notomi T., et al.: Nucleic Acids Research 28, No. 12, e63 (2000)
- Nagamine K., et al.: Clin. Chem. 47, No. 9, 1742–1743 (2001)
- Mori Y., et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 289, No. 1, 150–154 (2001)

- Tomita N., et al.: Nat. Protoc. 3, No. 5, 877–882 (2008)
- 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)
- WHO global TB database:
<http://www.who.int/tb/country/en/>
http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/update/a-1_summary.pdf
http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/update/a-3_summary.pdf
- Kekkaku No Tokei 2009 (Statistics of TB 2009): Japan Anti-Tuberculosis Associa

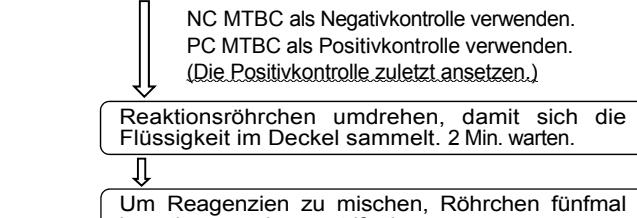
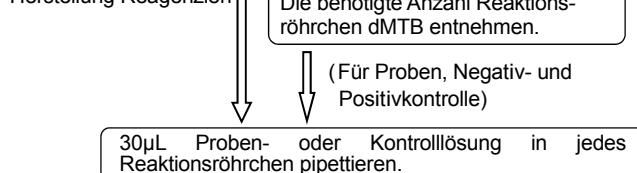
Methodenübersicht

Durchführung mit dem Real-Time Turbidimeter

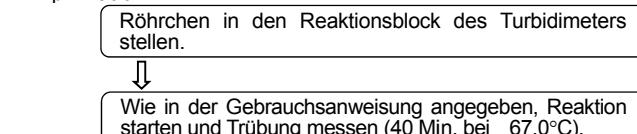
Herstellung der Probenlösung und Negativkontrolle



Herstellung Reagenzien



Amplifikation



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



Exklusiver Distributor

HUMAN Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH,

Max-Planck-Ring 21 65205 Wiesbaden Germany



EIKEN CHEMICAL CO., LTD.

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

Revisionsdatum: 1. Oktober, 2019