

MAST ISOPLEX® *Malaria PfPv*

MAST ISOPLEX® *Malaria PfPv*

REF 67MALA-2

96 Tests

UDI-DI 4250729702501

**Gebrauchsanweisung /
Instructions for Use /
Instructions d'utilisation**

**Nur zur Verwendung durch Fachpersonal /
For professional use only /
Pour un usage professionnel uniquement**



Deutsch

Seiten

02–07



English

Pages

08–12



Français

Pages

13–17

MAST ISOPLEX® Malaria PfPv

ZUR VERWENDUNG IN DER IN-VITRO-DIAGNOSTIK

Nur für den professionellen Gebrauch

Verwendungszweck

MAST ISOPLEX® Malaria PfPv ist ein In-vitro-Diagnosekit für den qualitativen Nachweis von *Plasmodium falciparum* und *Plasmodium vivax* Parasiten in menschlichen Blutproben.

Er ist als Hilfsmittel für die Diagnose von *P. falciparum* und *P. vivax* bei symptomatischen Patienten oder Personen mit fiebrigen Episoden bestimmt.

Hintergrund

Die Malariainfektion wird durch den Erreger *Plasmodium* ssp. verursacht. Der Erreger kann persistieren, ohne dass es zu Symptomen kommt. Da es in endemischen Gebieten weltweit viele fieberversachende Erreger gibt, ist es wichtig, eine genaue Diagnose zu stellen, welcher Erreger für das Fiebersymptom verantwortlich ist. Der MAST ISOPLEX® Malaria PfPv-Test wurde so angepasst, dass er nur die Malariainfektionen nachweist, die für die symptomatischen Fieberschübe verantwortlich sind.

Testprinzip

Der MAST ISOPLEX® Malaria PfPv basiert auf dem Prinzip der isothermalen LAMP (1). Der Assay dient dem direkten, qualitativen Nachweis von DNA der Malariaerreger *P. falciparum* und *P. vivax* in menschlichen Blutproben.

Im MAST ISOPLEX® Malaria PfPv wird die DNA der Protozoen *P. falciparum* oder *P. vivax* durch eine LAMP amplifiziert. Die Verwendung neuartiger "Mediator Displacement Probes" in Kombination mit universellen Reportern (2) ermöglicht ein Echtzeit-Multiplexing der spezifischen Zielsequenzen.

Der Kit enthält alle für eine LAMP-Reaktion erforderlichen Komponenten (spezifische Primer, Sonden, universelle Reporter, dNTPs, Puffer und DNA-Polymerase mit Strand-Displacement Aktivität) sowie eine Positivkontrolle bzw. eine interne Inhibitionskontroll-DNA (IC) zur Überwachung der Probenvorbereitung und/oder zur Identifizierung einer möglichen Hemmung der Amplifikationsreaktion.

Die *P. falciparum*-spezifische Zielsequenz der mitochondrialen Region wird amplifiziert und im roten Kanal (Cy5) nachgewiesen. Die *P. vivax*-spezifische Zielsequenz des 18S ribosomalen Gens wird amplifiziert und im grünen Kanal (FAM) gemessen. Die IC-Zielsequenz wird amplifiziert und im orangefarbenen Kanal (ROX) nachgewiesen.

Für die isothermale Amplifikation und Detektion können real-time PCR-Geräte oder spezielle programmierbare real-time Heizblöcke verwendet werden, die Fluoreszenzsignale auslesen können.

Das amplifizierte Produkt kann innerhalb von 45 Minuten nachgewiesen werden.

Packungsinhalt

Die Reagenzien eines Kits sind ausreichend für 96 Tests.

Tabelle 1:

Kit Code	Inhalt	Volume	Deckelfarbe	Zusätzliche Packungsinformationen
CONTROL +	Positivkontrolle	1x 250 µL	Rot	Lyophilisiert, muss vor Gebrauch rekonstituiert werden
CONTROL IC	Interne Kontrolle	1x 50 µL	Blau	Lyophilisiert, muss vor Gebrauch rekonstituiert werden
PEL	Lyo Pellet PfPv	8 Pellets für je 12 Reaktionen	Gelb	Lyophilisiert, muss vor Gebrauch rekonstituiert werden
RB-PEL	Rekonstitutionspuffer-Pellets	2x 1.1 mL	Schwarz	RTU
RB-CONTROL	Kontrollen des Rekonstitutionspuffers	2x 1.1 mL	Transparent	RTU

Weitere verwendete Abkürzungen

RTU gebrauchsfertig

Zusätzlich benötigte Materialien

- Geeignetes real-time PCR-Gerät, das die isothermale Nukleinsäure-Amplifikation und den Nachweis amplifizierter Produkte mittels Fluoreszenz ermöglicht (RotorGene 4 plex oder höhere Ausbaustufen von Qiagen wurde validiert, andere Geräte sollten vor der Verwendung validiert werden)
- Geeignetes Nukleinsäure-Extraktionssystem oder -Kit (MAST ISOPLEX® DNA / RNA Extraction Kit wurde validiert, andere Extraktionssysteme sollten vor der Verwendung validiert werden)
- DNase-freies Standardmaterial wie Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen mit Filtern
- Wasser von molekularer Qualität (DNase-/RNase-frei)
- Geeignete Reaktionsgefäße für Cyclo-Modelle oder 96-Well-PCR-Platten mit entsprechendem Verschlussmaterial
- Vortexer
- Tischzentrifuge mit Rotor zur Aufnahme von 1,5-mL-Reaktionsgefäßen
- Zentrifuge mit Rotor für Mikrotiterplatten, wenn 96-Well-PCR-Platten verwendet werden
- Eiskübel mit Eis oder Kälteblock
- Puderfreie Einweghandschuhe
- Einstellbare kalibrierte Pipetten
- Persönliche Schutzausrüstung

Tabelle 2: Empfohlene real-time PCR-Geräte, Verbrauchsmaterialien / Extraktionskits

Real-time PCR Hersteller	Model
Qiagen	RotorGene 4-plex oder höhere Ausbaustufen
Isothermale Nukleinsäureextraktionssysteme	Typ
MAST	MAST ISOPLEX® DNA / RNA Extraction Kit

Warnungen

- Halten Sie die allgemeinen Gesundheits- und Sicherheitsrichtlinien für die Arbeit mit potenziell infektiösen Materialien ein. Tragen Sie geeignete Schutzkleidung und benutzen Sie geeignete Laboreinrichtungen.
- Die Reagenzien des MAST ISOPLEX® Malaria PfPv Kits sind sehr empfindlich, daher sind Vorsichtsmaßnahmen zu treffen, um Reagenzien und Proben vor Kontamination zu schützen. Verwenden Sie keine kontaminierten Reagenzien. Reagenzien mit beschädigten Flaschen oder Verpackungen sollten aufgrund des Kontaminationsrisikos nicht verwendet werden.
- Das Kit und seine Bestandteile enthalten keine infektiösen Materialien. Der Benutzer muss jedoch beim Umgang mit Patientenproben vorsichtig sein, da diese infektiöse Organismen und Viren enthalten können.
- Einzelne Kitreagenzien enthalten bovine Komponenten. Zum Schutz vor Infektionen mit Prionen oder zoonotischen Erregern müssen die gängigen Arbeitsschutzregeln (GLP) eingehalten werden.

Vorsichtsmaßnahmen

- Lesen Sie die Anweisungen sorgfältig durch, bevor Sie den Test durchführen. Ändern Sie das Verfahren nicht ohne vorherige Validierung.
- Keine Kitreagenzien nach dem Ablauf der Haltbarkeit verwenden.
- Keine Kitreagenzien aus verschiedenen Chargen kombinieren.
- Vor dem Pipettieren sollten alle Reagenzien durch leichtes Schütteln gründlich gemischt werden.
- In Übereinstimmung mit der Guten Laborpraxis (GLP) sollten alle Laborgeräte regelmäßig auf ihre Richtigkeit und Präzision überprüft werden.
- Es wird empfohlen, bei der Arbeit mit dem Kit, den Kitkomponenten und den Probenmaterialien Schutzkleidung zu tragen, z. B. Laborkittel, Schutzhandschuhe und Schutzbrille. Regionale und arbeitsplatzspezifische Vorschriften müssen beachtet werden.
- Die Reaktionsgefäße sind nach Zugabe der Reagenzien stets verschlossen zu halten und nach Gebrauch entsprechend den örtlichen Richtlinien ungeöffnet zu entsorgen.
- Um eine Kontamination mit dem amplifizierten Produkt zu vermeiden, darf ein Fläschchen nach der Amplifikation niemals in der Umgebung geöffnet werden, in der Probenvorbereitung oder Mastermixe hergestellt werden!

Entsorgung

- Die Röhrchen sollten nach Gebrauch ungeöffnet und gemäß den örtlichen Richtlinien entsorgt werden. Potenziell infektiöses Material sollte vor der Entsorgung inaktiviert werden.

Stabilität und Lagerung

- Das MAST ISOPLEX® Malaria PfPv Kit wird bei Raumtemperatur versandt. Die Komponenten des Kits sind gefriergetrocknet. Wenn die Kit-Verpackung bei Erhalt beschädigt ist oder die Röhrchen während des Transports beschädigt wurden, wenden Sie sich bitte an Ihren örtlichen Händler.
- Alle Reagenzien sollten bei 2-8 °C gelagert und **innerhalb von 4 Wochen nach dem ersten Öffnen der Fläschchen** verbraucht werden. Ausnahmen: Rekonstituierte Lyo-Pellets sind unmittelbar nach der Rekonstitution zu verwenden.
- Die rekonstituierte IC und PC sind bei einer Lagerung von 2-8 °C für mindestens 2 Wochen stabil.
- Reagenzien dürfen nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden!

Testdurchführung

1. Entnahme und Vorbereitung der Proben
MAST ISOPLEX® Malaria PfPv ist für die Verwendung mit aus humanen Blutproben extrahierter DNA bestimmt.
2. DNA Extraktion
MAST ISOPLEX® Malaria PfPv wurde an Proben nach Nukleinsäureextraktion validiert. Der Assay wurde nicht an nicht-extrahierten Proben validiert. Nukleinsäureextraktionssysteme sollten eine Reinheit bei einem Verhältnis von 260 / 280 nm von 1,8 bis 2,0 ergeben.
3. Rekonstitution der Positiv- und Inhibitionskontrolle

	Schritt	Durchführung	
Positivkontrolle PC	Rekonstitution	1. Bringen Sie das PC-Pellet durch kurzes Zentrifugieren des Gefäßes auf den Boden. 2. Pipettieren Sie 250 µL RB-CONTROL in das Röhrchen und stellen Sie es für 5 Minuten auf Eis, um es aufzulösen. Die PC ist ausreichend für 50 Reaktionen. 3. Die rekonstituierte PC kurz vortexen, um sie zu mischen.	Endvolumen 250 µL
Inhibitionskontrolle IC	Rekonstitution	1. Bringen Sie das PC-Pellet durch kurzes Zentrifugieren des Gefäßes auf den Boden. 2. 50 µl in das RB-CONTROL Röhrchen pipettieren und 5 Minuten lang auf Eis legen, um es aufzulösen. 3. Die rekonstituierte IC kurz vortexen, um sie zu mischen.	Endvolumen 50 µL

Vorbereitung der Reaktion

Hinweis:

- Verwenden Sie nur Reaktionsgefäße, die für das von Ihnen gewählte Amplifikationsgerät empfohlen werden.
- Stellen Sie sicher, dass die Reaktionsgefäße vor der Verwendung nicht zerkratzt oder gesprungen sind.
- Während der Testvorbereitung sollten die Reagenzien auf Eis oder in einem Kühlblock aufbewahrt werden.
- Mischen Sie die Reagenzien im Reaktionsgefäß nicht zu stark.
- Schützen Sie die Reagenzien vor direktem Sonnenlicht.

Ein Lyopellet (Reaktionspellet) reicht für 12 Reaktionen.

1. Bringen Sie das Lyo-Pellet durch kurzes Zentrifugieren auf den Boden des Röhrchens.
2. Lösen Sie das Pellet mit 250 µL Puffer auf.
3. 5 µL der rekonstituierten IC-Kontroll-DNA hinzufügen.
4. Schließen Sie das Röhrchen und mischen Sie es vorsichtig, indem Sie es mehrmals auf den Kopf stellen und wieder zurückdrehen. Starkes und langes Vortexen kann sich negativ auf die Polymerase auswirken.
5. Zentrifugieren Sie das Reaktionsgefäß kurz, um Flüssigkeiten vom Deckel oder von den Wänden zu entfernen, und stellen Sie das Master-Mix-Gefäß dann auf Eis.
6. Pipettieren Sie 20 µL dieses Mastermixes in jedes Amplifikationsröhrchen.

Zugabe von Proben und Kontrollen

1. Geben Sie 5 µL des Proben-DNA-Extrakts in jedes Master-Mix-Gefäß und verschließen Sie das Gefäß sofort.
2. Positivkontrolle: Geben Sie bei jedem Lauf die im Kit enthaltene Positivkontrolle in ein Röhrchen. Geben Sie 5 µL PC in ein Röhrchen anstelle der Patientenprobe.
Negativkontrolle: Fügen Sie bei jedem Lauf immer eine Negativkontrolle (RB-Kontrolle) hinzu. Geben Sie 5 µL RB-Kontrolle in ein Röhrchen anstelle der Patientenprobe. Als Negativkontrolle können auch Kontrollen ohne Vorlage oder Wasser verwendet werden.
3. Die Reaktionsröhrchen fest verschließen und in einer Mini-Zentrifuge kurz anzentrifugieren, um alle Flüssigkeiten am Boden des Reaktionsgefäßes zu sammeln.
4. Geben Sie die Reaktionsgefäße in das Amplifikationsgerät und starten Sie die Amplifikationsreaktion.

Geräteeinstellung

1. Definieren Sie ein Programm für die isothermale Amplifikation auf den PCR- oder LAMP-Geräten.
2. Stellen Sie die Amplifikationstemperatur auf **64 °C** ein.
3. Stellen Sie die Amplifikationszeit auf **45 Minuten** ein.
4. Wählen Sie Filter für FAM, Cy5 und ROX.
5. Das Fluoreszenzsignal alle **30** oder **60** Sekunden messen.

Kontrollen

Jede Reaktion muss entweder ein PC- oder ein IC-Target enthalten, um die korrekte Durchführung des Assays zu belegen.

Im Falle positiver Reaktionen mit *P. falciparum*- und/oder *P. vivax*-Genen kann die IC eine Reaktion zeigen. Auch ohne ein Signal der IC kann das Testergebnis gültig sein (siehe Tabelle 2).

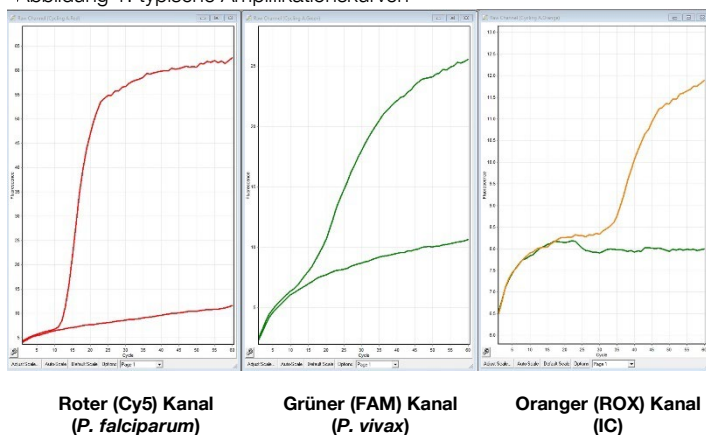
Im Falle einer negativen Reaktion auf *P. falciparum*- und/oder *P. vivax*-Gene muss die IC eine Reaktion zeigen.

Die PC kann Reaktionen in Cy5 und / oder FAM zeigen. Mindestens ein Kanal muss positiv sein. Zusätzlich kann die IC eine positive Reaktion zeigen.

Für das korrekte Erscheinungsbild des IC-Signals siehe das mit jeder Charge gelieferte Analysenzertifikat.

Interpretation der Ergebnisse

Abbildung 1: typische Amplifikationskurven



Ein positives Ergebnis wird durch eine Amplifikationskurve angezeigt, die vom Hintergrund exponentiell ansteigt. Bei einem negativen Test beweist eine flache Linie, dass es keine Amplifikation gibt.

Positiv:

Ein positives Ergebnis wird durch eine Amplifikationskurve angezeigt, die vom Hintergrund exponentiell ansteigt. Als Beispiel siehe Abbildung 1.

Eine positive Reaktion im roten (Cy5-) Kanal zeigt das Vorhandensein von *P. falciparum* an. Eine positive Reaktion im grünen (FAM-) Kanal weist auf das Vorhandensein von *P. vivax* hin. Eine positive Reaktion sowohl im roten als auch im grünen Kanal weist auf das Vorhandensein von *P. falciparum* und *P. vivax* hin.

Die interne Kontrollreaktion zeigt in den meisten Fällen eine positive Amplifikation im orangefarbenen (ROX) Kanal. Erscheint das Signal jedoch nicht in Anwesenheit eines *P. falciparum*- und / oder *P. vivax*-Signals, ist das Ergebnis dennoch gültig.

Negativ:

Bei jeder echten negativen Reaktion muss eine IC-Reaktion auftreten, um zu beweisen, dass keine Hemmungen aufgetreten sind.

Das negative Amplifikationsdiagramm der Proben zeigt eine flache Linie entlang der x-Achse, ein leichter kontinuierlicher Anstieg der Kurve muss als negativ gewertet werden. Die Probenqualität kann zu einem höheren Hintergrund führen, der einen Anstieg der Signalleistung verursacht, der jedoch während der Amplifikationszeit nie zu einem Peak ansteigt. Als Beispiel ist in Abb. 1 die flache Linie in jedem der Kanäle zu sehen. Ein leichter dauerhafter Anstieg der Kurve (Ramp-Effekt) bedeutet kein positives Signal.

Limitationen / Interferenzen

- Der MAST ISOPLEX® *Malaria PfPv* LAMP Assay wurde entwickelt, um symptomatische Patienten in ihrem fiebrigen Krankheitsstadium nachzuweisen. **Der Assay ist nicht für den spezifischen Nachweis von Malariaerregern bei asymptomatischen Patienten und bei stillen Trägern bestimmt.**
- Alle Testergebnisse müssen zusammen mit anderen klinischen und prävalenten Informationen über Malaria interpretiert werden. Im Zweifelsfall müssen andere klinische und diagnostische Daten für eine endgültige Diagnose herangezogen werden. Ein negatives Ergebnis kann auftreten, wenn die Konzentration der Plasmodium-DNA in einer Probe unter der Nachweisgrenze des Tests liegt. Ein negatives Testergebnis schließt daher die Möglichkeit einer Infektion mit Plasmodium-Parasiten nicht aus.
- Der MAST ISOPLEX® *Malaria PfPv* LAMP Assay weist nur *P. falciparum* und *P. vivax* nach. Je nach Infektionsgebiet können andere Plasmodium-Arten in einer Patientenprobe vorhanden sein.
- Positive Testergebnisse schließen Koinfektionen mit anderen Erregern nicht aus.
- Negative Testergebnisse beweisen nicht das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein von Infektionen mit anderen Erregern fieberiger Erkrankungen.
- Positive und negative Vorhersagewerte sind stark von der Prävalenz abhängig. Falsch negative Testergebnisse sind wahrscheinlicher, wenn die Prävalenz der Krankheit hoch ist. Falsch positive Testergebnisse sind wahrscheinlicher, wenn die Prävalenz mäßig bis niedrig ist.
- Der Assay wurde nicht an nicht extrahierten Blutproben validiert.

Kommentare zu falsch positiven, falsch negativen und Abfrageergebnissen:

Falschpositive Ergebnisse:

Falsch positive Signale sind schwer zu erkennen, da sie wie echte positive Signale aussehen. Mögliche Gründe können sein:

- Falsch positive Ergebnisse können in seltenen Fällen am Ende der Amplifikation auftreten. Sie können auf Primer-Multimere zurückzuführen sein, die zu amplifizieren beginnen.
- Kreuzkontaminationen können zu falsch-positiven Ergebnissen führen, auch Aerosole, die das Amplifikationsprodukt tragen, führen zuverlässig zu falsch-positiven Reaktionen.

Falschnegative Ergebnisse:

Falsch-negative Ergebnisse liegen vor, wenn die IC zwar ein Signal liefert, die erwarteten Zielregionen in *P. falciparum* und *P. vivax* aber nicht reagieren. Solche Effekte können verursacht werden durch:

- Probenvolumen < 5 µL
- Die DNA-Kopien liegen unterhalb der Nachweisgrenze.

Tabelle 2: Interpretationskriterien

Cy5 Pf	FAM Pv	ROX IC	Ergebnis	Lauf
+	+	+	positiv für <i>P. falciparum</i> und <i>P. vivax</i>	valide
+	-	+	positiv für <i>P. falciparum</i>	valide
+	+	-	positiv für <i>P. falciparum</i> und <i>P. vivax</i>	valide
-	+	+	positiv für <i>P. vivax</i>	valide
-	+	-	positiv für <i>P. vivax</i>	valide
+	-	-	positiv für <i>P. falciparum</i>	valide
-	-	+	Negativ	valide
-	-	-	Nicht auswertbar	ungültig

- IC (Volumina von deutlich mehr als 1 µl pro Reaktion) konkurrieren mit den Zielgenen und verzögern ihre Reaktion, um mit der Amplifikationszeit positiv zu werden.
- Falsche Amplifikationstemperatur

Leistungsdaten

MAST ISOPLEX® *Malaria PfPv* detektiert eine mitochondriale Zielregion von *P. falciparum* und eine 18S ribosomale Region von *P. vivax*.

Kreuzreaktivität

Potenziell kreuzreagierende Organismen wurden in einer wissenschaftlichen Veröffentlichung bewertet (Referenz 3). Die Kreuzreaktivität wurde auf andere Plasmodium-Arten sowie auf Organismen, die mit fieberigen Symptomen in Verbindung gebracht werden, getestet.

- Plasmodium ovale
- Plasmodium malariae
- Plasmodium knowlesi
- Dengue virus serotypes 1 and 2
- Chikungunya virus
- Salmonella enterica Typhi
- Salmonella enterica paratyphi A

Rückverfolgbarkeit

Der WHO-Standard *Plasmodium falciparum* 04/176 (NIBSC) kann zur Kalibrierung des Assays und zur Überprüfung der Reaktivität des Assays verwendet werden.

Detektionslimit

Der Assay hat eine Nachweisgrenze von $22,4 \times 10^3$ Kopien für *P. falciparum* und 300 Kopien für *P. vivax* pro Reaktion.

Präzision

Die Präzision wurde anhand der Ct-Werte von zwei positiven Proben (stark und schwach) berechnet. Der Ct-Wert ist der Zeitpunkt, an dem eine Reaktion positiv wird. Diese korrelieren nur grob mit der Kopienzahl der Erreger. So kann es bei niedrigen Erregerkonzentrationen vorkommen, dass ein positives Ergebnis früher als erwartet auftritt. Bei hohen Kopienzahlen liegen die Ct-Werte oft näher beieinander.

- Intra-assay Präzision (%):

FAM	Cy5	ROX (Interne Kontrolle)
0.76-3.46%	3.01-65.53%	2.59-7.95%

- Inter-assay Präzision (%):

FAM	Cy5	ROX (Interne Kontrolle)
17.16%	7.65-21.47%	18.89%

Messbereich

Der Messbereich ist abhängig von der Messeinheit des jeweiligen Amplifikationsgerätes und kann nicht verallgemeinert werden.

Klinische Leistungsdaten

Zur Bewertung der diagnostischen Leistung wurde der "Dicke Blutstropfen" als Goldstandard verwendet.

Ein Kollektiv von 38 positiven und 56 negativen Proben wurde auf *P. falciparum* untersucht.

Ein Kollektiv von 3 positiven und 91 negativen Proben wurde auf *P. vivax* untersucht.

Alle Proben wurden in einem endemischen Gebiet von einem nationalen Zentrallabor (Central Laboratory, Khartoum, Sudan) entnommen.

	Formel	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>
Sensitivität	$\frac{TP}{(TP + FN)}$	95 %	>99 %
Spezifität	$\frac{TN}{(TN + FP)}$	95 %	>99 %
Positiver prädiktiver Wert	$\frac{TP}{(TP + FP)}$	92 %	>99 %
Negativer prädiktiver Wert	$\frac{TN}{(TN + FN)}$	96 %	>99 %
Positive Likelihood Ratio	$\frac{Sens}{(1 - Spec)}$	17.68	>99
Negative Likelihood Ratio	$\frac{(1 - Sens)}{Spec}$	0.06	<0.01
Effizienz	$\frac{(TP + TN)}{Total}$	95 %	>99 %

MAST ISOPLEX® Malaria PfPv

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE

For professional use only**Intended purpose**

MAST ISOPLEX® Malaria PfPv is an in vitro diagnostic kit for qualitative detection of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* parasites in human blood samples.

It is intended to be used as an aid in the diagnosis of *P. falciparum* and *P. vivax* in symptomatic patients or individuals suffering from febrile episodes.

Background

Malaria infection is caused by the *Plasmodium* spp. pathogen. The pathogen can persist without symptoms appearing. Since there are many fever-causing pathogens in endemic areas worldwide, it is important to make an accurate diagnosis of which pathogen is responsible for the symptom of fever. The MAST ISOPLEX® Malaria PfPv assay has been adjusted to detect only those malaria infections that are responsible for the symptomatic fever episodes.

Test principle

MAST ISOPLEX® Malaria PfPv is based on the principle of loop-mediated isothermal amplification (LAMP, 1). The assay is used for the direct, qualitative detection of DNA from the malaria pathogens *P. falciparum* and *P. vivax* in human blood samples.

In the MAST ISOPLEX® Malaria PfPv, the DNA of the protozoa *P. falciparum* or *P. vivax* is amplified by a LAMP reaction. The use of novel "Mediator Displacement Probes" in combination with universal reporters (2) allows real-time multiplexing of the specific target sequences.

The kit contains all the components necessary for a LAMP reaction (specific primers, probes, universal reporters, dNTPs, buffer and DNA polymerase with strand displacement activity) as well as a Positive Control (PC) and an Internal Inhibition Control DNA (IC), respectively, to monitor the sample preparation and/or identify a possible inhibition of the amplification reaction.

The *P. falciparum* specific target sequence of the mitochondrial region is amplified and detected in the red channel (Cy5). The *P. vivax* specific target of the 18S ribosomal gene is amplified measured in the green channel (FAM). The IC target sequence is amplified and detected in the orange channel (ROX).

For isothermal amplification and detection standard real-time PCR instruments can be used or specific programmable real-time heat blocks capable to read fluorescent signals.

The amplified product can be detected within 45 minutes.

Kit Contents

The reagents of one kit are sufficient for 96 tests.

Table 1:

Kit code	Content	Volume	Lid colour	Additional packaging information
CONTROL +	Positive Control	1x 250 µL	red	Lyophilized, to be reconstituted before use
CONTROL IC	Internal Control	1x 50 µL	blue	Lyophilized, to be reconstituted before use
PEL	Lyo pellet PfPv	8x pellets for 12 reactions each	yellow	Lyophilized, to be reconstituted before use
RB-PEL	Reconstitution Buffer Pellets	2x 1.1 mL	black	RTU
RB-CONTROL	Reconstitution Buffer Controls	2x 1.1 mL	transparent	RTU

Further abbreviations

RTU ready to use

Materials required but not Provided

- Appropriate real-time PCR instrument or equipment capable of isothermal nucleic acid amplification and detection of amplified products using fluorescence (RotorGene 4 plex or higher from Qiagen has been validated, other instruments should be validated before use)
- Appropriate nucleic acid extraction system or kit (MAST ISOPLEX® DNA / RNA Extraction Kit has been validated, other extraction system should be validated before use)
- Standard DNase free supplies such as reaction tubes, pipette tips with filters
- Molecular grade water (DNase / RNase free)
- Appropriate reaction tubes for cyclor model or 96 well reaction plates with corresponding closing material
- Vortex mixer
- Tabletop centrifuge with rotor to hold 1.5 mL assay reaction tubes
- Centrifuge with rotor for microtiter plates, if using 96 well reaction plates
- Ice bucket with ice or cold block
- Disposable powder-free gloves
- Adjustable calibrated pipettes
- Personal protective equipment

Table 2: Recommended Real-time PCR equipment, consumables / extraction kits

Real-time PCR manufacturer	Model
Qiagen	RotorGene 4-plex or higher
Isothermal nucleic acid extraction systems	Type
MAST	MAST ISOPLEX® DNA / RNA Extraction Kit

Warnings

- Comply with the general health and safety guidelines for working with potentially infectious materials. Wear appropriate protective clothing and use appropriate lab facilities.
- The reagents of the MAST ISOPLEX® *Malaria PfPv* Kit are very sensitive, therefore take precautions to protect reagents and samples from contamination. Do not use contaminated reagents. Do not use reagents with damaged bottles or packaging.
- The kit and its components do not contain any infectious materials. The user, however, must take care when handling patient samples, because they may carry infectious organisms and viruses.
- The kit reagents may contain bovine components. To protect against infections with prions or zoonotic pathogens, standard occupational safety regulations (GLP) must be observed.

Precautions

- Read instructions carefully before conducting the assay. Do not modify the procedure without prior validation.
- Do not use reagents after expiry date.
- Do not mix reagents between different lots, as reagents have been calibrated for each batch.
- Before pipetting, all reagents should be mixed thoroughly by gentle agitation.
- In accordance with Good Laboratory Practice (GLP) all laboratory equipment should be checked regularly regarding accuracy and precision.
- It is recommended to wear protective clothing e.g. lab coat, protective gloves and goggles while working with the kit, kit components and sample materials. Regional and workplace specific regulations must be observed.
- Reaction tubes should be kept closed at all times following addition of reagents and should be discarded, without opening following use, as per local guidelines.
- To avoid any contamination with the amplified product never open a vial after amplification in the environment where sample preparation or master mixes are prepared!

Disposal

- The tubes should be disposed of unopened after use and according to local guidelines. Potential infectious material should be inactivated before disposal.

Stability and Storage

- MAST ISOPLEX® *Malaria PfPv* kit is shipped at ambient temperatures. The components of the kit are freeze dried. If the kit box is damaged upon receipt, or if tubes have been compromised during shipment, contact your local distributor for assistance.
- All reagents should be stored at 2-8 °C and **used up within 4 weeks** after first opening of the vials. **Exception:** Reconstituted Lyo pellets shall be used immediately after reconstitution.
- Reconstituted IC and PC are stable for at least 2 weeks at 2-8 °C.
- Reagents should not be used after expiry!

Test Procedure

1. Specimen collection and preparation

MAST ISOPLEX® *Malaria PfPv* is intended for use with DNA extracted from human blood samples.

1. DNA Extraction

MAST ISOPLEX® *Malaria PfPv* was validated on samples after nucleic acid extraction. The assay is not validated on non-extracted specimen. Nucleic acid extraction systems should give a purity at a 260 / 280 nm ratio from 1.8 to 2.0.

2. Reconstitution of Positive and Inhibition Control

	Step	Conduction	
Positive control PC	Reconstitution	1. Bring the PC pellet to the bottom of the tube by briefly centrifuging the tube. 2. Pipette 250 µL RB-CONTROL into the tube and place on ice for 5 min to dissolve. The PC is sufficient for 50 reactions. 3. Vortex briefly to mix the reconstituted PC.	End volume 250 µL
Inhibition control IC	Reconstitution	1. Bring the PC pellet to the bottom of the tube by briefly centrifuging the tube. 2. Pipette 50 µL RB-CONTROL into the tube and place on ice for 5 min to dissolve. 3. Vortex briefly to mix the reconstituted IC.	End volume 50 µL

Reaction Preparation

Note:

- Only use reaction tubes which are recommended for your chosen amplification instrument
- Ensure reaction tubes are not scratched or cracked prior to use
- During assay set-up reagents should be kept on ice or in a cold block
- Do not mix reagents vigorously in the reaction tube
- Protect the reagents from direct sun light

A lyo-pellet (reaction pellet) is enough for 12 reactions.

1. Bring the Lyo pellet to the bottom of the tube by brief centrifugation.
2. Dissolve the pellet with 250 µL buffer.
3. Add 5 µL of the reconstituted IC control DNA.
4. Close the tube, mix gently by turning it upside down and back several times. Strong and long vortexing may have a negative effect on the polymerase.
5. Centrifuge the reaction tube briefly to collect liquids from the lid or walls, then place the master-mix tube on ice.
6. Pipette 20 µL of this master-mix into each amplification tube.

Addition of samples and controls

1. Add 5 µL of sample DNA extract into each master-mix tube, then immediately close the tube.
2. Positive Control reactions: Always include the PC provided in the kit in one tube during each run. Add 5 µL of PC to one tube instead of the patient sample.
Negative Control: Always include a Negative Control (RB-control) during each run. Add 5 µL RB-control to one tube instead of the patient sample. No template controls, or water can also be used as negative control.
3. Tightly seal the reaction tubes and spin in a mini centrifuge (holding for 8 strip tubes) to collect all liquids at the bottom of the vial.
4. Transfer reaction tubes into the amplification instrument and start the amplification reaction.

Instrument Setup

1. Define a program for isothermal amplification on the PCR or LAMP instruments.
2. Set amplification **temperature to 64 °C**.
3. Set amplification **time to 45 min**.
4. Select filters for FAM, Cy5 and ROX.
5. Allow a reading of the fluorescence signal every **30 or 60 sec**.

Control Procedure

Each reaction shall contain either an PC or IC target to prove correct assay performance.

In case of positive reactions with *P. falciparum* and / or *P. vivax* genes, the IC may show a reaction. Even without a signal of inhibition control the assay result can be valid (see table 2).

In case of a negative reaction with *P. falciparum* and / or *P. vivax* genes the IC must show a reaction.

The PC may show reactions in Cy5 and / or FAM. At least one channel must be positive. Additionally, the IC may show a positive reaction.

For correct signal appearance of IC see the Certificate of Analysis supplied with each batch.

Interpretation of Results

Figure 1: Typical amplification plots

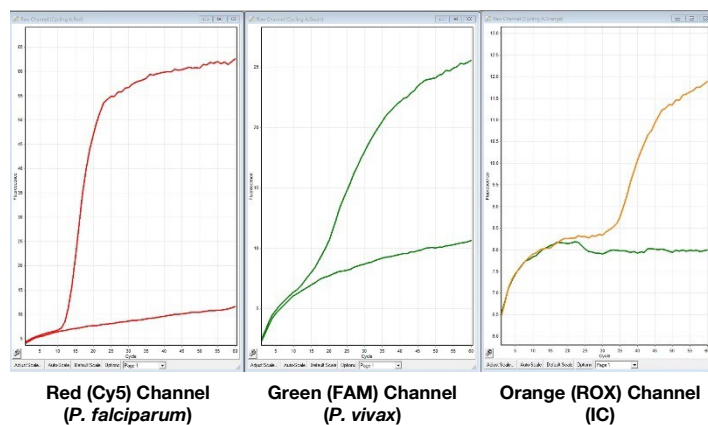


Table 2: Interpretation criteria

Cy5 Pf	FAM Pv	ROX IC	Result	Run
+	+	+	positive for <i>P. falciparum</i> and <i>P. vivax</i>	valid
+	-	+	positive for <i>P. falciparum</i>	valid
+	+	-	positive for <i>P. falciparum</i> und <i>P. vivax</i>	valid
-	+	+	positive for <i>P. vivax</i>	valid
-	+	-	positive for <i>P. vivax</i>	valid
+	-	-	positive for <i>P. falciparum</i>	valid
-	-	+	negative	valid
-	-	-	not interpretable	invalid

A positive result is indicated by an amplification plot rising from background exponentially. In a negative test a flat line is proving that there is no amplification.

Positive:

A positive result is indicated by an amplification plot rising from background exponentially. As example see figure 1.

A positive reaction in the red (Cy5) channel indicates the presences of *P. falciparum*. A positive reaction in the green (FAM) channel indicates the presence of *P. vivax*. A positive reaction in both red and green channel indicates the presence of both *P. falciparum* and *P. vivax*.

The internal control reaction shows a positive amplification in most cases in the orange (ROX) channel. However, if the signal does not appear in the presence of a *P. falciparum* and / or *P. vivax* signal than the result is still valid.

Negative:

An IC reaction must occur in any true negative reaction, to prove that no inhibitions occurred.

The negative amplification plot of samples shows a flat line along the x-axis, a slight continuous increase of the curve must be read as negative. Sample quality may lead to a higher background causing an increase in signal performance, however, never rising to a peak during the amplification time. As an example, see in Fig. 1 the flat line in each of the channels. A slight permanent increase of the curve (ramping effect) does not mean a positive signal.

Limitations / Interferences

- The MAST ISOPLEX® *Malaria PfPv* LAMP assay is designed to detect symptomatic patients in their febrile disease state. **The assay is not designed to be used to specifically detect Malaria pathogens in asymptomatic patients and in silent carriers.**
- All assay results must be interpreted together with other clinical and prevalence information of malaria. In case of doubt other clinical and diagnostic data must be taken into consideration for a final diagnosis. A negative result may occur if the concentration of Plasmodium DNA in a sample is below the detection limit of the test. A negative test result therefore does not eliminate the possibility of an infection with Plasmodium parasites.
- The MAST ISOPLEX® *Malaria PfPv* LAMP assay is only detecting *P. falciparum* and *P. vivax*. Other Plasmodium species may be present in a patient sample depending on the area of infection.
- Positive test results do not rule out co-infections with other pathogens.
- Negative test results do not prove the presence or absence of infections with other causative agents of febrile diseases.
- Positive and negative predicted values are highly dependent on prevalence. False negative test results are more likely when prevalence of disease is high. False positive test results are more likely when prevalence is moderate to low.
- The assay has not been validated on non-extracted blood samples.

Comments on false positive, false negative and query results:

False positive results:

False positive are hard to detect, they look like true positive signal. Possible reasons could be:

- False positive results may occur in rare cases at the end of the amplification. They may be due to primer multimers which start to amplify.
- Cross contamination may lead to false-positive results, even aerosol carrying the amplification product reliably lead to false positive reactions.

False negative results:

False negative results are those, when the IC is giving a signal but the expected target regions in *P. falciparum* and *P. vivax* are not reacting. Such effects might be caused by:

- Sample volume < 5 µL
- DNA copies are below the limit of detection.
- IC (volumes significantly higher than 1 µL per reaction) compete with the target genes, delaying their reaction to become positive with the amplification time
- Incorrect amplification temperature

Performance Characteristics

MAST ISOPLEX® *Malaria PfPv* detects a mitochondrial target region of *P. falciparum* and an 18S ribosomal region of *P. vivax*.

Cross-reactivity

Potentially cross-reacting organisms has been evaluated in a scientific publication (reference 3). The cross reactivity was tested for other *Plasmodium* species as well as organisms associated with febrile symptoms.

- *Plasmodium ovale*
- *Plasmodium malariae*
- *Plasmodium knowlesi*
- Dengue virus serotypes 1 and 2
- Chikungunya virus
- *Salmonella enterica* Typhi
- *Salmonella enterica* paratyphi A

Traceability

The WHO standard *Plasmodium falciparum* 04/176 (NIBSC) can be used to calibrate the assay and check the reactivity of the assay.

Limit of detection

The assay has a limit of detection of 22.4×10^3 copies for *P. falciparum* and 300 copies for *P. vivax* per reaction.

Precision

The precision was calculated using the Ct values of two positive samples (strong and weak). The Ct value is the time at which a reaction becomes positive. These only roughly correlate with the copy number of the pathogens. For example, low pathogen concentrations can sometimes show a positive result earlier than expected. With high copy numbers, the Ct values are often closer together.

- Intra-assay precision (%):

FAM	Cy5	ROX (internal control)
0.76-3.46%	3.01-65.53%	2.59-7.95%

- Inter-assay precision (%):

FAM	Cy5	ROX (internal control)
17.16%	7.65-21.47%	18.89%

Measuring Range

The measuring range depends on the signal strength units of the respective amplification instrument and cannot be generalised.

Clinical Performance

To evaluate diagnostic performance, the "thick blood drop" was used as the gold standard.

A collective of 38 positive and 56 negative samples were analysed for *P. falciparum*.

A collective of 3 positive and 91 negative samples were analysed for *P. vivax*.

All samples were collected in an endemic area by a national central laboratory (Central Laboratory, Khartoum, Sudan).

	<i>Formula</i>	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>
Sensitivity	$\frac{TP}{(TP + FN)}$	95 %	>99 %
Specificity	$\frac{TN}{(TN + FP)}$	95 %	>99 %
Positive predictive value	$\frac{TP}{(TP + FP)}$	92 %	>99 %
Negative predictive value	$\frac{TN}{(TN + FN)}$	96 %	>99 %
Positive likelihood ratio	$\frac{Sens}{(1 - Spec)}$	17.68	>99
Negative likelihood ratio	$\frac{(1 - Sens)}{Spec}$	0.06	<0.01
Efficiency	$\frac{(TP + TN)}{Total}$	95 %	>99 %

MAST ISOPLEX® Malaria PfPv

POUR LE DIAGNOSTIC IN VITRO

Pour un usage professionnel uniquement

Objectif visé

MAST ISOPLEX® Malaria PfPv est un kit de diagnostic in vitro pour la détection qualitative des parasites *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium vivax* dans les échantillons de sang humain.

Il est destiné à être utilisé comme aide au diagnostic de *P. falciparum* et *P. vivax* chez les patients symptomatiques ou les personnes souffrant d'épisodes fébriles.

Contexte

L'infection paludéenne est causée par l'agent pathogène *Plasmodium* ssp. L'agent pathogène peut persister sans que des symptômes n'apparaissent. Comme il existe de nombreux agents pathogènes responsables de la fièvre dans les zones endémiques du monde entier, il est important d'établir un diagnostic précis de l'agent pathogène responsable du symptôme de la fièvre. Le test MAST ISOPLEX® Malaria PfPv a été ajusté pour détecter uniquement les infections palustres responsables des épisodes de fièvre symptomatique.

Principe du test

Le test MAST ISOPLEX® Malaria PfPv est basé sur le principe de l'amplification isotherme à médiation de boucle (LAMP, 1). Le test sert à la détection directe et qualitative de l'ADN des agents pathogènes du paludisme *P. falciparum* et *P. vivax* dans des échantillons de sang humain.

Dans le MAST ISOPLEX® Malaria PfPv, l'ADN des protozoaires *P. falciparum* ou *P. vivax* est amplifié par une LAMP. L'utilisation de nouvelles "Mediator Displacement Probes" en combinaison avec des rapporteurs universels (2) permet un multiplexage en temps réel des séquences cibles spécifiques.

Le kit contient tous les composants nécessaires à une réaction LAMP (amorces spécifiques, sondes, rapporteurs universels, dNTPs, tampon et ADN polymérase avec activité de déplacement de brin) ainsi qu'un contrôle positif et un contrôle interne d'inhibition de l'ADN (IC), respectivement, pour contrôler la préparation de l'échantillon et/ou identifier une éventuelle inhibition de la réaction d'amplification.

La séquence cible spécifique de *P. falciparum* de la région mitochondriale est amplifiée et détectée dans le canal rouge (Cy5). La cible spécifique de *P. vivax* du gène ribosomal 18S est amplifiée et mesurée dans le canal vert (FAM). La séquence cible IC est amplifiée et détectée dans le canal orange (ROX).

Pour l'amplification isotherme et la détection, des instruments standard de PCR en temps réel peuvent être utilisés ou des blocs thermiques en temps réel programmables spécifiques capables de lire les signaux fluorescents.

Le produit amplifié peut être détecté en 45 minutes.

Contenu du kit

Les réactifs d'un kit sont suffisants pour 96 tests.

Tableau 1 :

Code du kit	Contenu	Volume	Couleur du couvercle	Informations supplémentaires sur l'emballage
CONTROL+	Contrôle positif	1x 250 µL	rouge	Lyophilisé, à reconstituer avant utilisation
CONTROL IC	Contrôle interne	1x 50 µL	bleu	Lyophilisé, à reconstituer avant utilisation
PEL	Lyo pellet PfPv	8x Pellet pour 12 réactions chacune	jaune	Lyophilisé, à reconstituer avant utilisation
RB-PEL	Tampon de reconstitution Pellets	2x 1.1 mL	noir	RTU
RB-CONTROL	Contrôles du tampon de reconstitution	2x 1.1 mL	transparent	RTU

Autres abréviations

RTU prêt à l'emploi

Matériel requis mais non fourni

- Instrument ou équipement PCR en temps réel approprié, capable d'amplifier l'acide nucléique de manière isotherme et de détecter les produits amplifiés par fluorescence (RotorGene 4-plex ou niveaux de développement supérieurs de Qiagen a été validé, les autres instruments doivent être validés avant d'être utilisés).
- Système ou kit d'extraction d'acides nucléiques approprié (le kit d'extraction d'ADN / ARN ISOPLEX® de MAST a été validé, tout autre système d'extraction doit être validé avant utilisation).
- Fournitures standard sans DNase telles que tubes de réaction, embouts de pipette avec filtres
- Eau de qualité moléculaire (sans DNase / RNase)
- Tubes de réaction appropriés pour le modèle de cyclé ou plaques de réaction à 96 puits avec le matériel de fermeture correspondant.
- Mélangeur vortex
- Centrifugeuse de table avec rotor pouvant contenir des tubes de réaction de 1,5 ml.
- Centrifugeuse avec rotor pour plaques de microtitration, si vous utilisez des plaques de réaction à 96 puits
- Seau à glace avec glace ou bloc froid
- Gants jetables non poudrés
- Pipettes calibrées réglables
- Équipement de protection individuelle

Tableau 2 : Équipement PCR en temps réel recommandé, consommables / kits d'extraction

PCR en temps réel Fabricant	Modèle
Qiagen	RotorGene 4-plex ou niveaux de développement supérieurs
Systèmes isothermes d'extraction d'acides nucléiques	Type
MAST	MAST ISOPLEX® DNA / RNA Extraction Kit

Avertissements

- Se conformer aux directives générales de santé et de sécurité pour le travail avec des matériaux potentiellement infectieux. Porter des vêtements de protection appropriés et utiliser les installations de laboratoire appropriées.
- Les réactifs du kit MAST ISOPLEX® Malaria PfPv sont très sensibles. Il convient donc de prendre des précautions pour protéger les réactifs et les échantillons de toute contamination. Ne pas utiliser de réactifs contaminés. N'utilisez pas de réactifs dont le flacon ou l'emballage est endommagé.
- Le kit et ses composants ne contiennent aucune matière infectieuse. L'utilisateur doit toutefois faire preuve de prudence lorsqu'il manipule des échantillons de patients, car ils peuvent être porteurs d'organismes infectieux et de virus.
- Les réactifs du kit peuvent contenir des composants bovins. Pour se protéger contre les infections par des prions ou des agents pathogènes zoonotiques, il convient d'observer les règles standard de sécurité au travail (BPL).

Précautions

- Lire attentivement les instructions avant d'effectuer l'essai. Ne pas modifier la procédure sans validation préalable.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption.
- Ne pas mélanger les réactifs entre différents lots, car les réactifs ont été calibrés pour chaque lot.
- Avant le pipetage, tous les réactifs doivent être mélangés soigneusement par une légère agitation.
- Conformément aux bonnes pratiques de laboratoire (BPL), l'exactitude et la précision de tous les équipements de laboratoire doivent être vérifiées régulièrement.
- Il est recommandé de porter des vêtements de protection, par exemple une blouse de laboratoire, des gants de protection et des lunettes de protection lors de l'utilisation du kit, de ses composants et des échantillons. Les réglementations régionales et spécifiques au lieu de travail doivent être respectées.
- Les tubes de réaction doivent être maintenus fermés à tout moment après l'ajout des réactifs et doivent être jetés sans être ouverts après utilisation, conformément aux directives locales.
- Pour éviter toute contamination par le produit amplifié, ne jamais ouvrir un flacon après l'amplification dans l'environnement où la préparation de l'échantillon ou les mélanges maîtres sont préparés !

Élimination

- Les tubes doivent être éliminés sans être ouverts après utilisation et conformément aux directives locales. Le matériel infectieux potentiel doit être inactivé avant d'être éliminé.

Stabilité et stockage

- Le kit MAST ISOPLEX® Malaria PfPv est expédié à température ambiante. Les composants du kit sont lyophilisés. Si la boîte du kit est endommagée à la réception, ou si les tubes ont été endommagés pendant le transport, contactez votre distributeur local pour obtenir de l'aide.
- Tous les réactifs doivent être conservés à 2-8 °C et utilisés dans les 4 semaines suivant la première ouverture des flacons. Exception : Les Lyo-Pellets reconstitués doivent être utilisés immédiatement après leur reconstitution.
- Les IC et PC reconstitués sont stables pendant au moins 2 semaines à 2-8 °C.
- Les réactifs ne doivent pas être utilisés après la date de péremption !

Procédure d'essai

- Collecte et préparation des échantillons
MAST ISOPLEX® Malaria PfPv est destiné à être utilisé avec de l'ADN extrait d'échantillons de sérum humain.
- Extraction de l'ADN

MAST ISOPLEX® *Malaria PfPv* a été validé sur des échantillons après extraction des acides nucléiques. Le test n'est pas validé sur des échantillons non extraits. Les systèmes d'extraction des acides nucléiques doivent donner une pureté à un rapport 260 / 280 nm de 1,8 à 2,0.

3. Reconstitution du contrôle positif et du contrôle d'inhibition

	Étape	Conduction	
Contrôle positif PC	Reconstitution	1. Amener le culot de PC au fond du tube en centrifugeant brièvement le tube. 2. Pipeter 250 µL RB-CONTROL dans le tube et placer sur la glace pendant 5 min pour dissoudre. Le PC est suffisant pour 50 réactions. 3. Vortexer brièvement pour mélanger le PC reconstitué.	End volume 250 µL
Contrôle de l'inhibition IC	Reconstitution	1. Amener le culot de PC au fond du tube en centrifugeant brièvement le tube. 2. Pipeter 50 µL RB-CONTROL dans le tube et placer sur la glace pendant 5 min pour dissoudre. 3. Vortexer brièvement pour mélanger le CI reconstitué.	End volume 50 µL

Préparation de la réaction

Note :

- N'utilisez que des tubes de réaction recommandés pour l'instrument d'amplification que vous avez choisi.
- S'assurer que les tubes de réaction ne sont pas rayés ou fissurés avant de les utiliser.
- Pendant la mise en place du test, les réactifs doivent être conservés sur la glace ou dans un bloc froid.
- Ne pas mélanger vigoureusement les réactifs dans le tube de réaction.
- Protégez les réactifs de la lumière directe du soleil.

Une lyo-pellet (pellet de réaction) est suffisante pour 12 réactions.

1. Amener le culot de Lyo au fond du tube par une brève centrifugation.
2. Dissoudre le culot avec 250 µl de tampon.
3. Ajouter 5 µL de l'ADN de contrôle IC reconstitué.
4. Fermez le tube, mélangez doucement en le retournant plusieurs fois. Un vortex fort et long peut avoir un effet négatif sur la polymérase.
5. Centrifuger brièvement le tube de réaction pour recueillir les liquides du couvercle ou des parois, puis placer le tube de mélange maître sur la glace.
6. Pipeter 20 µL de ce master mix dans chaque tube d'amplification.

Ajout d'échantillons et de contrôles

1. Ajouter 5 µL d'extrait d'ADN d'échantillon dans chaque tube de master-mix, puis fermer immédiatement le tube.
2. Réactions de Contrôle Positif : Toujours inclure le PC fourni dans le kit dans un tube lors de chaque série. Ajouter 5 µL de PC dans un tube au lieu de l'échantillon du patient.
 Contrôle Négatif : Toujours inclure un Contrôle Négatif (RB-control) lors de chaque cycle. Ajouter 5 µL de RB-control dans un tube à la place de l'échantillon du patient. Les contrôles sans matrice ou l'eau peuvent également être utilisés comme contrôle négatif.
3. Fermez hermétiquement les tubes de réaction et faites-les tourner dans une mini-centrifugeuse (en tenant pour 8 tubes à bande) pour recueillir tous les liquides au fond du flacon.
4. Transférez les tubes de réaction dans l'instrument d'amplification et démarrez la réaction d'amplification.

Configuration de l'instrument

1. Définir un programme d'amplification isotherme sur les instruments PCR ou LAMP.
2. Réglez la température d'amplification à 64 °C.
3. Réglez le temps d'amplification à **45 minutes**.
4. Sélectionner les filtres pour FAM, Cy5 et ROX.
5. Faites une lecture du signal de fluorescence toutes les 30 ou 60 secondes.

Procédure de contrôle

Chaque réaction doit contenir une cible PC ou IC pour prouver la bonne performance du test.

En cas de réactions positives avec les gènes de *P. falciparum* et / ou *P. vivax*, la CI peut montrer une réaction. Même sans un signal de contrôle d'inhibition, le résultat du test peut être valide (voir tableau 2).

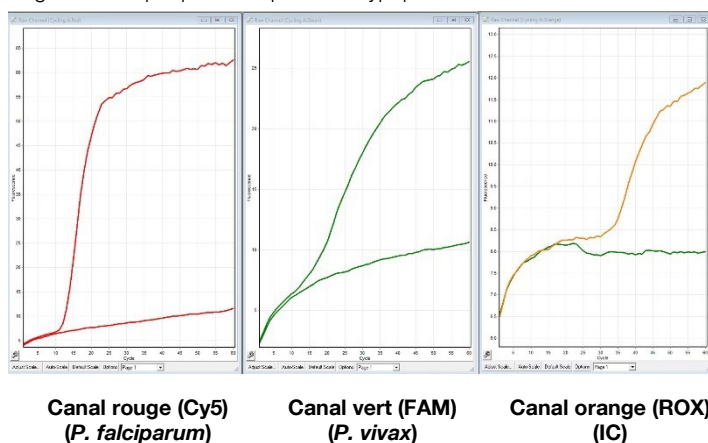
En cas de réaction négative avec les gènes de *P. falciparum* et / ou *P. vivax*, le CI doit montrer une réaction.

Le PC peut montrer des réactions en Cy5 et / ou FAM. Au moins un canal doit être positif. De plus, le CI peut montrer une réaction positive.

Pour l'apparence correcte du signal de l'IC, voir le certificat d'analyse fourni avec chaque lot.

Interprétation des résultats

Figure 1 : Graphiques d'amplification typiques



Un résultat positif est indiqué par un tracé d'amplification augmentant de manière exponentielle à partir du fond. Dans un test négatif, une ligne plate prouve qu'il n'y a pas d'amplification.

Positif :

Un résultat positif est indiqué par un tracé d'amplification augmentant de manière exponentielle à partir du fond. A titre d'exemple, voir la figure 1.

Une réaction positive dans le canal rouge (Cy5) indique la présence de *P. falciparum*. Une réaction positive dans le canal vert (FAM) indique la présence de *P. vivax*. Une réaction positive dans les deux canaux rouge et vert indique la présence de *P. falciparum* et de *P. vivax*.

La réaction du contrôle interne montre une amplification positive dans la plupart des cas dans le canal orange (ROX). Toutefois, si le signal n'apparaît pas en présence d'un signal de *P. falciparum* et / ou de *P. vivax*, le résultat reste valable.

Négatif :

Une réaction IC doit se produire dans toute réaction vraiment négative, pour prouver qu'aucune inhibition ne s'est produite.

Le tracé de l'amplification négative des échantillons montre une ligne plate le long de l'axe des x, une légère augmentation continue de la courbe doit être lue comme négative. La qualité de l'échantillon peut entraîner un bruit de fond plus élevé, ce qui provoque une augmentation du signal, qui n'atteint toutefois jamais un pic pendant le temps d'amplification. A titre d'exemple, voir sur la figure 1 la ligne plate dans chacun des canaux. Une légère augmentation permanente de la courbe (effet de rampe) ne signifie pas un signal positif.

Limites / Interférences

- Le test MAST ISOPLEX® *Malaria PfPv* LAMP est conçu pour détecter les patients symptomatiques dans leur état de maladie fébrile. **Le test n'est pas conçu pour être utilisé afin de détecter spécifiquement les agents pathogènes du paludisme chez les patients asymptomatiques et les porteurs silencieux.**
- Tous les résultats du test doivent être interprétés conjointement avec d'autres informations cliniques et de prévalence du paludisme. En cas de doute, d'autres données cliniques et diagnostiques doivent être prises en considération pour un diagnostic final. Un résultat négatif peut être obtenu si la concentration d'ADN de Plasmodium dans un échantillon est inférieure à la limite de détection du test. Un résultat négatif n'élimine donc pas la possibilité d'une infection par des parasites Plasmodium.
- Le test MAST ISOPLEX® *Malaria PfPv* LAMP permet uniquement de détecter *P. falciparum* et *P. vivax*. D'autres espèces de Plasmodium peuvent être présentes dans l'échantillon d'un patient selon la zone d'infection.
- Les résultats positifs du test n'excluent pas les co-infections avec d'autres agents pathogènes.
- Des résultats négatifs ne prouvent pas la présence ou l'absence d'infections par d'autres agents responsables de maladies fébriles.
- Les valeurs prédites positives et négatives dépendent fortement de la prévalence. Les résultats faussement négatifs sont plus probables lorsque la prévalence de la maladie est élevée. Les résultats faussement positifs sont plus probables lorsque la prévalence est modérée ou faible.
- Le test n'a pas été validé sur des échantillons de sang non extraits.

Commentaires sur les faux positifs, les faux négatifs et les résultats de l'interrogation :

Résultats faussement positifs :

Les faux positifs sont difficiles à détecter, ils ressemblent à de vrais signaux positifs. Les raisons possibles sont les suivantes :

- Des résultats faussement positifs peuvent se produire dans de rares cas à la fin de l'amplification. Ils peuvent être dus à des multimères d'amorces qui commencent à s'amplifier.
- La contamination croisée peut conduire à des résultats faussement positifs, même l'aérosol transportant le produit d'amplification conduit de manière fiable à des réactions faussement positives.

Résultats faussement négatifs :

Les résultats faussement négatifs sont ceux où la CI donne un signal mais où les régions cibles attendues chez *P. falciparum* et *P. vivax* ne réagissent pas. De tels effets peuvent être causés par :

- Volume de l'échantillon < 5 µL
- Les copies d'ADN sont en dessous de la limite de détection. IC (volumes nettement supérieurs à 1 µL par réaction) entrent en compétition avec les gènes cibles, retardant leur réaction pour devenir positifs avec le temps d'amplification.
- Température d'amplification incorrecte

Tableau 2 : Critères d'interprétation

Cy5 Pf	FAM Pv	ROX IC	Résultat	Exécuter
+	+	+	positifs pour <i>P. falciparum</i> et <i>P. vivax</i>	valide
+	-	+	positifs pour <i>P. falciparum</i>	valide
+	+	-	positifs pour <i>P. falciparum</i> et <i>P. vivax</i>	valide
-	+	+	positifs pour <i>P. vivax</i>	valide
-	+	-	positifs pour <i>P. vivax</i>	valide
+	-	-	positifs pour <i>P. falciparum</i>	valide
-	-	+	négatif	valide
-	-	-	non évaluable	invalide

Caractéristiques de performance

MAST ISOPLEX® *Malaria PfPv* détecte une région cible mitochondriale de *P. falciparum* et une région ribosomale 18S de *P. vivax*.

Réactivité croisée

Les organismes susceptibles de réagir de manière croisée ont été évalués dans une publication scientifique (référence 3). La réactivité croisée a été testée pour d'autres espèces de *Plasmodium* ainsi que pour des organismes associés à des symptômes fébriles.

- *Plasmodium ovale*
- *Plasmodium malariae*
- *Plasmodium knowlesi*
- Dengue virus serotypes 1 and 2
- Chikungunya virus
- *Salmonella enterica* Typhi
- *Salmonella enterica* paratyphi A

Traçabilité

Le standard OMS *Plasmodium falciparum* 04/176 (NIBSC) peut être utilisé pour calibrer le test et vérifier la réactivité du test.

Limite de détection

Le test a une limite de détection de 22,4x103 copies pour *P. falciparum* et 300 copies pour *P. vivax* par réaction.

Précision

La précision a été calculée en utilisant les valeurs Ct de deux échantillons positifs (fort et faible). La valeur Ct est le moment à partir duquel une réaction devient positive. Elle ne présente qu'une corrélation approximative avec le nombre de copies des agents pathogènes. Par exemple, de faibles concentrations d'agents pathogènes peuvent parfois donner un résultat positif plus tôt que prévu. Lorsque le nombre de copies est élevé, les valeurs Ct sont souvent plus proches les unes des autres.

- Intra-assay précision (%):

FAM	Cy5	ROX (contrôle interne)
0.76-3.46%	3.01-65.53%	2.59-7.95%

- Inter-assay précision (%):

FAM	Cy5	ROX (contrôle interne)
17.16%	7.65-21.47%	18.89%

Plage de mesure

La plage de mesure dépend des unités d'intensité du signal de l'instrument d'amplification respectif et ne peut être généralisée.

Performance clinique

- Pour évaluer la performance diagnostique, la "goutte de sang épaisse" a été utilisée comme étalon-or.
- Un collectif de 38 échantillons positifs et 56 échantillons négatifs ont été analysés pour *P. falciparum*.
- Un collectif de 3 échantillons positifs et 91 échantillons négatifs ont été analysés pour *P. vivax*.
- Tous les échantillons ont été collectés dans une zone endémique par un laboratoire central national (Central Laboratory, Khartoum, Soudan).

	Formule	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>
Sensibilité	$\frac{TP}{(TP + FN)}$	95 %	>99 %
Spécificité	$\frac{TN}{(TN + FP)}$	95 %	>99 %
Valeur prédictive positive	$\frac{TP}{(TP + FP)}$	92 %	>99 %
Valeur prédictive négative	$\frac{TN}{(TN + FN)}$	96 %	>99 %
Rapport de vraisemblance positif	$\frac{Sens}{(1 - Spec)}$	17.68	>999
Rapport de vraisemblance négatif	$\frac{(1 - Sens)}{Spec}$	0.06	<0.01
Efficacité	$\frac{(TP + TN)}{Total}$	95 %	>99 %

Referenzen / References / Références

1. T Notomi 1, H Okayama, H Masubuchi, T Yonekawa, K Watanabe, N Amino, T Hase; Loop-mediated Isothermal Amplification of DNA, Nucleic Acids Res. 2000 Jun 15;28(12):E63. doi: 10.1093/nar/28.12.e63.
2. Becherer L, Bakheit M, Frischmann S, Stinco S, Borst N, Zengerle R, von Stetten F.; Simplified Real-Time Multiplex Detection of Loop-Mediated Isothermal Amplification Using Novel Mediator Displacement Probes with Universal Reporters. Anal Chem. 2018 Apr 3;90(7):4741-4748. doi: 10.1021/acs.analchem.7b05371. Epub 2018 Mar 14.
3. Hin S, Lopez-Jimena B, Bakheit M, Klein V, Stack S, Fall C, et al. (2021) Fully automated point-of-care differential diagnosis of acute febrile illness. PLoS Negl Trop Dis 15(2): e0009177. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009177>

Änderungshistorie / Change History / Historique des changements

Chapter	Description of Change
Warnings and Precautions	Separation into two different sections Inclusion of additional points for assay handling
Disposal	Separation from warnings and precautions

**Mast Diagnostica GmbH,**

Feldstraße 20,
23858 Reinfeld,
Deutschland

Tel: +49 (0)4533 2007 0

Fax: +49 (0)4533 2007 68

email: mast@mast-diagnostica.de

Web: www.mast-group.com

Mast Group Ltd.

Mast House, Derby Road
Bootle, Merseyside, L20 1EA
United Kingdom

Tel: +44 (0)151 472 1444

Fax: +44 (0)151 944 1332

email: sales@mastgrp.com

Web: www.mast-group.com

Mast Diagnostic

12 rue Jean-Jacques Mention
CS91106, 80011 Amiens, CEDEX 1
France

Tél: +33 (3) 22 80 80 67

Fax: +33 (3) 22 80 99 22

email: info@mast-diagnostic.fr

Web: www.mast-group.com

Verwendete Symbole gemäß DIN EN ISO 15223-1

Icons are used according to DIN EN ISO 15223-1

Icônes utilisées selon DIN EN ISO 15223-1