



Malaria and Malaria PLUS DNA Amplification Assays

DNA Amplification Assays for the Detection of *Plasmodium sp.*

REF 280925, 281125

IVD In vitro diagnostic medical device

INTENDED USE

The *illumigene* Malaria and *illumigene* Malaria PLUS DNA amplification assays, performed on the *illumipro-10™*, are qualitative in vitro diagnostic tests for the direct detection of *Plasmodium sp.* DNA in human venous EDTA whole blood specimens from individuals with signs and symptoms of malarial infection. Results from *illumigene* Malaria assays are intended to be used as an aid in the diagnosis of human malaria infection.

illumigene Malaria assays utilize loop-mediated isothermal DNA amplification (LAMP) technology to detect *Plasmodium sp.* DNA by targeting segments of the *Plasmodium* genome. *illumigene* Malaria assays do not distinguish between *Plasmodium* species.

illumigene Malaria and *illumigene* Malaria PLUS are intended for use in hospital, reference or state laboratory settings. The devices are not intended for nonlaboratory point-of-care use.

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

The *illumigene* Malaria and *illumigene* Malaria PLUS molecular assays are based on loop-mediated amplification (LAMP)^{1,2} technology. The assays target a region of the *Plasmodium* genome that is conserved across *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, and *Plasmodium knowlesi*. The *illumigene* Malaria assays target a 214 base pair (bp) sequence of a *Plasmodium sp.* mitochondrial DNA noncoding region.

Loop-mediated amplification uses specially designed primers to provide for specific and continuous isothermal DNA amplification. A by-product of amplification is magnesium pyrophosphate, which forms a white precipitate leading to a turbid reaction solution. Reaction solution absorbance characteristics are monitored by the Meridian *illumipro-10* Incubator/Reader. Changes in reaction solution absorbance characteristics created by precipitation of magnesium pyrophosphate indicate the presence of target DNA. The absence of target DNA results in no significant change in sample absorbance.

The *illumigene* Malaria kit includes *illumigene* Malaria Test Devices, Sample Preparation Apparatus IV (SMP PREP IV), *illumigene* Buffer I, and tubes. Whole blood specimens are first treated with Buffer I; cells are disrupted and nucleic acids are released. The lysate is added to SMP PREP IV and filtered into a clean Tube I by gently squeezing. Sample effluent collected after filtration contains nucleic acids for use with the *illumigene* Malaria Test Device.

The *illumigene* Malaria PLUS kit includes *illumigene* Malaria Test Devices, *M-prep* Columns, *illumigene* Buffer I, *M-prep* Buffer II, *M-prep* Buffer III, and ST Tubes. Whole blood specimens are processed using size exclusion chromatography by gravity flow to separate and purify nucleic acids. *M-prep* Columns provide the matrix for purification of nucleic acids while the included buffers facilitate cell lysis and sample elution. Whole blood specimens are first treated with Buffer I; cells are disrupted and nucleic acids are released. Sample material is applied to the *M-prep* Column and allowed to move through the column by gravity, with the largest molecules moving through the column matrix first, or fastest. *M-prep* Buffer II is applied to the *M-prep* Column, facilitating movement of the sample through the column matrix. *M-prep* Buffer II contains a non-reactive colorant that provides a visual indicator of sample progression. *M-prep* Buffer III is applied to the *M-prep* Column after Buffer II has entered the gel matrix. Sample effluent collected after the addition of *M-prep* Buffer III contains nucleic acids for use with the *illumigene* Malaria Test Device. Neither *illumigene* Malaria nor *illumigene* Malaria PLUS require specialized laboratory equipment.

The *illumigene* Malaria Test Device contains one lyophilized amplification reagent bead in each of two chambers: a TEST chamber with *Plasmodium sp.*-specific primers and a CONTROL chamber with human mitochondrial DNA-specific primers. Human mitochondrial DNA in whole blood samples and the human mitochondrial DNA-specific primers in the Test Device CONTROL chambers function as the Internal Control for the assay. During specimen preparation, human mitochondrial DNA is extracted with the *Plasmodium sp.* mitochondrial DNA to allow for parallel processing of target DNA and Control DNA through amplification and detection. The Internal Control monitors DNA extraction, amplification inhibition, assay reagent performance and sample processing effectiveness. The Control target must be amplified and detected in the final reaction or the test is considered invalid and results are not reported.

The *illumipro-10* monitors changes in absorbance characteristics by measuring transmission of light through the Test and Control reaction solutions. Light transmission is checked at the assay Run Start (Signal_{initial}, S) and at the assay Run End (Signal_{final}, S_r). The *illumipro-10* calculates the change in light transmission between Run End and Run Start (S_r:S) and compares the ratio to a fixed cut-off value.

Fixed cut-off values for the TEST chamber are used to report sample results. TEST chamber S_r:S ratios less than 70% are reported as 'POSITIVE'; TEST chamber S_r:S ratios greater than or equal to 70% are reported as 'NEGATIVE'. Numerical values are not reported.

Fixed cut-off values for the CONTROL chamber are used to determine validity. CONTROL chamber S_r:S ratios less than 85% are considered valid and allow for reporting of TEST chamber results (POSITIVE, NEGATIVE). CONTROL chamber S_r:S ratios greater than or equal to 85% are considered invalid and prevent reporting of TEST chamber results. Invalid CONTROL chamber reactions are reported as 'INVALID'. Numerical values are not reported.

More stringent cut-off criteria are applied to the CONTROL chamber reaction to ensure amplification is not inhibited, reagents are performing as intended and that sample processing was performed appropriately.

BIOLOGICAL PRINCIPLES

Malaria is a public health challenge world-wide, with an estimated 3.2 billion people at risk for infection in 97 countries.³ The World Health Organization (WHO) estimates 198 million cases occurred in 2013 that led to approximately 584,000 deaths.³ Malaria is caused by the intracellular parasite *Plasmodium* and is transmitted to humans by female *Anopheles* mosquitoes.³ Once humans are infected, *Plasmodium* exhibit multiple life stage morphologies for initial growth in liver cells, followed by invasion of red blood cells.⁴ *Plasmodium* replicate within red blood cells, causing cell rupture and clinical symptoms of the disease.⁴

There are five *Plasmodium* species known to cause malaria in humans (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, and *Plasmodium knowlesi*), with the majority of infections caused by *P. falciparum* and *P. vivax*. Malaria treatment is dependent on the *Plasmodium* species, clinical status of the patient, and antimicrobial susceptibility.⁵ Infections caused by *P. falciparum* and *P. knowlesi* are typically more severe and require rapid treatment.⁵

The WHO recommends diagnostic testing for all individuals with suspected malaria.³ Thin and thick smear microscopy is currently the gold standard diagnostic method. However, accuracy and precision of microscopy is highly dependent on the technician skill (limit of detection ranging from 4-100 parasites/ μ L or higher), with false negative and false positive rates between 10-25% and approximately 2-3 fold variability in quantitation.^{6,7,8} In addition, errors in the *Plasmodium* species identification are common in routine microscopy examination.⁸ Immunooassay-based rapid diagnostic tests (RDTs) are also an available diagnostic method. Quality assessment testing performed by the WHO demonstrated that at low parasite densities (200 parasites/ μ L), only 76% and 42% of available RDTs could detect *P. falciparum* and *P. vivax*, respectively.³

The *illumigene* Malaria assays provide rapid results with higher sensitivity than microscopy and RDTs.

REAGENTS/MATERIALS PROVIDED

The maximum number of tests obtained from this test kit is listed on the outer box.

For *illumigene* Malaria, Catalog Number 280925

- illumigene* Malaria Test Device: Two-chambered device containing lyophilized amplification reagents (DNA polymerase, deoxynucleotide triphosphates) and either *Plasmodium sp.*-specific primers (TEST Chamber) or human mitochondrial DNA-specific primers (CONTROL Chamber).
- illumigene* Buffer I: Lysis solution containing 0.2N sodium hydroxide.
- illumigene* Sample Preparation Apparatus IV (SMP PREP IV): Tris-buffer solution containing 0.09% azide as a preservative.
- illumigene* Tube I: 1.5 mL tubes

For *illumigene* Malaria PLUS, Catalog Number 281125

- illumigene* Malaria Test Device: Two-chambered device containing lyophilized amplification reagents (DNA polymerase, deoxynucleotide triphosphates) and either *Plasmodium sp.*-specific primers (TEST Chamber) or human mitochondrial DNA-specific primers (CONTROL Chamber).
- illumigene* Buffer I: Lysis solution containing 0.2N sodium hydroxide.
- M-prep* Buffer II: Solution containing phenol red and 0.09% azide as a preservative.
- M-prep* Buffer III: Tris-buffered solution with 0.09% azide as a preservative.
- M-prep* Column: 5.0 cm long column with twist-off tip and plug seal cap containing chromatography resin in a tris-buffered solution containing sodium azide (0.09%) as a preservative.
- ST Tubes: 2.0 mL screw-top microcentrifuge tubes.

MATERIALS PROVIDED SEPARATELY

- illumigene* Malaria External Control Kit, Meridian Bioscience, Inc. Catalog Number: 279970

MATERIALS NOT PROVIDED

- Disposable latex gloves, powder free
- DNase/RNase-free, aerosol resistant pipette tips
- Blood collection tubes with EDTA anticoagulant

EQUIPMENT NOT PROVIDED

- Interval Timer
- Vortex mixer (optional)
- Micropipette capable of dispensing 50 μ L
- Micropipette capable of dispensing 250 μ L (Catalog Number 281125 only)
- illumipro-10™*, Meridian Bioscience, Inc. Catalog Number: 610172

PRECAUTIONS

- All reagents are for in vitro diagnostic use only.
- Do not interchange kit reagents and Test Devices between lots. Individual lots of Tube I and ST Tubes are interchangeable within each kit type provided they are within the assigned expiration date when used.
- The *illumipro-10* may produce incorrect results if the Malaria assay program is not used for testing.
- Follow Biosafety Level 2 and Good Laboratory practices during testing.⁹ Treat all specimens and used Test Devices as capable of transmitting infectious agents. Do not eat, drink or smoke in areas where specimens or kit reagents are handled.
- Wear disposable gloves while handling specimens and thoroughly wash hands afterwards.
- Quality Control Programs for Molecular Testing Laboratories, including proper use and care of equipment, should be employed.¹⁰
- The *illumigene* Malaria Test Devices contain lyophilized reagents. The protective pouches should not be opened until ready to perform the assay.
- The *illumigene* Malaria Test Devices include a latch feature that is designed to prevent contamination of the test area with amplification product. Do NOT use Test Devices with broken latches.
- Dispose of used *illumigene* Malaria Test Devices, *M-prep* Columns, and tubes immediately after processing. Leave the Test Device latch securely in place. Do NOT open the Test Device after processing. Opening the device after amplification may result in contamination of the test area with amplification product.

HAZARD AND PRECAUTIONARY STATEMENTS

Refer to the SDS, available at www.meridianbioscience.com, for Hazards and Precautionary Statements.

SHELF LIFE AND STORAGE

The expiration date is indicated on the kit label. Store the kit components at the temperature indicated on the label.

REAGENT PREPARATION

Ensure kit reagents are at room temperature (19-30 C) before use. Ensure Buffer I has been warmed to room temperature completely prior to use and no precipitate is visible. Incorrect results may be obtained if reagents are not brought to room temperature prior to use.

COLUMN PREPARATION (For *illumigene* Malaria PLUS Catalog Number 281125 only)

Visually inspect each *M-prep* Column and ensure the column bed and filters were not disturbed during transportation. Columns with disturbed resin beds or improperly placed filters may not perform correctly.

Column Set-up:

- Use 1 *M-prep* Column for each sample to be tested. Remove the top cap and the bottom twist-off tip.
- Place the column tip into an ST Tube. The ST Tube should be held at a slight angle (approximately 15 degrees) from the *M-prep* Column.
NOTE: Do not seat the column directly in the collection tube as this may create a seal and cause improper flow through the column. Refer to Figure 1 for proper column and collection tube placement.
- Let the *M-prep* Column drain into the ST Tube. Drained *M-prep* Columns should be used within 1 hour.
- Proceed with Sample Preparation for *illumigene* Malaria PLUS.

FIGURE 1: *M-prep* Column and ST Tube placement

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Sample type: Human venous whole blood samples with EDTA as a preservative.

Sample Collection: Venous whole blood samples should be collected into a specimen tube containing EDTA according with institutional guidelines for collection of clinical specimens for malaria infection. Ensure the blood collection tube is inverted immediately after collection at least 8 times, or according to the manufacturer's instructions.

EDTA venous whole blood samples may be stored at 2-30 C after collection and during transportation to the laboratory. Samples should be tested as soon as possible, but may be stored for up to 7 days at room temperature (19-30 C) or up to 14 days refrigerated (2-8 C) prior to testing. Samples that will not be tested within this time frame should be frozen immediately at -20 C for up to 30 days until tested. Samples may be frozen and thawed 2 times after storage at -20 C prior to testing with the *illumigene* Malaria assays.

SPECIMEN PREPARATION

NOTE: Ensure that the *illumipro-10* is powered on and required performance verifications have been completed prior to initiation of SPECIMEN PREPARATION. Refer to the *illumipro-10* Operator's Manual for further information regarding instrument set-up and operation.

NOTE: Ensure specimens are at room temperature (19-30 C) before specimen preparation.

Specimens to be tested with the *illumigene* Malaria assay may be prepared using one of the following methods:

1. *illumigene* Malaria Specimen Preparation (Catalog Number 280925)

- Invert EDTA whole blood specimen 2-3 times to mix.
- Add 50 µL of the collected venous whole blood sample (with EDTA) to one tube of Buffer I. Mix by inversion 5 times or by vortexing for approximately 10 seconds. Hold the sample for 2 minutes.
- Mix by inversion 5 times or by vortexing for approximately 10 seconds and immediately transfer 50 µL of lysate into SMP PREP IV. Mix by inversion 5 times or by vortexing for 10 seconds.
- Gently squeeze the SMP PREP IV and slowly collect 5 to 10 drops into a clean Tube I. Visually verify that the eluate is tinted red to reddish brown. Label the tube with the specimen identification and proceed to the Test Procedure.

2. *illumigene* Malaria PLUS Specimen Preparation (Catalog Number 281125)

NOTE: Sample elution steps with *M-prep* Columns should take no longer than 30 minutes. Samples that take longer than 30 minutes to elute should be discarded and re-tested with the original patient sample.

- Invert EDTA whole blood specimen 2-3 times to mix.
- Add 50 µL of the collected venous whole blood sample (with EDTA) to one tube of Buffer I. Mix by inversion 5 times or by vortexing for approximately 10 seconds. Hold the sample for 2 minutes.
- Mix by inversion 5 times or by vortexing for approximately 10 seconds and, using a micropipette, immediately transfer 250 µL of the prepared sample to the top of an appropriately labeled and prepared *M-prep* Column. Wait approximately 2 minutes, or until the sample has been absorbed by the column and flow stops. This step should take no longer than 30 minutes.
- Using a micropipette, add 250 µL of *M-prep* Buffer II to the top of the *M-prep* Column. Discard the pipette tip. The column will have a red appearance after the addition of *M-prep* Buffer II. Wait approximately 2 minutes, or until the red-colored buffer is absorbed by the column and flow stops. This step should take no longer than 30 minutes.
- Remove the last drop of liquid from the column tip with the ST Tube. Discard the tube.
- Place a clean ST Tube under the *M-prep* Column. Using a micropipette, add 250 µL of *M-prep* Buffer III to the top of the *M-prep* Column. Discard the pipette tip. Wait approximately 2 minutes or until flow stops. This step should take no longer than 30 minutes.
- Remove the last drop of liquid from the column tip with the ST Tube. Visually verify that the eluate is tinted red to reddish brown. Label the tube with sample identification information and proceed to the Test Procedure.

TEST PROCEDURE

NOTE: A maximum of 10 samples can be processed in a single *illumipro-10* run.

- Remove 1 *illumigene* Malaria Test Device from its protective pouch per sample. Carefully open the device, holding the chambers such that the lyophilized reagents will not fall out upon opening. Place the device on a flat surface or in a rack that can accommodate the device.
- Using a micropipette, transfer 50 µL of the sample to both the TEST (White Bead) and CONTROL (Yellow Bead) chambers of the *illumigene* Malaria Test. Take care not to introduce air to the reaction mixture.
- Close the *illumigene* Test Device and fasten the latches securely.
- Tap device(s) on the bench top or mix to remove air bubbles. Carefully examine the Test Device(s) for rehydration of the Control/Test Bead, for air bubbles left in the chamber and liquid in the top of the device. If undissolved beads, air bubbles or liquid in the top of the device are noted, tap the device on the bench top and repeat visual inspection. Amplification and detection should be initiated within 15 minutes.
- Repeat Test Procedure Steps for all samples to be tested.
- Insert the *illumigene* Test Devices into the *illumipro-10* and initiate run using the Malaria Program. Results will be displayed at the conclusion of the run.

INTERPRETATION OF RESULTS

Sample ID	Reported Result	Interpretation
Patient Specimen	POSITIVE	Sample contains <i>Plasmodium</i> sp. target DNA.
	NEGATIVE	No <i>Plasmodium</i> sp. DNA detected.
	INVALID	No reportable result. Repeat the test using the original sample. Inhibitory patient specimen, improper sample preparation, reagent failure, instrument failure or internal control failure.
Positive Control	POSITIVE	Valid positive control result. Reagents active at time of use, <i>illumipro-10</i> performing correctly.
	NEGATIVE	Incorrect control result. Repeat the control tests as the first step in determining the root cause of the failure. If control failures are repeated please contact Meridian's Technical Services Department at 1-800-343-3858 (US) or your local distributor.
	INVALID	No reportable result. Repeat entire assay run using original samples. Improper sample preparation, reagent failure, instrument failure or internal control failure.
Negative Control	POSITIVE	Incorrect control result. Repeat the control tests as the first step in determining the root cause of the failure. If control failures are repeated please contact Meridian's Technical Services Department at 1-800-343-3858 (US) or your local distributor.
	NEGATIVE	Valid negative control result. Reagents active at time of use, <i>illumipro-10</i> performing correctly.
	INVALID	No reportable result. Repeat entire assay run using original samples. Improper sample preparation, reagent failure, instrument failure or internal control failure.
EMPTY WELL	NONE	No <i>illumigene</i> Test Device in the <i>illumipro-10</i> Well. OR The <i>illumigene</i> Test Device present is compromised due to sample preparation failure, dirty device or improperly seated device. Repeat the test using original sample.

QUALITY CONTROL

This test should be performed per applicable local, state, or federal regulations or accrediting agencies.

- Each device contains an internal control that controls for amplification inhibition, assay reagents, DNA preparation, and sample processing effectiveness. Human mitochondrial DNA, which serves as the internal control DNA, is isolated from the whole blood sample and processed through all steps of the procedure. Primers for amplification of internal control DNA are present in the Control Chamber of the *illumigene* Test Device.
- Good laboratory practice recommends the use of control materials. Users should follow the appropriate federal, state and local guidelines concerning the running of external quality controls.
- illumigene* Malaria External Positive Control Reagent is supplied separately (Catalog 279970). Alternatively, previously characterized clinical or contrived *Plasmodium* sp. positive blood samples can be used as an external positive control. A qualified negative human whole blood sample with EDTA may be used as an external negative control. It is recommended that the reactivity of each new lot and each new shipment of *illumigene* Malaria and *illumigene* Malaria PLUS be verified on receipt and before use. External control tests should be performed thereafter in accordance with appropriate federal, state and local guidelines. The *illumigene* Malaria and *illumigene* Malaria PLUS test kit should not be used in patient testing if the external controls do not produce the correct results.
- A separate Test Device must be used for each external control reagent.

EXPECTED VALUES

The incidence of *Plasmodium* sp. as detected by the *illumigene* Malaria assay during the 2015 clinical study was 68.1% (147/216) using the *illumigene* Malaria sample preparation method (Catalog number 280925) and 70.6% (149/211) using the *illumigene* Malaria PLUS Method (Catalog number 281125). The overall incidence of each *Plasmodium* species is provided below.

Species	Prevalence by <i>Plasmodium</i> species		<i>illumigene</i> Malaria PLUS (n=211)	
	Total Positive	Prevalence	Total Positive	Prevalence
<i>P. falciparum</i>	137	63.4%	134	63.5%
<i>P. vivax</i>	0	0%	0	0%
<i>P. ovale</i>	1	0.5%	1	0.5%
<i>P. malariae</i>	1	0.5%	1	0.5%
<i>P. knowlesi</i>	0	0%	0	0%
Unknown*	8	3.7%	13	6.2%

*Samples were negative by microscopy and therefore species could not be determined.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- This product can only be used with the *illumipro-10* instrument.
- illumigene* Malaria and *illumigene* Malaria PLUS do not distinguish between *Plasmodium* species.
- Hematocrit (>57.5%) and hemoglobin (>30 g/dL) above normal physiological levels may produce invalid results with the *illumigene* Malaria assays.
- Performance of the *illumigene* Malaria assays has not been established for packed red blood cell specimens.
- Performance of *Plasmodium knowlesi* with the *illumigene* Malaria assay was established using purified genomic DNA only; whole organism testing was not performed.
- illumigene* Malaria and *illumigene* Malaria PLUS are qualitative assays and do not provide quantitative values or information about organism load.
- The detection of nucleic acids is dependent upon proper specimen collection, handling, transportation, storage and preparation. Failure to observe proper procedure in any one of these steps can lead to incorrect results.
- Organism nucleic acid may persist *in vivo*, independent of organism viability. *illumigene* Malaria and *illumigene* Malaria PLUS do not distinguish between viable and nonviable organisms.
- As with all molecular based diagnostic tests, (A) False negative results may occur from the presence of inhibitors, technical error, sample mix-up or low numbers of organisms in the clinical specimen; (B) False positive results may occur from the presence of cross-contamination by target organisms, their nucleic acids or amplified product, and from non-specific signals.

SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The performance characteristics of the *illumigene* Malaria and *illumigene* Malaria PLUS DNA Amplification Assays were established in clinical studies conducted in November 2015 in Senegal, Africa. Performance characteristics of the assay were compared to the reference method, thin and thick film microscopy. *Plasmodium* species identification for all positive samples was determined by microscopy.

Samples included prospective and retrospective venous whole blood specimens with EDTA from patients with signs and symptoms of *Plasmodium* infection. A total of 216 eligible, de-identified whole blood specimens were evaluated. 66 specimens were tested prospectively and 150 specimens were prospectively-collected and stored frozen prior to testing by the *illumigene* Malaria assay (retrospective). Each specimen was prepared by both *illumigene* Malaria and *illumigene* Malaria PLUS sample preparation methods. An additional five samples were considered ineligible for the *illumigene* Malaria PLUS assay due to process error. Therefore, there are 211 eligible samples for *illumigene* Malaria PLUS. All samples were tested prospectively by microscopy.

Analysis of assay performance with prospective and retrospective specimens indicated there is no difference in performance for fresh and frozen specimens with the *illumigene* Malaria and *illumigene* Malaria PLUS assays. The tables below summarize the performance of the *illumigene* Malaria and *illumigene* Malaria PLUS DNA Amplification Assays for both prospective and retrospective samples combined.

illumigene Malaria Performance Compared to Microscopy

	Microscopy			<i>illumigene</i>	Performance				
	Pos	Neg	Total		INV ^a	Sensitivity	100.0%	139/139	97.3-100.0%
<i>illumigene</i> Malaria	Pos	139	8	147	0(1)				
	Neg	0	67	67	2(2)	Specificity	89.3%	67/75	80.3-94.5%
	Total	139	75	214	2				

^aInitial invalid results are reported within the parentheses. The final number of invalid samples remaining after repeat testing is shown before the parenthesis.

illumigene Malaria PLUS Performance Compared to Microscopy

	Microscopy			<i>illumigene</i>	Performance				
	Pos	Neg	Total		INV	Sensitivity	100.0%	136/136	97.3-100.0%
<i>illumigene</i> Malaria PLUS	Pos	136	13	149	0				
	Neg	0	62	62	0	Specificity	82.7%	62/75	72.6-89.6%
	Total	136	75	211	0				

Samples were collected from patients ranging in age from 4 to 77 years. 15 were between 1 – 12 years of age; 75 were between 13 – 21 years of age; 125 were ≥22 years old; the age of one patient was not defined. There was no noted performance difference based on age. The study population included 84 (38.9%) female and 131 (60.6%) male patients; the gender of one patient was not defined. There is no expectation that assay performance is influenced by gender.

ANALYTICAL SENSITIVITY

Limit of Detection (LoD) was determined using *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. The LoD was confirmed using 20 replicates and a stated probability (eg, 95%, where 19/20 replicates are positive) of obtaining positive responses.

	<i>illumigene</i> Malaria	<i>illumigene</i> Malaria PLUS
<i>Plasmodium</i> Species	Parasites/µL	Parasites/µL
<i>P. falciparum</i> (3D7)	2	0.25
<i>P. vivax</i> (India VII)	0.125	0.063

ASSAY REACTIVITY

Quantified stocks of *P. malariae*, *P. ovale*, and *P. knowlesi* DNA were diluted in negative whole blood to approximately three times the limit of detect for each *illumigene* Malaria and *illumigene* Malaria PLUS sample preparation method (approximately 72 copies/µL or 6 parasites/µL for *illumigene* Malaria; approximately 9 copies/µL or 0.75 parasites/µL for *illumigene* Malaria PLUS). All species reacted at the concentrations tested.

REPRODUCIBILITY

Reproducibility studies were carried out by three internal laboratories. Blind-coded panels of 10 samples were supplied to participating laboratories. The panels included contrived *Plasmodium falciparum* (strain 3D7) samples manufactured as moderate positive samples, low positive samples, or high negative samples. The panel also included one negative whole blood sample. Testing was performed by at least 2 different operators at each laboratory on the same day (intra-assay variability) for five days (inter-assay variability). Three lots each of *illumigene* Malaria or *illumigene* Malaria PLUS and 8 *illumipro-10* instruments were used in this study. External Positive and Negative Controls were tested with each panel; a qualified negative blood sample was used as the Negative Control.



Test di amplificazione del DNA *illumigene* Malaria e Malaria PLUS

Test di amplificazione del DNA per il rilevamento di *Plasmodium spp.*

REF 280925, 281125

IVD Dispositivo medico-diagnostico in vitro

FINALITÀ D'USO

I test di amplificazione del DNA *illumigene* Malaria e *illumigene* Malaria PLUS, condotti sullo strumento *illumipro-10™*, sono test diagnostici in vitro di tipo qualitativo per il rilevamento diretto di DNA di *Plasmodium spp.* in campioni ematici di sangue intero venoso EDTA provenienti da individui con segni e sintomi di infezione malarica. I risultati ottenuti con i test *illumigene* Malaria sono destinati ad essere usati come strumento ausiliario nella diagnosi di un'infezione da malaria nell'uomo.

I test *illumigene* Malaria utilizzano la tecnologia LAMP (amplificazione isoterma del DNA loop-mediata) per rilevare il DNA di *Plasmodium spp.* utilizzando come target i segmenti del genoma del *Plasmodium*. I test *illumigene* Malaria non distinguono tra le diverse specie di *Plasmodium*.

I test *illumigene* Malaria e *illumigene* Malaria PLUS sono destinati ad essere utilizzati in ambito ospedaliero o in laboratori statali o di riferimento. Questi dispositivi non sono destinati all'uso ambulatoriale, al di fuori del laboratorio.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

I test molecolari *illumigene* Malaria e *illumigene* Malaria PLUS si basano sulla tecnologia LAMP (amplificazione isoterma del DNA loop-mediata).^{1, 2} Il target del test è una regione del genoma di *Plasmodium* comune a *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium knowlesi*. Il target del test *illumigene* Malaria è una sequenza di 214 paia di basi (bp) di una regione non codificante del DNA mitocondriale di *Plasmodium sp.*

L'amplificazione loop-mediata utilizza dei primer appositamente progettati per fornire l'amplificazione isoterma, specifica e continua del DNA. Un sottoprodotto dell'amplificazione è il magnesio pirofosfato, il quale forma un precipitato bianco che crea una soluzione di reazione torbida. Le caratteristiche di assorbanza della soluzione di reazione vengono monitorate dall'incubatore/lettore Meridian *illumipro-10*. I cambiamenti nelle caratteristiche di assorbanza della soluzione di reazione creata dalla precipitazione del magnesio pirofosfato indicano la presenza del DNA bersaglio. L'assenza del DNA bersaglio non causa un cambiamento significativo dell'assorbanza del campione.

Il kit *illumigene* Malaria include i dispositivi test *illumigene* Malaria, l'Apparato di Preparazione dei Campioni IV (SMP PREP IV), il Tampone I *illumigene* e le provette. I campioni di sangue intero vengono innanzitutto trattati con il Tampone I; questo causa la lisi delle cellule e il rilascio degli acidi nucleici. Il lisato viene aggiunto all'apparato SMP PREP IV e filtrato in una provetta pulita tramite una leggera compressione. L'eluato del campione ottenuto dopo la filtrazione contiene gli acidi nucleici da usare con il dispositivo test *illumigene* Malaria.

Il kit *illumigene* Malaria PLUS include i Dispositivi Test *illumigene* Malaria, le Colonne *M-prep*, il Tampone I *illumigene*, il Tampone II *M-prep*, il Tampone III *M-prep* e le provette ST con tappo a vite. I campioni di sangue intero sono trattati mediante cromatografia ad esclusione dimensionale con flusso a gravità per separare e purificare gli acidi nucleici. Le colonne *M-prep* forniscono la matrice per la purificazione degli acidi nucleici mentre i tamponi inclusi aiutano la lisi cellulare e l'eluazione del campione. I campioni di sangue intero vengono innanzitutto trattati con il Tampone I; questo causa la lisi delle cellule e il rilascio degli acidi nucleici. Il materiale campione viene applicato alla colonna *M-prep*, nella colonna il materiale si sposta per gravità, con le molecole più grandi che si spostano prima o più velocemente. Il Tampone II *M-prep* viene applicato alla colonna *M-prep*, per promuovere lo spostamento del campione attraverso la matrice della colonna. Il Tampone III *M-prep* contiene un colorante non reattivo che fornisce un indicatore visivo per seguire la progressione del campione. Il Tampone III *M-prep* viene applicato alla colonna *M-prep* dopo che il Tampone II è entrato nella matrice gel. L'effluente del campione ottenuto dopo l'aggiunta del Tampone III *M-prep* contiene gli acidi nucleici da usare con il Dispositivo test *illumigene* Malaria. Né il test *illumigene* Malaria né il test *illumigene* Malaria PLUS richiedono attrezzatura da laboratorio specializzata.

Il Dispositivo Test *illumigene* Malaria contiene un granulo liofilizzato di reagente di amplificazione in ognuna delle due camere: una camera TEST con primer specifici per *Plasmodium spp.* e una camera CONTROLLO con primer specifici per DNA mitocondriale umano. Il DNA mitocondriale umano nei campioni di sangue intero e i relativi primer specifici presenti nelle camere CONTROLLO dei dispositivi test fungono da controllo interno dei test. Nel corso della preparazione del campione, il DNA mitocondriale umano è estratto con il DNA mitocondriale di *Plasmodium spp.* per consentire il trattamento parallelo del DNA bersaglio e del DNA di controllo nell'ambito dell'amplificazione e del rilevamento. Il controllo interno esegue un monitoraggio sull'estrazione del DNA, sull'inibizione dell'amplificazione, sulle prestazioni del reagente analitico e sull'efficacia del trattamento del campione. Il target del controllo deve essere amplificato e rilevato nella reazione finale, altrimenti il test è considerato non valido e i risultati non vengono referati.

illumipro-10 monitora le variazioni nelle caratteristiche di assorbanza misurando la trasmissione della luce attraverso le soluzioni di reazione contenute nelle provette Test e Controllo. La trasmissione della luce viene controllata all'inizio dell'esecuzione dell'analisi (Signal_{initial}, S) nonché alla fine (Signal_{final}, S). *illumipro-10* calcola la variazione nella trasmissione della luce fra la fine e l'inizio dell'analisi (Sr:S) e confronta il rapporto con un valore stabilito di cut-off.

I valori stabiliti di cut-off per la provetta TEST sono utilizzati per referare i risultati del campione. I rapporti Sr:S della provetta TEST inferiori all'70% sono referati come "POSITIVI"; i rapporti Sr:S della provetta TEST superiori o pari all'70% sono referati come "NEGATIVI". I valori numerici non sono riportati.

I valori stabiliti di cut-off per la provetta CONTROLLO sono utilizzati per determinare la validità. I rapporti Sr:S della provetta CONTROLLO inferiori al 85% sono considerati validi e consentono di referare i risultati della provetta TEST (POSITIVO, NEGATIVO). I rapporti Sr:S della provetta CONTROLLO superiori o pari al 85% sono considerati non validi e impediscono di referare i risultati della provetta TEST. Le reazioni della provetta CONTROLLO non valide sono riportate come "NON VALIDE". I valori numerici non sono riportati.

Per la reazione della provetta CONTROLLO valgono criteri di cut-off più rigorosi per garantire che l'amplificazione non sia inibita, i reagenti reagiscano come previsto e l'elaborazione del campione avvenga correttamente.

PRINCIPI BIOLOGICI

Con 3,2 miliardi di persone stimate a rischio di contrarre l'infezione in 97 paesi, la malaria pone un serio rischio per la salute pubblica in tutto il mondo.³ Secondo la stima dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) sono stati 198 milioni i casi nel 2013, con circa 584.000 decessi.³ La malaria è causata da un parassita intracellulare chiamato *Plasmodium* che viene trasmesso all'uomo dalla zanzara femmina del genere *Anopheles*.³ Una volta infettato l'organismo, il parassita *Plasmodium* presenta un ciclo vitale con varie morfologie, con una fase iniziale in cui invade gli epatociti e una fase successiva in cui infetta i globuli rossi.⁴ Nei globuli rossi, il *Plasmodium* si moltiplica, portando alla rottura dei globuli stessi e all'insorgenza dei sintomi clinici della malattia.⁴

Esistono 5 specie di *Plasmodium* che possono infettare l'uomo (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi*), con la maggior parte delle infezioni attribuite a *P. falciparum* e *P. vivax*. Il trattamento della malaria dipende dalla specie di *Plasmodium* che ha causato l'infezione, dallo stato clinico del paziente e dalla sua suscettibilità antimicrobica.⁵ Le infezioni da *P. falciparum* e *P. knowlesi* sono di solito più gravi e richiedono un intervento tempestivo.⁵

Reproducibility Study Summary: <i>illumigene</i> Malaria Sample Preparation Method								
Sample Type	Site 1		Site 2		Site 3		Total	
	Percent Agreement		Percent Agreement		Percent Agreement		Percent Agreement	
Moderate Positive (8 parasites/μL)	30/30	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90	100.0%
Low Positive (2 parasites/μL)	30/30	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90	100.0%
High Negative (0.458 parasites/μL)	30/30	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90	100.0%
Negative	10/10	100.0%	10/10	100.0%	10/10	100.0%	30/30	100.0%
Negative Control	10/10	100.0%	10/10	100.0%	10/10	100.0%	30/30	100.0%
Positive Control	10/10	100.0%	10/10	100.0%	10/10	100.0%	30/30	100.0%

Reproducibility Study Summary: <i>illumigene</i> Malaria PLUS Sample Preparation Method								
Sample Type	Site 1		Site 2		Site 3		Total	
	Percent Agreement		Percent Agreement		Percent Agreement		Percent Agreement	
Moderate Positive (1 parasite/μL)	30/30	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90	100.0%
Low Positive (0.5 parasites/μL)	30/30	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90	100.0%
High Negative (0.029 parasites/μL)	29/30	96.7%	28/30	93.3%	30/30	100.0%	87/90	96.7%
Negative	10/10	100.0%	10/10	100.0%	10/10	100.0%	30/30	100.0%
Negative Control	10/10	100.0%	10/10	100.0%	10/10	100.0%	30/30	100.0%
Positive Control	10/10	100.0%	10/10	100.0%	10/10	100.0%	30/30	100.0%

CROSSREACTIVITY STUDIES

Crossreactivity studies employed positive (*P. falciparum* 3D7) and negative whole blood specimens inoculated with bacterial or fungal organisms to a minimum concentration of 1.0×10^6 CFU/mL, virus at a minimum of 1.0×10^5 TCID₅₀/mL, or protozoans to a minimum concentration of 1.0×10^5 organisms/mL. Where whole organisms were not available, 1.0×10^6 copies/mL for genomic DNA was tested. None of the following organisms or their genetic material reacted with the *illumigene* Malaria assays:

Babesia microti, *Borrelia burgdorferi*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum*, *Leptospira interrogans*, *Mycobacterium smegmatis*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Treponema pallidum*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Cytomegalovirus* (CMV), Epstein-Barr virus (EBV), Hepatitis B virus, Hepatitis C virus, Herpes simplex virus 1 (HSV 1), HIV-1, Human Papilloma Virus (HPV), and Rubella virus.

The following organisms or their DNA could not be obtained for testing and were evaluated through *in silico* analysis. None of the following organisms are expected to react with the *illumigene* Malaria assays based on this analysis: *Anaplasma phagocytophilum*, *Clostridium botulinum*, *Orientia tsutsugamushi*, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, Chikungunya virus, Dengue virus (types 1-4), West Nile virus, and Yellow Fever virus.

Human genomic DNA was nonreactive at 1.0×10^6 copies/mL.

TESTS FOR INTERFERING SUBSTANCES

Interference testing was performed in the presence of worst-case concentrations of chemical and biological substances introduced directly into contrived low positive (*P. falciparum* 3D7) and negative whole blood samples. No interference was observed with the following substances for either *illumigene* Malaria sample preparation methods:

Acetaminophen (1 mg/mL), Amoxicillin (0.1 mg/mL), Artesunate (1 mg/mL), Aspirin (1 mg/mL), Atovaquone (0.1 mg/mL), Cephalaxin (0.1 mg/mL), Chloroquine (1 mg/mL), Ciprofloxacin (0.1 mg/mL), Clindamycin (1 mg/mL), Doxycycline hydrochloride (1 mg/mL), Erythromycin (0.1 mg/mL), Hydroxychloroquine sulfate (1 mg/mL), Ibuprofen (1 mg/mL), Lumefantrine (1 mg/mL), Mefloquine (1 mg/mL), Primaquine phosphate (1 mg/mL), Proguanil hydrochloride (1 mg/mL), Pyrimethamine (1 mg/mL), Quinine sulfate (1 mg/mL), Sodium Citrate (0.11 M), elevated Bilirubin (>0.15 mg/dL), elevated leukocytes (buffy coat) >10% v/v, serum albumin (>0.03 g/mL), and triglycerides >9.9 mg/dL.

Hematocrit (>57.5%) and hemoglobin (>30 g/dL) above normal physiological levels may produce invalid results with the *illumigene* Malaria assays.

L'OMS raccomanda di effettuare un test diagnostico laddove si sospetti un caso di malaria.³ La diagnosi microscopica con striscio ematico sottile e con goccia spessa rappresenta attualmente il metodo diagnostico di riferimento. Tuttavia, la precisione e l'accuratezza della tecnica microscopica dipendono in larga misura dalle competenze tecniche di chi effettua il test (con il limite di rilevabilità che va da un minimo di 4 a 100 parassiti/µL o più), con tassi di falsi negativi e falsi positivi tra il 10 e il 25% e una variabilità nella quantificazione di circa 2-3 volte.^{6, 7, 8} In aggiunta, gli errori nell'identificazione della specie di *Plasmodium* sono comuni negli esami microscopici di routine.⁸ I test immunologici rapidi (RDT) rappresentano un metodo di diagnosi alternativo. I test di valutazione qualitativa eseguiti dall'OMS hanno dimostrato che a basse densità parassitarie (200 parassiti/µL), solo il 76% e il 42% dei test RDT disponibili erano in grado di rilevare, rispettivamente, *P. falciparum* e *P. vivax*.³

I test *illumigene* Malaria forniscono risultati rapidi con una sensibilità superiore rispetto alla microscopia e ai test RDT.

REAGENTI/ MATERIALI FORNITI

Il numero massimo di analisi eseguibili con questo kit è indicato sulla confezione esterna.

Test *illumigene* Malaria, numero di catalogo 280925

1. **Dispositivo test *illumigene* Malaria:** dispositivo a due camere contenente i reagenti di amplificazione liofilizzati (DNA polimerasi, deossinucleotidi trifosfati) e i primer specifici per *Plasmodium spp.* (camera di TEST) o i primer specifici per il DNA mitocondriale umano (camera di CONTROLLO).
2. **Tampone I *illumigene*:** soluzione di lisi contenente idrossido di sodio 0,2 N.
3. **Apparato di Preparazione dei Campioni IV *illumigene* (SMP PREP IV):** soluzione tampone Tris contenente azide (0,09%) come conservante.
4. **Provetta I *illumigene*:** provette da 1,5 mL

Test *illumigene* Malaria PLUS, numero di catalogo 281125

1. **Dispositivo Test *illumigene* Malaria:** dispositivo a due camere contenente i reagenti di amplificazione liofilizzati (DNA polimerasi, deossinucleotidi trifosfati) e i primer specifici per *Plasmodium spp.* (camera di TEST) o i primer specifici per il DNA mitocondriale umano (camera di CONTROLLO).
2. **Tampone I *illumigene*:** soluzione di lisi contenente idrossido di sodio 0,2 N.
3. **Tampone II *M-prep*:** soluzione contenente rosso fenolo e azide (0,09%) come conservante.
4. **Tampone III *M-prep*:** soluzione tampone Tris contenente azide (0,09%) come conservante.
5. **Colonna *M-prep*:** colonna da 5,0 cm con puntale a vite e cappuccio, contenente una resina per cromatografia in una soluzione tampone Tris contenente azide (0,09%) come conservante.
6. **Provette ST:** provette per microcentrifuga da 2,0 mL con tappo a vite.

MATERIALI FORNITI SEPARATAMENTE

1. Kit di controllo esterno *illumigene* Malaria, Meridian Bioscience, Inc., Numero di Catalogo: 279970

MATERIALI NON FORNITI

1. Guanti in lattice monouso, senza talco
2. Puntali per pipetta privi di DNase/RNase e resistenti alla contaminazione da aerosol
3. Provette per la raccolta di sangue con EDTA come anticoagulante

STRUMENTI NON FORNITI

1. Timer
2. Vortex (opzionale)
3. Micropipetta in grado di erogare 50 µL
4. Micropipetta in grado di erogare 250 µL (solo per kit Numero di Catalogo 281125)
5. *illumipro-10™*, Meridian Bioscience, Inc. Numero di catalogo: 610172

PRECAUZIONI

1. Tutti i reagenti sono esclusivamente per uso diagnostico in vitro.
2. Non mischiare i reagenti di controllo e i dispositivi di test di lotti diversi. I singoli lotti di Provette I e Provette ST sono intercambiabili nell'ambito di ciascun tipo di kit purché non vengano usati oltre la data di scadenza indicata.
3. Se non viene utilizzato il programma per il test Malaria, *illumipro-10* produce un risultato non corretto.
4. Adottare il livello di biosicurezza 2 e le buone pratiche di laboratorio durante l'esecuzione dei test.⁹ Trattare tutti i campioni e i dispositivi di analisi usati come capaci di trasmettere agenti infettivi. Non mangiare, bere o fumare in aree in cui vengono manipolati i campioni o i reagenti del kit.
5. Indossare guanti monouso per la manipolazione dei campioni e subito dopo lavarsi a fondo le mani.
6. Applicare i programmi di controllo qualità per i laboratori di analisi molecolari che comprendano impiego e manutenzione adeguati dell'apparecchiatura.¹⁰
7. Il dispositivo di test *illumigene* Malaria contiene reagenti liofilizzati. Le buste protettive non devono essere aperte fino a quando non si è pronti a eseguire il test.
8. I Dispositivi Test *illumigene* Malaria sono dotati di un sistema di chiusura ideato per prevenire la contaminazione dell'area di analisi con il prodotto di amplificazione. NON utilizzare Dispositivi Test con linguette di chiusura rotte.
9. Smaltire le colonne *M-prep* ed i Dispositivi Test *illumigene* Malaria immediatamente dopo l'utilizzo. Lasciare in posizione la linguetta di chiusura del dispositivo di test. NON aprire il Dispositivo Test dopo l'elaborazione. L'apertura del dispositivo dopo l'amplificazione può comportare la contaminazione dell'area di analisi con il prodotto di amplificazione.

DICHIARAZIONI DI PERICOLO E PRUDENZA

Fare riferimento alla SDS, disponibile sul sito www.meridianbioscience.com (US version) / www.meridianbioscience.eu (EU version) per i rischi e i consigli di prudenza.

STABILITÀ E CONSERVAZIONE

La data di scadenza è riportata sull'etichetta del kit. Conservare i componenti del kit alla temperatura indicata sull'etichetta.

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Assicurarsi che i reagenti del kit siano a temperatura ambiente (19-30 C) prima dell'uso. Assicurarsi che il Tampone I sia a temperatura ambiente prima dell'uso e che non vi siano precipitati visibili. Si potrebbero ottenere risultati non corretti se i reagenti non vengono portati a temperatura ambiente prima dell'uso.

PREPARAZIONE DELLA COLONNA (esclusivamente per test *illumigene* Malaria PLUS, Numero di Catalogo 281125)

Ispezionare visivamente ciascuna Colonna *M-Prep* ed accertarsi che la resina e i filtri non si siano spostati durante il trasporto. Le colonne con resina non perfettamente impaccata o filtri posizionati in modo scorretto potrebbero non funzionare in modo adeguato.

Preparazione della colonna

1. Usare 1 Colonna *M-prep* per ciascun campione da analizzare. Rimuovere il cappuccio superiore e poi il tappo inferiore a vite, ruotandolo.
2. Inserire la punta della Colonna in una Provetta ST. La Provetta ST deve essere tenuta in modo che sia leggermente inclinata (di circa 15 degree) rispetto alla Colonna *M-prep*.
NOTA: non appoggiare la Colonna direttamente sulla provetta di raccolta poiché potrebbe crearsi una chiusura, causando un flusso scorretto nella colonna. Consultare la figura 1 per il posizionamento corretto della Colonna e della Provetta di Raccolta.
3. Lasciare drenare la Colonna *M-prep* nella Provetta ST. Le Colonne *M-prep* da cui è stato drenato il liquido devono essere usate entro 1 ora.
4. Procedere con la preparazione del campione per il test *illumigene* Malaria PLUS.

FIGURA 1: posizionamento della Colonna *M-prep* e della Provetta ST



RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Tipo di campione: campioni di sangue intero venoso umano con EDTA come conservante.

Prelievo del campione: i campioni di sangue intero venoso vanno prelevati usando le provette per campione contenenti EDTA, conformemente a quanto stabilito dai protocolli istituzionali in merito al prelievo di campioni clinici ai fini del rilevamento di un'infezione malarica. Capovolgere la provetta di sangue immediatamente dopo il prelievo almeno 8 volte o secondo le istruzioni del fabbricante.

In seguito al prelievo e durante il trasporto in laboratorio, è opportuno conservare i campioni di sangue intero venoso in EDTA a una temperatura compresa tra 2 e 30 C. I campioni devono essere analizzati tempestivamente, ma prima dell'analisi possono essere conservati per un massimo di 7 giorni a temperatura ambiente (19-30 C) o fino a 14 giorni in frigorifero (-2-8 C). I campioni che non vengono analizzati nell'arco di tale periodo vanno congelati immediatamente a -20 C per un massimo di 30 giorni fino al momento dell'analisi. Dopo averli conservati a -20 C, i campioni possono essere congelati e scongelati al massimo 2 volte prima dell'analisi con il test *illumigene* Malaria.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

NOTA: assicurarsi che *illumipro-10* sia acceso e che siano state completate le necessarie verifiche del funzionamento prima di dare inizio alla PREPARAZIONE DEI CAMPIONI. Consultare il Manuale d'Uso di *illumipro-10* per ulteriori informazioni sulla configurazione e sul funzionamento dello strumento.

NOTA: accertarsi che i campioni siano a temperatura ambiente (19-30 C) prima della preparazione.

I campioni da analizzare con il test *illumigene* Malaria possono essere preparati seguendo uno dei metodi indicati di seguito.

1. **Preparazione dei campioni per il test *illumigene* Malaria (Numero di Catalogo 280925)**
 - a. Capovolgere 2-3 volte il campione di sangue intero con EDTA per miscelarlo.
 - b. Aggiungere 50 µL di sangue intero venoso con EDTA del paziente a una provetta di Tampone I. Miscelare capovolgendo 5 volte oppure su vortex per circa 10 secondi. Lasciare incubare il campione per 2 minuti.
 - c. Miscelare capovolgendo 5 volte oppure su vortex per circa 10 secondi e trasferire immediatamente 50 µL di lisato nell'Apparato di Preparazione dei Campioni **SMP PREP IV**. Miscelare capovolgendo 5 volte oppure su vortex per circa 10 secondi.
 - d. Premere delicatamente l'apparato SMP PREP IV e trasferire lentamente 5-10 gocce in una Provetta I pulita. Verificare in modo visivo che l'eluato abbia un colore da rosso a rossiccio-marrone. Etichettare la provetta con le informazioni identificative del campione e proseguire con la procedura di test.
2. **Preparazione dei campioni per il test *illumigene* Malaria PLUS (Numero di Catalogo 281125)**

NOTA: la procedura di eluzione dei campioni con le Colonne *M-prep* dovrebbe richiedere non più di 30 minuti. I campioni che richiedono tempi di eluzione superiori a 30 minuti vanno scartati e rianalizzati partendo dal campione originale.

 - a. Capovolgere 2-3 volte il campione di sangue intero con EDTA per miscelarlo.
 - b. Aggiungere 50 µL di sangue intero venoso con EDTA del paziente a una provetta Tampone I. Miscelare capovolgendo 5 volte oppure su vortex per circa 10 secondi. Lasciare incubare il campione per 2 minuti.
 - c. Miscelare capovolgendo 5 volte oppure su vortex per circa 10 secondi, quindi con una micropipetta trasferire immediatamente 250 µL del campione preparato nella parte superiore di una Colonna *M-prep* appositamente etichettata e preparata. Attendere circa 2 minuti o finché il campione non è stato assorbito dalla colonna e il flusso si interrompe. Questa procedura dovrebbe richiedere non più di 30 minuti.
 - d. Usando una micropipetta, aggiungere 250 µL di Tampone II *M-prep* alla parte superiore della Colonna *M-prep*. Gettare il puntale della pipetta. Dopo l'aggiunta del Tampone II *M-prep*, la colonna acquisisce un colore rosso. Attendere circa 2 minuti o finché il tampone rosso non viene assorbito dalla colonna e il flusso si interrompe. Questa procedura dovrebbe richiedere non più di 30 minuti.
 - e. Togliere l'ultima goccia di liquido dal puntale della Colonna con la Provetta ST. Gettare la provetta.
 - f. Inserire una Provetta ST pulita sotto la Colonna *M-prep*. Usando una micropipetta, aggiungere 250 µL di Tampone III *M-prep* alla parte superiore della Colonna *M-prep*. Gettare il puntale della pipetta. Attendere circa 2 minuti o finché il flusso non si interrompe. Questa procedura dovrebbe richiedere non più di 30 minuti.
 - g. Togliere l'ultima goccia di liquido dal puntale della Colonna con la Provetta ST. Verificare in modo visivo che l'eluato abbia un colore da rosso a rossiccio-marrone. Etichettare la provetta con le informazioni identificative del campione e passare alla procedura del test.

PROCEDURA DEL TEST

NOTA: In una seduta, con *illumipro-10* si possono analizzare massimo dieci campioni.

1. Rimuovere dalla relativa busta protettiva un dispositivo di test *illumigene* Malaria per ogni campione. Aprire con attenzione il dispositivo, tenendo le camere in maniera tale che i reagenti liofilizzati non fuoriescano dall'apertura. Collocare il dispositivo su una superficie piana o su un supporto in grado di contenerlo.
2. Con una micropipetta, trasferire 50 µL di campione nelle due camere TEST (granulo bianco) e CONTROLLO (granulo giallo) del Dispositivo Test *illumigene* Malaria. Fare attenzione a non introdurre aria nella miscela di reazione.
3. Chiudere il Dispositivo Test *illumigene* e chiudere saldamente la linguetta di chiusura.
4. Picchiettare il Dispositivo o i Dispositivi sul bancone o agitarli per rimuovere le bolle d'aria. Esaminare attentamente il Dispositivo o i Dispositivi Test per verificare la dissoluzione della microsfera di controllo/test e per escludere la presenza di bolle d'aria residue nella camera così come di liquido nella parte superiore del dispositivo. Se si notano microsferi non disciolte, bolle d'aria o liquido nella parte superiore del dispositivo, picchiettare il dispositivo sul bancone e ripetere l'ispezione visiva. L'amplificazione e il rilevamento devono iniziare entro 15 minuti.
5. Ripetere i passaggi della procedura di test per tutti i campioni da analizzare.
6. Inserire i Dispositivi Test *illumigene* nello strumento *illumipro-10* e avviarlo impostando il **programma per la malaria**. I risultati saranno visualizzati al completamento della seduta.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

ID Campione	Risultato riportato	Interpretazione
Campione del paziente	POSITIVO	Il campione contiene il DNA bersaglio di <i>Plasmodium spp.</i>
	NEGATIVO	Non è stato rilevato DNA di <i>Plasmodium spp.</i>
	NON VALIDO	Nessun risultato refertabile. Ripetere il test utilizzando il campione originale del paziente. Campione del paziente con effetto inibitorio, preparazione del campione non corretta, deterioramento del reagente, guasto dello strumento o fallimento del controllo interno.
Controllo positivo	POSITIVO	Risultato del controllo positivo valido. Reagenti reattivi al momento dell'uso, <i>illumipro-10</i> correttamente funzionante.
	NEGATIVO	Risultato del controllo non corretto. Ripetere il test di controllo come prima azione per la determinazione dell'insuccesso. Se i fallimenti del controllo sono ripetuti contattare l'Assistenza tecnica Meridian al numero 1-800-343-3858 (USA) o il proprio distributore locale (in Italia, +39 0331433636)
	NON VALIDO	Nessun risultato refertabile. Ripetere l'intera seduta di analisi usando i campioni originali. Preparazione del campione non corretta, deterioramento del reagente, guasto dello strumento o fallimento del controllo interno.
Controllo negativo	POSITIVO	Risultato del controllo non corretto. Ripetere il test di controllo come prima azione per la determinazione dell'insuccesso. Se i fallimenti del controllo sono ripetuti contattare l'Assistenza tecnica Meridian al numero 1-800-343-3858 (USA) o il proprio distributore locale. (in Italia, +39 0331433636)
	NEGATIVO	Risultato del controllo negativo valido. Reagenti reattivi al momento dell'uso, <i>illumipro-10</i> correttamente funzionante.
	NON VALIDO	Nessun risultato refertabile. Ripetere l'intero ciclo di analisi usando i campioni originali. Preparazione del campione non corretta, deterioramento del reagente, guasto dello strumento o fallimento del controllo interno.
POZZETTO VUOTO	NESSUNO	Nessun dispositivo di analisi <i>illumigene</i> nel pozzetto dell' <i>illumipro-10</i> . OPPURE Il risultato di analisi <i>illumigene</i> presente è compromesso a causa di un errore nella preparazione del campione, dispositivo sporco o dispositivo non propriamente alloggiato. Ripetere il test utilizzando il campione originale.

CONTROLLO QUALITÀ

Il test va eseguito conformemente ai requisiti stabiliti dai competenti enti locali, regionali, nazionali o dagli enti di accreditamento.

- Ogni dispositivo contiene un controllo interno che verifica l'inibizione dell'amplificazione, i reagenti di analisi, la preparazione del DNA e l'efficacia del trattamento del campione. Il DNA mitocondriale umano, che funge da DNA di controllo interno, è isolato a partire dal campione di sangue intero e viene processato facendolo passare per tutte le fasi della procedura. I primer per l'amplificazione del DNA di controllo interno sono presenti nella Camera di Controllo del dispositivo di test *illumigene*.
- La buona pratica di laboratorio raccomanda l'uso di materiali di controllo. Gli operatori devono attenersi alle pertinenti linee guida federali, statali e locali relative all'utilizzo di controlli di qualità esterni.
- Il Reagente di Controllo Positivo Esterno *illumigene* Malaria è disponibile separatamente (Numero di Catalogo 279970). In alternativa, campioni di sangue clinici caratterizzati come positivi a *Plasmodium spp.* o preparati artificialmente possono essere utilizzati come controlli esterni positivi. Come controllo esterno negativo è possibile utilizzare un campione di sangue umano intero con EDTA, precedentemente caratterizzato come negativo. Al momento della ricezione e prima dell'utilizzo, si raccomanda di verificare la reattività di ogni nuovo lotto e di ogni nuova spedizione del test *illumigene* Malaria e *illumigene* Malaria PLUS. I test di controllo esterni vanno eseguiti successivamente, in conformità con le linee guida statali e locali vigenti in materia. Il kit del test *illumigene* Malaria e *illumigene* Malaria PLUS non va utilizzato per l'analisi dei pazienti se i controlli esterni non producono risultati corretti.
- Occorre utilizzare un Dispositivo di Test separato per ciascun reagente di controllo esterno.

VALORI ATTESI

L'incidenza di *Plasmodium spp.* secondo quanto rilevato con il test *illumigene* Malaria nel corso della sperimentazione clinica condotta nel 2015 è stata del 68.1% (147/216) usando il metodo di preparazione del campione *illumigene* Malaria (numero di catalogo 280925) e del 70.6% (149/211) con il metodo *illumigene* Malaria PLUS (numero di catalogo 281125). L'incidenza complessiva di ciascuna specie di *Plasmodium* è riportata di seguito.

Specie	Prevalenza per specie di <i>Plasmodium</i>			
	<i>illumigene</i> Malaria (n=216)		<i>illumigene</i> Malaria PLUS (n=211)	
	Totale positivo	Prevalenza	Totale positivo	Prevalenza
<i>P. falciparum</i>	137	63.4%	134	63.5%
<i>P. vivax</i>	0	0%	0	0%
<i>P. ovale</i>	1	0.5%	1	0.5%
<i>P. malariae</i>	1	0.5%	1	0.5%
<i>P. knowlesi</i>	0	0%	0	0%
Sconosciuto*	8	3.7%	13	6.2%

*I campioni sono risultati negativi al microscopio a di conseguenza la speciazione non può essere effettuata.

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

- Questo prodotto può essere usato esclusivamente con lo strumento *illumipro-10*.
- I test *illumigene* Malaria e *illumigene* Malaria PLUS non distinguono le diverse specie di *Plasmodium*.
- Livelli di ematocrito (>57.5%) e di emoglobina (>30 g/dL) superiori ai normali livelli fisiologici possono produrre risultati non validi con i test *illumigene* Malaria.
- Le prestazioni dei test *illumigene* Malaria non sono state determinate per i campioni di eritrociti concentrati.
- Le performance di *Plasmodium knowlesi* con i test *illumigene* Malaria sono state valutate usando solo DNA genomico purificato; test sull'intero organismo non sono stati effettuati.
- I test *illumigene* Malaria e *illumigene* Malaria PLUS sono test qualitativi che non forniscono valori quantitativi né informazioni sul carico dell'organismo.
- Il rilevamento dell'acido nucleico bersaglio dipende dall'adeguatezza delle procedure di prelievo, manipolazione, trasporto, conservazione e preparazione dei campioni. Il mancato rispetto della procedura appropriata per ciascuna di queste fasi può portare a risultati errati.
- È possibile che gli acidi nucleici degli organismi persistano in vivo indipendentemente dalla vitalità degli organismi stessi. I test *illumigene* Malaria e *illumigene* Malaria PLUS non distinguono tra organismi vitali e non vitali.
- Come per tutti i test diagnostici molecolari vale quanto segue: (A) i risultati falsi negativi possono verificarsi in presenza di inibitori, errori tecnici, scambio di campioni o basso numero di organismi nel campione clinico; (B) i risultati falsi positivi possono verificarsi in presenza di contaminazione crociata da parte degli organismi bersaglio, dei rispettivi acidi nucleici o del prodotto di amplificazione, nonché di segnali aspecifici.

PRESTAZIONI SPECIFICHE

Le caratteristiche prestazionali dei test di amplificazione del DNA *illumigene* Malaria e *illumigene* Malaria PLUS sono state determinate nel corso di sperimentazioni cliniche condotte nel novembre 2015 in Senegal, Africa. Le caratteristiche prestazionali dei test sono state confrontate con il metodo di riferimento, cioè la microscopia a striscio sottile e a goccia spessa. L'identificazione della specie di *Plasmodium* per tutti i campioni positivi è stata effettuata mediante microscopia.

I campioni comprendevano campioni di sangue intero venoso con EDTA prospettici e retrospettivi provenienti da pazienti che manifestavano segni e sintomi di infezione da *Plasmodium*. Sono stati valutati complessivamente 216 campioni idonei di sangue intero resi anonimi. 66 campioni sono stati valutati in maniera prospettica mentre 150 campioni sono stati prelevati in modo prospettico e congelati prima di essere analizzati con il test *illumigene* Malaria (retrospettivo). Ciascun campione è stato analizzato con entrambi i metodi di preparazione del campione *illumigene* Malaria e *illumigene* Malaria PLUS. Cinque campioni sono stati considerati non idonei per il test *illumigene* Malaria PLUS a causa di errori di preparazione. Di conseguenza *illumigene* Malaria PLUS è stato valutato con 211 campioni idonei. Tutti i campioni sono stati analizzati prospettivamente al microscopio.

L'analisi delle prestazioni dei test con i campioni prospettici e retrospettivi ha indicato che non esiste alcuna differenza in termini di prestazione tra l'uso di campioni freschi e campioni congelati con i test *illumigene* Malaria e *illumigene* Malaria PLUS. Le tabelle che seguono riiepilogano le prestazioni dei test di amplificazione del DNA *illumigene* Malaria e *illumigene* Malaria PLUS per i campioni prospettici e retrospettivi combinati.

Prestazioni del test *illumigene* Malaria a confronto con la microscopia

	Microscopia			<i>illumigene</i>	Prestazioni				
	Pos	Neg	Totale	INV ^a			95% CI		
<i>illumigene</i> Malaria	Pos	139	8	147	0(1)	Sensibilità	100.0%	139/139	97.3-100.0%
	Neg	0	67	67	2(2)	Specificità	89.3%	67/75	80.3-94.5%
	Totale	139	75	214	2				

^aI risultati inizialmente invalidi sono riportati nelle parentesi. Il numero finale di campioni risultati invalidi dopo la ripetizione del test è mostrato prima della parentesi.

Prestazioni del test *illumigene* Malaria PLUS a confronto con la microscopia

	Microscopia			<i>illumigene</i>	Prestazioni				
	Pos	Neg	Totale	INV			95% CI		
<i>illumigene</i> Malaria PLUS	Pos	136	13	149	0	Sensibilità	100.0%	136/136	97.3-100.0%
	Neg	0	62	62	0	Specificità	82.7%	62/75	72.6-89.6%
	Totale	136	75	211	0				

I campioni sono stati raccolti da pazienti di età compresa tra 4 e 77 anni. 15 avevano un'età di 1 – 12 anni; 13 un'età di 13 – 21 anni; 125 un'età di ≥22 anni. L'età di un paziente non è stata definita. Non è stata notata alcuna differenza nelle prestazioni in base all'età. La popolazione dello studio includeva 84 (38.9%) pazienti di sesso femminile e 131 (60.6%) pazienti di sesso maschile; il sesso di un paziente è rimasto incognito. Non si prevedono differenze nelle prestazioni dei test in base al sesso.

SENSIBILITÀ ANALITICA

Il limite di rilevabilità (LdI) è stato determinato usando *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax*. Tale limite è stato determinato utilizzando 20 repliche e una probabilità dichiarata (ad es., 95%, dove 19 repliche su 20 sono positive) di ottenere risposte positive.

	<i>illumigene</i> Malaria	<i>illumigene</i> Malaria PLUS
Specie di <i>Plasmodium</i>	Parassiti/μL	Parassiti/μL
<i>P. falciparum</i> (3D7)	2	0.25
<i>P. vivax</i> (India VII)	0.125	0.063

REATTIVITÀ ANALISI

Quantità determinate di *P. malariae*, *P. ovale* e di DNA di *P. knowlesi* sono state diluite in sangue intero negativo fino a circa tre volte il limite di rilevabilità per ciascun metodo di preparazione del campione del test *illumigene* Malaria e *illumigene* Malaria PLUS (approssimativamente 72 copie/μL o 6 parassiti/μL per il test *illumigene* Malaria; approssimativamente 9 copie/μL o 0,75 parassiti/μL per il test *illumigene* Malaria PLUS). Alle concentrazioni analizzate, tutte le specie hanno dato segnale positivo.

RIPRODUCIBILITÀ

Tre laboratori interni hanno eseguito studi di riproducibilità. A questi laboratori partecipanti sono stati forniti pannelli di 10 campioni codificati in cieco. I pannelli includevano campioni artificiali di *Plasmodium falciparum* (ceppo 3D7) creati come campioni moderatamente positivi, campioni debolmente positivi o campioni fortemente negativi. Il pannello includeva altresì un campione di sangue intero negativo. L'analisi è stata condotta da almeno 2 diversi operatori in ciascun laboratorio lo stesso giorno (variabilità intra-analisi) per cinque giorni (variabilità inter-analisi). Per lo studio sono stati utilizzati tre lotti ciascuno di test *illumigene* Malaria e *illumigene* Malaria PLUS e 8 strumenti *illumipro-10*. I controlli esterni positivi e negativi sono stati testati con ogni pannello e un campione di sangue negativo qualificato è stato usato come controllo negativo.

Riepilogo dello studio di riproducibilità: metodo di allestimento del campione *illumigene* Malaria

Tipo di campione	Laboratorio 1		Laboratorio 2		Laboratorio 3		Totale	
	Percentuale di concordanza		Percentuale di concordanza		Percentuale di concordanza		Percentuale di concordanza	
Positivo moderato (8 Parassiti/μL)	30/30	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90	100.0%
Positivo basso (2 Parassiti/μL)	30/30	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90	100.0%
Negativo alto (0.458 Parassiti/μL)	30/30	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90	100.0%
Negativo	10/10	100.0%	10/10	100.0%	10/10	100.0%	30/30	100.0%
Controllo negativo	10/10	100.0%	10/10	100.0%	10/10	100.0%	30/30	100.0%
Controllo positivo	10/10	100.0%	10/10	100.0%	10/10	100.0%	30/30	100.0%

Riepilogo dello studio di riproducibilità: metodo di allestimento del campione <i>illumigene</i> Malaria PLUS								
Tipo di campione	Laboratorio 1		Laboratorio 2		Laboratorio 3		Totale	
	Percentuale di concordanza		Percentuale di concordanza		Percentuale di concordanza		Percentuale di concordanza	
Positivo moderato (1 Parassiti/µL)	30/30	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90	100.0%
Positivo basso (0.5 Parassiti/µL)	30/30	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90	100.0%
Negativo alto (0.029 Parassiti/µL)	29/30	96.7%	28/30	93.3%	30/30	100.0%	87/90	96.7%
Negativo	10/10	100.0%	10/10	100.0%	10/10	100.0%	30/30	100.0%
Controllo negativo	10/10	100.0%	10/10	100.0%	10/10	100.0%	30/30	100.0%
Controllo positivo	10/10	100.0%	10/10	100.0%	10/10	100.0%	30/30	100.0%

CROSS-REATTIVITÀ

Gli studi sulla reattività crociata hanno fatto uso di campioni di sangue positivi (*P. falciparum* 3D7) e negativi inoculati con organismi batterici o funghi a una concentrazione minima di $1,0 \times 10^4$ UFC/mL, virus a un minimo di $1,0 \times 10^5$ TCID₅₀/mL o protozoi a una concentrazione minima di $1,0 \times 10^5$ organismi/mL. Laddove non fossero disponibili organismi interi, si è analizzato il DNA genomico alla concentrazione di $1,0 \times 10^6$ copie/mL. Nessuno dei seguenti organismi o dei relativi materiali genetici ha reagito con i test *illumigene* Malaria: *Babesia microti*, *Borrelia burgdorferi*, *Hemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum*, *Leptospira interrogans*, *Mycobacterium smegmatis*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Treponema pallidum*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli*, *Vibrio parahaemolyticus*, citomegalovirus (CMV), virus di Epstein-Barr (EBV), virus dell'epatite B, virus dell'epatite C, virus Herpes simplex 1 (HSV 1), HIV-1, papillomavirus umano (HPV) e virus della rosolia.

Non è stato possibile ottenere gli organismi seguenti, o il relativo DNA, a scopo di analisi e pertanto essi sono stati valutati tramite analisi *in silico*. Sulla base di tale analisi, non si prevede alcuna reazione dei seguenti organismi con il test *illumigene* Malaria:

Anaplasma phagocytophilum, *Clostridium botulinum*, *Orientia tsutsugamushi*, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, virus della malattia di Chikungunya, virus Dengue (tipi 1-4), il virus del Nilo occidentale e il virus della febbre gialla.

Il DNA genomico umano non ha reagito alla concentrazione di $1,0 \times 10^6$ copie/mL.

ANALISI DI SOSTANZE INTERFERENTI

Il test sull'interferenza è stato condotto in presenza delle concentrazioni peggiori di sostanze chimiche e biologiche introdotte direttamente nei campioni debolmente positivi (*P. falciparum* 3D7) prodotti artificialmente e nei campioni negativi di sangue intero. Per nessuno dei metodi di preparazione del campione *illumigene* Malaria sono state osservate interferenze con le sostanze seguenti:

acetaminofene (1 mg/mL), amoxicillina (0,1 mg/mL), artesunato (1 mg/mL), aspirina (1 mg/mL), atovaquone (0,1 mg/mL), cefalexina (0,1 mg/mL), clorochina (1 mg/mL), ciprofloxacina (0,1 mg/mL), clindamicina (1 mg/mL), doxiciclina cloridrato (1 mg/mL), eritromicina (0,1 mg/mL), idrossiclorochina solfato (1 mg/mL), ibuprofene (1 mg/mL), lumefantrina (1 mg/mL), meflochina (1 mg/mL), piramichina fosfato (1 mg/mL), proguanil cloridrato (1 mg/mL), pirimetamina (1 mg/mL), chinina solfato (1 mg/mL), citrato di sodio (0,11 M), bilirubina elevata (>0,15 mg/mL), leucociti elevati (buffy coat) >10% v/v, sierioalbumina (>0,03 g/mL) e trigliceridi (>9,9 mg/mL).

Livelli di ematocrito (>57.5%) e di emoglobina (>30 g/dL) superiori ai normali livelli fisiologici possono produrre risultati non validi con i test *illumigene* Malaria.

FRANÇAIS



Tests d'amplification de l'ADN *illumigene* Malaria et *illumigene* Malaria PLUS

Tests d'amplification de l'ADN pour la détection d'espèces du genre *Plasmodium*.

REF 280925, 281125

IVD Dispositif médical de diagnostic in vitro

BUT DE LE METHODE

Les tests d'amplification de l'ADN *illumigene* Malaria et *illumigene* Malaria PLUS réalisés sur le système *illumipro-10™* sont des tests qualitatifs de diagnostic *in vitro* pour la détection directe d'ADN d'espèces du genre *Plasmodium* dans des échantillons de sang total veineux humain EDTA provenant de personnes présentant des signes et symptômes d'une infection paludéenne. Les résultats des tests *illumigene* Malaria sont destinés à être utilisés comme aide au diagnostic d'une infection paludéenne chez l'humain.

Les tests *illumigene* Malaria utilisent la technique d'amplification isotherme de l'ADN facilitée par boucle (LAMP, *loop-mediated isothermal DNA amplification*) pour détecter l'ADN d'espèces du genre *Plasmodium* en ciblant des segments du génome de *Plasmodium*. Les tests *illumigene* Malaria ne font pas de distinction entre les différentes espèces de *Plasmodium*.

Les tests *illumigene* Malaria et *illumigene* Malaria PLUS sont destinés à une utilisation dans des laboratoires en milieu hospitalier, de référence, régionaux, privés ou publics. Les dispositifs ne sont pas prévus pour une utilisation dans une unité de soins hors laboratoire.

RESUME ET EXPLICATION DU TEST

Les tests moléculaires *illumigene* Malaria et *illumigene* Malaria PLUS reposent sur la technique d'amplification facilitée par boucle (LAMP).^{1,2} Les tests ciblent une région du génome de *Plasmodium* présent chez les espèces suivantes: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* et *Plasmodium knowlesi*. Les tests *illumigene* Malaria ciblent une séquence de 214 paires de bases (pb) de la région non codante de l'ADN mitochondrial d'espèces du genre *Plasmodium*.

L'amplification facilitée par boucle utilise des amorces spécialement conçues pour obtenir une amplification isotherme et continue de l'ADN. Le pyrophosphate de magnésium, sous-produit de cette amplification forme un précipité blanc qui trouble la solution de réaction. Les caractéristiques d'absorbance de la solution de réaction sont suivies par l'incubateur/lecteur *illumipro-10* de Meridian. La présence de l'ADN cible est signalée par la modification des caractéristiques d'absorbance de la solution de réaction en raison de la précipitation de pyrophosphate de magnésium. En l'absence de l'ADN cible, aucune modification significative de l'absorbance de l'échantillon n'est observée.

Le kit *illumigene* Malaria inclut des dispositifs de test *illumigene* Malaria, le système de préparation des échantillons IV (SMP PREP IV), le tampon I *illumigene* et des tubes. Les échantillons de sang total sont d'abord traités avec le tampon I; les cellules sont lysées libérant des acides nucléiques. Le lysat est alors ajouté au système SMP PREP IV et filtré dans un tube I propre par pression douce. L'effluent de l'échantillon recueilli après la filtration contient les acides nucléiques à utiliser dans le test *illumigene* Malaria.

Le kit *illumigene* Malaria PLUS inclut des dispositifs de test *illumigene* Malaria, des colonnes *M-prep*, le tampon I *illumigene*, le tampon II *M-prep*, le tampon III *M-prep* et des tubes ST. Les échantillons de sang total sont traités par chromatographie d'exclusion par la taille, qui par écoulement par gravité sépare et purifie les acides nucléiques. Les colonnes *M-prep* fournissent la matrice pour la purification des acides nucléiques tandis que les tampons inclus facilitent la lyse cellulaire et l'élué des échantillons. Les échantillons de sang total sont d'abord traités avec le tampon I; les cellules sont lysées libérant les acides nucléiques. L'échantillon est déposé dans la colonne *M-prep* où il se déplace par gravité, les molécules les plus grosses se déplaçant d'abord (plus rapidement) tout au long de la colonne. Le tampon II *M-prep* est introduit dans la colonne *M-prep*, facilitant le déplacement de l'échantillon dans la matrice de la colonne. Le tampon III *M-prep* contient un colorant non réactif qui sert d'indicateur visuel de la progression de l'échantillon. Le tampon III *M-prep* est introduit dans la colonne *M-prep* après pénétration du tampon II dans le gel de la matrice. L'effluent d'échantillon recueilli après l'ajout du tampon III *M-prep* contient les acides nucléiques à utiliser dans le dispositif de test *illumigene* Malaria. Aucun des tests *illumigene* Malaria ou *illumigene* Malaria PLUS ne nécessite d'équipement de laboratoire spécialisé.

Le dispositif de test *illumigene* Malaria contient une bille de réactif d'amplification lyophilisée dans chacune de ses deux chambres: une chambre de TEST comprenant des amorces spécifiques des espèces du genre *Plasmodium* et une puits chambre de CONTROLE comprenant des amorces spécifiques de l'ADN mitochondrial humain. L'ADN mitochondrial humain dans les échantillons de sang total et les amorces spécifiques de l'ADN mitochondrial humain dans la chambre de CONTROLE du dispositif de test jouent le rôle de contrôle interne du test. Pendant la préparation des échantillons, l'ADN mitochondrial humain est extrait simultanément avec l'ADN mitochondrial des espèces de *Plasmodium* afin de permettre un traitement en parallèle de l'ADN cible et de l'ADN de contrôle lors des étapes d'amplification et de détection. Le contrôle interne permet de surveiller l'extraction de l'ADN, l'inhibition de l'amplification, la performance des réactifs du test et l'efficacité du traitement des échantillons. La séquence cible du contrôle doit être amplifiée et détectée dans la réaction finale. Dans le cas contraire, le test est considéré comme étant non valide et les résultats ne sont pas rendus.

L'instrument *illumipro-10* suit les modifications des caractéristiques d'absorbance en mesurant la transmission de la lumière à travers les solutions de réaction de test et de contrôle. La transmission de la lumière est contrôlée au début (Signal_{initial}, S_i) et à la fin (Signal_{final}, S_f) de l'exécution du test. L'instrument *illumipro-10* calcule la variation de la transmission de la lumière entre le début et la fin de l'exécution du test (Sr:S_f) et il compare le rapport à une valeur seuil prédéfinie.

Des valeurs seuil prédéfinies pour la chambre de TEST sont utilisées pour présenter les résultats des échantillons. Les rapports Sr:S_f inférieurs à 70% dans la chambre de TEST sont présentés en résultat «POSITIF»; les rapports Sr:S_f supérieurs ou égaux à 70% dans la chambre de TEST sont présentés en résultat «NEGATIF». Les valeurs numériques ne sont pas présentées.

Des valeurs seuil prédéfinies pour la chambre de CONTROLE sont utilisées pour confirmer la validité du test. Les rapports Sr:S_f inférieurs à 85% dans la chambre de CONTROLE sont considérés comme valides et conduisent à la présentation des résultats de la chambre de TEST (POSITIF, NEGATIF). Les rapports Sr:S_f supérieurs ou égaux à 85% dans la chambre de CONTROLE sont considérés comme non valides et empêchent la présentation des résultats pour la chambre de TEST. Les réactions non valides de la chambre de CONTROLE sont présentées comme «NON VALIDES». Les valeurs numériques ne sont pas présentées.

Des critères d'exclusion plus sévères sont appliqués à la réaction de la chambre de CONTROLE pour s'assurer que l'amplification n'est pas inhibée, que les réactifs fonctionnent comme prévu et que l'échantillon a été traité de manière appropriée.

PRINCIPE DU TEST

En matière de santé publique, le paludisme (ou malaria) représente un problème à l'échelle mondiale, la population à risque d'infection étant estimée à 3,2 milliards de personnes dans 97 pays.³ L'Organisation mondiale de la Santé (OMS) estime à 198 millions le nombre de cas en 2013, dont environ 584 000 décès.³ Le paludisme est provoqué par un parasite intracellulaire du genre *Plasmodium* transmis aux humains par la femelle du moustique du genre *Anopheles*.³ Après avoir infecté l'humain, le parasite *Plasmodium* passe par de nombreux stades morphologiques, comportant une phase initiale de croissance dans les cellules hépatiques, suivie d'une invasion des globules rouges.⁴ *Plasmodium* se réplique ensuite dans les globules rouges, causant leur rupture et les symptômes cliniques de la maladie.⁴

On dénombre cinq espèces du genre *Plasmodium* connues pour provoquer le paludisme chez l'humain (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* et *Plasmodium knowlesi*), la majorité des infections étant causées par *P. falciparum* et *P. vivax*. Le traitement du paludisme dépend de l'espèce *Plasmodium*, de l'état clinique du patient et de sa sensibilité aux antimicrobiens.⁵ Les infections causées par *P. falciparum* et *P. knowlesi* sont généralement plus graves et nécessitent un traitement rapide.⁵

L'OMS recommande d'effectuer des tests diagnostiques dès qu'un cas de paludisme est soupçonné.⁶ Habituellement, l'examen microscopique d'un frottis mince et d'une goutte épaisse sont la méthode de référence pour le diagnostic de la malaria. Toutefois, l'exactitude et la précision de cet examen microscopique dépendent beaucoup de la compétence du technicien (la limite de détection se situant entre 4 à 100 parasites/µL, voire davantage), avec des taux de faux négatifs et de faux positifs variant entre 10 et 25% et une variabilité de l'analyse quantitative de 2 à 3 fois supérieure.^{6,7,8} De plus, les erreurs dans l'identification de l'espèce du genre *Plasmodium* en jeu sont fréquentes lors de l'examen microscopique de routine.⁸ Les tests diagnostiques rapides (TDR) par immuno-essai peuvent aussi être utilisés pour le diagnostic. Des analyses de qualité effectuées par l'OMS ont montré qu'à de faibles densités parasitaires (200 parasites/µL), seulement 76% et 42% des TDR disponibles pouvaient respectivement détecter *P. falciparum* et *P. vivax*.³

Les tests *illumigene* Malaria permettent d'obtenir rapidement des résultats d'une plus grande sensibilité que celle des examens de microscopie et des TDR.

MATERIEL FOURNI

Le nombre maximal de tests pouvant être réalisés à partir de ce coffret est indiqué sur la boîte.

- Pour le test *illumigene* Malaria, référence 280925
- Dispositif de test *illumigene* Malaria: dispositif à deux chambres contenant des réactifs d'amplification lyophilisés (ADN polymérase, désoxynucléotides triphosphates) et des amorces spécifiques d'espèces de *Plasmodium* (chambre de TEST) ou de l'ADN mitochondrial humain (chambre de CONTROLE).
 - Tampon I *illumigene*: solution de lyse contenant de l'hydroxyde de sodium à 0,2 N
 - Système de préparation des échantillons *illumigene* IV (SMP PREP IV): solution tamponnée au Tris contenant une solution d'azide à 0,09% en tant que conservateur.
 - Tube I *illumigene*: tubes de 1,5 mL

Pour le test *illumigene* Malaria PLUS, référence 281125

- Dispositif de test *illumigene* Malaria: dispositif à deux chambres contenant les réactifs d'amplification lyophilisés (ADN polymérase, désoxynucléotides triphosphates) et des amorces spécifiques d'espèces de *Plasmodium* (chambre de TEST) ou de l'ADN mitochondrial humain (chambre de CONTROLE).
- Tampon I *illumigene*: solution de lyse contenant de l'hydroxyde de sodium 0,2 N.
- Tampon II *M-prep*: solution contenant du rouge de phénol et une solution d'azide à 0,09% comme conservateur.
- Tampon III *M-prep*: solution tamponnée au Tris contenant une solution d'azide à 0,09% comme conservateur.
- Colonne *M-prep*: colonne de 5,0 cm de long avec un embout à dévisser et capuchon d'étanchéité contenant la résine de chromatographie dans une solution tamponnée au Tris et une solution d'azide à 0,09% comme conservateur.
- Tubes ST: tubes de microcentrifugation de 2,0 mL à bouchon à vis.

MATERIEL FOURNI SEPARÉMENT

1. Kit de contrôle externe *illumigene* Malaria, Meridian Bioscience, référence: 279970

MATERIEL NON FOURNI

- Gants jetables en latex, non poudrés
- Embouts de pipettes résistant aux aérosols, sans ADNase/ARNase
- Tubes de collecte de sang avec anticoagulant EDTA

EQUIPEMENT NON FOURNI

- Minuteur
- Agitateur-mélangeur vortex (facultatif)
- Micropipette pouvant distribuer 50 µL
- Micropipette pouvant distribuer 250 µL (référence 281125 uniquement)
- illumipro-10*, Meridian Bioscience, Inc. Numéro de référence: 610172

PRECAUTIONS D'EMPLOI

1. Tous les réactifs sont pour un usage diagnostique in vitro.
2. Ne pas mélanger les réactifs et les dispositifs de test appartenant à des lots différents. Les lots individuels de tubes I et de tubes ST sont interchangeables pour chacun des types de kit, à condition de les utiliser avant la date de péremption indiquée.
3. L' *illumipro-10* peut donner des résultats incorrects si le programme de test Malaria n'est pas utilisé.
4. Suivre les consignes de sécurité biologique de niveau 2 et les bonnes pratiques de laboratoire pendant les tests.⁹ Traiter tous les spécimens et tous les dispositifs de test comme s'ils étaient susceptibles de transmettre des agents infectieux. Ne pas manger, boire ou fumer dans les espaces où les échantillons ou les réactifs du kit sont manipulés.
5. Porter des gants jetables lors de la manipulation des échantillons. Se laver minutieusement les mains après la manipulation.
6. Les programmes de contrôle de la qualité pour les laboratoires d'analyses moléculaires, y compris la bonne utilisation et l'entretien de l'équipement, doivent être suivis.¹⁰
7. Les dispositifs de test *illumigene* Malaria contiennent des réactifs lyophilisés. Ne pas ouvrir les pochettes de protection avant d'être prêt à effectuer le test.
8. Les dispositifs de test *illumigene* Malaria sont munis d'un loquet conçu pour éviter la contamination de la zone de test avec le produit d'amplification. NE PAS utiliser les dispositifs de test dont le loquet est endommagé.
9. Jeter les dispositifs de test *illumigene* Malaria, les colonnes **M-prep** et les tubes immédiatement après utilisation. Laisser le loquet du dispositif bien en place. NE PAS ouvrir le dispositif de test après le traitement. L'ouverture du dispositif après l'amplification risque de contaminer la zone de test avec le produit d'amplification.

DANGER ET MISES EN GARDE

Pour les dangers et les précautions à prendre, se référer à la fiche de sécurité, disponible sur le site web de Meridian Bioscience. [(www.meridianbioscience.com) (US version) / (www.meridianbioscience.eu) (EU version)]

DUREE DE CONSERVATION ET STOCKAGE

La date de péremption figure sur l'étiquette du kit. Stocker les composants du kit à la température indiquée sur l'étiquette.

PREPARATION DES REACTIFS

S'assurer que les réactifs du kit sont à la température ambiante (19 C à 30 C) avant leur emploi. S'assurer que le tampon I est à température ambiante avant utilisation et qu'aucun précipité n'est présent. Si les réactifs ne sont pas amenés à la température ambiante avant l'emploi, des résultats incorrects pourraient être observés.

PREPARATION DE LA COLONNE (uniquement pour le test *illumigene* Malaria PLUS, référence: 281125)

Examiner visuellement chaque colonne **M-Prep** et s'assurer que les microsphères et les filtres de la colonne n'ont pas été perturbés pendant le transport. Les colonnes dont la résine a été dérangée ou dont les filtres sont mal positionnés peuvent donner des résultats incorrects.

Préparation de la colonne:

1. Utiliser 1 colonne **M-prep** pour chaque échantillon à tester. Retirer le capuchon du haut et l'embout à dévisser du bas.
2. Placer l'embout de la colonne dans un tube **ST**. Le tube **ST** doit être maintenu légèrement incliné (à un angle d'environ 15°) par rapport à la colonne **M-prep**.
REMARQUE: Ne pas poser la colonne directement sur le tube de prélèvement car cela peut créer un blocage et entraîner un mauvais écoulement à travers la colonne. Consulter la Figure 1 pour le positionnement correct de la colonne et du tube de prélèvement.
3. Laisser la colonne **M-prep** se vider dans le tube **ST**. Les colonnes **M-prep** drainées doivent être utilisées dans un délai de 1 heure.
4. Préparer les échantillons pour le test *illumigene* Malaria PLUS.

FIGURE 1: Positionnement de la colonne **M-prep** et du tube **ST**



PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Type d'échantillon: Echantillons de sang total veineux humain avec EDTA comme conservateur.

Prélèvement des échantillons: les échantillons de sang veineux total doivent être prélevés dans des tubes pour échantillon contenant de l'EDTA, conformément aux directives de l'établissement relatives à la collecte d'échantillons pour la détection d'infections paludéennes. Veiller à retourner le tube de collecte de sang au moins 8 fois après le prélèvement ou conformément aux instructions du fabricant.

Après leur prélèvement et pendant leur transport vers le laboratoire, les échantillons de sang veineux total EDTA peuvent être conservés entre 2 et 30 C. Les échantillons doivent être analysés dès que possible, mais peuvent être conservés à température ambiante (19 à 30 C) pendant 7 jours maximum ou au réfrigérateur (entre 2 et 8 C) pendant 14 jours maximum avant d'être analysés. Les échantillons non analysés dans ce délai doivent être congelés immédiatement à une température à -20 C jusqu'à 30 jours maximum avant d'être analysés. Avant d'être soumis aux tests *illumigene* Malaria, les échantillons peuvent être congelés et décongelés 2 fois après avoir été conservés à -20 C.

PREPARATION DES ECHANTILLONS

REMARQUE: S'assurer que l'instrument *illumipro-10* est sous tension et que les vérifications de performances ont été effectuées avant le début de la PREPARATION DES ECHANTILLONS. Consulter le manuel de l'utilisateur de l'*illumipro-10* pour obtenir de plus amples renseignements sur l'installation et le fonctionnement de l'appareil.

REMARQUE: S'assurer que les échantillons sont à température ambiante (19-30 C) avant la préparation des échantillons.

Les échantillons à analyser à l'aide du dispositif *illumigene* Malaria peuvent être préparés en utilisant les méthodes suivantes:

1. **Préparation des échantillons *illumigene* Malaria (référence 280925)**
 - a. Mélanger l'échantillon de sang total veineux EDTA par 2 à 3 inversions du tube de prélèvement.
 - b. Ajouter 50 µL de sang total EDTA de patient à un tube de tampon I. Mélanger en inversant le tube 5 fois ou passer au vortex pendant environ 10 secondes. Laisser reposer l'échantillon pendant 2 minutes.
 - c. Mélanger en inversant le tube 5 fois ou passer au vortex pendant 10 secondes, puis transférer immédiatement 50 µL du lysat vers le système SMP PREP IV. Mélanger en inversant 5 fois ou passer au vortex pendant 10 secondes.
 - d. Presser doucement le système SMP PREP IV et recueillir lentement 5 à 10 gouttes dans un tube I propre. Vérifier visuellement que l'éluat est d'une couleur rouge à brun rougeâtre. Étiqueter le tube en indiquant les informations sur l'échantillon et procéder au test.
2. **Préparation des échantillons *illumigene* Malaria PLUS (référence 281125)**

REMARQUE: avec les colonnes **M-prep**, les étapes d'éluat de l'échantillon ne devraient pas durer plus de 30 minutes. Les échantillons dont l'éluat dure plus de 30 minutes doivent être jetés et de nouveaux tests doivent être effectués sur l'échantillon original du patient.

 - a. Mélanger l'échantillon de sang total veineux EDTA par 2 à 3 inversions du tube de prélèvement.
 - b. Ajouter 50 µL de sang total EDTA du patient à un tube de tampon I. Mélanger en retournant le tube 5 fois ou passer au vortex pendant environ 10 secondes. Laisser incuber l'échantillon pendant 2 minutes.
 - c. Mélanger en inversant le tube 5 fois ou passer au vortex pendant 10 secondes, puis à l'aide d'une micropipette, transférer immédiatement 250 µL de l'échantillon préparé dans la partie supérieure d'une colonne **M-prep** étiquetée et préparée de façon appropriée. Attendre environ 2 minutes ou jusqu'à ce que l'échantillon soit absorbé par la colonne et que l'écoulement s'arrête. Cette étape ne devrait pas prendre plus de 30 minutes.
 - d. A l'aide d'une micropipette, ajouter 250 µL de tampon **M-prep** II dans la partie supérieure de la colonne **M-prep**. Jeter l'embout de la pipette. La colonne vira au rouge après l'ajout de tampon **M-prep** II. Attendre environ 2 minutes ou jusqu'à ce que le tampon de couleur rouge soit absorbé par la colonne et que l'écoulement s'arrête. Cette étape ne devrait pas prendre plus de 30 minutes.
 - e. Retirer la dernière goutte de liquide de l'embout de la colonne à l'aide du tube **M-prep**. Jeter le tube.
 - f. Placer un tube **M-prep** propre sous la colonne **M-prep**. A l'aide d'une micropipette, ajouter 250 µL de tampon **M-prep** III dans la partie supérieure de la colonne **M-prep**. Jeter l'embout de la pipette. Attendre environ 2 minutes ou jusqu'à ce que l'écoulement s'arrête. Cette étape ne devrait pas prendre plus de 30 minutes.
 - g. Retirer la dernière goutte de liquide de l'embout de la colonne à l'aide du tube **ST**. Vérifier visuellement que l'éluat est d'une couleur rouge à brun rougeâtre. Étiqueter le tube en indiquant les informations d'identification de l'échantillon et procéder au test.

PROCEDURE DE TEST

REMARQUE: *illumipro-10* peut traiter un maximum de 10 dispositifs de test par série

1. Retirer 1 dispositif de test *illumigene* Malaria de sa pochette de protection par échantillon. Ouvrir délicatement le dispositif en tenant les puits de façon à ce que les réactifs lyophilisés ne s'échappent pas lors de l'ouverture. Placer le dispositif sur une surface plane ou dans un support adapté pour le recevoir.
2. A l'aide d'une micropipette, transférer 50 µL de l'échantillon à la fois vers la chambre de TEST (bille blanche) et la chambre de CONTROLE (bille jaune) du dispositif de test *illumigene* Malaria. Veiller à ne pas faire entrer de bulles d'air dans le mélange réactionnel.
3. Fermer le dispositif de test *illumigene* et rabattre correctement le loquet.
4. Tapoter le ou les dispositifs sur la paillasse ou mélanger pour éliminer les bulles d'air. Examiner soigneusement le ou les dispositifs de test pour vérifier la réhydratation de la bille de contrôle/de test, l'absence de bulles d'air dans la chambre et de liquide au sommet du dispositif. En cas de billes non dissoutes, de bulles d'air ou de liquide dans les bouchons, tapoter le dispositif sur la paillasse et répéter l'examen visuel. L'amplification et la détection doivent commencer dans les 15 minutes.
5. Répéter ces étapes pour tous les échantillons à tester.
6. Insérer chaque dispositif de test *illumigene* dans l'instrument *illumipro-10* et lancer la réaction d'amplification en utilisant le programme Malaria. Les résultats seront affichés à la fin de l'exécution du test.

INTERPRETATION DES RESULTATS

ID échantillon	Résultats indiqués	Interprétation
Echantillon de patient	POSITIF	Échantillon contenant l'ADN cible d'espèces du genre <i>Plasmodium</i>
	NEGATIF	Pas d'ADN <i>Plasmodium</i> détecté.
	NON VALIDE	Aucun rendu de résultat possible. Recommencer le test à l'aide de l'échantillon de patient d'origine. Spécimen de patient inhibiteur, mauvaise préparation de l'échantillon, échec du réactif, erreur de l'instrument ou échec du contrôle interne.
Contrôle positif	POSITIF	Résultat de contrôle positif valide. Réactifs actifs au moment de l'utilisation, fonctionnement correct de l' <i>illumipro-10</i> .
	NEGATIF	Résultat de contrôle non valide. La première étape pour déterminer la cause de l'échec est de répéter les tests de contrôle. Contacter le Service Technique de Meridian Bioscience ou votre distributeur local pour assistance si les résultats de contrôle escomptés ne sont pas observés de façon répétée.
	NON VALIDE	Aucun rendu de résultat possible. Recommencer l'intégralité de l'analyse à l'aide des échantillons d'origine. Mauvaise préparation de l'échantillon, échec du réactif, erreur de l'instrument ou échec du contrôle interne.
Contrôle négatif	POSITIF	Résultat de contrôle non valide. La première étape pour déterminer la cause de l'échec est de répéter les tests de contrôle. Contacter le Service Technique de Meridian Bioscience ou votre distributeur local pour assistance si les résultats de contrôle escomptés ne sont pas observés de façon répétée.
	NEGATIF	Résultat de contrôle négatif valide. Réactifs actifs au moment de l'utilisation, fonctionnement correct de l' <i>illumipro-10</i> .
	NON VALIDE	Aucun rendu de résultat possible. Recommencer l'intégralité de l'analyse à l'aide des échantillons d'origine. Mauvaise préparation de l'échantillon, échec du réactif, erreur de l'instrument ou échec du contrôle interne.
PUITS VIDE	AUCUN	Aucun dispositif de test <i>illumigene</i> dans le puits de l' <i>illumipro-10</i> . OU le dispositif de test <i>illumigene</i> présent ne répond pas en raison d'une mauvaise préparation de l'échantillon, de saleté ou d'un mauvais positionnement du dispositif. Recommencer le test à partir des échantillons d'origine.

CONTROLE DE QUALITE

Ce test doit être réalisé en fonction des exigences des réglementations locales et / ou nationales ou des directives des organismes d'accréditation.

- Chaque dispositif contient un contrôle interne qui vérifie l'absence d'inhibition de l'amplification, les réactifs de test, la préparation de l'ADN et l'efficacité du traitement des échantillons. L'ADN mitochondrial humain, qui sert de contrôle d'ADN interne, est isolé de l'échantillon de sang total et passe par toutes les étapes de la procédure. Les amorces d'amplification de l'ADN du contrôle interne sont présentes dans la chambre de contrôle du dispositif de test *illumigene*.
- Les bonnes pratiques de laboratoire recommandent l'emploi de matériels de contrôle. Les utilisateurs doivent suivre les directives locales, nationales ou fédérales appropriées relatives à l'exécution de contrôles de qualité externes.
- Le réactif de contrôle externe positif *illumigene* Malaria est fourni séparément (référence 279970). Alternativement, un échantillon sanguin précédemment positif pour l'espèce *Plasmodium*, qu'il soit clinique ou artificiel, peut être utilisé comme contrôle positif externe. Un échantillon qualifié négatif de sang veineux total humain à l'EDTA peut être utilisé en tant que contrôle externe négatif. Il est recommandé de vérifier la réactivité de chaque nouveau lot et de chaque nouvel envoi de test *illumigene* Malaria et *illumigene* Malaria PLUS dès leur réception et avant l'emploi. Les tests de contrôle externe doivent être effectués par la suite conformément aux directives locales, nationales et/ou fédérales. Les kits de test *illumigene* Malaria et *illumigene* Malaria PLUS ne doivent pas être utilisés pour tester les patients si les contrôles externes ne fournissent pas de résultats escomptés.
- Utiliser un dispositif de test séparé pour chaque réactif de contrôle externe.

VALEURS ATTENDUES

L'incidence des espèces de *Plasmodium* telle qu'elle a été détectée par le test *illumigene* Malaria au cours de l'étude clinique de 2015 a été de 68.1% (147/216) avec la méthode de préparation d'échantillons *illumigene* Malaria (référence 280925) et 70.6% (149/211) avec la méthode *illumigene* Malaria PLUS (référence 281125). L'incidence globale de chaque espèce de *Plasmodium* est indiquée ci-dessous.

Espèces	Prévalence des espèces de <i>Plasmodium</i>			
	<i>illumigene</i> Malaria (n=216)		<i>illumigene</i> Malaria PLUS (n=211)	
	Total positifs	Prévalence	Total positifs	Prévalence
<i>P. falciparum</i>	137	63.4%	134	63.5%
<i>P. vivax</i>	0	0%	0	0%
<i>P. ovale</i>	1	0.5%	1	0.5%
<i>P. malariae</i>	1	0.5%	1	0.5%
<i>P. knowlesi</i>	0	0%	0	0%
Inconnu*	8	3.7%	13	6.2%

* Les échantillons étaient négatifs par microscopie, par conséquent l'espèce n'a pu être identifiée.

LIMITES DU TEST

- Ce produit ne peut être utilisé qu'avec l'instrument *illumipro-10*.
- Les tests *illumigene* Malaria et *illumigene* Malaria PLUS ne font pas de distinction entre les différentes espèces du genre *Plasmodium*.
- Des taux d'hématocrite (>57.5%) et d'hémoglobine (>30 g/dL) supérieurs aux niveaux physiologiques normaux peuvent produire des résultats non valides avec les tests *illumigene* Malaria.
- La performance des tests *illumigene* Malaria n'a pas été définie pour les échantillons de globules rouges concentrés.
- Les performances des tests *illumigene* Malaria sur *Plasmodium knowlesi* ont été établies à partir de l'ADN génomique purifié; les tests sur organisme entier n'ont pas été réalisés.
- Les tests *illumigene* Malaria et *illumigene* Malaria PLUS sont des tests qualitatifs et ne fournissent pas de valeurs ou d'informations quantitatives sur la charge en organismes.
- La détection des acides nucléiques dépend du prélèvement, de la manipulation, du transport, du stockage et/ou de la préparation. Le non-respect de la procédure décrite lors de l'une de ces étapes peut entraîner des résultats incorrects.
- L'acide nucléique de l'organisme peut persister *in vivo*, indépendamment de la viabilité de l'organisme. Les tests *illumigene* Malaria et *illumigene* Malaria PLUS ne font pas de distinction entre les organismes viables et non viables.
- Comme avec tous les tests de diagnostic moléculaire, (A) des résultats faussement négatifs peuvent se produire en raison de la présence d'inhibiteurs, d'erreurs techniques, de mélanges d'échantillons ou de faibles quantités d'organismes dans l'échantillon clinique; (B) des résultats faussement positifs peuvent se produire en raison de la présence d'une contamination croisée par des organismes cibles, leurs acides nucléiques ou leur produit amplifié, et en raison de signaux non spécifiques.

PERFORMANCES DU TEST

Les caractéristiques de performance des tests d'amplification de l'ADN *illumigene* Malaria et *illumigene* Malaria PLUS ont été définies au cours d'études cliniques en novembre 2015 au Sénégal, en Afrique. Les caractéristiques de performance du test ont été comparées à celles de la méthode de référence, de l'examen microscopique d'un frottis mince et d'une goutte épaisse. L'identification des espèces de *Plasmodium* pour tous les échantillons positifs a été déterminée par microscopie.

Les échantillons incluaient des échantillons prospectifs et rétrospectifs de sang total veineux à l'EDTA provenant de patients présentant des signes et symptômes d'une infection par *Plasmodium*. Au total, 216 échantillons de sang total désidentifiés et éligibles ont été évalués. 66 échantillons ont été testés prospectivement et 150 échantillons ont été prospectivement recueillis et stockés congelés avant analyse (rétrospective) avec le test *illumigene* Malaria. Chaque spécimen a été préparé selon les deux méthodes de préparation d'échantillons *illumigene* Malaria et *illumigene* Malaria PLUS. Cinq échantillons additionnels n'ont pas été retenus pour le test *illumigene* Malaria PLUS, à cause d'erreurs de procédure. Dès lors, seuls 211 échantillons ont été éligibles pour le test *illumigene* Malaria PLUS. Tous les échantillons ont été testés prospectivement par microscopie.

L'analyse de la performance du test avec des échantillons prospectifs et rétrospectifs a indiqué qu'il n'y avait aucune différence de performance entre les spécimens frais et congelés avec les tests *illumigene* Malaria et *illumigene* Malaria PLUS. Les tableaux ci-dessous récapitulent la performance des tests d'amplification d'ADN *illumigene* Malaria et *illumigene* Malaria PLUS pour les deux échantillons prospectifs et rétrospectifs combinés.

Performance du test *illumigene* Malaria comparée à celle de la microscopie

	Microscopie			<i>illumigene</i>	Performance				
	Pos	Nég	Total	INV ^a	Sensibilité	100.0%	139/139	97.3-100.0%	
<i>illumigene</i> Malaria	Pos	139	8	147	0(1)				
	Nég	0	67	67	2(2)	Spécificité	89.3%	67/75	80.3-94.5%
	Total	139	75	214	2				

^a Les résultats initiaux non valides sont reportés entre parenthèses. Le nombre total d'échantillons non valides restant après répétition des tests sont présentés avant la parenthèse.

Performance du test *illumigene* Malaria PLUS comparée à celle de la microscopie

	Microscopie			<i>illumigene</i>	Performance				
	Pos	Nég	Total	INV ^a	Sensibilité	100.0%	136/136	97.3-100.0%	
<i>illumigene</i> Malaria PLUS	Pos	136	13	149	0				
	Nég	0	62	62	0	Spécificité	82.7%	62/75	72.6-89.6%
	Total	136	75	211	0				

Les échantillons ont été prélevés sur des patients âgés de 4 à 77 ans. 15 d'entre eux étaient âgés de 1 à 12 ans, 75 de 13 à 21 ans, 125 de ≥22 ans. L'âge d'un patient n'était pas connu. Aucune différence en raison de l'âge n'a été observée. La population de l'étude comprenait 84 (38.9%) patientes (femmes) et 131 (60.6%) patients (hommes). Le sexe d'un patient n'était pas connu. Aucune influence sur les performances du test n'était attendue du fait du sexe des patients.

SENSIBILITE ANALYTIQUE

La limite de détection (LoD) a été déterminée avec le *Plasmodium falciparum* et le *Plasmodium vivax*. La LoD a été confirmée à l'aide de 20 réplicats et d'une probabilité théorique d'obtenir des réponses positives (par ex., 95%, où 19/20 réplicats étaient positifs).

	<i>illumigene</i> Malaria	<i>illumigene</i> Malaria PLUS
Espèces de <i>Plasmodium</i>	Parasites/µL	Parasites/µL
<i>P. falciparum</i> (3D7)	2	0.25
<i>P. vivax</i> (India VII)	0.125	0.063

REACTIVITE DU TEST

Des proportions quantifiées de l'ADN de *P. malariae*, *P. ovale* et *P. knowlesi* ont été diluées dans du sang total négatif jusqu'à atteindre environ trois fois la limite de détection de chaque méthode de préparation d'échantillons de test *illumigene* Malaria et *illumigene* Malaria PLUS (environ 72 copies/µL ou 6 parasites/µL pour le test *illumigene* Malaria; environ 9 copies/µL ou 0,75 parasite/µL pour le test *illumigene* Malaria PLUS). Toutes les espèces ont réagi aux concentrations testées.

REPRODUCTIBILITE DU TEST

Des études de reproductibilité ont été menées par trois laboratoires internes. Les laboratoires participants ont reçu des panels codés en aveugle de 10 échantillons. Ces panels incluaient des échantillons préparés artificiellement de *Plasmodium falciparum* (souche 3D7) en tant qu'échantillons modérément positifs, faiblement positifs ou fortement négatifs. Ces panels incluaient aussi un échantillon de sang total négatif. Les tests ont été exécutés par 2 techniciens différents au moins dans chaque laboratoire, le même jour (variabilité intra-test), pendant cinq jours (variabilité inter-test). Trois lots de chacun des tests *illumigene* Malaria ou *illumigene* Malaria PLUS et 8 appareils *illumipro-10* ont été utilisés dans cette étude. Des contrôles externes positifs et négatifs ont été testés pour chaque panel, et un échantillon de sang qualifié négatif a été utilisé en tant que contrôle négatif.

Récapitulatif de l'étude de reproductibilité: Méthode de préparation des échantillons du test <i>illumigene</i> Malaria								
Type d'échantillon	Centre 1		Centre 2		Centre 3		Total	
	Concordance en pourcentage	Concordance en pourcentage	Concordance en pourcentage	Concordance en pourcentage	Concordance en pourcentage	Concordance en pourcentage	Concordance en pourcentage	Concordance en pourcentage
Modérément positif (8 parasites/µL)	30/30	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90	100.0%
Faiblement positif (2 parasites/µL)	30/30	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90	100.0%
Fortement négatif (0.458 parasites/µL)	30/30	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90	100.0%
Négatif	10/10	100.0%	10/10	100.0%	10/10	100.0%	30/30	100.0%
Contrôle négatif	10/10	100.0%	10/10	100.0%	10/10	100.0%	30/30	100.0%
Contrôle positif	10/10	100.0%	10/10	100.0%	10/10	100.0%	30/30	100.0%

Récapitulatif de l'étude de reproductibilité: Méthode de préparation des échantillons du test <i>illumigene</i> Malaria PLUS								
Type d'échantillon	Centre 1		Centre 2		Centre 3		Total	
	Concordance en pourcentage		Concordance en pourcentage		Concordance en pourcentage		Concordance en pourcentage	
Modérément positif (1 parasite/ µL)	30/30	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90	100.0%
Faiblement positif (0.5 parasites/ µL)	30/30	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90	100.0%
Fortement négatif (0.029 parasites/ µL)	29/30	96.7%	28/30	93.3%	30/30	100.0%	87/90	96.7%
Négatif	10/10	100.0%	10/10	100.0%	10/10	100.0%	30/30	100.0%
Contrôle négatif	10/10	100.0%	10/10	100.0%	10/10	100.0%	30/30	100.0%
Contrôle positif	10/10	100.0%	10/10	100.0%	10/10	100.0%	30/30	100.0%

REACTIONS CROISEES

Des études de réactivité croisée ont utilisé des échantillons de sang total positifs (*P. falciparum* 3D7) et négatifs dans lesquels ont été inoculés des organismes bactériens ou fongiques à une concentration minimum de $1,0 \times 10^6$ UFC/mL, des virus à une concentration minimum de $1,0 \times 10^5$ DICT₅₀/mL ou des protozoaires à une concentration minimum de $1,0 \times 10^5$ organismes/mL. En l'absence d'organismes entiers, $1,0 \times 10^6$ copies/mL d'ADN génomique ont été testées. Aucun des organismes suivants (ou leur matériel génétique) n'a réagi avec les tests *illumigene* Malaria:

Babesia microti, *Borrelia burgdorferi*, *Hemophilus influenza*, *Klebsiella pneumoniae*, *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum*, *Leptospira interrogans*, *Mycobacterium smegmatis*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Treponema pallidum*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli*, *Vibrio parahaemolyticus*, cytomégalovirus (CMV), virus d'Epstein Barr, virus de l'hépatite B, virus de l'hépatite C, virus Herpès simplex 1 (HSV 1), VIH-1, papillomavirus et virus de la rubéole.

Les organismes suivants (ou leur ADN) n'ont pas pu être obtenus en vue de leur test et ont été évalués à l'aide d'une analyse *in silico*. D'après cette analyse, aucun des organismes suivants ne devrait réagir avec les tests *illumigene* Malaria: *Anaplasma phagocytophilum*, *Clostridium botulinum*, *Orientia tsutsugamushi*, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, virus du Chikungunya, virus de la Dengue (types 1 à 4), virus du Nil occidental et virus de la fièvre jaune.

L'ADN génomique humain était non réactif à $1,0 \times 10^6$ copies/mL.

TESTS POUR LES SUBSTANCES INTERFERENTES

Un test d'interférence a été mené en présence de concentrations des pires cas de substances chimiques et biologiques introduites directement dans des échantillons positifs préparés artificiellement (*P. falciparum* 3D7) et des échantillons de sang total négatifs. Aucune interférence n'a été observée avec les substances suivantes, quelle que soit la méthode de préparation des échantillons *illumigene* Malaria: paracétamol (1 mg/mL), amoxicilline (0,1 mg/mL), artésunate (1 mg/mL), aspirine (1 mg/mL), atovaquone (0,1 mg/mL), céfalexine (0,1 mg/mL), chloroquine (1 mg/mL), ciprofloxacine (0,1 mg/mL), clindamycine (1 mg/mL), chlorhydrate de doxycycline (1 mg/mL), érythromycine (0,1 mg/mL), sulfate d'hydroxychloroquine (1 mg/mL), ibuprofène (1 mg/mL), luméfántrine (1 mg/mL), méfloquine (1 mg/mL), phosphate de primaquine (1 mg/mL), chlorhydrate de proguanil (1 mg/mL), pyriméthamine (1 mg/mL), sulfate de quinine (1 mg/mL), citrate de sodium (0,11 M), bilirubine élevée (>0,15 mg/mL), taux élevés de leucocytes (couche leuco-plaquettaire) (>10% v/v), sérumalbumine (>0,03 g/mL) et triglycérides (>9,9 mg/mL).

Des taux d'hématocrite (>57.5%) et d'hémoglobine (>30 g/dL) supérieures aux niveaux physiologiques normaux peuvent produire des résultats non valides avec les tests *illumigene* Malaria.

ESPAÑOL



Ensayos de amplificación de ADN *illumigene* Malaria y Malaria PLUS

Ensayos de amplificación de ADN para la detección de *Plasmodium* sp.

REF 280925, 281125

IVD Dispositivo médico para diagnóstico *in vitro*

USO INDICADO

Los ensayos de amplificación de ADN *illumigene* Malaria e *illumigene* Malaria PLUS, que se realizan en el *illumipro-10™*, son ensayos cualitativos de diagnóstico *in vitro* para la detección directa de ADN de *Plasmodium* sp. en muestras de sangre venosa humana completa con EDTA de individuos con signos y síntomas de infección palúdica. Los resultados de los ensayos *illumigene* Malaria se emplean como complemento para el diagnóstico de infección palúdica en humanos.

Los ensayos *illumigene* Malaria utilizan la tecnología de amplificación isotérmica de ADN mediante tallo-bucle (LAMP) para detectar ADN de *Plasmodium* sp. tomando como diana segmentos del genoma de *Plasmodium*. Los ensayos *illumigene* Malaria no distinguen entre las distintas especies de *Plasmodium*.

illumigene Malaria e *illumigene* Malaria PLUS están concebidos para uso en laboratorios de hospital, de referencia o estatales. Estos productos no están pensados para usarse en centros de atención fuera de un laboratorio.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

Los ensayos moleculares *illumigene* Malaria e *illumigene* Malaria PLUS se basan en la tecnología de amplificación mediante tallo-bucle (LAMP).^{1,2} La diana de los ensayos es una región del genoma de *Plasmodium* conservada en *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* y *Plasmodium knowlesi*. La diana de los ensayos *illumigene* Malaria es una secuencia de 214 pares de bases (pb) de una región no codificante del ADN mitocondrial de *Plasmodium* sp.

La amplificación mediante tallo-bucle utiliza cebadores especialmente diseñados para conseguir una amplificación isotérmica continua y específica del ADN. Un subproducto de esta amplificación es el pirofosfato de magnesio, un precipitado blanco que enturbia la solución de la reacción. El incubador/lector *illumipro-10* de Meridian monitoriza las características de absorción de la solución de reacción. Los cambios en las características de absorción de la solución de reacción creados por la precipitación del pirofosfato de magnesio indican la presencia del ADN diana. En ausencia del ADN diana, la absorción de la muestra no cambia de forma significativa.

El kit *illumigene* Malaria incluye dispositivos de prueba *illumigene* Malaria, un aparato para la preparación de muestras IV (SMP PREP IV), tampón I *illumigene* y tubos. Primero se tratan las muestras de sangre completa con el tampón I; las células se rompen y se liberan los ácidos nucleicos. El lisado se añade al SMP PREP IV y se filtra y dispensa en un tubo I limpio apretando con suavidad. El efuente de la muestra recogido después de la filtración contiene ácidos nucleicos que se pueden usar en el dispositivo de prueba *illumigene* Malaria.

El kit *illumigene* Malaria PLUS incluye dispositivos de prueba *illumigene* Malaria, columnas *M-prep*, tampón I *illumigene*, tampón II *M-prep*, tampón III *M-prep* y tubos con tapón de rosca. Las muestras de sangre completa se procesan usando cromatografía de exclusión por tamaño mediante flujo por gravedad para separar y purificar los ácidos nucleicos. Las columnas *M-prep* proporcionan la matriz para la purificación de los ácidos nucleicos, mientras que los tampones incluidos facilitan la lisis celular y la elución de las muestras. Primero se tratan las muestras de sangre completa con el tampón I; las células se rompen y se liberan los ácidos nucleicos. El material de la muestra se aplica a la columna *M-prep* para que pase a través de ella por gravedad; las moléculas de mayor tamaño son las que primero (o más deprisa) atraviesan la matriz de la columna. Se añade el tampón II *M-prep* a la columna *M-prep* para facilitar el paso de la muestra a través de la matriz de la columna. El tampón II *M-prep* contiene un colorante no reactivo que indica visualmente el avance de la muestra. Cuando el tampón II ya ha entrado en la matriz de gel, se añade a la columna *M-prep* el tampón III *M-prep*. El efuente de la muestra recogido después de añadir el tampón III *M-prep* contiene ácidos nucleicos que se pueden usar en el dispositivo de prueba *illumigene* Malaria. Para usar los *illumigene* Malaria o *illumigene* Malaria PLUS no se requiere un equipo de laboratorio especializado.

El dispositivo de prueba *illumigene* Malaria contiene una microesfera de reactivo de amplificación liofilizado en cada una de sus dos cámaras: una cámara de PRUEBA con cebadores específicos para *Plasmodium* sp. y una cámara de CONTROL con cebadores específicos para ADN mitocondrial humano. El ADN mitocondrial humano de las muestras de sangre completa y los cebadores específicos para ADN mitocondrial humano de las cámaras de CONTROL de los dispositivos de prueba funcionan como control interno del ensayo. Durante la preparación de las muestras, se extrae ADN mitocondrial humano y el ADN mitocondrial de *Plasmodium* sp. para procesar en paralelo el ADN diana y el ADN de control durante la amplificación y la detección. El control interno sirve para verificar la extracción del ADN, la inhibición de la amplificación, el rendimiento de los reactivos del ensayo y la eficacia del procesamiento de la muestra. La diana de control debe amplificarse y detectarse en la reacción final; si no es así, la prueba se considera no válida y no se notifican los resultados.

El dispositivo de prueba *illumigene* Malaria contiene una microesfera de reactivo de amplificación liofilizado en cada una de sus dos cámaras: una cámara de PRUEBA con cebadores específicos para *Plasmodium* sp. y una cámara de CONTROL con cebadores específicos para ADN mitocondrial humano. El ADN mitocondrial humano de las muestras de sangre completa y los cebadores específicos para ADN mitocondrial humano de las cámaras de CONTROL de los dispositivos de prueba funcionan como control interno del ensayo. Durante la preparación de las muestras, se extrae ADN mitocondrial humano y el ADN mitocondrial de *Plasmodium* sp. para procesar en paralelo el ADN diana y el ADN de control durante la amplificación y la detección. El control interno sirve para verificar la extracción del ADN, la inhibición de la amplificación, el rendimiento de los reactivos del ensayo y la eficacia del procesamiento de la muestra. La diana de control debe amplificarse y detectarse en la reacción final; si no es así, la prueba se considera no válida y no se notifican los resultados.

El *illumipro-10* monitoriza los cambios en las características de absorción a través de la medición de la transmisión de luz por las soluciones de reacción de Prueba y Control. La transmisión de luz se comprueba al Inicio del proceso (Señal_{Inicio}, S_i) y al Final del proceso (Señal_{Final}, S_f) del ensayo. El *illumipro-10* calcula el cambio producido en la transmisión de luz entre el Final del proceso y el Inicio del proceso (S_f:S_i) y compara el porcentaje con un valor de corte fijo.

Los valores de corte fijos de la cámara de PRUEBA se utilizan para informar resultados de muestras. Los porcentajes de la cámara de PRUEBA S_f:S_i inferiores al 70% se muestran como «POSITIVO»; los porcentajes de la cámara de PRUEBA S_f:S_i superiores o iguales al 70% se muestran como «NEGATIVO». Los valores numéricos no se informan.

Los valores de corte fijos de la cámara de CONTROL se utilizan para determinar la validez. Los porcentajes S_f:S_i de la cámara de CONTROL inferiores al 85% se consideran válidos y permiten mostrar los resultados de la cámara de PRUEBA (POSITIVO, NEGATIVO). Los porcentajes S_f:S_i de la cámara de CONTROL superiores o iguales al 85% se consideran no válidos e impiden notificar los resultados de la cámara de PRUEBA. Las reacciones no válidas de la cámara de CONTROL se informan como «NO VÁLIDAS». Los valores numéricos no se informan.

Los criterios de corte más rigurosos se aplican a la reacción de la cámara de CONTROL para garantizar que no se inhiba la amplificación, que los reactivos tengan el rendimiento esperado y que el procesamiento de muestras se haya realizado adecuadamente.

PRINCIPIOS BIOLÓGICOS

El paludismo es un problema de salud pública a escala internacional, y se estima que hay unos 3200 millones de personas de 97 países en riesgo de infección.³ Según las estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2013 hubo 198 millones de casos con aproximadamente 584 000 muertes.³ La causa del paludismo es un parásito intracelular, *Plasmodium*, que se transmite a los seres humanos a través de los mosquitos hembras del género *Anopheles*.³ Después de infectar a una persona, *Plasmodium* pasa por un ciclo vital con múltiples estadios morfológicos entre el crecimiento inicial en los hepatocitos y la invasión de los eritrocitos.⁴ *Plasmodium* se replica en el interior de los eritrocitos, y provoca la ruptura de las células y los síntomas clínicos de la enfermedad.⁴

Se sabe que hay cinco especies de *Plasmodium* que provocan el paludismo en los seres humanos (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* y *Plasmodium knowlesi*), aunque la mayoría de las infecciones se deben a *P. falciparum* y *P. vivax*. El tratamiento del paludismo depende de la especie de *Plasmodium*, del estado clínico del paciente y de la sensibilidad antimicrobiana.⁵ Las infecciones causadas por *P. falciparum* y *P. knowlesi* suelen ser las más graves y requieren un tratamiento rápido.⁵

La OMS recomienda hacer pruebas diagnósticas a todas las personas en quienes se sospeche la presencia de paludismo.³ El estudio al microscopio de frotis en gota fina y gruesa es actualmente el método de diagnóstico de referencia. Sin embargo, la exactitud y la precisión de la microscopía depende mucho de la pericia del técnico (el límite de detección es de 4 – 100 parásitos/µL o más), tiene una tasa de falsos negativos y falsos positivos del 10 – 25% y una variabilidad aproximada del orden de 2 – 3 veces en la cuantificación.^{6,7,8} Además, en un examen microscópico ordinario es habitual identificar erróneamente la especie de *Plasmodium*.⁹ Otro tipo de métodos que también están disponibles son las pruebas diagnósticas rápidas (PDR) basadas en inmunoensayos. Las pruebas de evaluación de la calidad realizadas por la OMS han puesto de manifiesto que con una densidad baja de parásitos (200 parásitos/µL), sólo el 76% y el 42% de las PDR disponibles son capaces de detectar *P. falciparum* y *P. vivax*, respectivamente.²

Los ensayos *illumigene* Malaria proporcionan resultados rápidamente con mayor sensibilidad que la microscopía y las PDR.

REACTIVOS/MATERIALES PROPORCIONADOS

El número máximo de pruebas que se puede obtener con este equipo está indicado en el exterior de la caja. Para *illumigene* Malaria, número de catálogo 280925

- Dispositivo de prueba *illumigene* Malaria:** Dispositivo de dos cámaras que contiene reactivos de amplificación liofilizados (ADN polimerasa, desoxirribonucleótidos trifosfato) y cebadores específicos para *Plasmodium* sp. (cámara de PRUEBA) o cebadores específicos para ADN mitocondrial humano (cámara de CONTROL).
- Tampón I *illumigene*:** Solución de lisis con hidróxido de sodio 0,2 N.
- Aparato para la preparación de muestras IV (SMP PREP IV) *illumigene*:** Solución tamponada con tris con un 0,09% de azida como conservante.
- Tubo I *illumigene*:** Tubos de 1,5 mL.

Para *illumigene* Malaria PLUS, número de catálogo 281125

- Dispositivo de prueba *illumigene* Malaria:** Dispositivo de dos cámaras que contiene reactivos de amplificación liofilizados (ADN polimerasa, desoxirribonucleótidos trifosfato) y cebadores específicos para *Plasmodium* sp. (cámara de PRUEBA) o cebadores específicos para ADN mitocondrial humano (cámara de CONTROL).
- Tampón I *illumigene*:** Solución de lisis con hidróxido de sodio 0,2 N.
- Tampón II *M-prep*:** Solución que contiene rojo fenol y azida al 0,09% como conservante.
- Tampón III *M-prep*:** Solución tamponada con tris con un 0,09% de azida como conservante.
- Columna *M-prep*:** Columna de 5,0 cm de longitud con punta desenroscable y tapa con cierre hermético que contiene resina para cromatografía en una solución tamponada con tris con azida sódica (0,09%) como conservante.
- Tubos ST** Tubos de microcentrifugación de 2,0 mL con tapón de rosca.

MATERIALES PROPORCIONADOS POR SEPARADO

- Kit de control externo *illumigene* Malaria, Meridian Bioscience, Inc. Número de catálogo: 279970

MATERIALES NO PROPORCIONADOS

1. Guantes desechables de látex, sin polvo
2. Puntas de pipeta resistentes a los aerosoles, sin ribonucleasa/desoxirribonucleasa
3. Tubos de extracción de sangre con EDTA como anticoagulante

EQUIPO NO PROPORCIONADO

1. Cronómetro de intervalos
2. Mezclador vortex (opcional)
3. Micropipeta capaz de dispensar 50 µL
4. Micropipeta capaz de dispensar 250 µL (número de catálogo 281125 únicamente)
5. *illumipro-10*, Meridian Bioscience, Inc. Número de catálogo: 610172

PRECAUCIONES

1. Todos los reactivos son sólo para uso diagnóstico in vitro.
2. No intercambie reactivos del kit ni dispositivos de prueba de distintos lotes. Los lotes individuales del tubo I y los tubos ST se pueden intercambiar dentro de cada tipo de kit siempre y cuando se usen antes de la fecha de caducidad asignada.
3. El *illumipro-10* puede producir resultados incorrectos si no se usa para correr la prueba el programa para el ensayo de Malaria.
4. Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio y Bioseguridad de Nivel 2 durante la prueba.⁹ Trate todas las muestras y los dispositivos de prueba usados como capaces de transmitir agentes infecciosos. No coma, beba ni fume en las zonas donde se manejan los reactivos del equipo o las muestras.
5. Use guantes desechables cuando maneje las muestras y lávese bien las manos después.
6. Se deben emplear programas de Control de Calidad para Laboratorios de Prueba Molecular, incluyendo el uso y cuidado correctos del equipo.¹⁰
7. Los dispositivos de prueba *illumigene* Malaria contienen reactivos liofilizados. Las bolsas de protección no deberían abrirse hasta que se esté listo para realizar el ensayo.
8. Los dispositivos de prueba *illumigene* Malaria incluyen un sistema de cierre diseñado para evitar la contaminación de la zona de pruebas con el producto de amplificación. NO utilice dispositivos de prueba con cierres rotos.
9. Deseche las columnas *M-prep* de los dispositivos de prueba *illumigene* Malaria y los tubos usados inmediatamente después del procesamiento. Deje bien asegurado el cierre de los dispositivos de prueba. NO abra el dispositivo de prueba después del procesamiento. Si se abre el dispositivo después de la amplificación, el producto de amplificación puede contaminar la zona de pruebas.

DECLARACIONES DE RIESGO Y PRECAUCIÓN

Se debe referir a los SDS, disponibles en www.meridianbioscience.com (US version) / www.meridianbioscience.eu (EU version) para las Frases de Peligro y Precaución.

VIDA UTIL Y ALMACENAMIENTO

La fecha de caducidad se indica en la etiqueta del kit. Almacene los componentes del kit a la temperatura indicada en la etiqueta.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Asegúrese de que los reactivos del equipo están a temperatura ambiente (19 - 30 C) antes de su uso. Asegure que el Tampón I se trae a temperatura ambiente completamente antes de usar y no hay precipitado visible. Se pueden obtener resultados incorrectos si los reactivos no están a temperatura ambiente antes del uso.

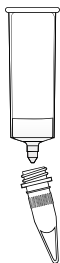
PREPARACIÓN DE COLUMNAS (únicamente para *illumigene* Malaria PLUS, número de catálogo 281125)

Inspeccione visualmente cada columna *M-prep* y asegúrese de que el lecho de la columna y los filtros no hayan sufrido alteraciones durante el transporte. Las columnas con lechos de resina alterados o filtros colocados de forma inadecuada pueden no funcionar correctamente.

Preparación de la columna:

1. Utilice 1 columna *M-prep* para cada muestra que se vaya a someter a prueba. Retire la tapa superior y la punta desenroscable inferior.
2. Coloque la punta de la columna en un tubo *ST*. El tubo *ST* debe mantenerse con un leve ángulo de inclinación (aproximadamente 15 grados) con respecto a la columna *M-prep*.
NOTA: No asiente la columna directamente en el tubo de recogida ya que esto podría crear un cierre hermético y provocar un flujo inadecuado a través de la columna. Consulte en la **Figura 1** la colocación correcta de la columna y el tubo de recogida.
3. Deje que la columna *M-prep* drene en el tubo *ST*. Las columnas *M-prep* drenadas deben utilizarse en el plazo de 1 hora.
4. Prosiga con la preparación de la muestra para *illumigene* Malaria PLUS.

FIGURA 1: Colocación de la columna *M-prep* y del tubo *ST*



RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Tipo de muestra: Muestras de sangre venosa humana completa con EDTA como conservante.

Toma de muestras: Las muestras de sangre venosa completa deben recogerse en tubos de muestra con EDTA siguiendo las directrices del centro en cuanto a la extracción de muestras clínicas para la infección palúdica. Dele la vuelta al tubo de extracción de sangre inmediatamente después de la extracción al menos 8 veces (o lo que indiquen las instrucciones del fabricante).

Después de la extracción y durante el transporte al laboratorio, las muestras de sangre venosa completa con EDTA pueden conservarse a 2 - 30 C. Aunque conviene analizar las muestras lo antes posible, pueden conservarse un máximo de 7 días a temperatura ambiente (19 - 30 C) y un máximo de 14 días refrigeradas (2 - 8 C) antes del análisis. Las muestras que no se vayan a analizar en este periodo de tiempo deben congelarse inmediatamente a -20 C durante un máximo de 30 días hasta que se analicen. Las muestras se pueden congelar y descongelar 2 veces después de almacenarlas a -20 C antes de analizarlas con los ensayos *illumigene* Malaria.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

NOTA: Asegúrese de que el *illumipro-10* esté encendido y de que se hayan completado las verificaciones de funcionamiento necesarias antes de iniciar la PREPARACIÓN DE LA MUESTRA. Consulte el Manual del operador del *illumipro-10* para obtener más información acerca de la instalación y el funcionamiento del instrumento.

NOTA: Asegúrese de que las muestras están a temperatura ambiente (19 C-30 C) antes de la preparación de las muestras.

Las muestras que se vayan a analizar con el ensayo *illumigene* Malaria se pueden preparar usando uno de los métodos siguientes:

1. Preparación de muestras para *illumigene* Malaria (número de catálogo 280925)

- a. Invierta la muestra de sangre completa con EDTA 2 - 3 veces para mezclarla.
- b. Añada 50 µL de la muestra de sangre venosa completa extraída (con EDTA) a un tubo de tampón I. Dele la vuelta 5 veces para que se mezcle o use un agitador vortex durante aproximadamente 10 segundos. Deje reposar la muestra durante 2 minutos.

- c. Dele la vuelta 5 veces para que se mezcle o use un agitador vortex durante aproximadamente 10 segundos, y transfiera inmediatamente 50 µL del lisado al SMP PREP IV. Dele la vuelta 5 veces para que se mezcle o use un agitador vortex durante 10 segundos.
- d. Apriete el SMP PREP IV con suavidad y recoja despacio 5 - 10 gotas con un tubo I limpio. Compruebe que el eluido está teñido de un color rojo o marrón rojizo. Etiquete el tubo con la información de identificación de la muestra y prosiga con el procedimiento de prueba.

2. Preparación de muestras para *illumigene* Malaria PLUS (número de catálogo 281125)

NOTA: Los pasos de elución de la muestra con columnas *M-prep* no deberían llevar más de 30 minutos. Las muestras que tardan más de 30 minutos en eluirse deben desecharse y volverse a analizar usando la muestra del paciente original.

- a. Invierta la muestra de sangre completa con EDTA 2 - 3 veces para mezclarla.
- b. Añada 50 µL de la muestra de sangre venosa completa extraída (con EDTA) a un tubo de tampón I. Dele la vuelta 5 veces para que se mezcle o use un agitador vortex durante aproximadamente 10 segundos. Deje reposar la muestra durante 2 minutos.
- c. Dele la vuelta 5 veces para que se mezcle o use un agitador vortex durante aproximadamente 10 segundos, y transfiera inmediatamente con una micropipeta 250 µL de la muestra preparada a la parte superior de una columna *M-prep* correctamente preparada y etiquetada. Espere unos 2 minutos o hasta que la columna haya absorbido la muestra y se haya detenido el flujo. Este paso no debería durar más de 30 minutos.
- d. Utilizando una micropipeta, añada 250 µL de tampón II *M-prep* a la parte superior de una columna *M-prep*. Deseche la punta de la pipeta. Después de añadir el tampón II *M-prep*, la columna tendrá un aspecto rojizo. Espere unos 2 minutos o hasta que la columna haya absorbido el tampón rojo y se haya detenido el flujo. Este paso no debería durar más de 30 minutos.
- e. Retire la última gota de líquido de la punta de la columna con el tubo ST Deseche el tubo.
- f. Ponga un tubo ST limpio debajo de la columna *M-prep*. Utilizando una micropipeta, añada 250 µL de tampón III *M-prep* a la parte superior de una columna *M-prep*. Deseche la punta de la pipeta. Espere aproximadamente 2 minutos o hasta que se detenga el flujo. Este paso no debería durar más de 30 minutos.
- g. Retire la última gota de líquido de la punta de la columna con el tubo ST Compruebe que el eluido está teñido de un color rojo o marrón rojizo. Etiquete el tubo con la información de identificación de la muestra y prosiga con el procedimiento de prueba.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

NOTA: Se pueden procesar un máximo de 10 muestras por cada *illumipro-10*.

1. Saque 1 dispositivo de prueba *illumigene* Malaria de su bolsa de protección para cada muestra. Abra el dispositivo con cuidado mientras sujeta las cámaras de modo que los reactivos liofilizados no se caigan al abrirlo. Coloque el dispositivo sobre una superficie plana o en una gradilla en la que se pueda poner el dispositivo.
2. Utilizando una micropipeta, transfiera 50 µL de la muestra tanto a la cámara de PRUEBA (microesfera blanca) como a la cámara de CONTROL (microesfera amarilla) del dispositivo de prueba *illumigene* Malaria. Procure no introducir aire en la mezcla de reacción.
3. Cierre el dispositivo de prueba *illumigene* y asegure bien el cierre.
4. Golpee ligeramente el dispositivo contra la superficie de la mesa de laboratorio o mezcle bien para quitar las burbujas de aire. Examine atentamente el dispositivo de prueba para comprobar la rehidratación de las microesferas de control y de prueba, y la presencia de burbujas de aire en la cámara y de líquido en la parte superior del dispositivo. Si observa microesferas sin disolver, burbujas de aire o líquido en la parte superior del dispositivo, golpee ligeramente el dispositivo contra la superficie de la mesa de laboratorio y repita la inspección visual. La amplificación y la detección deben comenzar en un plazo de 15 minutos.
5. Repita los pasos del procedimiento de la prueba con todas las muestras que se vayan a analizar.
6. Introduzca los dispositivos de prueba *illumigene* en el *illumipro-10* e inicie el análisis usando el programa Malaria. Los resultados se indican al final del análisis.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

ID de la muestra	Resultado notificado	Interpretación
Muestra de la paciente	POSITIVO	La muestra contiene el ADN objetivo de <i>Plasmodium sp.</i>
	NEGATIVO	No se detecta ADN de <i>Plasmodium sp.</i>
	NO VÁLIDO	Sin resultados notificables. Repita la prueba usando la muestra de la paciente original. Muestra de la paciente inhibitoria, preparación de la muestra inadecuada, fallo del reactivo, fallo del instrumento a fallo de control interno.
Control positivo	POSITIVO	Resultado de control positivo válido. Reactivos activos en el momento del uso, el <i>illumipro-10</i> funciona correctamente.
	NEGATIVO	Resultado de control incorrecto. Repita la prueba de control como primer paso para determinar la causa de origen del fallo. Si los fallos de control se repiten, póngase en contacto con los servicios técnicos de Meridian al 1-800-343-3858 (EE.UU.) o con su distribuidor local.
	NO VÁLIDO	Sin resultados notificables. Repita todo el proceso de ensayo usando las muestras originales. Preparación de la muestra inadecuada, fallo del reactivo, fallo del instrumento o fallo de control interno.
Control negativo	POSITIVO	Resultado de control incorrecto. Repita la prueba de control como primer paso para determinar la causa de origen del fallo. Si los fallos de control se repiten, póngase en contacto con los servicios técnicos de Meridian al 1-800-343-3858 (EE.UU.) o con su distribuidor local.
	NEGATIVO	Resultado de control negativo válido. Reactivos activos en el momento del uso, el <i>illumipro-10</i> funciona correctamente.
	NO VÁLIDO	Sin resultados notificables. Repita todo el proceso de ensayo usando las muestras originales. Preparación de la muestra inadecuada, fallo del reactivo, fallo del instrumento o fallo de control interno.
POCILLO VACIO	NINGUNO	No hay ningún dispositivo de prueba de <i>illumigene</i> en el pocillo del <i>illumipro-10</i> . O El dispositivo de prueba del <i>illumigene</i> no funciona bien debido a un fallo en la preparación de la muestra o a que el dispositivo está sucio o mal colocado. Repita la prueba usando la muestra original.

CONTROL DE CALIDAD

Este ensayo debe ser realizado siguiendo las regulaciones de acreditación locales, estatales o federales.

- Cada dispositivo contiene un control interno que comprueba la inhibición de la amplificación y la eficacia de los reactivos del ensayo, de la preparación del ADN y del procesamiento de la muestra. El ADN mitocondrial humano, que es el ADN utilizado para el control interno, se aísla de la muestra de sangre completa y se procesa pasando por todos los pasos del procedimiento. La cámara de control del dispositivo de prueba *illumigene* contiene cebadores para amplificar el ADN del control interno.
- Las buenas prácticas de laboratorio recomiendan el uso de materiales de control. Los usuarios deberían seguir las directrices federales, estatales y locales adecuadas relativas a la ejecución de controles de calidad externos.
- El reactivo del control positivo externo *illumigene* Malaria se suministra por separado (número de catálogo 279970). Como alternativa, las muestras de sangre previamente caracterizadas como positivas para *Plasmodium sp.* o preparadas para dar resultados positivos se pueden usar como control positivo externo. Como control negativo externo se puede utilizar una muestra negativa validada de sangre completa humana con EDTA. Es conveniente comprobar la reactividad de cada nuevo lote y cada nuevo envío de *illumigene* Malaria e *illumigene* Malaria PLUS en el momento de la recepción y antes de usarlos. A partir de entonces, deben realizarse pruebas de control externo de conformidad con las directrices nacionales, regionales y locales correspondientes. Los kits de prueba *illumigene* Malaria e *illumigene* Malaria PLUS no deben usarse para analizar a pacientes si los controles externos no dan los resultados correctos.
- Se debe utilizar un dispositivo de prueba independiente para cada reactivo de control externo.

VALORES ESPERADOS

En el estudio clínico de 2015 se obtuvo una incidencia de *Plasmodium sp.*, detectado con el ensayo *illumigene* Malaria, del 68.1% (147/216) usando el método de preparación de muestras *illumigene* Malaria (número de catálogo 280925) y del 70.6% (149/211) usando el método de *illumigene* Malaria PLUS (número de catálogo 281125). Más abajo se indica la incidencia global de cada especie de *Plasmodium*.

Prevalencia de las especies de <i>Plasmodium</i>				
Especie	<i>illumigene</i> Malaria (n=216)		<i>illumigene</i> Malaria PLUS (n=211)	
	Total positivos	Prevalencia	Total positivos	Prevalencia
<i>P. falciparum</i>	137	63.4%	134	63.5%
<i>P. vivax</i>	0	0%	0	0%
<i>P. ovale</i>	1	0.5%	1	0.5%
<i>P. malariae</i>	1	0.5%	1	0.5%
<i>P. knowlesi</i>	0	0%	0	0%
Desconocido*	8	3.7%	13	6.2%

* Las cepas no pudieron ser determinadas dado que las muestras eran negativas por microscopía.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Este producto solo se puede utilizar con el instrumento *illumipro-10*.
- illumigene* Malaria e *illumigene* Malaria PLUS no distinguen entre las especies de *Plasmodium*.
- Si el hematocrito (>57.5%) y los niveles de hemoglobina (>30 g/dL) son superiores a los niveles fisiológicos normales, los resultados de los ensayos *illumigene* Malaria pueden no ser válidos.
- No se ha determinado el rendimiento de los ensayos *illumigene* Malaria con muestras de concentrado de eritrocitos.
- El rendimiento de *illumigene* Malaria con *Plasmodium knowlesi* fue establecido solamente usando genoma del ADN purificado; no se llevó a cabo pruebas con el organismo completo.
- illumigene* Malaria e *illumigene* Malaria PLUS son ensayos cualitativos y no proporcionan valores cuantitativos ni información sobre la cantidad de microorganismos.
- La detección de ácidos nucleicos requiere que las muestras se obtengan, manipulen, transporten, almacenen y preparen adecuadamente. Si no se utiliza el procedimiento adecuado en cualquiera de estos pasos pueden obtenerse resultados incorrectos.
- Los ácidos nucleicos de los microorganismos pueden perdurar in vivo, independientemente de la viabilidad del microorganismo. *illumigene* Malaria e *illumigene* Malaria PLUS no distinguen entre microorganismos viables y no viables.
- Al igual que sucede con todas las pruebas de diagnóstico molecular, pueden obtenerse (A) falsos resultados negativos por la presencia de inhibidores, errores técnicos, por confundir las muestras o porque haya muy pocos microorganismos en la muestra clínica, y (B) falsos resultados positivos por contaminación cruzada con los microorganismos analizados, sus ácidos nucleicos o el producto amplificado, así como por señales inespecíficas.

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

Las características de rendimiento de los ensayos de amplificación de ADN *illumigene* Malaria e *illumigene* Malaria PLUS se determinaron en diversos estudios clínicos llevados a cabo en noviembre de 2015 en Senegal, África. Las características de rendimiento del ensayo se compararon con el método de referencia, el estudio al microscopio de frotis en gota fina y gruesa. Las especies de *Plasmodium* de todas las muestras positivas se identificaron mediante microscopía.

Las muestras incluyeron muestras de sangre venosa completa con EDTA prospectivas y retrospectivas de enfermos con signos y síntomas de infección por *Plasmodium*. Se analizaron un total de 216 muestras aptas de sangre completa anonimizada. 66 muestras se analizaron de manera prospectiva, y 150 muestras se extrajeron de manera retrospectiva y se conservaron congeladas hasta el análisis con el ensayo *illumigene* Malaria (retrospectivo). Todas y cada una de las muestras se prepararon usando los métodos de preparación de muestras tanto de *illumigene* Malaria como de *illumigene* Malaria PLUS. Cinco muestras fueron consideradas como ilegibles por el ensayo de *illumigene* Malaria PLUS dado a un error de proceso. De manera que *illumigene* Malaria PLUS tiene 211 muestras elegibles. Todas las muestras se estudiaron al microscopio de forma prospectiva.

El análisis del rendimiento de los ensayos con muestras prospectivas y retrospectivas puso de manifiesto que no había diferencias entre las muestras recientes y congeladas en el ensayo *illumigene* Malaria o *illumigene* Malaria PLUS. En las tablas siguientes se resume el rendimiento de los ensayos de amplificación de ADN *illumigene* Malaria e *illumigene* Malaria PLUS con las muestras prospectivas y retrospectivas combinadas.

Rendimiento de *illumigene* Malaria comparado con la microscopía

	Microscopía			<i>illumigene</i>	Rendimiento				
	Pos	Neg	Total		INV ^a		95% CI		
<i>illumigene</i> Malaria	Pos	139	8	147	0(1)	Sensibilidad	100.0%	139/139	97.3-100.0%
	Neg	0	67	67	2(2)	Especificidad	89.3%	67/75	80.3-94.5%
	Total	139	75	214	2				

^a Resultados inicialmente inválidos están reportados dentro del paréntesis. El número final de resultados inválidos que restan luego de repetir la prueba están al frente del paréntesis.

Rendimiento de *illumigene* Malaria PLUS comparado con la microscopía

	Microscopía			<i>illumigene</i>	Rendimiento				
	Pos	Neg	Total		INV		95% CI		
<i>illumigene</i> Malaria PLUS	Pos	136	13	149	0	Sensibilidad	100.0%	136/136	97.3-100.0%
	Neg	0	62	62	0	Especificidad	82.7%	62/75	72.6-89.6%
	Total	136	75	211	0				

Las muestras se obtuvieron de pacientes con edades comprendidas entre 4 y 77 años. 15 eran de pacientes de 1 a 12 años de edad, 75 de pacientes de 13 a 21 años, 125 de pacientes de ≥22 años y la edad de un paciente no fue definida. No se advirtieron diferencias de rendimiento en función de la edad. La población del estudio incluía 84 (38.9%) mujeres y 131 (60.6%) hombres; el género de un paciente no fue definido. No es previsible que el sexo influya en el rendimiento del ensayo.

SENSIBILIDAD ANALÍTICA

Para determinar el límite de detección (LD) se usaron *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax*. El LD se confirmó utilizando 20 réplicas y una determinada probabilidad (p. ej., 95%, o 19 de 20 réplicas positivas) de obtener respuestas positivas.

	<i>illumigene</i> Malaria	<i>illumigene</i> Malaria PLUS
Especies de <i>Plasmodium</i>	Parásitos/μL	Parásitos/μL
<i>P. falciparum</i> (3D7)	2	0.25
<i>P. vivax</i> (India VII)	0.125	0.063

REACTIVIDAD DEL ENSAYO

Se diluyeron cepas cuantificadas de ADN de *P. malariae*, *P. ovale* y *P. knowlesi* en sangre completa negativa hasta aproximadamente tres veces el límite de detección del método de preparación de muestras de *illumigene* Malaria y de *illumigene* Malaria PLUS (aproximadamente 72 copias/μL ó 6 parásitos/μL para *illumigene* Malaria; aproximadamente 9 copias/ μL ó 0,75 parásitos/μL para *illumigene* Malaria PLUS). Todas las especies reaccionaron a las concentraciones analizadas.

REPRODUCIBILIDAD

Tres laboratorios internos realizaron estudios de reproducibilidad. Se suministraron paneles de 10 muestras codificadas con enmascaramiento a los laboratorios participantes. Los paneles incluían muestras artificiales de *Plasmodium falciparum* (cepa 3D7) positivas moderadas, positivas bajas o negativas altas. El panel también incluía una muestra negativa de sangre completa. Al menos 2 técnicos diferentes de cada centro hicieron la prueba el mismo día (variabilidad intranalítica) durante cinco días (variabilidad interanalítica). En este estudio se utilizaron tres lotes de *illumigene* Malaria y de *illumigene* Malaria PLUS y 8 instrumentos *illumipro-10*. Con cada panel se analizaron controles externos positivos y negativos; como control negativo se utilizó una muestra negativa validada de sangre.

Resumen del estudio de reproducibilidad: Método de preparación de muestras de <i>illumigene</i> Malaria							
Tipo de muestra	Centro 1		Centro 2		Centro 3		Total
	Porcentaje de concordancia	Porcentaje de concordancia	Porcentaje de concordancia	Porcentaje de concordancia	Porcentaje de concordancia	Porcentaje de concordancia	Porcentaje de concordancia
Positiva moderada (8 Parásitos/μL)	30/30	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90 100.0%
Positiva baja (2 Parásitos/μL)	30/30	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90 100.0%
Negativa alta (0.458 Parásitos/μL)	30/30	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90 100.0%
Negativa	10/10	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90 100.0%
Control negativo	10/10	100.0%	10/10	100.0%	10/10	100.0%	30/30 100.0%
Control positivo	10/10	100.0%	10/10	100.0%	10/10	100.0%	30/30 100.0%

Resumen del estudio de reproducibilidad: Método de preparación de muestras de <i>illumigene</i> Malaria PLUS							
Tipo de muestra	Centro 1		Centro 2		Centro 3		Total
	Porcentaje de concordancia	Porcentaje de concordancia	Porcentaje de concordancia	Porcentaje de concordancia	Porcentaje de concordancia	Porcentaje de concordancia	Porcentaje de concordancia
Positiva moderada (1 Parásitos/μL)	30/30	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90 100.0%
Positiva baja (0.5 Parásitos/μL)	30/30	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90 100.0%
Negativa alta (0.029 Parásitos/μL)	29/30	96.7%	28/30	93.3%	30/30	100.0%	87/90 96.7%
Negativa	10/10	100.0%	10/10	100.0%	10/10	100.0%	30/30 100.0%
Control negativo	10/10	100.0%	10/10	100.0%	10/10	100.0%	30/30 100.0%
Control positivo	10/10	100.0%	10/10	100.0%	10/10	100.0%	30/30 100.0%

REACTIVIDAD CRUZADA

Para los estudios de reactividad cruzada se emplearon muestras de sangre completa positivas (*P. falciparum* 3D7) y negativas inoculadas con bacterias u hongos a una concentración mínima de $1,0 \times 10^5$ UFC/mL, virus a una concentración mínima de $1,0 \times 10^5$ TCID₅₀/mL o protozoos a una concentración mínima de $1,0 \times 10^5$ organismos/mL. En los casos en los que no había microorganismos completos disponibles, se analizaron $1,0 \times 10^5$ copias/mL de ADN genómico. Ninguno de los siguientes microorganismos, ni su material genético, reaccionaron con los ensayos *illumigene* Malaria: *Babesia microti*, *Borrelia burgdorferi*, *Hemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum*, *Leptospira interrogans*, *Mycobacterium smegmatis*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Treponema pallidum*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli*, *Vibrio parahaemolyticus*, citomegalovirus (CMV), virus de Epstein-Barr (EBV), virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus del herpes común 1 (HSV 1), HIV-1, virus de los papilomas humanos (HPV) y virus de la rubéola.

Los siguientes microorganismos o su ADN no se pudieron obtener para analizarlos y se evaluaron mediante un análisis informático. Sobre la base de este análisis, no es previsible que ninguno de los siguientes microorganismos reaccione con los ensayos *illumigene* Malaria: *Anaplasma phagocytophilum*, *Clostridium botulinum*, *Orientia tsutsugamushi*, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, virus del chikunguña, virus del dengue (tipos 1 – 4), virus del Nilo Occidental y virus de la fiebre amarilla.

El ADN genómico humano fue no reactivo a una concentración de $1,0 \times 10^6$ copias/ml.

PRUEBAS PARA SUSTANCIAS INTERFERENTES

Se realizaron pruebas de interferencia en presencia de sustancias químicas y biológicas a las concentraciones más desfavorables introducidas directamente en muestras artificiales positivas bajas (*P. falciparum* 3D7) y negativas de sangre completa. No se observaron interferencias en ninguno de los métodos de preparación de muestras *illumigene* Malaria con las siguientes sustancias: paracetamol (1 mg/mL), amoxicilina (0,1 mg/mL), artesunato (1 mg/mL), ácido acetilsalicílico (1 mg/mL), atovacuna (0,1 mg/mL), cefalexina (0,1 mg/mL), cloroquina (1 mg/mL), ciprofloxacino (0,1 mg/mL), clindamicina (1 mg/mL), clorhidrato de doxiciclina (1 mg/mL), eritromicina (0,1 mg/mL), sulfato de hidroxiquinona (1 mg/mL), ibuprofeno (1 mg/mL), lufametrina (1 mg/mL), mefloquina (1 mg/mL), fosfato de primaquina (1 mg/mL), clorhidrato de proguanil (1 mg/mL), pirimetamina (1 mg/mL), sulfato de quinina (1 mg/mL), citrato sódico (0,11 M), niveles elevados de bilirrubina (>0,15 mg/mL, recuento leucocitario alto (capa leucocitaria) >10 % v/v), seroalbúmina (>0,03 g/mL), y triglicéridos (>9,9 mg/mL).

Si el hematocrito (>57.5%) y los niveles de hemoglobina (>30 g/dL) son superiores a los niveles fisiológicos normales, los resultados de los ensayos *illumigene* Malaria pueden no ser válidos.



illumigene Malaria und illumigene Malaria PLUS DNA-Amplifikationstests

DNA-Amplifikationstests für den Nachweis von *Plasmodium sp.*

REF

280925, 281125

IVD

In-vitro-Diagnostikum

VERWENDUNGSZWECK

Die DNA-Amplifikationstests *illumigene* Malaria und *illumigene* Malaria PLUS, die auf dem *illumipro-10™* Gerät durchgeführt werden, sind qualitative Diagnostiktests für den direkten Nachweis von DNA von *Plasmodium sp.* in menschlichen, venösen EDTA-Vollblutproben von Patienten mit Anzeichen und Symptomen einer Malariaerkrankung. Die Ergebnisse der *illumigene* Malaria Tests dienen zur Unterstützung bei der Diagnose einer Malariainfektion bei Menschen.

Die *illumigene* Malaria Tests verwenden die „Loop-Mediated Isothermal Amplification“ (LAMP)-Technologie zum Nachweis von *Plasmodium sp.* Dabei werden gezielt DNA-Abschnitte im *Plasmodium* Genom nachgewiesen. Man kann mit den *illumigene* Malaria Tests nicht zwischen den verschiedenen *Plasmodium*-Arten unterscheiden.

illumigene Malaria und *illumigene* Malaria PLUS sind für den Einsatz in Krankenhäusern, Referenzlaboren oder staatlichen Laboren vorgesehen. Diese Assays sind nicht für die „Point-of-Care-Diagnostik“ außerhalb eines Labors vorgesehen.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DES TESTS

Die molekularen Tests *illumigene* Malaria und *illumigene* Malaria PLUS beruhen auf der LAMP-Methode.^{1,2} Die Assays weisen eine Region im Genom von *Plasmodium* nach, die bei *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* und *Plasmodium knowlesi* konserviert ist. Die *illumigene* Malaria Tests haben als DNA-Zielregion einen Sequenzabschnitt von 214 Basenpaaren (bp), der in der nichtkodierenden Mitochondrien-DNA von *Plasmodium sp.* vorkommt.

Bei der LAMP-Methode (Loop-mediated Isothermal Amplification) sorgen spezielle Primer für eine spezifische und kontinuierliche isotherme DNA-Amplifikation. Ein Nebenprodukt der Amplifikation ist Magnesiumpyrophosphat, das einen weißen Niederschlag bildet, wodurch eine trübe Reaktionslösung entsteht. Die Änderungen der Extinktionen der Reaktionslösung werden von dem Meridian *illumipro-10* Inkubator/Leesegerät gemessen. Die durch den Niederschlag von Magnesiumpyrophosphat erzeugten Änderungen der Extinktion der Reaktionslösung deuten auf die Anwesenheit der Ziel-DNA hin. Die Abwesenheit der Ziel-DNA bewirkt keine signifikante Änderung der Extinktion der Probe.

Zum *illumigene* Malaria Kit gehören die *illumigene* Malaria Analysegefäße, der Probenvorbereitungsschritt IV (SMP PREP IV), der *illumigene* Puffer I und die Röhren. Zuerst werden die Vollblutproben mit dem Puffer I behandelt; die Zellen werden aufgebrochen und die Nukleinsäuren freigesetzt. Das Lysat wird in den SMP PREP IV überführt und durch sanftes Drücken in ein sauberes Röhrchen I gefüllt. Das so erhaltene nukleinsäurehaltige Probefiltrat ist für das Testen in dem *illumigene* Malaria Analysegefäß vorgesehen.

Zum *illumigene* Malaria PLUS Kit gehören die *illumigene* Malaria Analysegefäße, die *M-prep* Säulen, der *illumigene* Puffer I, der *M-prep* Puffer II, der *M-prep* Puffer III und die ST-Röhren. Die Vollblutproben werden einer Schwerkraft-Größenausschlusschromatographie unterzogen, um die Nukleinsäuren abzutrennen und zu reinigen. Die Nukleinsäuren werden über die Matrix der *M-prep* Säulen aufgereinigt, während die mitgelieferten Puffer die Zellyse und die Elution der Probe bewirken. Zuerst werden die Vollblutproben mit dem Puffer I behandelt; die Zellen werden aufgebrochen und die Nukleinsäuren freigesetzt. Die Probe wird anschließend auf die *M-prep* Säule aufgetragen und wandert durch die Wirkung der Schwerkraft durch die Säule wobei die größten Moleküle am schnellsten wandern und die Säulenmatrix als Erstes verlassen. Der *M-prep* Puffer II wird auf die *M-prep* Säule aufgetragen, damit die Probe leichter durch die Säulenmatrix wandern kann. Der *M-prep* Puffer II enthält einen nichtreaktiven Farbstoff, mit dem die Wanderung der Probe durch die Säule sichtbar wird. Wenn der Puffer II von der Gelmatrix vollständig aufgenommen worden ist, wird der *M-prep* Puffer III auf die *M-prep* Säule aufgetragen. Das nukleinsäurehaltige Probeneluat wird nach der Zugabe des *M-prep* Puffers III für das Testen in dem *illumigene* Malaria Analysegefäß verwendet. Es werden weder für den *illumigene* Malaria Test noch für den *illumigene* Malaria PLUS Test spezielle Laborgeräte benötigt.

In den beiden Kammern des *illumigene* Malaria Analysegefäßes befindet sich je ein Kügelchen aus lyophilisierten Reagenzien für die Amplifikation sowie entweder spezifische Primer gegen *Plasmodium sp.* (TEST-Kammer) oder spezifische Primer gegen die humane Mitochondrien-DNA (KONTROLL-Kammer). Die humane Mitochondrien-DNA der Vollblutproben dient zusammen mit den spezifischen Primern gegen die humane mitochondriale DNA in der KONTROLL-Kammer des Analysegefäßes als interne Kontrolle für den Test. Bei der Probenvorbereitung wird die humane Mitochondrien-DNA zusammen mit der Mitochondrien-DNA von *Plasmodium sp.* extrahiert. So können die Ziel-DNA und die Kontroll-DNA parallel amplifiziert und nachgewiesen werden. Mit der internen Kontrolle wird die Effizienz der DNA-Extraktion und der Probenverarbeitung, die Inhibition der Amplifikation und die Leistung der Test Reagenzien überwacht und kontrolliert. Die Zielsequenz der Kontrolle muss amplifiziert und in der endgültigen Reaktion nachgewiesen werden, oder der Test wird als ungültig erachtet und die Ergebnisse werden nicht weitergegeben.

Zur Überwachung der Änderungen der Absorptionsmerkmale misst das *illumipro-10* Gerät den Lichtdurchlass durch die TEST- und die KONTROLL-Reaktionslösungen. Der Lichtdurchlass wird zu Beginn des Testdurchlaufs (Signal_{initial}, S_i) und am Ende des Testdurchlaufs (Signal_{end}, S_e) bestimmt. Die Änderung des Lichtdurchlasses zwischen Ende und Beginn des Durchlaufs (Sr:S) wird vom *illumipro-10* gemessen, und das Verhältnis wird mit einem festgelegten Cutoff-Wert verglichen.

Die Probenergebnisse werden anhand festgelegter Cutoff-Werte für die TEST-Kammer gemeldet. Sr:S-Verhältnisse der TEST-Kammer von weniger als 70% werden als „POSITIV“, Sr:S-Verhältnisse der TEST-Kammer, größer als oder gleich 70% werden als „NEGATIV“ gemeldet. *Es werden keine numerischen Werte ausgegeben.*

Die Gültigkeit wird anhand fester Cutoff-Werte für die KONTROLL-Kammer beurteilt. Sr:S-Verhältnisse der KONTROLL-Kammer von weniger als 85% werden für gültig erachtet und lassen die Meldung der Ergebnisse der TEST-Kammer zu (POSITIV, NEGATIV). Sr:S-Verhältnisse der KONTROLL-Kammer größer als oder gleich 85% werden für ungültig erachtet und verhindern die Meldung der Ergebnisse der TEST-Kammer. Ungültige Ergebnisse für die KONTROLL-Kammer werden als „UNGÜLTIG“ gemeldet. *Es werden keine numerischen Werte gemeldet.*

Die Cutoff-Kriterien für die KONTROLL-Kammer-Reaktion sind strenger, um zu gewährleisten, dass die Amplifikation nicht gehemmt wird, dass die Reagenzien bestimmungsgemäß funktionieren und dass die Probenverarbeitung sachgemäß durchgeführt wurde.

BIOLOGISCHE PRINZIPIEN

Malaria bedroht die öffentliche Gesundheit weltweit. Laut Schätzungen besteht für 3,2 Milliarden Menschen in 97 Ländern eine Infektionsgefahr.³ Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) schätzt, dass 2013 198 Millionen Erkrankungsfälle vorkamen, die 584.000 Todesfälle zur Folge hatten.³ Malaria wird von dem intrazellulären Parasit *Plasmodium* verursacht und von weiblichen *Anopheles*-Stechmücken übertragen.³ Nach der Infektion eines Menschen durchläuft *Plasmodium* mehrere Lebensphasen und Morphologien nach der anfänglichen Einnistung in Leberzellen, gefolgt von einer Invasion der roten Blutzellen.⁴ *Plasmodium* vervielfältigt sich in den roten Blutzellen, was Zellrupturen und klinische Erkrankungssymptome bewirkt.⁴

Von fünf *Plasmodium*-Arten ist bekannt, dass sie Malaria bei Menschen (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* und *Plasmodium knowlesi*) verursachen; Infektionen sind jedoch überwiegend auf *P. falciparum* und *P. vivax* zurückzuführen. Die Behandlung gegen Malaria hängt von der *Plasmodium*-Art, dem klinischen Status des Patienten und der Empfindlichkeit gegenüber Antimikrobiotika ab.⁵ Infektionen durch *P. falciparum* und *P. knowlesi* nehmen typischerweise einen schweren Verlauf und müssen zeitnah behandelt werden.⁵

Die WHO empfiehlt, dass bei allen Personen mit Verdacht auf Malaria Diagnosetests durchgeführt werden sollten.³ Normale (Dünner Tropfen) und angereicherte Blutausstriche (Dicker Tropfen) stellen zurzeit die Goldstandard-Diagnosemethode dar. Sorgfalt und Präzision dieser mikroskopischen Methode hängen jedoch stark von den Fähigkeiten des Anwenders ab (Nachweisgrenze 4-100 Parasiten/µL oder höher); falsch-negative und falsch-positive Raten liegen zwischen 10-25%, und bei der Quantifizierung wird eine 2- bis 3-fache Variabilität beobachtet.^{6,7,8} Darüber hinaus treten bei der mikroskopischen Identifikation der *Plasmodium*-Art oft Fehler auf.⁸ Auf Immunassays basierende, sogenannte schnelle Diagnosetests (RDT, *Rapid Diagnostic Tests*) sind eine alternative Diagnosemethode. Die WHO untersuchte die Qualität dieser Schnelltests und kam zum Schluss, dass bei niedrigen Parasitendichten (200 Parasiten/µL) *P. falciparum* mit nur 76% der erhältlichen RDTs nachgewiesen werden konnte und *P. vivax* mit nur 42%.³

Die *illumigene* Malaria Tests liefern schnelle Ergebnisse mit einer höheren Empfindlichkeit als die Mikroskopie und RDTs.

REAGENZIENTHALTENE MATERIALIEN

Die Höchstzahl der mit diesem Testkit durchführbaren Tests ist auf der Außenseite der Packung angegeben.

illumigene Malaria, Bestellnummer 280925

- illumigene* Malaria Analysegefäß:** Analysegefäß mit zwei Kammern, die lyophilisierte Amplifikationsreagenzien (DNA-Polymerase, Deoxy nukleotidtriphosphate) und entweder spezifische Primer gegen *Plasmodium sp.* (TEST-Kammer) oder Primer gegen menschliche Mitochondrien-DNA (KONTROLL-Kammer) enthalten.
- illumigene* Puffer I:** Lyiselösung (0,2 N Natriumhydroxid).
- illumigene* Probenvorbereitungsschritt IV (SMP PREP IV):** Tris-gepufferte Lösung mit Konservierungsmittel Natriumazid (0,09 %)
- illumigene* Röhrchen I:** 1,5-mL-Röhrchen

illumigene Malaria PLUS, Bestellnummer 281125

- illumigene* Malaria PLUS Analysegefäß:** Analysegefäß mit zwei Kammern, die lyophilisierte Amplifikationsreagenzien (DNA-Polymerase, Deoxy nukleotidtriphosphate) und entweder spezifische Primer gegen *Plasmodium sp.* (TEST-Kammer) oder Primer gegen die menschliche Mitochondrien-DNA (KONTROLL-Kammer) enthalten.
- illumigene* Puffer I:** Lyiselösung (0,2 N Natriumhydroxid).
- M-prep* Puffer II:** Lösung mit Phenolrot und dem Konservierungsmittel Natriumazid (0,09%).
- M-prep* Puffer III:** Tris-gepufferte Lösung mit Konservierungsmittel Natriumazid (0,09%).
- M-prep* Säule:** 5,0 cm lange Säule mit abschraubbare Spitze und Verschlusskappe mit Stopfen, enthält das Chromatographieharz in einer mit Tris-gepufferten Lösung mit dem Konservierungsmittel Natriumazid (0,09%).
- ST-Röhrchen:** Mikrozentrifugenröhrchen mit Schraubverschluss, 2,0 mL.

SEPARAT GELIEFERTE MATERIALIEN

- illumigene* Malaria externes Kontroll-Kit, Meridian Bioscience, Inc. Bestellnummer: 279970

BENÖTIGTE, ABER NICHT ENTHALTENE MATERIALIEN

- Einweg-Latexhandschuhe, ungepudert
- DNase/RNase-freie, aerosolbeständige Pipettenspitzen
- Blutentnahmeröhrchen mit Antikoagulant EDTA

NICHT MITGELIEFERTE AUSTÜSTUNG

- Intervall-Stoppuhr
- Vortexmischer (optional)
- Mikropipette zur Abgabe von 50 µL
- Mikropipette zur Abgabe von 250 µL (nur Bestellnummer 281125)
- illumipro-10* Gerät, Bestellnummer von Meridian Bioscience, Inc.: 610172

VORSICHTSMASSNAHMEN

- Sämtliche Reagenzien sind ausschließlich für die In-vitro-Diagnostik bestimmt.
- Kombinieren Sie keine Kitreagenzien oder Analysegefäße unterschiedlicher Chargen. Bei Kits des gleichen Typs können jedoch Einzelchargen von Röhrchen I und ST-Röhrchen frei miteinander kombiniert werden, solange das jeweilige Halbarkeitsdatum bei der Verwendung noch nicht abgelaufen ist.
- Es entstehen falsche Ergebnisse, wenn nicht das Programm für den Malaria-Test auf dem *illumipro-10* Gerät verwendet wird.
- Befolgen Sie bei den Untersuchungen die Biosicherheitsstufe 2 und eine gute Laborpraxis.⁹ Behandeln Sie alle Proben und gebrauchte Testsysteme so als könnten sie infektiöse Erreger übertragen. In den Bereichen, in denen die Proben und Reagenzien der Kits bearbeitet werden, darf weder gegessen, noch getrunken oder geraucht werden.
- Bei der Handhabung der Proben sind Einweghandschuhe zu tragen. Nach der Arbeit sind die Hände gründlich zu waschen.
- Qualitätskontrollprogramme für Laboratorien, die molekulare Tests durchführen, einschließlich für den richtigen Gebrauch und die Pflege der Ausrüstung, sollten angewendet werden.¹⁰
- Die *illumigene* Malaria-Analysegefäße enthalten lyophilisierte Reagenzien. Der Schutzbeutel darf erst dann geöffnet werden, wenn der Test durchgeführt wird.
- Die *illumigene* Malaria-Analysegefäße sind mit einer Verschlussflasche ausgestattet, um eine Kontamination des Testbereichs mit dem Amplifikationsprodukt zu verhindern. Analysegefäße mit defekter Verschlussflasche NICHT verwenden.
- Entsorgen Sie gebrauchte *illumigene* Malaria Analysegefäße, *M-prep* Säulen und Röhrchen sofort nach dem Gebrauch. Halten Sie die Analysegefäße sicher geschlossen. Öffnen Sie die Analysegefäße nach der Bearbeitung NICHT mehr. Ein Öffnen der Analysegefäße nach der Amplifikation kann zu einer Kontamination des Testbereichs mit dem Amplifikationsprodukt führen.

GEFAHREN UND SICHERHEITSHINWEISE

Für weitere Informationen zu den Gefahren- und Sicherheitshinweisen, beziehen Sie sich auf die SDS, die unter folgendem Link verfügbar sind www.meridianbioscience.com (US Version) / www.meridianbioscience.eu (EU Version).

HALTBARKEIT UND LAGERUNG

Das Verfallsdatum ist auf dem Etikett des Kits angegeben. Die Komponenten des Testkits bei der auf dem Etikett angegebenen Temperatur lagern.

VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Stellen Sie sicher, dass die Kitreagenzien vor dem Gebrauch Raumtemperatur (19-30 C) erreicht haben. Stellen Sie sicher, dass der Puffer I vor dem Gebrauch Raumtemperatur erreicht hat und kein Präzipitat sichtbar ist. Werden die Reagenzien vor dem Gebrauch nicht auf Raumtemperatur gebracht, kann dies zu falschen Ergebnissen führen.

SÄULENVORBEREITUNG (nur *illumigene* Malaria PLUS Bestellnummer 281125)

Jede *M-prep*-Säule visuell inspizieren und, sicherstellen, dass das Säulenbett und die Filter nicht während des Transports beschädigt wurden. Säulen mit beschädigten Harzbetten oder unsachgemäß platzierten Filtern könnten nicht korrekt funktionieren

Vorbereiten der Säule:

- Für jede zu testende Probe eine **M-prep**-Säule verwenden. Die obere Kappe und den unteren Schraubverschluss entfernen.
- Die Säulenspitze in einem **ST-Röhrchen** platzieren. Das **ST-Röhrchen** muss in einem kleinen Winkel (ca. 15°) zur **M-prep**-Säule gehalten werden.
HINWEIS: Die Säule nicht direkt in das Sammelröhrchen setzen, weil sich dadurch eine Abdichtung bilden und den Fluss durch die Säule behindern könnte. Siehe **Abbildung 1** für die ordnungsgemäße Platzierung von Säule und Sammelröhrchen.
- Die Flüssigkeit aus der **M-prep**-Säule in einem **ST-Röhrchen** auffangen. Abgetropfte **M-prep**-Säulen müssen innerhalb von einer Stunde verwendet werden.
- Probenvorbereitung für **illumigene Malaria PLUS** wie folgt fortführen.

ABBILDUNG 1: Platzierung von M-prep-Säule und ST-Röhrchen



PROBENNAHME UND -VORBEREITUNG

Probentyp: Humane, venöse Vollblutproben mit EDTA als Konservierungsmittel.

Probennahme: Die Entnahme von venösen Vollblutproben in ein EDTA-Probenröhrchen muss übereinstimmend mit den Richtlinien der Einrichtung zur Entnahme klinischer Proben bei einer Malariainfektion erfolgen. Das Blutentnahmeröhrchen muss nach der Entnahme sofort mindestens 8-mal über Kopf gedreht werden (oder gemäß den Anweisungen des Herstellers).

Venöse EDTA-Vollblutproben können nach der Entnahme und beim Transport zum Labor bei 2-30 C gelagert werden. Die Proben sollten so schnell wie möglich getestet werden. Falls notwendig können die Proben vor dem Test 7 Tage lang bei Raumtemperatur (19-30 C) oder 14 Tage lang gekühlt (2-8 C) aufbewahrt werden. Proben, die nicht innerhalb dieses Zeitraums getestet werden können, sollten sofort bei -20 C eingefroren werden. Diese Proben können so 30 Tage lang aufbewahrt werden. Die Proben dürfen vor dem Testen mit den **illumigene Malaria** Tests nach der Aufbewahrung bei -20 C zweimal wieder aufgetaut und wieder eingefroren werden.

PROBENVORBEREITUNG

HINWEIS: Darauf achten, dass das **illumipro-10**-Gerät eingeschaltet ist und die erforderlichen Leistungsüberprüfungen vor Beginn der **PROBENVORBEREITUNG** durchgeführt wurden. Weitere Informationen zur Einrichtung und zum Betrieb des Geräts finden Sie im **illumipro-10**-Bedienhandbuch.

HINWEIS: Stellen Sie sicher, dass die Proben vor der Vorbereitung Raumtemperatur (19–30 C) haben.

Proben, die mit einem **illumigene Malaria** Test getestet werden sollen, können mit einer der beiden folgenden Methoden vorbereitet werden:

- illumigene Malaria Probenvorbereitung (Bestellnummer 280925)**
 - Drehen Sie die EDTA-Vollblutprobe zum Vermischen 2- bis 3-mal über Kopf.
 - Geben Sie 50 µL des entnommenen, venösen Vollbluts (mit EDTA) in ein Röhrchen mit dem Puffer I. Drehen Sie das Röhrchen 5-mal über Kopf oder mischen Sie es ungefähr 10 Sekunden lang mit dem Vortexmischer. Inkubieren Sie die Proben 2 Minuten lang.
 - Drehen Sie das Röhrchen 5-mal über Kopf oder mischen Sie es ungefähr 10 Sekunden lang mit dem Vortexmischer. Geben Sie sofort 50 µL Lysat in den SMP PREP IV. Drehen Sie den SMP PREP IV 5-mal über Kopf oder mischen Sie ihn 10 Sekunden lang mit dem Vortexmischer.
 - Drücken Sie den SMP PREP IV vorsichtig zusammen und sammeln Sie 5 bis 10 Tropfen in einem sauberen Röhrchen I. Überprüfen Sie, dass das Eluat rot bis braun-rot gefärbt ist. Beschriften Sie das Röhrchen mit den Probenangaben und fahren Sie mit dem eigentlichen Testen fort.
- illumigene Malaria PLUS Probenvorbereitung (Bestellnummer 281125)**

HINWEIS: Die Probenelutionschritte mit den **M-prep** Säulen sollten nicht länger als 30 Minuten dauern. Wenn die Probenelution länger als 30 Minuten dauert, sollten die Proben entsorgt und der Test mit der Originalprobe des Patienten wiederholt werden.

 - Drehen Sie die EDTA-Vollblutprobe zum Vermischen 2- bis 3-mal über Kopf.
 - Überführen Sie 50 µL des entnommenen, venösen Vollbluts (mit EDTA) in ein Röhrchen mit dem Puffer I. Drehen Sie das Röhrchen 5-mal über Kopf oder mischen Sie es ungefähr 10 Sekunden lang mit dem Vortexmischer. Inkubieren Sie die Proben 2 Minuten lang.
 - Drehen Sie das Röhrchen 5-mal über Kopf oder mischen Sie es ungefähr 10 Sekunden lang mit dem Vortexmischer. Überführen Sie 250 µL der vorbereiteten Probe mit einer Mikropipette oben auf eine angemessen beschriftete und vorbereitete **M-prep** Säule. Warten Sie ungefähr 2 Minuten oder bis die Probe von der Säule vollständig aufgenommen worden ist und der Fluss aufhört. Dieser Schritt sollte nicht länger als 30 Minuten dauern.
 - Überführen Sie mit einer Mikropipette 250 µL des **M-prep** Puffers II oben auf die **M-prep** Säule. Entsorgen Sie die Pipettenspitze. Nach der Zugabe des **M-prep** Puffers II ist die Säule rot gefärbt. Warten Sie ungefähr 2 Minuten oder bis der Fluss aufhört. Dieser Schritt sollte nicht länger als 30 Minuten dauern.
 - Entfernen Sie den letzten Tropfen Flüssigkeit von der Säulenspitze mit dem **ST-Röhrchen**. Entsorgen Sie das Röhrchen.
 - Setzen Sie ein sauberes **ST-Röhrchen** unter die **M-prep** Säule. Überführen Sie mit einer Mikropipette 250 µL des **M-prep** Puffers III oben auf die **M-prep** Säule. Entsorgen Sie die Pipettenspitze. Warten Sie ungefähr 2 Minuten oder bis der Fluss aufhört. Dieser Schritt sollte nicht länger als 30 Minuten dauern.
 - Entfernen Sie den letzten Tropfen Flüssigkeit von der Säulenspitze mit dem **ST-Röhrchen**. Stellen Sie sicher, dass das Eluat rot bis braun-rot gefärbt ist. Beschriften Sie das Röhrchen mit den Angaben für die Probe und fahren Sie mit dem eigentlichen Testen fort.

TESTDURCHFÜHRUNG

HINWEIS: Bei einem einzigen **illumipro-10**-Lauf können maximal 10 Proben verarbeitet werden.

- Nehmen Sie pro Probe ein **illumigene Malaria** Analysegefäß aus dem Schutzbeutel. Öffnen Sie vorsichtig das Analysegefäß und halten Sie die Kammer so, dass das lyophilisierte Reagenz beim Öffnen nicht herausfällt. Platzieren Sie das Analysegefäß auf einer ebenen Oberfläche oder in einen für das System passenden Probenständer.
- Überführen Sie mit einer Mikropipette je 50 µL der vorbereiteten Probe in die TEST-Kammer (weißes Kügelchen) und in die KONTROLL-Kammer (gelbes Kügelchen) des **illumigene Malaria** Analysegefäßes. Achten Sie dabei darauf, dass keine Luft in das Reaktionsgemisch kommt.
- Schließen Sie das **illumigene** Analysegefäß und sichern Sie die Sperrvorrichtung fest. Schließen Sie die **illumigene** Testvorrichtung und befestigen Sie die Verschlusslaschen.

- Klopfen Sie das Analysegefäß leicht auf die Arbeitsfläche auf oder schwenken Sie es, um Luftblasen zu entfernen. Überprüfen Sie das Analysegefäß sorgfältig auf die Rehydratation des KONTROLL-/TEST-Kügelchen sowie auf Luftblasen in der Kammer und auf Flüssigkeit im oberen Teil des Analysegefäßes. Falls nicht gelöste Kügelchen, Luftblasen oder Flüssigkeit im oberen Teil des Analysegefäßes zu erkennen sind, klopfen Sie dieses vorsichtig auf die Arbeitsfläche und wiederholen Sie die Sichtkontrolle. Die Amplifikation und Detektion sollten innerhalb von 15 Minuten initiiert werden.
- Wiederholen Sie die Schritte des Testverfahrens für alle zu testenden Proben.
- Stellen Sie das **illumigene** Analysegefäß in das **illumigene-10** Gerät und starten Sie das **Programm für Malaria**. Die Ergebnisse werden am Ende des Laufs angezeigt.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Proben-ID	Ausgegebenes Ergebnis	Interpretation
Patientenprobe	POSITIV	Die Probe enthält die Ziel-DNA von <i>Plasmodium sp.</i>
	NEGATIV	Die Probe enthält keine Ziel-DNA von <i>Plasmodium sp.</i>
	UNGÜLTIG	Kein angezeigtes Ergebnis. Wiederholen Sie den Test unter Verwendung der originalen Patientenprobe. Inhibitorische Patientensprobe, unsachgemäße Probenvorbereitung, Reagenzversagen, Instrumentenversagen oder interner Kontrollfehler.
Positivkontrolle	POSITIV	Gültiges positives Kontrollergebnis. Reagenzien, die zum Zeitpunkt der Verwendung aktiv sind, funktionieren mit dem illumipro-10 korrekt.
	NEGATIV	Falsches Kontrollergebnis. Wiederholen Sie den Kontrolltest als ersten Schritt zur Bestimmung der Fehlerquelle. Sollte Kontrollfehler wiederholen, wenden Sie sich bitte an den technischen Service von Meridian unter +1-800-343-3858 (USA) oder an Ihren Vertriebshändler vor Ort.
	UNGÜLTIG	Kein angezeigtes Ergebnis. Wiederholen Sie den gesamten Testlauf unter Verwendung der ursprünglichen Proben. Falsche Probenvorbereitung, Reagenzversagen, Instrumentenversagen oder interner Kontrollfehler.
Negativkontrolle	POSITIV	Falsches Kontrollergebnis. Wiederholen Sie den Kontrolltest als ersten Schritt zur Bestimmung der Fehlerquelle. Sollte sich Kontrollfehler wiederholen, wenden Sie sich bitte an den technischen Service von Meridian unter +1-800-343-3858 (USA) oder an Ihren Vertriebshändler vor Ort.
	NEGATIV	Gültiges negatives Kontrollergebnis. Reagenzien, die zum Zeitpunkt der Verwendung aktiv sind, funktionieren mit dem illumipro-10 korrekt.
	UNGÜLTIG	Kein angezeigtes Ergebnis. Wiederholen Sie den gesamten Testlauf unter Verwendung der ursprünglichen Proben. Falsche Probenvorbereitung, Reagenzversagen, Instrumentenversagen oder interner Kontrollfehler.
LEERER SCHACHT	KEINER	Kein illumigene Analysegefäß in der illumipro-10-Vertiefung. ODER Das vorhandene illumigene Analysegefäß ist aufgrund fehlerhafter Probenvorbereitung, verunreinigtem Gefäß oder falsch aufgestelltem Gefäß beeinträchtigt. Wiederholen Sie den Test unter Verwendung der ursprünglichen Proben.

QUALITÄTSKONTROLLE

Den Test gemäß der einschlägigen lokalen, bundesstaatlichen oder nationalen bzw. zulassungsbehördlichen Auflagen durchführen.

- Jede Testvorrichtung enthält eine interne Kontrolle, mit der die Effizienz der Test Reagenzien, der DNA-Extraktion, der Probenbearbeitung und die Inhibition der Amplifikation überwacht und kontrolliert wird. Die humane Mitochondrien-DNA dient als interne Kontroll-DNA. Sie stammt aus der ursprünglichen Blutprobe und bleibt bei allen Verfahrensschritten erhalten. Die Primer für die Amplifikation der internen Kontroll-DNA befinden sich in der Kontrollkammer des **illumigene** Analysegefäßes.
- Gemäß guter Laborpraxis wird die Anwendung von Kontrollmaterialien empfohlen. Die Anwender sollten die entsprechenden bundesstaatlichen, staatlichen und kommunalen Richtlinien zur Mitführung von externen Qualitätskontrollen befolgen.
- Externe positive Kontrollreagenzien für **illumigene Malaria** sind separat erhältlich (Bestell-Nr. 279970). Alternativ können vorher als *Plasmodium sp.* positiv charakterisierte klinische oder künstlich hergestellte Blutproben als externe Positivkontrolle verwendet werden. Eine bekannte negative humane EDTA-Vollblutprobe kann als externe negative Kontrolle dienen. Es wird empfohlen, die Reaktivität jeder neuen Charge und jeder neuen Lieferung von **illumigene Malaria** und **illumigene Malaria PLUS** beim Empfang und vor Gebrauch zu überprüfen. Danach sind externe Kontrolltests gemäß der bundesstaatlichen, staatlichen und kommunalen Richtlinien durchzuführen. Die **illumigene Malaria** und **illumigene Malaria PLUS** Testkits sollen nicht für Tests an Patientenproben verwendet werden, wenn die externen Kontrollen nicht die richtigen Ergebnisse ergeben.
- Für jedes externe Kontrollreagenz muss ein separates Testgefäß verwendet werden.

ERWARTETE WERTE

Bei der klinischen Studie 2015 lag die Inzidenz von *Plasmodium sp.* gemäß dem Nachweis mit dem **illumigene Malaria** Test bei 68.1% (147/216) mit der **illumigene Malaria** Probenvorbereitungsmethode (Bestell-Nr. 280925) und bei 70.6% (149/211) mit der **illumigene Malaria PLUS** Methode (Bestell-Nr. 281125). Die Gesamtinzidenz jeder *Plasmodium*-Art ist weiter unten aufgeführt.

Arten	Prävalenz von <i>Plasmodium</i> -Arten			
	illumigene Malaria (n=216)		illumigene Malaria PLUS (n=211)	
	Insgesamt positiv	Prävalenz	Insgesamt positiv	Prävalenz
<i>P. falciparum</i>	137	63.4%	134	63.5%
<i>P. vivax</i>	0	0%	0	0%
<i>P. ovale</i>	1	0.5%	1	0.5%
<i>P. malariae</i>	1	0.5%	1	0.5%
<i>P. knowlesi</i>	0	0%	0	0%
Unbekannt*	8	3.7%	13	6.2%

* Es konnten keine Arten bestimmt werden, da die Proben bei der Mikroskopie negativ waren.

EINSCHRÄNKUNGEN

- Dieses Produkt kann nur mit dem **illumipro-10**-Instrument verwendet werden.
- Mit **illumigene Malaria** und **illumigene Malaria PLUS** kann nicht zwischen einzelnen *Plasmodium*-Arten unterschieden werden.
- Hämatokrit (>57.5%) und Hämoglobinwerte (>30 g/dL) über dem normalen physiologischen Bereich können die Ergebnisse der **illumigene Malaria** Tests ungültig machen.
- illumigene Malaria** Tests sind nicht mit Proben aus dem Erythrozytenkonzentrat getestet worden.
- Die Leistung des **illumigene Malaria** Tests zum Nachweis von *Plasmodium knowlesi* wurde mit aufgereinigter, genomischer DNA bestimmt; es wurden dafür keine vollständigen Organismen verwendet.
- illumigene Malaria** und **illumigene Malaria PLUS** sind qualitative Tests und geben keine Auskunft über quantitative Parameter z. B. Hinweise auf die Belastung des Organismus.
- Der Nachweis von Nukleinsäuren hängt von der korrekten Probenentnahme sowie von der Handhabung, dem Transport, der Lagerung und der Vorbereitung der Proben ab. Wird bei einem dieser Schritte das ordnungsgemäße Verfahren nicht eingehalten, kann dies zu falschen Ergebnissen führen.

8. Die Nukleinsäuren des Organismus können unabhängig von der Lebensfähigkeit des Organismus in vivo fortbestehen. Mit *illumigene* Malaria und *illumigene* Malaria PLUS kann nicht zwischen lebensfähigen und nicht-lebensfähigen Organismen unterschieden werden.
9. Wie bei allen anderen diagnostischen Tests auf molekularer Grundlage können (A) falsch-negative Ergebnisse infolge der Präsenz von Inhibitoren, technischen Fehlern, Vertauschen der Proben und geringer Organismenanzahl in der klinischen Probe sowie (B) falsch-positive Ergebnisse infolge der Präsenz einer Kreuzkontamination mit Zielorganismen, deren Nukleinsäuren oder dem amplifizierten Produkt sowie von nicht-spezifischen Signalen entstehen.

LEISTUNGSMERKMALE

Die Leistungsfähigkeit der *illumigene* Malaria und *illumigene* Malaria PLUS DNA-Amplifikations Tests wurde in klinischen Studien im November 2015 in Senegal in Afrika ermittelt. Die Leistungsmerkmale des Tests wurden mit der Referenzmethode (verglichen Blutausstriche dünner und dicker Tropfen). Die Bestimmung der *Plasmodium*-Arten bei allen positiven Proben erfolgte mikroskopisch.

Zu den Proben gehörten venöse EDTA-Vollblutproben von Patienten mit Anzeichen und Symptomen einer *Plasmodium*-Infektion zur sofortigen Messung („prospektive Proben“) und zur späteren Messung („retrospektive Proben“). Insgesamt wurden 216 qualifizierte, de-identifizierte Vollblutproben untersucht. 66 Proben wurden sofort nach der Entnahme getestet (prospektiv) und 150 Proben wurden nach der Entnahme und vor dem Test mit dem *illumigene* Malaria Test geforen aufbewahrt (retrospektiv). Alle Blutproben wurden sowohl dem *illumigene* Malaria als auch dem *illumigene* Malaria PLUS Probenvorbereitungungsverfahren unterworfen. Weitere fünf Proben wurden aufgrund von Fehlern in der Durchführung des *illumigene* Malaria PLUS Tests nicht in Betracht gezogen. Demzufolge gibt es 211 zulässige Proben für den *illumigene* Malaria PLUS Test. Alle Proben wurden prospektiv mikroskopisch untersucht.

Die Analyse der Ergebnisse der *illumigene* Malaria und *illumigene* Malaria PLUS Tests im Vergleich der prospektiven und retrospektiven Proben ergab keinen Unterschied zwischen frischen und geforenen Proben. In der folgenden Tabelle werden die Ergebnisse der *illumigene* Malaria und *illumigene* Malaria PLUS DNA-Amplifikationstests für prospektive und retrospektive Proben zusammengefasst.

Ergebnisse von *illumigene* Malaria im Vergleich zur Mikroskopie

	Mikroskopie			<i>illumigene</i>	Leistung				
	Pos	Neg	Gesamt		INV ^a		95% CI		
<i>illumigene</i> Malaria	Pos	139	8	147	0(1)	Sensitivität	100.0%	139/139	97.3-100.0%
	Neg	0	67	67	2(2)	Spezifität	89.3%	67/75	80.3-94.5%
	Gesamt	139	75	214	2				

^aZunächst ungültige Ergebnisse werden in Klammern angegeben. Die auch nach Wiederholung verbliebene Anzahl an ungültigen Proben, steht vor der Klammer.

Ergebnisse von *illumigene* Malaria PLUS im Vergleich zur Mikroskopie

	Mikroskopie			<i>illumigene</i>	Leistung				
	Pos	Neg	Gesamt		INV		95% CI		
<i>illumigene</i> Malaria PLUS	Pos	136	13	149	0	Sensitivität	100.0%	136/136	97.3-100.0%
	Neg	0	62	62	0	Spezifität	82.7%	62/75	72.6-89.6%
	Gesamt	136	75	211	0				

Die Proben wurden von Patienten im Alter von 4 bis 77 Jahren gesammelt. Das Alter von 15 Patienten lag zwischen 1 – 12 Jahren, 75 waren zwischen 13 – 21 Jahre alt, 125 waren ≥ 22 Jahre alt. Das Alter eines Patienten wurde nicht bestimmt. Es wurden keine altersabhängigen Unterschiede bei den Testergebnissen beobachtet. Die Studienpopulation umfasste 84 (38.9%) weibliche Patienten und 131 (60.6%) männliche Patienten; das Geschlecht eines Patienten wurde nicht bestimmt. Es wird nicht erwartet, dass das Testergebnis vom Geschlecht beeinflusst wird.

ANALYTISCHE SENSITIVITÄT

Für *Plasmodium falciparum* und *Plasmodium vivax* wurde die Nachweisgrenze (LoD, Limit of Detection) ermittelt. Die LoD eines positiven Nachweises wurde unter Verwendung von mindestens 20 Replikaten und anhand einer vorgegebenen Wahrscheinlichkeit (z. B. 95 % für den Fall, dass 19 von 20 Replikaten positiv sind) bestimmt.

	<i>illumigene</i> Malaria	<i>illumigene</i> Malaria PLUS
<i>Plasmodium</i> -Arten	Parasiten/ μ L	Parasiten/ μ L
<i>P. falciparum</i> (3D7)	2	0.25
<i>P. vivax</i> (India VII)	0.125	0.063

TEST REAKTIVITÄT

P. malariae, *P. ovale* und *P. knowlesi* einer bekannten Menge DNA wurden in negativem Vollblut verdünnt. Die Konzentration wurde dabei auf das Dreifache der jeweiligen Nachweisgrenze für die *illumigene* Malaria und *illumigene* Malaria PLUS Probenvorbereitungsmethoden (*illumigene* Malaria: durchschnittlich 72 Kopien/ μ L oder 6 Parasiten/ μ L; *illumigene* Malaria PLUS: durchschnittlich 9 Kopien/ μ L oder 0,75 Parasiten/ μ L) eingestellt. Bei diesen getesteten Konzentrationen wurden alle Arten nachgewiesen.

REPRODUZIERBARKEIT

Die Reproduzierbarkeit wurde von drei internen Labors untersucht. Den teilnehmenden Labors wurden 10 verblindete Proben übergeben. Zu diesen Proben gehörten künstlich hergestellte Proben mit *Plasmodium falciparum* (Stamm 3D7), die schwach positiv, durchschnittlich positiv und stark positiv waren. Zu diesen Proben gehörte auch eine negative Vollblutprobe. Die Tests wurden am selben Tag von mindestens zwei verschiedenen Anwendern in jedem Labor (Intra-Assay-Variabilität) fünf Tage lang (Inter-Assay-Variabilität) durchgeführt. In dieser Studie wurden jeweils drei Chargen *illumigene* Malaria bzw. *illumigene* Malaria PLUS und 8 *illumipro-10* Geräte verwendet. Die verblindeten Proben wurden zusammen mit externen positiven und negativen Kontrollen getestet; eine bekannte negative Vollblutprobe diente als negative Kontrolle.

Zusammenfassung der Reproduzierbarkeitsstudie: <i>illumigene</i> Malaria Probenvorbereitungsmethode								
Probentyp	Standort 1		Standort 2		Standort 3		Gesamt	
	Übereinstimmung in Prozent	Übereinstimmung in Prozent	Übereinstimmung in Prozent	Übereinstimmung in Prozent	Übereinstimmung in Prozent	Übereinstimmung in Prozent	Übereinstimmung in Prozent	
Mäßig positiv (8 Parasiten/ μ L)	30/30	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90	100.0%
Schwach positiv (2 Parasiten/ μ L)	30/30	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90	100.0%
Stark negativ (0.458 Parasiten/ μ L)	30/30	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90	100.0%
Negativ	10/10	100.0%	10/10	100.0%	10/10	100.0%	30/30	100.0%
Negativkontrolle	10/10	100.0%	10/10	100.0%	10/10	100.0%	30/30	100.0%
Positivkontrolle	10/10	100.0%	10/10	100.0%	10/10	100.0%	30/30	100.0%

Zusammenfassung der Reproduzierbarkeitsstudie: <i>illumigene</i> Malaria PLUS								
Probentyp	Standort 1		Standort 2		Standort 3		Gesamt	
	Übereinstimmung in Prozent	Übereinstimmung in Prozent	Übereinstimmung in Prozent	Übereinstimmung in Prozent	Übereinstimmung in Prozent	Übereinstimmung in Prozent	Übereinstimmung in Prozent	
Mäßig positiv (1 Parasiten/ μ L)	30/30	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90	100.0%
Schwach positiv (0.5 Parasiten/ μ L)	30/30	100.0%	30/30	100.0%	30/30	100.0%	90/90	100.0%
Stark negativ (0.029 Parasiten/ μ L)	29/30	96.7%	28/30	93.3%	30/30	100.0%	87/90	96.7%
Negativ	10/10	100.0%	10/10	100.0%	10/10	100.0%	30/30	100.0%
Negativkontrolle	10/10	100.0%	10/10	100.0%	10/10	100.0%	30/30	100.0%
Positivkontrolle	10/10	100.0%	10/10	100.0%	10/10	100.0%	30/30	100.0%

KREUZREAKTIVITÄT

In den Kreuzreaktivitätsstudien wurden positive (*P. falciparum* 3D7) und negative Vollblutproben mit fremden Organismen geimpft. Dabei lagen die Minimumkonzentrationen von bakteriellen bzw. fungalen Organismen bei $1,0 \times 10^6$ CFU/mL, von Viren bei $1,0 \times 10^5$ TCID₅₀/mL und von Protozoen bei $1,0 \times 10^5$ Organismen/mL. Wo keine vollständigen Organismen erhältlich waren, wurden $1,0 \times 10^6$ Kopien/mL Genom-DNA hinzu gegeben und getestet. Keiner der folgenden Organismen (oder deren genetisches Material) reagierte mit den *illumigene* Malaria Tests: *Babesia microti*, *Borrelia burgdorferi*, *Hemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum*, *Leptospira interrogans*, *Mycobacterium smegmatis*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Treponema pallidum*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli*, *Vibrio parahaemolyticus*, Cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr-Virus (EBV), Hepatitis-B-Virus, Hepatitis-C-Virus, Herpes simplex virus 1 (HSV 1), HIV-1, humanes Papillomavirus (HPV) und Rubellavirus.

Die folgenden Organismen bzw. deren DNA standen nicht für die Tests zur Verfügung und wurden einer *In-silico*-Analyse unterzogen. Auf Grundlage dieser Computeranalyse wird nicht erwartet, dass einer der folgenden Organismen die *illumigene* Malaria Tests stört:

Anaplasma phagocytophilum, *Clostridium botulinum*, *Orientia tsutsugamushi*, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, Chikungunya-Virus, Dengue-Virus (Typen 1-4), West-Nil-Virus und Gelbfieber-Virus.

Humangenom-DNS reagierte bei $1,0 \times 10^6$ Kopien/mL nicht.

STÖRSUBSTANZEN-TESTS

Das Testen von Interferenzen wurde in Anwesenheit von Worst-Case-Konzentrationen von chemischen und biologischen Substanzen durchgeführt, mit denen künstlich positive (*P. falciparum* 3D7) und negative Vollblutproben versetzt wurden. Demnach verursachen die folgenden Substanzen keine Störung beider *illumigene* Malaria Vorbereitungsverfahren:

Acetaminophen (1 mg/mL), Amoxicillin (0,1 mg/mL), Artesunat (1 mg/mL), Aspirin (1 mg/mL), Atovaquon (0,1 mg/mL), Cephalaxin (0,1 mg/mL), Chloroquin (1 mg/mL), Ciprofloxacin (0,1 mg/mL), Clindamycin (1 mg/mL), Doxycyclin hydrochlorid (1 mg/mL), Erythromycin (0,1 mg/mL), Hydroxychloroquinsulfat (1 mg/mL), Ibuprofen (1 mg/mL), Lumefantrin (1 mg/mL), Mefloquin (1 mg/mL), Primaquin phosphat (1 mg/mL), Proguanil hydrochlorid (1 mg/mL), Pyrimethamin (1 mg/mL), Quinin sulfat (1 mg/mL), Natriumcitrat (0,11 M), erhöhte Bilirubin-Werte (>0,15 mg/mL), erhöhte Leukozytenwerte (Buffy-Coat) >10 % v/v), Serumalbumin (>0,3 g/mL) und Triglyceride (>9,9 mg/mL).

Hämatokrit (>57.5%) und Hämoglobinwerte (>30 g/dL) über dem normalen physiologischen Bereich können die Ergebnisse der *illumigene* Malaria Tests ungültig machen

REFERENCES

- Nagamine K, Hase T, Notoni T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplifications using loop primers. *Mol Cell Probes* 2002;16:223-29.
- Mori Y, Kitao M, Tomita N, Notoni T. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantitating template DNA. *J Biochem Biophys* 2004;59:145-47.
- World Malaria Report 2014. Global Malaria Programme, World Health Organization. http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report/en/.
- Cowman AF and Crabb BS. Invasion of Red Blood Cells by Malaria Parasites. *Cell* 2006; 124: 755-766.
- Treatment of Malaria (Guidelines for Physicians). Centers for Disease Control and Prevention, July 2013. www.cdc.gov/malaria/resources/pdf/clinicalguidance.pdf.
- O'Meara WP, Barcus M, Wongsrichanalai C, Muth S, Maguire JD, Jordan RG, Prescott WR, and McKenzie FE. Reader Technique as a Source of Variability in Determining Malaria Parasite Density by Microscopy. *Malaria J* 2006;5:118.
- McKenzie FE, Sirichaisinthop J, Miller RS, Gasser RA, and Wongsrichanalai C. Dependence of Malaria Detection and Species Diagnosis by Microscopy on Parasite Density. *Am J Trop Med Hyg* 2003;69(4):372-376.
- Wongsrichanalai C, Barcus MJ, Muth S, Sutarnhardja A, and Wernsdorfer WH. A Review of Malaria Diagnostic Tools: Microscopy and Rapid Diagnostic Test (RDT). *Am J Trop Med Hyg* 2007;77(6):119-127.
- US Department of Health and Human Services PHS/CDC/NIH. Biosafety in microbiology and biomedical laboratories, Washington DC: US Government Printing Office, 2007.
- CLSI: MM3-A2 Molecular diagnostic methods for infectious disease; approved guideline, 2nd ed. Wayne PA: Clinical Laboratory Standards Institute, 2006.



SN1102

REV. 01/16


Meridian Bioscience, Inc.
 USA/Corporate Office
 3471 River Hills Drive
 Cincinnati, Ohio 45244
 Telephone: 513.271.3700
 Orders/Customer Service:
 800.543.1980
 Technical Support Center:
 800.343.3858
 Information Fax: 513.272.5432
 Ordering Fax: 513.271.0124

Meridian Bioscience Europe S. r. l.
 Via dell'Industria, 7
 20020 Villa Cortese, Milano
 ITALY
 Tel: +39 0331 43 36 36
 Fax: +39 0331 43 36 16
 Email: info@meridianbioscience.eu
 WEB: www.meridianbioscience.eu

EC REP
 Authorized Representative

Meridian Bioscience Europe s.a./n.v.
 2 Avenue du Japon - 1420 Braine l'Alleud
 BELGIUM
 Tel: +32 (0) 67 89 59 59
 Fax: +32 (0) 67 89 59 58
 Email: info.bn@meridianbioscience.eu




















Meridian Bioscience Europe France
 34 rue de Ponthieu - 75008 Paris
 FRANCE
 Tel: +33 (0) 1 42 56 04 40
 Fax: +33 (0) 9 70 06 62 10
 Email: info.fr@meridianbioscience.eu

Meridian Bioscience Europe b.v.
 Postbus 301 - 5460 AH Veghel
 NETHERLANDS
 Tel: +31 (0) 411 62 11 66
 Fax: +31 (0) 411 62 48 41
 Email: info.bn@meridianbioscience.eu

INTERNATIONAL SYMBOL USAGE

You may see one or more of these symbols on the labeling/packaging of this product:

Key guide to symbols (Guida ai simboli, Guide des symboles, Guia de simbolos, Zeichenerklärung)

	Use By / Utilizzare entro / Utiliser jusqu'à / Fecha de caducidad / Verwendbar bis	CONTROL +	Positive control / Controllo positivo / Contrôle positif / Control positivo / Positive Kontrolle
LOT	Batch Code / Codice del lotto / Code du lot / Código de lote / Chargenbezeichnung	CONTROL -	Negative control / Controllo negativo / Contrôle négatif / Control negativo / Negative Kontrolle
IVD	In vitro diagnostic medical device / Dispositivo medico-diagnostico in vitro / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / In-Vitro-Diagnostikum	EC REP	Authorized Representative in the European Community / Rappresentante Autorizzato nella Comunità Europea / Mandataire dans la Communauté européenne / Representante autorizado en la Comunidad Europea / Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft
CE	This product fulfills the requirements of Directive 98/79/EC on in vitro diagnostic medical devices / Questo prodotto soddisfa i requisiti della Direttiva 98/79/CE sui dispositivi medico diagnostici in vitro / Ce produit répond aux exigences de la Directive 98/79 CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / Este producto cumple con las exigencias de la Directiva 98/79/CE sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Dieses Produkt entspricht den Anforderungen der Richtlinie über In-Vitro Diagnostica 98/79/EG	SMP PREP OIL SPE	Sample Preparation Apparatus containing Sample Diluent / Dispositivo per la preparazione del campione contenente il diluente del campione / Système pour la préparation de l'échantillon, diluant inclus / Aparato para Preparación de Muestra con Diluyente de Muestra / System zur Probenvorbereitung, in dem sich Probenverdünnungspuffer befindet
		STERILE R	Sterilization by gamma irradiation / Sterilizzazione con raggi gamma / Sterilisation par irradiation aux rayons gamma / Esterilizado por irradiación gamma / Sterilisation durch Gammastrahlen
REF	Catalogue number / Numero di catalogo / Référence du catalogue / Número de catálogo / Bestellnummer		Do not freeze / Non congelare / Ne pas congeler / No congelar / Nicht Einfrieren
	Consult Instructions for Use / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulter les instructions d'utilisation / Consulte las instrucciones de uso / Gebrauchsanweisung beachten	RoHS	Restriction of Hazardous Substances / Restrizione all'uso di sostanze pericolose / Limitation de substances dangereuses / Restricción de Substancias Nocivas / Beschränkung der Verwendung bestimmter gefährlicher Stoffe
	Manufacturer / Fabricante / Fabricant / Fabricante / Hersteller		Caution, consult accompanying documents / Attention, voir les instructions / Atención, ver instrucciones de uso / Achtung, Begleitdokumente beachten
SN	Serial number / Numero di serie / Numéro de série / Número de serie / Seriennummer	STERILE EO	Sterilization by ethylene oxide / Sterilizzazione con ossido di etilene / Sterilisation par oxyde d'éthylène / Esterilizado por óxido de etileno / Sterilisation durch Ethylenoxid
	Contains sufficient for "n" tests / Contiene sufficiente per "n" test / Contenu suffisant pour "n" tests / Contenido suficiente para "n" ensayos / Inhalt ausreichend für "n" Prüfungen	BUF RXN	Reaction Buffer / Tampone di reazione / Solution de réaction / tamponee / Tampón de Reacción / Reaktionspuffer
	Temperature limitation / Limiti di temperatura / Limites de température / Límite de temperatura / Temperaturbegrenzung		ETL Registered Mark Certified / Marchio di certificazione registrato a livello nazionale / Certifié Conforme ETL / Marca de Certificación Registrada Nacional / ETL Konform geprüfte
	Female / Femminile / De sexe féminin / Hembra / Frau		Recycle - do not dispose of as general waste / Riciclare - non eliminare come rifiuto generico / Recycler - ne pas jeter dans une poubelle / Recycle - no desecho como basura general / Recycling- dieses Produkt nicht über den Hausmüll entsorgen
	Single Use Only / Prodotto Monouso / A usage unique / Para Uso Solo / nur für die einmalige Anwendung		
TEST	Test Device / Dispositivo test / Dispositif de test / Dispositivo de Prueba / Testgerät	HT TUBE	Heat Treatment Tube / Provetta per il trattamento termico / Tube pour le traitement thermique / Tubo de tratamiento de calor / Röhrchen zur Hitzebearbeitung
	Date of manufacture / Data di fabbricazione / Date de fabrication / Fecha de fabricación / Herstellungsdatum		For IVD Performance Evaluation Only / Soltanto per valutazione delle prestazioni / Reactifs IVD réservés à l'évaluation des performances / Solo para evaluación del funcionamiento / Nur zur IVD Leistungsbewertung
	LASER RADIATION: Avoid Exposure to Beam / RADIAZIONE LASER: Evitare l'esposizione al raggio / RAYONNEMENT LASER: Eviter toute exposition au faisceau / Radiación Laser: Evite la Exposición a los Rayos / LASERSTRAHLUNG: Direkten Kontakt mit dem Strahl vermeiden		HOT SURFACE: Keep hands away from Hot Surfaces / Superficie calda: tenere le mani lontane dalle superfici calde / SURFACES CHAUDES: Ne pas toucher les surfaces chaudes / Superficie Caliente: Mantenga las manos alejadas de la superficie caliente / Heiße Oberfläche: Kontakt mit heißen Oberflächen vermeiden
	CAUTION: Laser Radiation / AVERTISSEMENT: Radiation Laser / AVERTISSEMENT: Rayonnement laser / Precaución: Radiación Laser / WARNUNG: Laserstrahlung	IPX-0	CAUTION: Protect from water / ATTENZIONE: Proteggere dall'acqua / AVERTISSEMENT: Protéger de l'humidité / Precaución: Proteja del agua / WARNUNG: Vor Feuchtigkeit schützen
	CAUTION: Risk of Danger / ATTENZIONE: Pericolo / AVERTISSEMENT: Risque de danger / Precaución: Peligroso / WARNUNG: Risikofaktor	CONTROL	Assay Control / Controllo del test / Test de contrôle / Control de Ensayo / Kontrolltest
BUF	Buffer / Soluzione tampone / Solution tamponnée / Tampón / Puffer		Warning / Avvertenze / Mise En Garde / Advertencia / Warnhinweise
MIN OIL	Mineral Oil / Olio Minerale / Huile Minérale / Aceite Mineral / Mineralöl	MEDIA	Media / Terreno di trasporto / Milieux / Medio / Medium
ST TUBE	Screw Top Tube / Provetta con tappo a vite / Tube à bouchon vissé / Tubo con tapa de rosca / Röhrchen mit Schnappverschluss	COL	Sample Preparation Column / Colonna di preparazione dei campioni / Colonne pour la préparation de l'échantillon / Columna de preparación de muestra / Säule zur Probenaufbereitung
BUF SMP	Sample Buffer / Soluzione tampone per il campione / Tampone de l'échantillon / Tampón de muestra / Probenpuffer	PRE REAG	Pretreatment Reagent / Reagente di Pretattamento / Réactif de prétraitement / Reactivo de prettreatment / Reagenz für die Vorbehandlung
		SMP PREP	Sample Preparation / Preparazione del campione / Préparation de l'échantillon / Preparación de Muestra / Probenvorbereitung

For technical assistance, call Technical Support Services at 800-343-3858 between the hours of 8AM and 6PM, USA Eastern Standard Time. To place an order, call Customer Service Department at 800-543-1980.