

BIOSYNEX

BIOSYNEX AMPLIFLASH MALARIA

REF 3150053L

FR (FRANÇAIS / FRENCH)	1
EN (ENGLISH)	12
ES (SPANISH)	22
IT (ITALIAN)	33

CONTENTS

MANUFACTURER INFORMATION



BIOSYNEX S.A.
22 boulevard Sébastien Brant
67400 ILLKIRCH-GRAFFENSTADEN – France
Standard : +33 3 88 78 78 87
www.biosynex.com

Contact France : +33 3 88 77 57 00
service.clients@biosynex.com
Contact other countries : +33 3 88 77 57 52
sales@biosynex.com
After-sales service: +33 3 88 77 57 25
tech.support@biosynex.com

CH REP

BIOSYNEX SWISS S.A.
Route de Rossemaison 100
2800 DELEMONT - Switzerland

NON-STANDARD SYMBOLS

	FR	EN	ES	IT
	Détection qualitative par PCR	Qualitative detection by PCR	Detección cualitativa mediante PCR	Rilevazione qualitativa mediante PCR
	Tampon d'activation	Activation buffer	Tampón de activación	Tampone di attivazione
	Master mix	Master mix	Master mix	Master mix
	Barrettes de bouchons	Cap strips	Tapones	Tappi

CONTENTS

BIOSYNEX AMPLIFLASH MALARIA

PCR ISOTHERME EN TEMPS REEL POUR LA DETECTION QUALITATIVE DE PLASMODIUM SPP ET L'IDENTIFICATION SPECIFIQUE DE PLASMODIUM FALCIPARUM A PARTIR D'UN ECHANTILLON DE SANG TOTAL EXTRAIT.

Dispositif médical de diagnostic *in vitro* à usage professionnel.

REF 3150053L

1. DESTINATION

BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria est un test de diagnostic moléculaire *in vitro* pour la détection qualitative par amplification isotherme en temps réel de 5 espèces de *Plasmodium* - *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* et *Plasmodium knowlesi* (PAN) et l'identification spécifique de *Plasmodium falciparum* (FALCI). Le test est une aide au diagnostic de la malaria réalisée à partir d'un extrait d'ADN obtenu à partir d'un échantillon de sang total. Ce test non automatisé est destiné au diagnostic *in vitro* en laboratoire par des professionnels uniquement.

2. RÉSUMÉ CLINIQUE

Le paludisme (Malaria) est une maladie potentiellement mortelle qui se propage principalement par les piqûres de moustiques anophèles femelles infectés. Les transfusions sanguines et les aiguilles contaminées peuvent également transmettre le paludisme. La maladie est surtout endémique dans les pays tropicaux, mais elle peut être importée à l'occasion de voyages et de migrations. Le paludisme peut être évité en empêchant les piqûres de moustiques et en suivant un traitement médical adapté.

Les premiers symptômes les plus courants du paludisme sont la fièvre, les maux de tête et les frissons. Les symptômes apparaissent généralement dans les 10 à 15 jours suivant la piqûre d'un moustique infecté.

Les symptômes peuvent être légers chez certaines personnes, en particulier chez celles qui ont déjà été infectées par le paludisme. Comme certains symptômes du paludisme ne sont pas spécifiques, il est essentiel de se faire dépister rapidement.

Certains types de paludisme peuvent entraîner une forme grave et la mort. Les nourrissons, les enfants de moins de 5 ans, les femmes enceintes, les voyageurs et les personnes atteintes du SIDA ou immunodéprimées en général courent un risque plus élevé. Les symptômes graves sont les suivants : fatigue extrême, troubles de la conscience, convulsions multiples, difficultés respiratoires, urine foncée ou sanglante, jaunisse (jaunissement des yeux et de la peau), saignements anormaux, décès dans les cas extrêmes. Les personnes présentant des symptômes graves doivent recevoir des soins d'urgence immédiatement. Un traitement précoce pour un paludisme léger peut empêcher l'infection de s'aggraver.

Une infection par le paludisme pendant la grossesse peut également provoquer un accouchement prématuré ou une insuffisance pondérale à la naissance.

Le rapport épidémiologique annuel de l'ECDC pour 2021¹ fournit des données épidémiologiques européennes.

Sur les 4 482 cas confirmés pour lesquels l'agent pathogène a été signalé, 3 771 (84,1 %) avaient *P. falciparum*, 96 (2,1 %) *P. vivax*, 181 (4,0 %) *P. ovale*, 137 (3,1 %) *P. malariae*, un cas *P. knowlesi*, et 296 (6,6 %) cas avaient été infectés par des espèces de *Plasmodium* non spécifiées. La létalité était de 1,1 % parmi les 1 944 cas de paludisme dont l'issue était connue. Parmi les 4 257 cas dont le statut d'importation était connu, 99,7 % étaient liés à un voyage.

Presque tous les cas de paludisme signalés par les pays de l'UE/EEE en 2021 ont été importés. Les pays qui signalent le plus grand nombre de cas ont des liens historiques, économiques, linguistiques et culturels avec les zones d'endémie, en particulier en Afrique et dans les Amériques.

En Europe, la chimioprophylaxie antipaludique est uniquement recommandée pour les voyageurs se rendant dans des pays où le paludisme est endémique, qui sont classés en trois groupes de risque (risque très limité de transmission du paludisme, risque de paludisme non *P. falciparum* et risque de paludisme *P. falciparum*) afin de déterminer le traitement médicamenteux le plus efficace.

3. PRINCIPE DU TEST

Le kit BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria contient des réactifs permettant l'amplification isotherme en temps réel LAMP (Amplification médiée par les boucles – Loop-Mediated Isothermal Amplification) pour déterminer la parasitémie positive ou négative pour *Plasmodium spp* (PAN) ou *Plasmodium falciparum* spécifiquement (FALCI). La séquence d'ADN ciblée de la version PAN est une séquence conservée du gène *cox* des génomes de *Plasmodium spp*. La séquence d'ADN ciblée de la version FALCI est une séquence spécifique du gène *cox* du génome de *Plasmodium falciparum*. Le kit contient un puits avec un contrôle interne endogène (gène codant pour la RNase P) pour assurer le bon déroulement de l'extraction et de l'amplification et évaluer la qualité de l'échantillon.

La LAMP est une méthode d'amplification isotherme spécifique d'une séquence nucléique avec incorporation d'un colorant fluorescent d'acide nucléique pendant l'amplification. Elle amplifie une séquence cible avec trois à quatre séries d'amorces à une température constante de +65°C.

BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria permet de tester un échantillon au coup par coup.

Une analyse avec l'AMPLIFLASH Malaria de BIOSYNEX consiste à effectuer les étapes suivantes :

- Libération rapide de l'ADN du sang avec le kit de lyse sanguine BIOSYNEX ;

- Amplification isotherme (LAMP) avec le tampon de réaction et les amorces répartis dans les microtubes (tube d'essai), comme indiqué sur l'image ci-dessous.

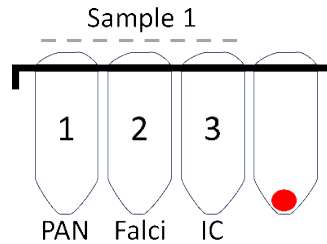


Figure 1 : 1= PAN ; 2= Falci ; 3= Contrôle interne ; 4= Vide (bille rouge)

Le test permet l'amplification de 2 séquences ciblées et d'un contrôle interne :

- PAN : cible conservée chez *Plasmodium spp* - position 1 sur la bande de microtubes (voir Figure 1) ;
- FALCI : cible spécifique de *Plasmodium falciparum* - position 2 sur la bande de microtubes (voir Figure 1) ;
- IC : gène codant pour la RNase P humaine utilisé comme contrôle interne pour les processus de lyse et d'amplification - position 3 sur la bande de microtubes (voir figure 1).

La languette (bande noire sur la figure) ainsi que le puits contenant la bille de couleur rouge servent de détrompeurs et permettent la bonne orientation de la barrette. En effet, pour une orientation correcte, il faut que la languette soit placée vers la gauche et le puits contenant la bille rouge vers la droite au moment du dépôt des échantillons et lors de l'insertion de la barrette dans le lecteur.

Le kit contient un tampon d'activation (ratio 10µL d'échantillon pour 30µL de tampon d'activation) contenant tous les sels permettant l'activation de la réaction à +65°C.

Ces amplifications sont réalisées en parallèle et le résultat de l'amplification est obtenu après une période allant de 3 à 25 minutes en fonction de la parasitémie de l'échantillon analysé.

Le test d'amplification isotherme est basé sur la détection, par le lecteur BIOSYNEX AMPLIFLASH, de la fluorescence générée lors de l'amplification de l'ADN cible. Le dispositif BIOSYNEX AMPLIFLASH Reader indique en temps réel pour chaque tube si l'amplification est positive (détection de la cible ADN) ou négative (pas de détection de l'ADN cible).

4. MATÉRIEL REQUIS

Matériel fourni :

- 2 sachets en plastique contenant chacun 12 barrettes de 4 puits (1 contenant 1 bille rouge et 3 contenant les master mixes)
 - 1 sachet en plastique contenant 24 bouchons de barrette
 - 24 tubes de tampon d'activation
 - 1 tube de contrôle positif (CONTROL+, bouchon rouge)
 - 1 tube de contrôle négatif (CONTROL-, bouchon vert)
- Note : 5 réactions contrôles sont réalisables avec les tubes fournis.

Matériel requis mais non fourni :

- Kit de prétraitement des échantillons BIOSYNEX Blood Lysis (Ref. 3150077)
- Gants à usage unique non poudrés
- Micropipette et embouts à filtre
- Vortex
- BIOSYNEX AMPLIFLASH Reader (Ref. 5150001)

5. PRECAUTIONS

- Suivez attentivement ce mode d'emploi. Le non-respect de l'une des instructions de cet IFU peut nuire à la performance du test et entraîner des conséquences néfastes.
- Respecter les Bonnes Pratiques de Laboratoire et porter des gants de laboratoire jetables non poudrés tout au long de la procédure de test.
- La gestion quotidienne de nombreux échantillons et la grande sensibilité de la technique LAMP par amplification isotherme peuvent, en l'absence de précautions, générer des résultats faussement positifs par contamination. Dans la mesure du possible, les opérations de pré-manipulation de la LAMP, de post-LAMP et d'extraction de l'ADN doivent donc être effectuées dans des pièces séparées. Porter des gants jetables dans chaque zone et les changer avant de passer d'une zone à l'autre.
- Le test et les bouchons sont à usage unique. Ne pas les réutiliser. Ne pas ouvrir les tubes à la fin du test.
- Ne pas utiliser le test si la languette est ouverte ou endommagée.
- Ne pas utiliser le kit en cas de bris ou de fuite. En cas de détérioration de l'emballage uniquement (pas de rupture ou de fuite), le kit reste utilisable.
- Gardez le kit à l'abri de la lumière.
- Centrifuger les tubes avant de les ouvrir et les ouvrir l'un après l'autre, en les fermant hermétiquement entre chaque tube pour éviter toute contamination.
- Le contrôle positif (CONTROL+) contient des quantités significatives de séquences d'ADN. Il peut donc potentiellement contaminer les autres composants du kit si les bonnes pratiques de biologie moléculaire ne sont pas respectées. Pour limiter ce

2/FR

risque de contamination, il est recommandé de stocker le contrôle positif séparément des autres composants du kit après la première utilisation.

- Des contrôles négatifs et positifs sont inclus dans le kit. Le contrôle négatif sert de témoin d'une éventuelle contamination. Le contrôle positif sert à vérifier la validité des réactifs et du lecteur. Chaque laboratoire doit définir son propre système de contrôle de la qualité.
- Jeter les pièces souillées ou les composants vides du kit dans une poubelle adaptée aux déchets biologiques. Tenir compte de la réglementation locale en matière d'élimination des déchets biologiques.
- Le dispositif contient du matériel d'origine bactérienne ou animale et doit être manipulé avec précaution.
- Si, en relation avec l'utilisation de BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria, un décès ou une détérioration grave de l'état de santé est survenu, il convient de le signaler au fabricant et à l'autorité compétente de votre pays. En cas de doute, signalez-le.
- Fiche de données de sécurité disponible sur demande. Un résumé de la sécurité et des performances sera disponible en ligne sur Eudamed.

6. RECOMMANDATIONS DE MANIPULATION

Compte tenu du risque important de contamination du matériel et de l'air ambiant associé à l'amplification isotherme, il est important de respecter scrupuleusement les recommandations et précautions indiquées dans la notice d'utilisation.

- Toujours s'assurer que les bouchons des tubes réactionnels sont bien fermés avant de lancer un protocole d'incubation dans le lecteur utilisé.
- A la fin du programme, lorsque les barrettes sont retirées du lecteur, placer les doigts au-dessus des bouchons pour éviter qu'ils ne s'ouvrent lors du retrait. Enlever immédiatement les gants ayant servis à retirer les barrettes usagées du lecteur en y enveloppant les microtubes avant de les jeter dans la poubelle adaptée.
- Réaliser un nettoyage du matériel et du poste de travail quotidiennement avec les détergents appropriés ainsi que l'entretien mensuel à l'isopropanol selon le protocole fourni par Biosynex (se référer au manuel d'utilisation du BIOSYNEX AMPLIFLASH Reader).

7. CONSERVATION DU KIT

Le kit est expédié congelé. Les composants du kit doivent arriver congelés. À réception, conserver le kit à une température inférieure ou égale à -20°C . Dans ces conditions, les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption. Ne pas utiliser le kit ni aucun de ses composants après la date de péremption. Protéger le kit et les réactifs de la lumière directe. Ne pas décongeler les composants du kit sauf lorsque cela est nécessaire et uniquement avant utilisation. Les tubes de contrôle peuvent être conservés entre $+2^{\circ}\text{C}$ et $+8^{\circ}\text{C}$ jusqu'à la date de péremption.

Remarque : les tubes de contrôle positif et négatif peuvent subir jusqu'à 5 cycles de congélation-décongélation.

8. PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS

Les ADN issus d'échantillons de sang total collectés dans des tubes de prélèvement EDTA ou héparine et extraits à l'aide du kit BIOSYNEX Blood Lysis peuvent être utilisés avec le kit BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria.

Les échantillons de sang total peuvent être extraits avec BIOSYNEX Blood Lysis immédiatement ou dans les 7 heures s'ils sont conservés à température ambiante ($+21^{\circ}\text{C}$ - $+30^{\circ}\text{C}$) ou conservés à $+4^{\circ}\text{C}$ pendant 5 jours.

Les cycles répétés de congélation/décongélation de l'échantillon doivent être évités (1 cycle maximum est autorisé).

Les échantillons traités avec le kit BIOSYNEX Blood Lysis (étape 1 de la procédure de test décrite à la section 9) peuvent être testés immédiatement ou dans les 7 jours s'ils sont stockés entre $+4^{\circ}\text{C}$ et $+30^{\circ}\text{C}$ ou stockés entre -20°C et -80°C pendant 3 mois.

Les échantillons mélangés au tampon d'activation (étape 2 de la procédure de test décrite au point 9) sont stables pendant 2 heures à température ambiante (entre $+21^{\circ}\text{C}$ et $+30^{\circ}\text{C}$). Après cette période, recommencer la procédure d'essai.

Le transport d'échantillons cliniques doit être conforme aux réglementations locales en matière de transport d'agents infectieux.

9. PROTOCOLE DU TEST

Pour un test, ou un contrôle, sortir une barrette, un tube de tampon d'activation et un bouchon. L'utilisation de l'instrument pour la réalisation d'un test est décrite dans l'annexe de cette notice d'utilisation au paragraphe 15.

1. Lyse de l'échantillon et libération de l'ADN

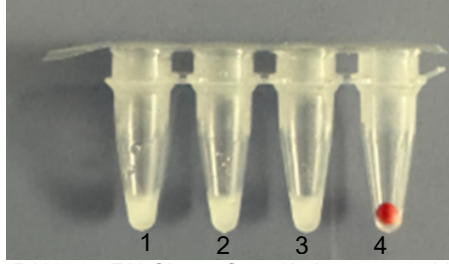
Pour la lyse rapide des échantillons avec le kit BIOSYNEX Blood lysis, veuillez-vous référer à la notice de ce kit, référence 3150077. Les contrôles positif et négatif sont prêts à être déposés et ne nécessitent donc pas d'étape d'extraction.

2. Préparation du mélange réactionnel

- a. Ouvrir le tube de tampon d'activation.
- b. A l'aide d'une micropipette munie d'une pointe à filtre, ajouter $10\mu\text{L}$ de lysat obtenu à l'étape précédente ou de contrôle dans les $30\mu\text{L}$ de tampon d'activation. Homogénéiser en pipettant de haut en bas ou en agitant le tube au vortex.

3. Ajout du mélange réactionnel à la barrette

- a. Sortir la barrette contenant les 4 microtubes de la barrette sans les séparer et les laisser décongeler.
- b. Orienter les puits de la bande en fonction de la position des dispositifs de codage (languette à gauche et puits contenant la bille rouge à droite) ; le puits #1 est le puits proximal.
- c. Retirer le film de scellage en aluminium et le jeter.



Microtubes de gauche à droite : 1= PAN ; 2= FALCI ; 3= Contrôle Interne ; 4= Vide=bille rouge (**ne rien y déposer**)

- d. Pipeter 10µL de mélange réactionnel à l'aide d'une micropipette et d'une pointe à filtre et distribuer les 10µL dans les trois premiers microtubes de la barrette.
- e. Homogénéiser en réalisant des aspirations/refoulement à la pipette.
- f. Fermer les puits à l'aide de la barrette de bouchons fournie.
- g. Tenir la barrette verticalement et la tapoter sur une surface plane pour éliminer les bulles d'air.
- h. Sans attendre, placer la barrette dans le lecteur AMPLIFLASH Reader, en gardant la bonne orientation. Le puits contenant la bille rouge permettant de conserver la bonne orientation de la barrette.

Note 1 : Les contrôles fournis permettent de réaliser 5 réactions.

10. ANALYSE DE DONNÉES ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

A. Critères de validation des études

Un contrôle positif et un contrôle négatif sont fournis dans le kit. Chaque laboratoire doit définir la fréquence des contrôles qualité qu'il applique. Les résultats attendus avec chaque contrôle sont définis dans le tableau suivant :

Contrôle	Cible		
	PAN	FALCI	RNaseP
Contrôle positif	+	+	+
Contrôle négatif	-	-	-

B. Interprétation qualitative (positive ou négative)

L'interprétation des échantillons sanguins est donnée dans le tableau suivant :

+ pour résultat positif - pour résultat négatif

Cible			Interprétation
PAN	FALCI	RNaseP	
+	+	+	Patient présentant un ADN spécifique de <i>Plasmodium falciparum</i> et pouvant également présenter un statut de co-infection
+	+	-	
+	-	+	Patient présentant un ADN de <i>Plasmodium spp</i> autre que l'ADN de <i>P. falciparum</i>
+	-	-	
-	-	+	Patient sans ADN spécifique de l'une des 5 espèces de <i>Plasmodium spp</i> détectables
-	-	-	Résultat non valide : mauvaise qualité de l'échantillon, inhibition de la réaction PCR ou problèmes au cours de l'exécution ou du processus de test - effectuer un nouveau test ou un nouvel échantillonnage

Note : Lors de l'utilisation du lecteur AMPLIFLASH Reader, les puits en positions 1, 2 et 3 peuvent apparaître en orange dans le logiciel Gene Series Ampliflash ou avec le pictogramme "!" sur le lecteur. Dans ce cas, le test n'est pas valide. Répéter le test avec un nouvel échantillon. Les positions 5 à 8 du lecteur n'accueillent pas de tubes, un résultat non valide correspond donc à un fonctionnement normal.

11. PERFORMANCES

• Sensibilité analytique

La sensibilité analytique de la réaction d'amplification isotherme du kit a été déterminée à partir de l'ADN quantifié du 1^{er} standard international de l'OMS pour *Plasmodium falciparum* et de l'ADN génomique quantifié de *Plasmodium falciparum* provenant de l'ATCC (American Type Culture Collection). La limite de détection (LoD) du kit BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria est définie comme la concentration, en nombre de copies/µL, qui peut être détectée à 95% au moins, sur un échantillon d'ADN spécifique de *Plasmodium spp*.

Chaque dilution a été testée 24 fois. Les résultats déterminés statistiquement sont présentés dans le tableau suivant :

Cible	LoD ₉₅	
	<i>P. falciparum</i> Standard OMS	<i>P. falciparum</i> ADNg ATCC
FALCI	3.09 UI/réaction (0.127 UI/μL)	2.75 copies/réaction (1.1 copies/μL)
PAN	3.19 UI/réaction (0.123 UI/μL)	2.3 copies/réaction (0.92 copy/μL)

- **Spécificité analytique**

Le design des oligonucléotides a été validé *in silico* par alignement BLAST. La comparaison des séquences obtenues montre une détection spécifique de la BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria sur sa cible *Plasmodium spp.*

Aucune amorce ne détecte d'ADN autre que le *Plasmodium spp* ciblé.

Réactivité croisée

Un panel de 99 échantillons d'ADN et 42 échantillons d'ARN provenant d'une biobanque répertoriée a été testé avec le kit BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria. Pour tous ces échantillons, aucune amplification des cibles (PAN ou FALCI) n'a été observée, exceptée pour l'ADN génomique de *P. falciparum*. Les deux tableaux ci-dessous lisent les espèces avec lesquelles aucune amplification n'a été observée.

ADN	
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
Adénovirus 41	Herpès simplex 1
Adénovirus	Herpès simplex 2
<i>Aspergillus fumigatus</i>	HHV-6
<i>Bacillus cereus</i>	HHV-8
<i>Bartonella henselae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae (ndm-1)</i>
<i>Bartonella quintana</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
Virus BK	<i>Leishmania chagasi</i>
<i>Bordetella holmesii</i>	<i>Leishmania infantum</i>
<i>Borrelia afzelii</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Borrelia burgdorferi</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>
<i>Borrelia garinii</i>	<i>Mycobacterium avium</i>
<i>Brucella abortus</i>	<i>Mycobacterium intracellulare</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Mycobacterium kansasii</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>Candida auris</i>	<i>Mycobacterium ulcerans</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i>
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>
<i>Chlamydia psittaci</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Neisseria meningitidis sg a</i>
<i>Coccidioides immitis</i>	<i>Neisseria meningitidis sg b</i>
<i>Coxiella burnetii</i>	Papillomavirus type 16
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Papillomavirus type 18
Cytomegalovirus	<i>Parvovirus b19 (plasmide)</i>
<i>Enterococcus faecalis (vanb)</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
<i>Enterococcus faecium (vana)</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
Epstein-barr virus	<i>Aeromonas caviae</i>
<i>Escherichia coli (eaec)</i>	<i>Aeromonas dhakensis</i>
<i>Escherichia coli (eiec)</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>
<i>Escherichia coli (epec)</i>	<i>Aeromonas veronii</i>
<i>Escherichia coli (etec)</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>
<i>Escherichia coli (vtec)</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Rickettsia conorii</i>	<i>Shigella boydii</i>
<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Salmonella typhi</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Shigella flexneri</i>	<i>Campylobacter upsaliensis</i>
<i>Staphylococcus aureus (mecA+)</i>	<i>Plesiomonas shigelloides</i>
<i>Staphylococcus aureus (mecA-)</i>	<i>Campylobacter coli</i>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli o111/nm</i>
<i>Toxoplasma gondii</i>	<i>Campylobacter fetus</i>
<i>Treponema pallidum</i>	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>
<i>Trichomonas vaginalis</i>	Amplirun adénovirus 41
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Adénovirus type 40 (species f) (strain: dugan)
<i>Ureaplasma parvum</i>	Adénovirus type 04 (species e)
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	Adénovirus type 20 (species d)
<i>Varicella-zoster virus</i>	Adénovirus type 11 (species b)
<i>Francisella tularensis</i>	Adénovirus type 02 (species c)
<i>Gardnerella vaginalis</i>	Adénovirus type 31 (species a)
<i>Haemophilus ducreyi</i>	-
<i>Haemophilus influenzae</i>	-

ARN		
Coronavirus oc43	Rotavirus	Parainfluenza 2
Coronavirus 229-e	Rubella	Parainfluenza 3
Coronavirus sars (2003)	Sars-cov-2	Parainfluenza 4 a
Coronavirus nl63	Tick-borne encephalitis virus	Respiratory syncytial virus (subtype a)
Coxsackie a6	Human parainfluenza 1	Respiratory syncytial virus (subtype b)
Coxsackie b1	Influenza a h1	West Nile virus
Coxsackie b5	Influenza a h3	Yellow fever virus
Dengue 1 virus	Influenza a h5	Zika virus (asian lineage)
Dengue 2 virus	Influenza b	Zika virus
Dengue 3 virus	Measles	Chikungunya virus
Dengue 4 virus	Mers coronavirus	Norovirus g1
Echovirus 5	Mumps	Norovirus g2
Enterovirus 68	Novel influenza a h1n1	Sapovirus
Rhinovirus	Parainfluenza 1	Astrovirus

• **Etudes d'interférences**

La présence d'inhibiteurs d'amplification dans l'échantillon, tel que l'héparine, pourrait induire une interférence négative sur les résultats du test. Les échantillons de sang total, qui sont généralement prélevés dans des tubes EDTA classiques (échantillons de sang EDTA utilisés pour développer et valider le prototype de BIOSYNEX Blood Lysis), peuvent, dans certains cas, être prélevés dans des tubes héparine. Les tests d'interférence de l'héparine sur le kit BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria ont été réalisés à l'aide d'échantillons sanguins négatifs spikés ou non avec des échantillons sanguins positifs de *P. falciparum* provenant du standard de l'OMS. Aucune interférence n'a été démontrée.

Des tests d'interférences sur sangs totaux aux paramètres hématologiques ou biochimiques anormaux sur le kit BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria ont été réalisés à l'aide d'échantillons sanguins négatifs spikés ou non avec un ADN génomique quantifié de *P. falciparum* provenant de l'ATCC.

Aucune interférence n'a été démontrée pour les paramètres hématologiques et biochimiques suivants :

- Bilirubine ≤ 158,6 mg/L
- Triglycérides ≤ 8,29 g/L
- Leucocytes ≤ 13 880 cellules/m³
- Erythrocytes ≤ 6 300 000 cellules/m³

A ce jour, nos études cliniques sur des échantillons de sang n'ont pas montré d'interférence sur les résultats.

• **Précision**

Répétabilité et reproductibilité

Les données de répétabilité du kit BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria ont été déterminées sur des tests répétés utilisant des échantillons de sang positifs et négatifs, chacun ayant été analysé 30 fois. Aucun échantillon sanguin positif de *P. knowlesi* n'étant disponible pour notre étude, les résultats pour cette espèce ont été obtenus par dilution d'ADN génomique purifié provenant de BEI Resources. Une concordance de 100 % a été démontrée pour chaque hypothèse.

Resultats (min:sec)					
Echantillon		PAN		FALCI	
		Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type
Négatif	-	N/A	-	N/A	-
<i>Plasmodium falciparum</i>	+++	03:18	00:10	04:08	00:17
	++	04:49	00:13	06:17	01:18
	+	06:11	00:27	07:33	00:36
<i>Plasmodium malariae</i>	++	07:31	00:20	N/A	-
	+	10:19	00:53	N/A	-
<i>Plasmodium ovale</i>	+++	04:50	00:09	N/A	-
	++	05:24	00:30	N/A	-
	+	07:59	00:37	N/A	-

<i>Plasmodium vivax</i>	++	06:01	00:12	N/A	-
	+	07:56	00:24	N/A	-
<i>Plasmodium knowlesi</i>	+++	05:32	00:17	N/A	-
	++	06:47	00:40	N/A	-
	+	06:53	00:55	N/A	-

Les données de reproductibilité inter-journalière, inter-lots, inter-laboratoires et inter-opérateurs pour le kit BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria ont été déterminées sur des tests répétés à partir d'échantillons de sang ou d'ADN génomique positifs et négatifs. Une concordance de 100 % a été démontrée pour chaque hypothèse.

Variabilité inter-jours, inter-opérateurs, inter-lots et inter-laboratoires :

Des contrôles positifs et négatifs ont été testés. Deux dilutions d'ADN génomique de l'ATCC ont été testées : 1 moyenne (++) à 100 copies/ μ L et 1 faible (+) à 2 copies/ μ L et deux dilutions de la norme OMS : 1 élevée (+++) à 25 000 UI/réaction et 1 faible (+) à 10 UI/réaction. L'échantillon négatif a également été testé.

Variabilité inter-jours

Chaque échantillon est testé sur le même lot en duplicata chaque jour par le même technicien, pendant 5 jours.

Variabilité inter-opérateurs

Chaque échantillon est testé sur le même lot en duplicata par deux techniciens.

Variabilité inter-lots

Chaque échantillon est testé en duplicata sur trois lots.

Variabilité inter-laboratoires

Chaque échantillon est testé en duplicata dans le premier lieu et en double dans le deuxième lieu.

PAN	CTRL+		CTRL-		ATCC ADNg ++		ATCC ADNg +		Standard OMS +++		Standard OMS +		Echantillon négatif	
	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type
Variabilité inter-jours	03:59	00:20	N/A	-	03:56	00:04	05:32	00:20	04:00	00:32	06:46	02:15	N/A	-
Variabilité inter-opérateurs	03:42	00:10	N/A	-	04:02	00:10	07:25	01:24	04:05	00:42	06:22	00:17	N/A	-
Variabilité inter-lots	04:15	00:18	N/A	-	04:11	00:24	06:38	01:22	03:21	00:12	06:01	00:02	N/A	-
Variabilité inter-laboratoires	03:55	00:07	N/A	-	04:17	00:24	05:12	00:10	03:35	00:07	05:52	00:24	N/A	-

FALCI	CTRL+		CTRL-		ATCC ADNg ++		ATCC ADNg +		Standard OMS +++		Standard OMS +		Echantillon négatif	
	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type
Variabilité inter-jours	04:35	00:12	N/A	-	04:48	00:05	06:47	00:49	04:34	00:13	08:16	01:17	N/A	-
Variabilité inter-opérateurs	04:30	00:21	N/A	-	04:50	00:00	07:30	01:17	04:42	00:17	07:27	00:17	N/A	-
Variabilité inter-lots	04:50	00:32	N/A	-	04:51	00:58	06:56	00:59	03:46	00:40	07:08	00:59	N/A	-
Variabilité inter-laboratoires	04:47	00:17	N/A	-	05:05	00:21	07:15	01:03	04:27	00:31	06:57	00:17	N/A	-

RNaseP – Contrôle interne	CTRL+		CTRL-		ATCC ADNg ++		ATCC ADNg +		OMS Standard +++		OMS Standard +		Echantillon négatif	
	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type
Variabilité inter-jours	05:35	00:31	N/A	-	N/A	-	N/A	-	07:48	01:12	07:47	01:48	07:04	01:32
Variabilité inter-opérateurs	05:37	00:10	N/A	-	N/A	-	N/A	-	06:20	00:07	06:17	00:03	06:15	00:07
Variabilité inter-lots	05:36	00:22	N/A	-	N/A	-	N/A	-	06:48	00:45	07:13	00:51	06:43	00:23
Variabilité inter-laboratoires	06:05	00:00	N/A	-	N/A	-	N/A	-	07:22	00:45	06:45	00:07	06:32	00:17

• Performances cliniques

La performance clinique du kit BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria a été évaluée sur des échantillons cliniques provenant de différentes études :

- Etude sur des échantillons négatifs de banque de sang (Etude 1)
- Etude sur des échantillons positifs et négatifs d'un centre hospitalier (Etude 2)
- Etude sur des échantillons positifs et négatifs d'un centre hospitalier situé en Afrique (Etude 3)

Total des échantillons de toutes les études pour les échantillons traités avec le kit BIOSYNEX Blood Lysis :

	Nombre d'échantillons	Qualification Malaria	
		Echantillons négatifs	Echantillons positifs (Puits PAN)
Etude 1	30	30	0
Etude 2	47	10	37
Etude 3	56	20	36
Total	133	60	73

Échantillons avec distinction entre *P. falciparum* et d'autres espèces de *Plasmodium* :

	Nombre d'échantillons	Qualification Malaria			
		Échantillons négatifs	<i>P. falciparum</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. ovale</i>
Etude 1	30	30	0	0	0
Etude 2	47	10	33	2	2
Etude 3	55	20	35*	0	0
Total	132	60	68	2	2

*Un échantillon a été qualifié positif pour *Plasmodium spp* et négatif pour *Plasmodium falciparum* et n'est donc pas inclus dans ce tableau (qualification vis-à-vis de l'espèce de *Plasmodium* inconnue).

Les données de toutes les études sont ensuite fusionnées.

Les résultats obtenus avec les 133 échantillons de sang de toutes les études sont présentés ci-dessous.

Le tableau de contingence ci-dessous montrent la performance globale sur les échantillons de sang total.

BIOSYNEX AMPLIQUICK Malaria	Qualification des échantillons	
	Positifs	Négatifs
	Positifs	73
Négatifs	0	60

Sensibilité : 100% (95%IC: 95.07-100%)

Spécificité : 100% (95%IC : 94.04-100%)

Précision : 100% (95%IC: 97.26-100%)

(IC: Intervalle de Confiance)

12. LIMITES

1. Le non-respect d'une instruction de cette notice d'utilisation peut avoir un effet négatif sur la performance de l'essai et/ou invalider le résultat de l'essai.
2. La possibilité d'obtenir des résultats faux positifs ou faux négatifs ne peut être exclue (par exemple, en cas de contamination accidentelle, en cas de mauvaise qualité de l'échantillon ou si la procédure de test n'est pas correctement suivie). Comme pour tous les tests diagnostiques, les résultats doivent être considérés avec les autres informations cliniques dont dispose le médecin.

13. LITERATURE

1 : ECDC Surveillance Report: Malaria, Annual Epidemiology Report for 2021. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/malaria-annual-epidemiological-report-2021>

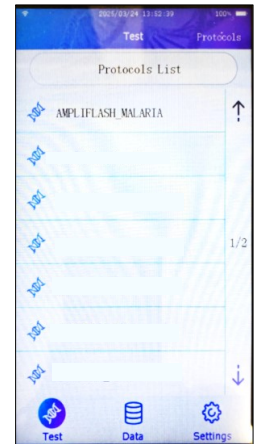
14. HISTORIQUE DES MODIFICATIONS

Version du document	Paragraphe modifié	Détail des changements
V1	Tout	Création du document.

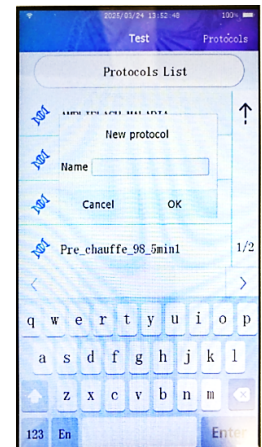
15. ANNEXE AU §9 PROTOCOLE DU TEST

Procédure alternative sans utilisation de l'ordinateur.

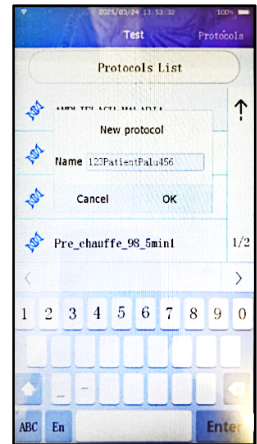
1. Débrancher la connexion USB entre l'instrument AMPLIFLASH Reader et l'ordinateur puis démarrer l'instrument grâce au bouton ON/OFF sur le côté gauche. L'écran s'ouvre sur la liste des protocoles enregistrés sur l'instrument.



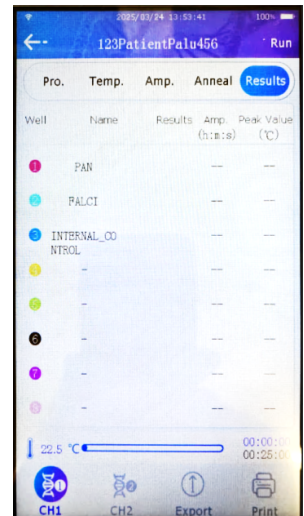
2. Sélectionner sur l'écran tactile le protocole « AMPLIFLASH Malaria ». La fenêtre « New protocol » s'ouvre.



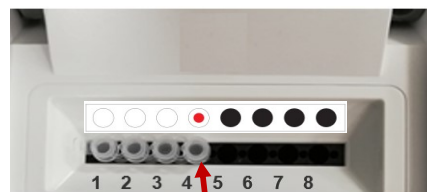
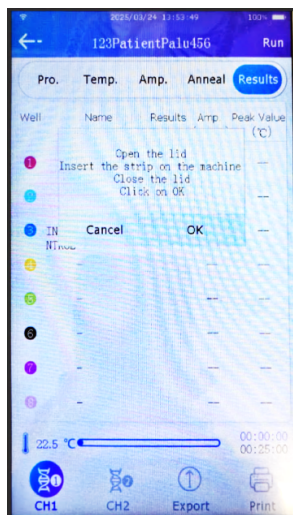
- Entrer manuellement sur la ligne « Name » l'identifiant patient et appuyer sur « OK ».



- La liste des cibles détectées par le test s'affiche. Sélectionner « Run » en haut à droite de l'écran.



- Une liste d'instructions apparaît à l'écran correspondant à « Ouvrir le capot », « Insérer la barrette dans la machine », « Fermer le capot », et « Cliquer sur OK ». Insérer la barrette de test en respectant la bonne orientation, refermer le capot et sélectionner « OK ».



Bille rouge

6. Les résultats peuvent être observés en temps réel dans les onglets « Amp. » et « Results » permettant de voir en temps réel respectivement l'apparition des courbes d'amplification et la détection ou non des cibles dans les puits ainsi que le temps de détection du signal positif.
7. A la fin du run, les résultats peuvent être récupérés au format .csv à l'aide d'une clé USB insérée dans le port situé à gauche de l'instrument et en sélectionnant « Export » en bas à droite de l'écran. Il est également possible de récupérer les anciens tests, y compris ceux réalisés via le logiciel de pilotage en allant dans l'onglet « Data » en bas de l'écran d'accueil ; l'intégralité des tests faits sur l'instruments y sont enregistrés et peuvent également être récupérés sur une clé USB selon la même procédure. Notez que l'export à partir de l'écran des résultats du test, un par un, permet leur récupération sous forme de tableur alors que l'export groupé de plusieurs résultats à partir de la mémoire interne se fera au format « texte ».

BIOSYNEX AMPLIFLASH MALARIA

REAL-TIME ISOTHERMAL PCR FOR THE QUALITATIVE DETECTION OF PLASMODIUM SPP AND SPECIFIC IDENTIFICATION OF PLASMODIUM FALCIPARUM FROM EXTRACTED WHOLE BLOOD SAMPLE.

In vitro diagnostic medical device for professional use.

REF 3150053L

1. INTENDED PURPOSE

BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria is a molecular *in vitro* diagnostic test for the qualitative detection by real-time isothermal PCR of 5 *Plasmodium* species - *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* and *Plasmodium knowlesi* (PAN) and the specific identification of *Plasmodium falciparum* (FALCI). The test is an aid for the diagnosis of Malaria performed using a DNA extract obtained from whole blood sample. This non-automated test is intended for *in vitro* diagnostic use in laboratory by professionals only.

2. CLINICAL SUMMARY

Malaria is a life-threatening disease mostly spreads to people through the bites of some infected female *Anopheles* mosquitoes. Blood transfusion and contaminated needles may also transmit malaria. It is mostly endemic in tropical countries but can be imported through travel and migrations. Malaria can be prevented by avoiding mosquito bites and with adapted medical treatment.

The most common early symptoms of malaria are fever, headache and chills. Symptoms usually start within 10–15 days of getting bitten by an infected mosquito.

Symptoms may be mild for some people, especially for those who have had a malaria infection before. Because some malaria symptoms are not specific, getting tested early is crucial.

Some types of malaria can cause severe illness and death. Infants, children under 5 years, pregnant women, travelers and people with AIDS or immunosuppressed in general are at higher risk. Severe symptoms include: extreme tiredness and fatigue, impaired consciousness, multiple convulsions, difficult breathing, dark or bloody urine, jaundice (yellowing of the eyes and skin), abnormal bleeding, death in extreme cases.

People with severe symptoms should get emergency care right away. Getting treatment early for mild malaria can stop the infection from becoming severe.

Malaria infection during pregnancy can also cause premature delivery or delivery of a baby with low birth weight.

The ECDC Annual Epidemiology Report for 2021¹ gives European Epidemiology data in the European Union.

Of 4 482 confirmed cases for which the pathogen was reported, 3 771 (84.1%) had *P. falciparum*, 96 (2.1%) had *P. vivax*, 181 (4.0%) had *P. ovale*, 137 (3.1%) had *P. malariae*, one had *P. knowlesi*, and 296 (6.6%) cases had infections with unspecified *Plasmodium* species. The case fatality was 1.1% among all 1 944 malaria cases with a known outcome. Among 4 257 cases with known importation status, 99.7% were travel related.

Nearly all malaria cases reported by EU/EEA countries for 2021 were imported. The countries reporting the highest numbers of cases have historical, economic, linguistic, and cultural links with endemic areas, particularly in Africa and the Americas. Most of the imported malaria cases in France and Spain are linked to travel routes from West Africa. Seasonality and age distribution of cases in Europe most likely reflect travel patterns to malaria-endemic countries. The literature suggests that a substantial proportion of imported malaria cases in the EU/EEA occur among recent immigrants from malaria-endemic countries and more settled migrants who have travelled to visit friends and relatives in malaria-endemic countries.

In Europe, malaria chemoprophylaxis is only recommended for travelers to malaria-endemic countries, which are classified into three risk groups (very limited risk of malaria transmission, risk of non-*P. falciparum* malaria and risk of *P. falciparum* malaria) to determine the most effective drug regimen (see WHO's requirements and recommendations¹ for international travelers, including a list of affected countries, as of 2022).

3. TEST PRINCIPLE

BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria kit contains reagents allowing the real-time isothermal LAMP (Loop-Mediated Amplification) amplification to determine positive or negative parasitemia for *Plasmodium spp* (PAN) or *Plasmodium falciparum* specifically (FALCI). The targeted DNA sequence of the PAN version is a conserved sequence of *cox* gene from *Plasmodium spp* genomes. The targeted DNA sequence of the FALCI version is a specific sequence of *cox* gene from *Plasmodium falciparum* genome. The kit contains a well with an endogenous Internal Control (RNAse P encoding gene) to ensure the correct running of the extraction and amplification and assess the quality of sample.

LAMP is a method of specific isothermal amplification of a nucleic sequence with incorporation of fluorescent nucleic acid stain during amplification. It amplifies a target sequence with three to four sets of primers at a constant temperature of +65°C.

BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria allows the test of one sample at a time.

An analysis with the BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria consists of carrying out the following steps:

- Quick DNA extraction from blood with BIOSYNEX Blood Lysis kit;
- Isothermal amplification (LAMP) with the reaction buffer and the primers distributed in the microtubes (assay tube), as shown on below picture.

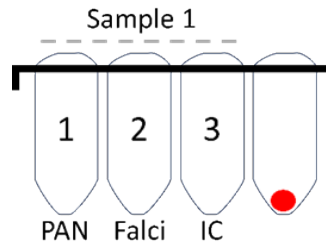


Figure 1: 1= PAN; 2= Falci; 3= Internal Control; 4= Empty (red bead)

The test allows the amplification of 2 targeted sequences and one internal control:

- PAN: target conserved in *Plasmodium spp* – position 1 on the strip of microtubes (see Figure 1);
- FALCI: target specific of *Plasmodium falciparum* – position 2 on the strip of microtubes (see Figure 1);
- IC: human RNase P encoded gene used as internal control for the lysis and amplification processes – position 3 on the strip of microtubes (see Figure 1).

The tongue (the black strip in the figure) and the well containing the red bead act as polarizers, ensuring the correct orientation of the strip. For correct orientation, the tongue must be positioned to the left and the well containing the red bead to the right when the samples are deposited and when the strip is inserted into the reader.

The kit contains an activation buffer (ratio 10µL sample for 30µL activation buffer) containing all the salts allowing the activation of the reaction at +65°C.

These amplifications are performed in parallel, and the amplification result is obtained after a period of between 3 and 25 minutes depending on the parasitemia of the sample being analyzed.

The isothermal amplification test is based on the detection, by the BIOSYNEX AMPLIFLASH Reader, of fluorescence generated during amplification of the target DNA. The BIOSYNEX AMPLIFLASH Reader device indicates in real time for each tube whether the amplification is positive (detection of the DNA target) or negative (no detection of the DNA target).

4. REQUIRED MATERIAL

Material provided:

- 2 plastic bags each containing 12 strips of 4 wells (1 well containing 1 red bead and 3 containing the master mixes)
- 1 plastic bag containing 24 strips of 4 caps
- 24 activation buffer tubes
- 1 tube of positive control (CONTROL+, red cap)
- 1 tube of negative control (CONTROL-, green cap)

Note: 5 control reactions are possible with the tubes provided.

Material required but not provided:

- Sample pre-treatment kit BIOSYNEX Blood Lysis (Ref. 3150077)
- Powder-free single-use gloves
- Micropipette & filter-tips
- Bench top vortex
- BIOSYNEX AMPLIFLASH Reader (Ref. 5150001)

5. PRECAUTIONS

- Carefully follow these instructions for use. Failure to follow any instruction of this IFU may adversely affect the test performance and have harmful consequences.
- Follow Good Laboratory Practice and wear powder-free laboratory disposable gloves throughout the test procedure.
- The daily management of many samples and the high sensitivity of the LAMP technique can, in the absence of precaution, generate false positive results by contamination. If possible, pre-handling LAMP, post-LAMP and DNA extraction should therefore be performed in separate rooms. Wear disposable gloves in each zone and change them before moving from one zone to another.
- The test and caps are for single use only. Do not reuse. Do not open the tubes at the end of the test.
- Do not use the test if the tongue is opened or damaged.
- Do not use the kit in case of breakage or leakage. In the event of damage to the packaging only (no breakage or leakage), the kit remains usable.
- Protect the kit from light.

- Centrifuge the tubes before opening, opening them one after the other by closing them well between each one to avoid any contamination.
- The CTRL+ contains significant amounts of DNA sequences. It can therefore potentially contaminate the other components of the kit if good molecular biology practices are not followed. To limit this risk of contamination, it is recommended to store this component outside the kit at the first opening of the kit.
- Negative and positive controls are included in the kit. The negative test serves as a sign of possible contamination. The positive control is used to verify the validity of the reagents and the reader. Each laboratory shall define its own quality control system.
- Dispose of soiled parts or empty kit components in a trash bin suitable for biological waste. Consider your local regulation on biological waste disposal.
- The device contains material of bacterial or animal origin and should be handled with caution.
- If, in relation to the use of BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria, a death or a serious deterioration of health has occurred, this should be reported to the manufacturer and the competent authority of your country. If in doubt, report it.
- Safety data sheet available on request. Summary of safety and performance will be available online on Eudamed.

6. RECOMMENDATIONS FOR USE

In view of the significant risk of contamination of the equipment and ambient air associated with isothermal amplification, it is important to carefully observe the recommendations and precautions indicated in the instructions for use.

- Always make sure that the caps of the reaction tubes are tightly closed before starting a heating protocol in the incubator used.
- At the end of the program, when the strips are removed from the reader, place your fingers over the caps to prevent them from opening during removal. Immediately take off gloves used to remove the used strips from the reader by wrapping the microtubes in them before disposing of it in the appropriate waste bin.
- Clean the equipment and the workstation daily with the appropriate detergents and clean monthly with isopropanol according to the protocol provided by Biosynex (refer to the user manual for the BIOSYNEX AMPLIFLASH Reader or the instrument used).

7. KIT STORAGE

The kit is shipped frozen. Kit components must arrive frozen. Upon receipt, keep the kit at a temperature below or equal to -20°C. Under these conditions, the reagents are stable until the expiration date. Do not use the kit and any of its components after the expiry date. Protect the kit and the reagents from direct light. Do not thaw the kit components except when needed and only before usage. Control tubes can be stored at +2/8°C until the expiration date.

Note: the positive and negative control tubes can undergo 5 freeze – thaw cycles.

8. SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

DNA of whole blood samples collected in EDTA or heparin collection tubes extracted with BIOSYNEX Blood Lysis kit should be used with the BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria kit.

Whole blood samples can either be extracted with BIOSYNEX Blood Lysis immediately or within 7 hours if stored at room temperature (+21°C - +30°C) or stored at +4°C for 5 days.

Repeated freeze/thaw cycles of the sample should be avoided (maximum of 1 cycle is allowed).

Samples treated with the BIOSYNEX Blood Lysis kit (step 1 of the test procedure described in section 9) can either be tested immediately or within 7 days if stored between +4°C and +30°C or stored between -20°C and -80°C for 3 months.

Samples mixed with the activation buffer (step 2 of the test procedure described in section 9) are stable for 2 hours at room temperature (+21°C - +30°C). After this time, restart the test procedure.

Transportation of clinical specimens must comply with local regulations for the transport of infectious agents.

9. TEST PROCEDURE

For a test or control, take a tube of activation buffer, a test strip and caps. Use of the instrument to perform a test is described in appendix in paragraph 15 of these instructions for use.

1. Sample lysis and DNA release

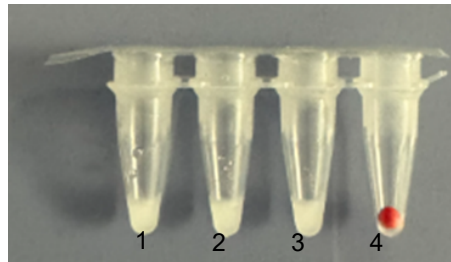
For rapid lysis of samples with the BIOSYNEX Blood Lysis kit, please refer to the package insert for this kit, reference 3150077. Positive and negative controls are ready to use and do not need any previous extraction step.

2. Preparation of the reaction mixture

- a. Open the tube of activation buffer.
- b. Using a micropipette fitted with a filter tip, place 10µL of lysate obtained in the previous step in the 30µL of activation buffer. Homogenize by pipetting up and down or by vortexing the tube.

3. Addition of the reaction mixture to the strip

- a. Take the 4 microtubes of the strip without separating them and let them thaw.
- b. Orient the wells of the strip according to the position of the polarizers (tongue to the left and well containing the red bead to the right); well #1 is the proximal well.
- c. Remove the aluminum foil and discard it.



Microtubes from the left to the right: 1= PAN; 2= FALCI; 3= Internal control; 4= red bead (Do not add anything to the well)

- d. Pipet 10µL of reaction mixture with a micropipette and filtered tip and dispense the 10µL into each microtube of the strip.
 - e. Homogenize by pipetting.
 - f. Close the wells with the provided caps.
 - g. Hold the strip vertically and tap it on a flat surface to remove any air bubbles.
 - h. Without delay, place the strip in the AMPLIFLASH Reader in the correct direction.
- The well containing the red bead allows to maintain the correct orientation of the strip.

Note 1: The controls provided allow 5 reactions to be performed.

10. DATA ANALYSIS AND INTERPRETATION OF RESULTS

A. Study validation criteria

A positive control and a negative control are supplied in the kit. Each laboratory must define the frequency of the quality controls it applies. The results expected with each control are defined in the following table:

Control	Target		
	PAN	FALCI	RNaseP
Positive control	+	+	+
Negative control	-	-	-

B. Qualitative interpretation (positive or negative)

The interpretation of blood samples is given in the following table:

Target			Interpretation
PAN	FALCI	RNaseP	
+	+	+	Patient with <i>Plasmodium falciparum</i> specific DNA and may also have co-infection status
+	+	-	
+	-	+	Patient with <i>Plasmodium spp</i> DNA other than <i>P. falciparum</i> DNA
+	-	-	
-	-	+	Patient without specific DNA of any of the 5 detectable <i>Plasmodium spp</i> species
-	-	-	Invalid result: poor sample quality, inhibition of PCR reaction, or problems during run or test process - perform a new test or re-sampling

+ Positive results - Negative results

Note: When using the AMPLIFLASH Reader, wells in positions 1, 2 and 3 can appear orange in the Gene Series Ampliflash software or with the "!" pictogram on the reader. In this case, the test is invalid. Repeat the test with a new sample. Positions 5 to 8 of the reader do not accommodate tubes, so an invalid result corresponds to normal functioning.

11. PERFORMANCES

Analytical sensitivity

The analytical sensitivity of the kit's isothermal amplification reaction was determined from quantified DNA from the 1st WHO International Standard for *Plasmodium falciparum* and quantified genomic DNA of *Plasmodium falciparum* form ATCC (American Type Culture Collection). The limit of detection (LoD) of the BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria kit is defined as the concentration, in copy number/µL, that can be detected at 95% at least, on a specific *Plasmodium spp* DNA sample.

Each dilution was tested 24 times. The statistically determined results are presented in the following table:

Target	LoD ₉₅	
	<i>P. falciparum</i> WHO Standard	<i>P. falciparum</i> ATCC gDNA
FALCI	3.09 IU/reaction (0.127 IU/µL)	2.75 copies/reaction (1.1 copies/µL)
PAN	3.19 IU/reaction (0.123 IU/µL)	2.3 copies/reaction (0.92 copy/µL)

Analytical specificity

The design of oligonucleotides was validated *in silico* by BLAST alignment. The comparison of the sequences obtained shows a specific detection of the BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria on its *Plasmodium spp* target.

No primers detect DNA other than the targeted *Plasmodium* spp.

Cross-reactivity

A panel of 99 DNA samples and 42 RNA samples from a biobank listed in the following tables were tested with the BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria kit. For all these samples, no amplification of the targets (PAN or FALCI) was observed.

DNA	
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
Adenovirus 41	Herpès simplex 1
Adenovirus	Herpès simplex 2
<i>Aspergillus fumigatus</i>	HHV-6
<i>Bacillus cereus</i>	HHV-8
<i>Bartonella henselae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae (ndm-1)</i>
<i>Bartonella quintana</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
Virus BK	<i>Leishmania chagasi</i>
<i>Bordetella holmesii</i>	<i>Leishmania infantum</i>
<i>Borrelia afzelii</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Borrelia burgdorferi</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>
<i>Borrelia garinii</i>	<i>Mycobacterium avium</i>
<i>Brucella abortus</i>	<i>Mycobacterium intracellulare</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Mycobacterium kansasii</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>Candida auris</i>	<i>Mycobacterium ulcerans</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i>
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>
<i>Chlamydophila psittaci</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Neisseria meningitidis sg a</i>
<i>Coccidioides immitis</i>	<i>Neisseria meningitidis sg b</i>
<i>Coxiella burnetii</i>	Papillomavirus type 16
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Papillomavirus type 18
Cytomegalovirus	Parvovirus b19 (plasmide)
<i>Enterococcus faecalis (vanb)</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
<i>Enterococcus faecium (vana)</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
Epstein-barr virus	<i>Aeromonas caviae</i>
<i>Escherichia coli (eaec)</i>	<i>Aeromonas dhakensis</i>
<i>Escherichia coli (eiec)</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>
<i>Escherichia coli (epec)</i>	<i>Aeromonas veronii</i>
<i>Escherichia coli (etec)</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>
<i>Escherichia coli (vtcc)</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Rickettsia conorii</i>	<i>Shigella boydii</i>
<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Salmonella typhi</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Shigella flexneri</i>	<i>Campylobacter upsaliensis</i>
<i>Staphylococcus aureus (mecA+)</i>	<i>Plesiomonas shigelloides</i>
<i>Staphylococcus aureus (mecA-)</i>	<i>Campylobacter coli</i>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli o111/nm</i>
<i>Toxoplasma gondii</i>	<i>Campylobacter fetus</i>
<i>Treponema pallidum</i>	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>
<i>Trichomonas vaginalis</i>	Amplirun adenovirus 41
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Adenovirus type 40 (species f) (strain: dugan)
<i>Ureaplasma parvum</i>	Adenovirus type 04 (species e)
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	Adenovirus type 20 (species d)
<i>Varicella-zoster virus</i>	Adenovirus type 11 (species b)
<i>Francisella tularensis</i>	Adenovirus type 02 (species c)
<i>Gardnerella vaginalis</i>	Adenovirus type 31 (species a)
<i>Haemophilus ducreyi</i>	-
<i>Haemophilus influenzae</i>	-

RNA		
Coronavirus oc43	Rotavirus	Parainfluenza 2
Coronavirus 229-e	Rubella	Parainfluenza 3
Coronavirus sars (2003)	Sars-cov-2	Parainfluenza 4 a
Coronavirus nl63	Tick-borne encephalitis virus	Respiratory syncytial virus (subtype a)
Coxsackie a6	Human parainfluenza 1	Respiratory syncytial virus (subtype b)
Coxsackie b1	Influenza a h1	West Nile virus
Coxsackie b5	Influenza a h3	Yellow fever virus
Dengue 1 virus	Influenza a h5	Zika virus (asian lineage)
Dengue 2 virus	Influenza b	Zika virus
Dengue 3 virus	Measles	Chikungunya virus
Dengue 4 virus	Mers coronavirus	Norovirus g1
Echovirus 5	Mumps	Norovirus g2
Enterovirus 68	Novel influenza a h1n1	Sapovirus
Rhinovirus	Parainfluenza 1	Astrovirus

• **Interference study**

The presence of PCR inhibitors in the sample may induce a positive or negative interference on test results. Whole blood samples, who are usually collected in classical EDTA tubes (EDTA blood samples used to develop and validate the BIOSYNEX Blood Lysis = prototype), can, in some cases, be collected in heparin tubes and heparin could be a source of inhibition. Whole blood with abnormal haematological and biochemical parameters could also be a source of inhibition.

The interference tests of Heparin on the BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria kit were performed using negative blood samples spiked or not with positive blood sample of *P. falciparum* from the WHO STD. No positive or negative interference was demonstrated. Whole blood interference tests with abnormal haematological or biochemical parameters on the BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria kit were performed using negative blood samples spiked or not with quantified *P. falciparum* gDNA from the ATCC. No positive or negative interference was demonstrated for the following haematological and biochemical parameters:

- Bilirubin ≤ 158.6 mg/L
- Triglycerides ≤ 8.29 g/L
- Leukocytes ≤ 13,880 cells/m³
- Erythrocytes ≤ 6,300,000 cells/m³

To this date, our clinical studies on samples with blood have not shown any interference on the results.

• **Precision**

Repeatability and Reproducibility

Repeatability data for the BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria kit was determined on replicate tests using positive and negative blood samples, each run 30 times. As no positive blood sample of *P. knowlesi* is available, results for this species were obtained with dilution of purified genomic DNA from BEI Resources. A 100% agreement was shown on each hypothesis.

Results (min:sec)					
Sample		PAN		FALCI	
		Mean	SD	Mean	SD
Negative sample	-	N/A	-	N/A	-
<i>Plasmodium falciparum</i>	+++	03:18	00:10	04:08	00:17
	++	04:49	00:13	06:17	01:18
	+	06:11	00:27	07:33	00:36
<i>Plasmodium malariae</i>	++	07:31	00:20	N/A	-
	+	10:19	00:53	N/A	-
<i>Plasmodium ovale</i>	+++	04:50	00:09	N/A	-
	++	05:24	00:30	N/A	-
	+	07:59	00:37	N/A	-
<i>Plasmodium vivax</i>	++	06:01	00:12	N/A	-
	+	07:56	00:24	N/A	-

<i>Plasmodium knowlesi</i>	+++	05:32	00:17	N/A	-
	++	06:47	00:40	N/A	-
	+	06:53	00:55	N/A	-

Inter-day, inter-batch, inter-laboratory, and inter-operator reproducibility data for the BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria kit were determined on replicate tests from positive and negative blood or genomic DNA samples. A 100% agreement was shown on each hypothesis.

Inter-days, operators, lots and places variability:

Positive and Negative Controls were tested. Two dilutions of gDNA from the ATCC were tested: 1 medium (++) at 100 copies/μL and 1 low (+) at 2 copies/μL) and two dilutions of the WHO Standard : 1 high (+++) at 25000 IU/reaction and 1 low (+) at 10 IU/reaction). Negative sample was also tested.

Inter-days variability

Each sample is tested on the same lot in duplicate each day by the same technician, during 5 days.

Inter-operators variability

Each sample is tested on the same lot in duplicate by two technicians.

Inter-lots variability

Each sample is tested in duplicate on three lots.

Inter-places variability

Each sample is tested in duplicate in the first place and in duplicate in the second place.

PAN	CTRL+		CTRL-		ATCC gDNA ++		ATCC gDNA +		WHO Standard +++		WHO Standard +		Negative Sample	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Inter days variability	03:59	00:20	N/A	-	03:56	00:04	05:32	00:20	04:00	00:32	06:46	02:15	N/A	-
Inter operators variability	03:42	00:10	N/A	-	04:02	00:10	07:25	01:24	04:05	00:42	06:22	00:17	N/A	-
Inter lots variability	04:15	00:18	N/A	-	04:11	00:24	06:38	01:22	03:21	00:12	06:01	00:02	N/A	-
Inter places variability	03:55	00:07	N/A	-	04:17	00:24	05:12	00:10	03:35	00:07	05:52	00:24	N/A	-
FALCI	CTRL+		CTRL-		ATCC gDNA ++		ATCC gDNA +		WHO Standard +++		WHO Standard +		Negative Sample	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Inter days variability	04:35	00:12	N/A	-	04:48	00:05	06:47	00:49	04:34	00:13	08:16	01:17	N/A	-
Inter operators variability	04:30	00:21	N/A	-	04:50	00:00	07:30	01:17	04:42	00:17	07:27	00:17	N/A	-
Inter lots variability	04:50	00:32	N/A	-	04:51	00:58	06:56	00:59	03:46	00:40	07:08	00:59	N/A	-
Inter places variability	04:47	00:17	N/A	-	05:05	00:21	07:15	01:03	04:27	00:31	06:57	00:17	N/A	-
RNaseP - Internal Control	CTRL+		CTRL-		ATCC gDNA ++		ATCC gDNA +		WHO Standard +++		WHO Standard +		Negative Sample	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Inter days variability	05:35	00:31	N/A	-	N/A	-	N/A	-	07:48	01:12	07:47	01:48	07:04	01:32
Inter operators variability	05:37	00:10	N/A	-	N/A	-	N/A	-	06:20	00:07	06:17	00:03	06:15	00:07
Inter lots variability	05:36	00:22	N/A	-	N/A	-	N/A	-	06:48	00:45	07:13	00:51	06:43	00:23
Inter places variability	06:05	00:00	N/A	-	N/A	-	N/A	-	07:22	00:45	06:45	00:07	06:32	00:17

• **Clinical performances**

The clinical performance of the BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria kit was evaluated on clinical samples from various studies:

- Study on negative blood bank samples (Study 1)
- Study on positive and negative samples from a hospital center (Study 2)
- Study on positive and negative samples from an African hospital (Study 3)

Total samples from all studies for samples treated with BIOSYNEX Blood Lysis kit:

	Number of Samples	Malaria Qualification	
		Negative Samples	Positive Samples (PAN well)
Study 1	30	30	0
Study 2	47	10	37
Study 3	56	20	36
Total	133	60	73

Samples with distinction between *P. falciparum* and other *Plasmodium* species:

	Number of Samples	Malaria Qualification			
		Negative Samples	<i>P. falciparum</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. ovale</i>
Study 1	30	30	0	0	0
Study 2	47	10	33	2	2
Study 3	55	20	35*	0	0
Total	132	60	68	2	2

*One sample was qualified positive for *Plasmodium spp* and negative for *Plasmodium falciparum*, therefore not considered in this table (unknown qualification against malaria species).

Then, data from all studies are merged.

Results obtained with the 133 blood samples from all the studies are presented below.

The contingency table below shows the overall performance on whole blood samples.

BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria		Sample Qualification	
		Positive	Negative
	Positive	73	0
	Negative	0	60

Sensitivity : 100% (95%CI: 95.07-100%)

Specificity : 100% (95%CI: 94.04-100%)

Precision : 100% (95%CI: 97.26-100%)

(CI: Confidence Interval)

12. LIMITATIONS

1. Failure to follow any instructions of the IFU may adversely affect the test performance and/or invalidate the test result.
2. The possibility to obtain false positive or false negative results cannot be ruled out (e.g. in case of accidental contamination, in case of poor quality of the sample or in case the test procedure is not correctly followed). As with all diagnostic tests, results must be considered with other clinical information available to the physician.

13. LITERATURE

1-ECDC Surveillance Report: Malaria, Annual Epidemiology Report for 2021. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/malaria-annual-epidemiological-report-2021>.

14. HISTORY

Record version	Amended paragraph	Change details
V1	All	Creation of the document.

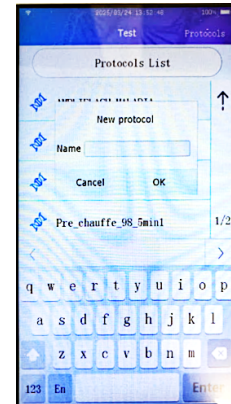
15. ANNEX §9 TEST PROTOCOL

Alternative procedure without the use of the computer.

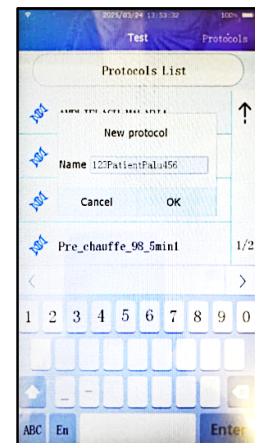
1. Unplug the USB connection between the AMPLIFLASH Reader instrument and the computer and start the instrument using the ON/OFF button on the left side. The screen opens to the list of protocols stored on the instrument.



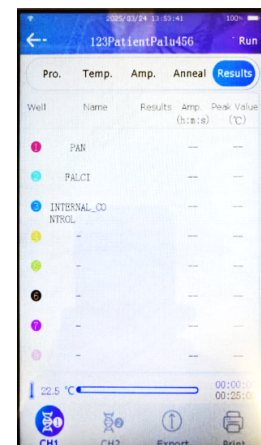
2. Select the "AMPLIFLASH Malaria" protocol on the touch screen. The "New protocol" window opens.



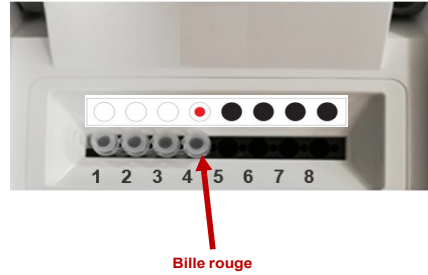
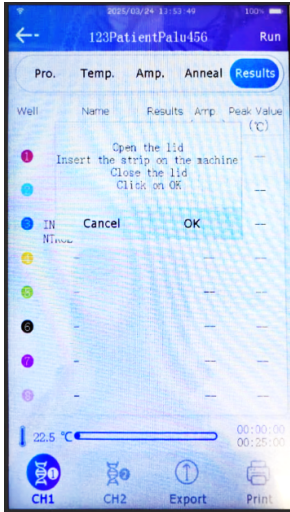
3. Manually enter the patient ID on the "Name" line and press "OK".



4. The list of targets detected by the test is displayed. Select "Run" at the top right of the screen.



5. A list of instructions appears on the screen corresponding to "Open the cover", "Insert the strip into the machine", "Close the cover", and "Click OK". Insert the test strip in the correct orientation, close the cover and select "OK".



6. The results can be observed in real time in the "Amp." and "Results" tabs, allowing you to see in real time the appearance of the amplification curves and the detection or not of the targets in the wells as well as the detection time of the positive signal.
7. At the end of the run, the results can be retrieved in .csv format using a USB stick inserted into the port on the left side of the instrument and selecting "Export" on the bottom right of the screen. It is also possible to retrieve old tests, including those carried out via the control software by going to the "Data" tab at the bottom of the home screen. All the tests done on the instrument are recorded there and can also be retrieved on a USB key according to the same procedure. Note that exporting test results from the screen, one by one, enables them to be retrieved in spreadsheet format, whereas exporting several results together from the internal memory will be in "text" format.

BIOSYNEX AMPLIFLASH MALARIA

PCR ISOTÉRMICA EN TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN CUALITATIVA DE *PLASMODIUM SPP.* Y LA IDENTIFICACIÓN ESPECÍFICA DE *PLASMODIUM FALCIPARUM* A PARTIR DE MUESTRAS DE SANGRE TOTAL EXTRAÍDAS.

Dispositivo médico de diagnóstico *in vitro* para uso profesional.

REF 3150053L

1. FINALIDAD PREVISTA

BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria es una técnica de diagnóstico molecular *in vitro* para la detección cualitativa mediante PCR isotérmica en tiempo real de 5 especies de *Plasmodium*: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* y *Plasmodium knowlesi* (PAN), y la identificación específica de *Plasmodium falciparum* (FALCI).

Esta técnica es una ayuda para el diagnóstico de la malaria que se realiza utilizando un extracto de ADN obtenido de una muestra de sangre total. Esta técnica no automatizada está destinada al uso diagnóstico *in vitro* en los laboratorios profesionales exclusivamente.

2. RESUMEN CLÍNICO

La malaria es una enfermedad mortal que se transmite principalmente a las personas a través de las picaduras de algunos mosquitos *Anopheles* hembras infectados. Las transfusiones de sangre y las agujas contaminadas también pueden transmitir la malaria. Es principalmente endémica en países tropicales, pero puede importarse a través de los viajes y las migraciones. La malaria se puede prevenir evitando las picaduras de mosquitos y con un tratamiento médico adecuado.

Los síntomas iniciales más comunes de la malaria son fiebre, dolor de cabeza y escalofríos. Los síntomas suelen aparecer entre 10 y 15 días después de la picadura de un mosquito infectado.

Los síntomas pueden ser leves en algunas personas, especialmente en aquellas que han sufrido varias infecciones por malaria. Dado que algunos síntomas de la malaria no son específicos, es fundamental hacer un diagnóstico lo antes posible.

Algunos tipos de malaria pueden causar enfermedades graves y la muerte. Los bebés, los niños menores de 5 años, las mujeres embarazadas, los viajeros y las personas con SIDA o inmunodeprimidas en general corren un mayor riesgo.

Los síntomas graves incluyen: cansancio y fatiga extremos, alteración del estado de conciencia, convulsiones múltiples, dificultad para respirar, orina oscura o con sangre, ictericia (coloración amarillenta de los ojos y la piel), sangrado anormal y, en casos extremos, la muerte. La infección por malaria durante el embarazo también puede provocar un parto prematuro o el nacimiento de un bebé con bajo peso.

Las personas con síntomas leves o graves deben recibir atención médica de urgencia inmediatamente y un tratamiento adecuado.

El Informe Epidemiológico Anual del ECDC para 2021 ofrece datos epidemiológicos europeos en la Unión Europea.

De los 4482 casos confirmados en los que se diagnosticó el patógeno, 3771 (84,1 %) tenían *P. falciparum*, 96 (2,1 %) tenían *P. vivax*, 181 (4,0 %) tenían *P. ovale*, 137 (3,1 %) tenían *P. malariae*, uno tenía *P. knowlesi* y 296 (6,6 %) casos tenían infecciones por especies de *Plasmodium* no determinadas. La tasa de mortalidad fue del 1,1 % entre los 1944 casos de malaria diagnosticados. De los 4257 casos de malaria, el 99,7 % estaban relacionados con viajes.

Casi todos los casos de malaria notificados por los países de la UE/EEE en 2021 fueron importados. Los países que notificaron el mayor número de casos tienen vínculos históricos, económicos, lingüísticos y culturales con zonas endémicas, especialmente en África y América. La mayoría de los casos importados de malaria en Francia y España están relacionados con rutas de viaje desde África Occidental. La estacionalidad y la distribución por edades de los casos en Europa probablemente reflejan los patrones de viaje a países donde la malaria es endémica.

La bibliografía sugiere que una proporción considerable de los casos importados de paludismo en la UE/EEE se dan entre inmigrantes recientes procedentes de países donde la malaria es endémica y entre migrantes más asentados que han viajado para visitar a amigos y familiares en países donde la malaria es endémica.

En Europa, la quimioprofilaxis contra la malaria solo se recomienda para los viajeros que se dirigen a países donde la malaria es endémica, que se clasifican en tres grupos de riesgo (riesgo muy limitado de transmisión de la malaria, riesgo de malaria no *P. falciparum* y riesgo de malaria *P. falciparum*) para determinar el régimen farmacológico más eficaz (véanse los requisitos y recomendaciones de la OMS para los viajeros internacionales, incluida una lista de los países afectados, a partir de 2022).

3. PRINCIPIO DE PRUEBA

El kit BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria contiene reactivos que permiten la amplificación isotérmica en tiempo real LAMP (amplificación mediada por bucle) para determinar en la muestra de sangre la presencia o ausencia de *Plasmodium spp* (PAN) o *P. falciparum* específicamente (FALCI). La secuencia de ADN específica de la versión PAN es una secuencia conservada del gen *cox* de los genomas de *Plasmodium spp*. La secuencia de ADN objetivo de la versión FALCI es una secuencia específica del gen *cox*

del genoma del *P. falciparum*. El kit contiene un microtubo con un control interno endógeno (gen codificador de RNase P) para garantizar el correcto funcionamiento de la extracción y amplificación y evaluar la calidad de la muestra.

LAMP es un método de amplificación isotérmica específica de una secuencia nucleica con incorporación de un colorante fluorescente de ácido nucleico durante la amplificación. Amplifica una secuencia objetivo con tres o cuatro conjuntos de cebadores a una temperatura constante de +65 °C.

BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria permite analizar una muestra cada vez.

El análisis con BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria consiste en realizar los siguientes pasos:

- Extracción rápida de ADN a partir de sangre con el kit BIOSYNEX Blood Lysis,
- Amplificación isotérmica (LAMP) con el tampón de reacción y los cebadores distribuidos en los microtubos (tubo de ensayo), como se muestra en la imagen siguiente.

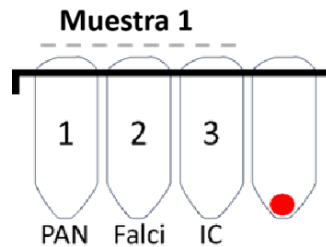


Figura 1: 1= PAN; 2= Falci; 3= Control Interno ; 4= Vacío (Cuenta roja)

Esta técnica permite la amplificación de dos secuencias específicas y un control interno:

- PAN: objetivo conservado en *Plasmodium spp* – posición 1 en la tira de microtubos (véase la figura 1);
- FALCI: objetivo específico de *Plasmodium falciparum* – posición 2 en la tira de microtubos (véase la figura 1);
- IC: gen codificado por la RNasa P humana utilizado como control interno para los procesos de lisis y amplificación; posición 3 en la tira de microtubos (véase la figura 1).

La lengüeta (la tira negra de la figura) y el microtubo que contiene la bola roja actúan como polarizadores, garantizando la orientación correcta de los microtubos. Para una orientación correcta, la lengüeta debe colocarse a la izquierda y el microtubo que contiene la gota roja a la derecha cuando se depositan las muestras y cuando se inserta el conjunto de microtubos en el lector.

El kit contiene un tampón de activación (proporción de 10 µl de muestra por 30 µl de tampón de activación) que contiene todas las sales necesarias para activar la reacción a +65 °C.

Estas amplificaciones se realizan en paralelo, y el resultado de la amplificación se obtiene tras un periodo de entre 3 y 25 minutos, dependiendo de la parasitemia de la muestra que se está analizando.

La prueba de amplificación isotérmica se basa en la detección, mediante el BIOSYNEX AMPLIFLASH Reader, de la fluorescencia generada durante la amplificación del ADN objetivo. El dispositivo BIOSYNEX AMPLIFLASH Reader indica en tiempo real para cada tubo si la amplificación es positiva (detección del ADN objetivo) o negativa (sin detección del ADN objetivo).

4. MATERIAL NECESARIO

Material proporcionado:

2 bolsas de plástico, cada una con 12 tiras de 4 microtubos (1 microtubo que contiene una perla roja y 3 que contienen las mezclas maestras)

1 bolsa de plástico que contiene 24 tiras de 4 tapones

24 tubos de tampón de activación

1 tubo de control positivo (CONTROL+, tapa roja)

1 tubo de control negativo (CONTROL-, tapa verde)

Nota: con los tubos suministrados es posible realizar 5 reacciones de control.

Material necesario pero no proporcionado

- Kit de pretratamiento de muestras BIOSYNEX Blood Lysis (Ref. 3150077)
- Guantes desechables sin polvo.
- Micropipeta y puntas con filtro
- Vortex de sobremesa
- BIOSYNEX AMPLIFLASH Reader (Ref. 5150001)

5. PRECAUCIONES

- Siga cuidadosamente estas instrucciones de uso. El incumplimiento de cualquiera de las instrucciones de este prospecto puede afectar negativamente al rendimiento de la prueba y tener consecuencias perjudiciales.
- Siga las buenas prácticas de laboratorio y utilice guantes desechables sin polvo durante todo el procedimiento de prueba.
- La gestión diaria de numerosas muestras y la alta sensibilidad de la técnica LAMP pueden, si no se toman precauciones, generar resultados falsos positivos por contaminación. Por lo tanto, si es posible, el pre-manejo LAMP, el post-LAMP y la extracción de ADN deben realizarse en salas separadas. Utilice guantes desechables en cada zona y cámbielos antes de pasar de una zona a otra.
- La tira de reacción y los tapones son de un solo uso. No los reutilice. No abra los tubos al finalizar la técnica.
- No utilice tira de reacción si la lengüeta de aluminio está abierto o dañado.
- No utilice el kit en caso de rotura o fuga. Si solo se ha dañado el embalaje (sin rotura ni fuga), el kit sigue siendo utilizable.
- Proteja el kit de la luz.
- Centrifugue los tubos antes de abrirlos, abriéndolos uno tras otro y cerrándolos bien entre cada uno para evitar cualquier contaminación.
- El CTRL+ contiene cantidades significativas de secuencias de ADN. Por lo tanto, puede contaminar potencialmente los demás componentes del kit si no se siguen las buenas prácticas de biología molecular. Para limitar este riesgo de contaminación, se recomienda almacenar este componente fuera del kit al abrirlo por primera vez.
- El kit incluye controles negativos y positivos. El control negativo sirve como indicio de una posible contaminación. El control positivo se utiliza para verificar la validez de los reactivos y del lector. Cada laboratorio deberá definir su propio sistema de control de calidad.
- Deseche las piezas sucias o los componentes vacíos del kit en un contenedor de basura adecuado para residuos biológicos. Tenga en cuenta la normativa local sobre eliminación de residuos biológicos.
- El dispositivo contiene material de origen bacteriano o animal y debe manipularse con precaución.
- Si, en relación con el uso de BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria, se ha producido una muerte o un deterioro grave de la salud, se debe informar de ello al fabricante y a la autoridad competente de su país. En caso de duda, informe de ello.
- Ficha de datos de seguridad disponible bajo petición. El resumen de seguridad y rendimiento estará disponible en línea en Eudamed.

6. RECOMENDACIONES DE USO

Dado el riesgo significativo de contaminación del equipo y del aire ambiente asociado a la amplificación isotérmica, es importante seguir cuidadosamente las recomendaciones y precauciones indicadas en las instrucciones de uso.

- Asegúrese siempre de que las tapas de los microtubos de reacción estén bien cerradas antes de iniciar un protocolo de calentamiento en el termociclador utilizado.
- Al final del programa, cuando se retiren las tiras del lector, coloque los dedos sobre las tapas para evitar que se abran durante la extracción. Quítense inmediatamente los guantes utilizados para retirar las tiras usadas del lector envolviendo los microtubos en ellos antes de desecharlos en el contenedor de residuos adecuado.
- Limpie el equipo y la estación de trabajo diariamente con los detergentes adecuados y mensualmente con isopropanol, de acuerdo con el protocolo proporcionado por Biosynex (consulte el manual de usuario del BIOSYNEX AMPLIFLASH Reader o del instrumento utilizado).

7. ALMACENAMIENTO DE KITS

El kit se envía congelado. Los componentes del kit deben llegar congelados. Al recibirlo, mantenga el kit a una temperatura inferior o igual a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. En estas condiciones, los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad. No utilice el kit ni ninguno de sus componentes después de la fecha de caducidad. Proteja el kit y los reactivos de la luz directa. No descongele los componentes del kit excepto cuando sea necesario y solo antes de su uso. Los tubos de control pueden almacenarse entre $+2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la fecha de caducidad.

Nota: los tubos de control positivo y negativo pueden someterse a hasta 5 ciclos de congelación y descongelación.

8. RECOGIDA Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

El ADN de las muestras de sangre total recogidas en tubos con EDTA o heparina, extraído con el kit BIOSYNEX Blood Lysis, debe utilizarse con el kit BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria.

Las muestras de sangre total pueden extraerse con BIOSYNEX Blood Lysis inmediatamente o en un plazo de 7 horas si se almacenan a temperatura ambiente ($+21\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $+30\text{ }^{\circ}\text{C}$) o a $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 días.

Se deben evitar los ciclos repetidos de congelación/descongelación de la muestra (se permite un máximo de 1 ciclo).

Las muestras tratadas con el kit BIOSYNEX Blood Lysis (paso 1 del procedimiento de prueba descrito en la sección 9) pueden analizarse inmediatamente o en un plazo de 7 días si se almacenan entre $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $+30\text{ }^{\circ}\text{C}$, o bien entre $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 3 meses.

Las muestras mezcladas con el tampón de activación (paso 2 del procedimiento de prueba descrito en la sección 9) son estables durante 2 horas a temperatura ambiente (+21 °C - +30 °C). Transcurrido este tiempo, reinicie el procedimiento de prueba.

El transporte de muestras clínicas debe cumplir con las normativas locales relativas al transporte de agentes infecciosos.

9. PROCEDIMIENTO DE PRUEBA

Para realizar una prueba o un control, tome un tubo de tampón de activación, una tira de 4 micropocillos y los tapones. El uso del instrumento para realizar una prueba se describe en el anexo, en el párrafo 15 de estas instrucciones de uso.

1. Lisis de muestras y liberación de ADN

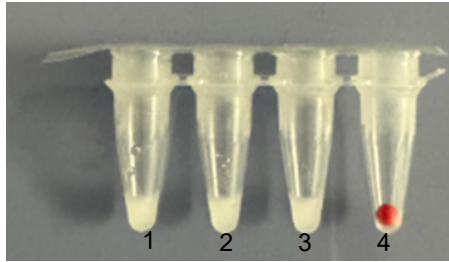
Para la lisis rápida de muestras con el kit BIOSYNEX Blood Lysis, consulte el prospecto de este kit, referencia 3150077. Los controles positivo y negativo están listos para usar y no necesitan ningún paso previo de extracción.

2. Preparación de la mezcla de reacción

- Abra el tubo de tampón de activación.
- Con una micropipeta provista de una punta con filtro, coloque 10 µl del lisado obtenido en el paso anterior en los 30 µl de tampón de activación. Homogeneice pipeteando hacia arriba y hacia abajo o agitando el tubo con un vórtex.

3. Adición de la mezcla de reacción a la tira

- Extraer la tira que contiene los 4 microtubos sin separarlos y dejarla descongelada.
- Orienta los microtubos de la tira según la posición de los polarizadores (la lengüeta a la izquierda y el microtubo que contiene la cuenta roja a la derecha); el microtubo n.º 1 es el que está en posición proximal.
- Retire el papel de aluminio y deséchelo.



Microtubos de izquierda a derecha: 1= PAN; 2= FALCI; 3= Control Interno; 4= Cuenta roja (No añadas nada al microtubo.)

- Pipetee 10 µl de la mezcla de reacción con una micropipeta y una punta filtrada y dispense los 10 µl en cada microtubo de la tira.
 - Homogeneizar por pipeteo.
 - Cierre los pozos con las tapas proporcionadas.
 - Sostenga la tira en posición vertical y golpéela suavemente sobre una superficie plana para eliminar cualquier burbuja de aire.
 - Coloque sin demora la tira en el lector AMPLIFLASH en la dirección correcta.
- El microtubo que contiene la cuenta roja permite mantener la orientación correcta de la tira.

Nota 1: Los controles provistos permiten realizar 5 reacciones.

10. ANÁLISIS DE DATOS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

A. Criterios de validación de la técnica

El kit incluye un control positivo y un control negativo. Cada laboratorio debe definir la frecuencia con la que aplica los controles de calidad. Los resultados esperados con cada control se definen en la siguiente tabla:

Control	Objetivo		
	PAN	FALCI	RNaseP
Control positivo	+	+	+
Control negativo	-	-	-

B. Interpretación cualitativa (positiva o negativa)

La interpretación de las muestras de sangre se muestra en la siguiente tabla:

Objetivo			Interpretación
PAN	FALCI	RNaseP	
+	+	+	Paciente con ADN específico de <i>Plasmodium falciparum</i> y que también puede presentar coinfección.
+	+	-	

+	-	+	Paciente con ADN de <i>Plasmodium spp</i> distinto del ADN de <i>P. falciparum</i> .
+	-	-	
-	-	+	Paciente sin ADN específico de ninguna de las 5 especies detectables de <i>Plasmodium spp</i> .
-	-	-	Resultado no válido: mala calidad de la muestra, inhibición de la reacción PCR o problemas durante el proceso de ejecución o prueba. Realice una nueva prueba o vuelva a tomar la muestra.

+ Resultados positivos - Resultados negativos

Nota: cuando se utiliza el AMPLIFLASH Reader, los microtubos en las posiciones 1, 2 y 3 pueden aparecer en color naranja en el software Gene Series Ampliflash o con el pictograma «!» en el lector. En este caso, la prueba no es válida. Repita la prueba con una nueva muestra. Las posiciones 5 a 8 del lector no admiten tubos, por lo que un resultado no válido corresponde a un funcionamiento normal.

11. ACTUACIONES

• Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica de la reacción de amplificación isotérmica del kit se determinó a partir del ADN cuantificado del primer Estándar Internacional de la OMS para *Plasmodium falciparum* y del ADN genómico cuantificado de *Plasmodium falciparum* de la ATCC (American Type Culture Collection).

El límite de detección (LoD) del kit BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria se define como la concentración, en número de copias/μL, que se puede detectar al menos en un 95 % en una muestra específica de ADN de *Plasmodium spp*.

Cada dilución se probó 24 veces. Los resultados determinados estadísticamente se presentan en la siguiente tabla:

Objetivo	LoD ₉₅	
	<i>P. falciparum</i> OMS Estándar	<i>P. falciparum</i> ATCC gDNA
FALCI	3.09 IU/reacción (0.127 IU/μL)	2.75 copias/reacción (1.1 copias/μL)
PAN	3.19 IU/reacción (0.123 IU/μL)	2.3 copias/reacción (0.92 copias/μL)

• Especificidad analítica

El diseño de los oligonucleótidos se validó *in silico* mediante alineación BLAST. La comparación de las secuencias obtenidas muestra una detección específica del BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria en su objetivo *Plasmodium spp*.

Ninguna de los cebadores detecta ADN distinto al de la especie *Plasmodium spp* objetivo.

Reactividad cruzada

Se analizaron 99 muestras de ADN y 42 muestras de ARN procedentes de un biobanco que figuran en las siguientes tablas con el kit BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria. En todas estas muestras no se observó amplificación de los objetivos (PAN o FALCI).

ADN	
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
Adenovirus 41	Herpes simplex 1
Adenovirus	Herpes simplex 2
<i>Aspergillus fumigatus</i>	HHV-6
<i>Bacillus cereus</i>	HHV-8
<i>Bartonella henselae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ndm-1)
<i>Bartonella quintana</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
Virus BK	<i>Leishmania chagasi</i>
<i>Bordetella holmesii</i>	<i>Leishmania infantum</i>
<i>Borrelia afzelii</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Borrelia burgdorferi</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>
<i>Borrelia garinii</i>	<i>Mycobacterium avium</i>
<i>Brucella abortus</i>	<i>Mycobacterium intracellulare</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Mycobacterium kansasii</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>Candida auris</i>	<i>Mycobacterium ulcerans</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i>
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>
<i>Chlamydia psittaci</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Neisseria meningitidis</i> sg a
<i>Coccidioides immitis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i> sg b
<i>Coxiella burnetii</i>	Papillomavirus tipo 16
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Papillomavirus tipo 18
Cytomegalovirus	Parvovirus b19 (plásmido)
<i>Enterococcus faecalis</i> (vanb)	<i>Vibrio cholerae</i>
<i>Enterococcus faecium</i> (vana)	<i>Yersinia enterocolitica</i>
Epstein-barr virus	<i>Aeromonas caviae</i>
<i>Escherichia coli</i> (eaec)	<i>Aeromonas dhakensis</i>
<i>Escherichia coli</i> (eiec)	<i>Vibrio vulnificus</i>

<i>Escherichia coli (epec)</i>		<i>Aeromonas veronii</i>
<i>Escherichia coli (etec)</i>		<i>Aeromonas hydrophila</i>
<i>Escherichia coli (vtec)</i>		<i>Shigella sonnei</i>
<i>Rickettsia conorii</i>		<i>Shigella boydii</i>
<i>Salmonella enteritidis</i>		<i>Shigella flexneri</i>
<i>Salmonella typhi</i>		<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Shigella flexneri</i>		<i>Campylobacter upsaliensis</i>
<i>Staphylococcus aureus (mecA+)</i>		<i>Plesiomonas shigelloides</i>
<i>Staphylococcus aureus (mecA-)</i>		<i>Campylobacter coli</i>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>		<i>Escherichia coli o111/nm</i>
<i>Toxoplasma gondii</i>		<i>Campylobacter fetus</i>
<i>Treponema pallidum</i>		<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>
<i>Trichomonas vaginalis</i>		Amplirun adenovirus 41
<i>Trypanosoma cruzi</i>		Adenovirus tipo 40 (especie f) (cepa: dugan)
<i>Ureaplasma parvum</i>		Adenovirus tipo 04 (especie e)
<i>Ureaplasma urealyticum</i>		Adenovirus tipo 20 (especie d)
<i>Varicella-zoster virus</i>		Adenovirus tipo 11 (especie b)
<i>Francisella tularensis</i>		Adenovirus tipo 02 (especie c)
<i>Gardnerella vaginalis</i>		Adenovirus tipo 31 (especie a)
<i>Haemophilus ducreyi</i>		-
<i>Haemophilus influenzae</i>		-
ARN		
Coronavirus oc43	Rotavirus	Parainfluenza 2
Coronavirus 229-e	Rubella	Parainfluenza 3
Coronavirus sars (2003)	Sars-cov-2	Parainfluenza 4 a
Coronavirus nl63	Virus de la encefalitis transmitida por garrapatas	Virus Respiratorio Sincitial (subtipo a)
Coxsackie a6	Parainfluenza 1 humana	Virus Respiratorio Sincitial (subtipo b)
Coxsackie b1	Influenza a h1	West Nile virus
Coxsackie b5	Influenza a h3	Virus de la fiebre amarilla
Dengue 1 virus	Influenza a h5	Virus del Zika (linaje asiático))
Dengue 2 virus	Influenza b	Virus del Zika
Dengue 3 virus	Sarampión	Chikungunya virus
Dengue 4 virus	Coronavirus MERS	Norovirus g1
Echovirus 5	Paperas	Norovirus g2
Enterovirus 68	Novel influenza a h1n1	Sapovirus
Rhinovirus	Parainfluenza 1	Astrovirus

• Estudio de interferencias

La presencia de inhibidores de la PCR en la muestra puede provocar una interferencia positiva o negativa en los resultados de la prueba. Las muestras de sangre total, que normalmente se recogen en tubos clásicos con EDTA (muestras de sangre con EDTA utilizadas para desarrollar y validar el prototipo BIOSYNEX Blood Lysis), pueden, en algunos casos, recogerse en tubos con heparina, y la heparina podría ser una fuente de inhibición. La sangre total con parámetros hematológicos y bioquímicos anormales también podría ser una fuente de inhibición.

Las pruebas de interferencia de la heparina en el kit BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria se realizaron utilizando muestras de sangre negativas enriquecidas o no con muestras de sangre positivas de *P. falciparum* procedentes del STD de la OMS. No se demostró ninguna interferencia positiva o negativa.

Se realizaron pruebas de interferencia con sangre total con parámetros hematológicos o bioquímicos anormales en el kit BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria utilizando muestras de sangre negativas enriquecidas o no con ADN genómico cuantificado de *P. falciparum* procedente del ATCC. No se demostró ninguna interferencia positiva o negativa para los siguientes parámetros hematológicos y bioquímicos:

- Bilirrubina \leq 158.6 mg/L
- Triglicéridos \leq 8.29 g/L
- Leucocitos \leq 13,880 cells/m³
- Eritrocitos \leq 6,300,000 cells/m³

Hasta la fecha, nuestros estudios clínicos con muestras de sangre no han mostrado ninguna interferencia en los resultados.

• Precisión

Repetibilidad y Reproducibilidad

Los datos de repetibilidad del kit BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria se determinaron en pruebas repetidas utilizando muestras de sangre positivas y negativas, cada una de ellas realizada 30 veces.

Dado que no se dispone de muestras de sangre positivas de *P. knowlesi*, los resultados para esta especie se obtuvieron mediante la dilución de ADN genómico purificado de BEI Resources. Se observó una concordancia del 100 % en cada determinación.

Resultados (min:sec)					
Muestra		PAN		FALCI	
		Media	DT	Media	DT
Muestra negativa	-	N/A	-	N/A	-
<i>Plasmodium falciparum</i>	+++	03:18	00:10	04:08	00:17
	++	04:49	00:13	06:17	01:18
	+	06:11	00:27	07:33	00:36
<i>Plasmodium malariae</i>	++	07:31	00:20	N/A	-
	+	10:19	00:53	N/A	-
<i>Plasmodium ovale</i>	+++	04:50	00:09	N/A	-
	++	05:24	00:30	N/A	-
	+	07:59	00:37	N/A	-
<i>Plasmodium vivax</i>	++	06:01	00:12	N/A	-
	+	07:56	00:24	N/A	-
<i>Plasmodium knowlesi</i>	+++	05:32	00:17	N/A	-
	++	06:47	00:40	N/A	-
	+	06:53	00:55	N/A	-

Los datos de reproducibilidad entre días, entre lotes, entre laboratorios y entre operadores del kit BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria se determinaron en pruebas repetidas a partir de muestras de sangre o ADN genómico positivas y negativas. Se observó una concordancia del 100 % en cada determinación.

Variabilidad entre días, operadores, lotes y lugares:

Se analizaron controles positivos y negativos. Se analizaron dos diluciones de ADN genómico (gDNA) de la ATCC: una media (++) a 100 copias/ μ L y una baja (+) a 2 copias/ μ L, y dos diluciones del estándar de la OMS: una alta (+++) a 25 000 UI/reacción y una baja (+) a 10 UI/reacción. También se analizó una muestra negativa.

Variabilidad entre días

Cada muestra se analiza en el mismo lote por duplicado cada día por el mismo técnico, durante 5 días.

Variabilidad entre operadores

Cada muestra se analiza en el mismo lote por duplicado por dos técnicos.

Variabilidad entre lotes

Cada muestra se analiza por duplicado en tres lotes.

Variabilidad entre lugares

Cada muestra se analiza por duplicado en primer lugar y por duplicado en segundo lugar.

PAN	CTRL+		CTRL-		ATCC gDNA ++		ATCC gDNA +		OMS Estándar +++		OMS Estándar +		Muestra Negativa	
	Media	DT	Media	DT	Media	DT	Media	DT	Media	DT	Media	DT	Media	DT
Variabilidad entre días	03:59	00:20	N/A	-	03:56	00:04	05:32	00:20	04:00	00:32	06:46	02:15	N/A	-
Variabilidad entre operadores	03:42	00:10	N/A	-	04:02	00:10	07:25	01:24	04:05	00:42	06:22	00:17	N/A	-
Variabilidad entre lotes	04:15	00:18	N/A	-	04:11	00:24	06:38	01:22	03:21	00:12	06:01	00:02	N/A	-
Variabilidad entre lugares	03:55	00:07	N/A	-	04:17	00:24	05:12	00:10	03:35	00:07	05:52	00:24	N/A	-

FALCI	CTRL+		CTRL-		ATCC gDNA ++		ATCC gDNA +		OMS Estándar +++		OMS Estándar +		Muestra Negativa	
	Media	DT	Media	DT	Media	DT	Media	DT	Media	DT	Media	DT	Media	DT
Variabilidad entre días	04:35	00:12	N/A	-	04:48	00:05	06:47	00:49	04:34	00:13	08:16	01:17	N/A	-
Variabilidad entre operadores	04:30	00:21	N/A	-	04:50	00:00	07:30	01:17	04:42	00:17	07:27	00:17	N/A	-
Variabilidad entre lotes	04:50	00:32	N/A	-	04:51	00:58	06:56	00:59	03:46	00:40	07:08	00:59	N/A	-
Variabilidad entre lugares	04:47	00:17	N/A	-	05:05	00:21	07:15	01:03	04:27	00:31	06:57	00:17	N/A	-

RNAseP - Internal Control	CTRL+		CTRL-		ATCC gDNA ++		ATCC gDNA +		OMS Estándar +++		OMS Estándar +		Muestra Negativa	
	Media	DT	Media	DT	Media	DT	Media	DT	Media	DT	Media	DT	Media	DT
Variabilidad entre días	05:35	00:31	N/A	-	N/A	-	N/A	-	07:48	01:12	07:47	01:48	07:04	01:32
Variabilidad entre operadores	05:37	00:10	N/A	-	N/A	-	N/A	-	06:20	00:07	06:17	00:03	06:15	00:07
Variabilidad entre lotes	05:36	00:22	N/A	-	N/A	-	N/A	-	06:48	00:45	07:13	00:51	06:43	00:23
Variabilidad entre lugares	06:05	00:00	N/A	-	N/A	-	N/A	-	07:22	00:45	06:45	00:07	06:32	00:17

• **Rendimiento clínico**

El rendimiento clínico del kit BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria se evaluó en muestras clínicas procedentes de diversos estudios:

- Estudio sobre muestras negativas de bancos de sangre (Estudio 1)
- Estudio sobre muestras positivas y negativas de un centro hospitalario (Estudio 2)
- Estudio sobre muestras positivas y negativas de un hospital africano (Estudio 3)

Total de muestras de todos los estudios para muestras tratadas con el kit BIOSYNEX Blood Lysis:

	Número de Muestras	Calificación de Malaria	
		Muestras Negativas	Muestras Positivas (PAN well)
Estudio 1	30	30	0
Estudio 2	47	10	37
Estudio 4	56	20	36
Total	133	60	73

Muestras con distinción entre *P. falciparum* y otras especies de *Plasmodium*:

	Número de Muestras	Calificación de Malaria			
		Muestras Negativas	<i>P. falciparum</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. ovale</i>
Estudio 1	30	30	0	0	0
Estudio 2	47	10	33	2	2
Estudio 3	55	20	35*	0	0
Total	132	60	68	2	2

*Una muestra dio positivo para *Plasmodium spp* y negativo para *Plasmodium falciparum*, por lo que no se ha tenido en cuenta en esta tabla (calificación desconocida respecto a las especies de malaria).

A continuación, se fusionan los datos de todos los estudios.

A continuación se presentan los resultados obtenidos con las 133 muestras de sangre de todos los estudios.

La tabla de contingencia que figura a continuación muestra el rendimiento global en muestras de sangre completa.

BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria		Calificación de la Muestra	
		Positivo	Negativo
	Positivo	73	0
	Negativo	0	60

Sensibilidad : 100% (95%CI: 95.07-100%) (CI: Intervalo de Confianza)

Especificidad : 100% (95%CI: 94.04-100%)

Precisión : 100% (95%CI: 97.26-100%)

12. LIMITACIONES

1. El incumplimiento de cualquiera de las instrucciones del prospecto puede afectar negativamente al rendimiento de la prueba y/o invalidar el resultado de la misma.
2. No se puede descartar la posibilidad de obtener resultados falsos positivos o falsos negativos (por ejemplo, en caso de contaminación accidental, en caso de mala calidad de la muestra o en caso de que no se siga correctamente el procedimiento de la prueba). Al igual que con todas las pruebas diagnósticas, los resultados deben considerarse junto con otra información clínica disponible para el médico.

13. BIBLIOGRAFÍA

1. ECDC Surveillance Report: Malaria, Annual Epidemiology Report for 2021. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/malaria-annual-epidemiological-report-2021>

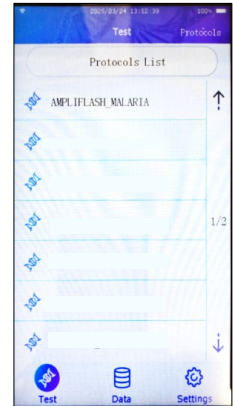
14. HISTORIAL DE MODIFICACIONES

Versión registrada	Párrafo modificado	Cambiar detalles
V1	Toda la IFU	Creación del documento.

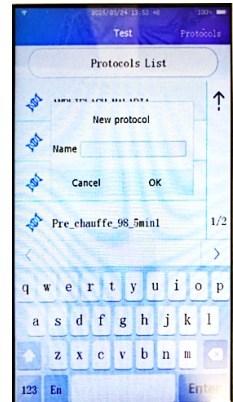
15. ANEXO, § 9 - PROCEDIMIENTO DE PRUEBA

Procedimiento alternativo sin el uso del ordenador.

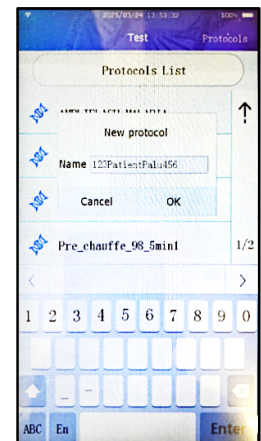
1. Desconecte la conexión USB entre el instrumento AMPLIFLASH Reader y el ordenador e inicie el instrumento utilizando el botón ON/OFF situado en el lado izquierdo. La pantalla se abre con la lista de protocolos almacenados en el instrumento.



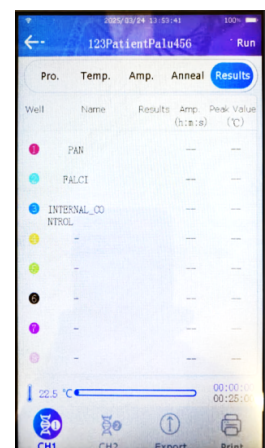
2. Seleccione el protocolo «AMPLIFLASH Malaria» en la pantalla táctil. Se abrirá la ventana «Nuevo protocolo».



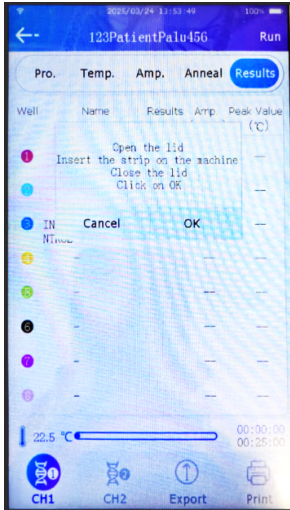
3. Introduzca manualmente el ID del paciente en la línea «Nombre» y pulse «OK».



4. Se muestra la lista de objetivos detectados por la técnica. Seleccione «Ejecutar» en la parte superior derecha de la pantalla.



5. En la pantalla aparece una lista de instrucciones correspondientes a «Abrir la cubierta», «Insertar la tira en la máquina», «Cerrar la cubierta» y «Hacer clic en OK». Inserte la tira reactiva en la orientación correcta,



Cuenta roja

cierra la tapa y seleccione «OK».

6. Los resultados se pueden observar en tiempo real en las pestañas «Amp.» y «Resultados», lo que le permite ver en tiempo real la aparición de las curvas de amplificación y la detección o no de los objetivos en los microtubos, así como el tiempo de detección de la señal positiva.
7. Al final de la ejecución, los resultados se pueden recuperar en formato .csv utilizando una memoria USB insertada en el puerto situado en el lado izquierdo del instrumento y seleccionando «Exportar» en la parte inferior derecha de la pantalla. También es posible recuperar pruebas antiguas, incluidas las realizadas a través del software de control, accediendo a la pestaña «Datos» situada en la parte inferior de la pantalla de inicio. Todas las pruebas realizadas en el instrumento se registran allí y también se pueden recuperar en una memoria USB siguiendo el mismo procedimiento. Tenga en cuenta que al exportar los resultados de las pruebas desde la pantalla, uno por uno, se pueden recuperar en formato de hoja de cálculo, mientras que al exportar varios resultados juntos desde la memoria interna, se guardarán en formato «texto».

BIOSYNEX AMPLIFLASH MALARIA

PCR ISOTERMICA IN TEMPO REALE PER LA RILEVAZIONE QUALITATIVA DI PLASMODIUM SPP E L'IDENTIFICAZIONE SPECIFICA DI PLASMODIUM FALCIPARUM DA CAMPIONE DI SANGUE INTERO ESTRATTO.

Dispositivo medico-diagnostico *in vitro* per uso professionale.

REF 3150053L

1. SCOPO PREVISTO

BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria è un test diagnostico molecolare *in vitro* per la rilevazione qualitativa mediante PCR isoterma in tempo reale di 5 specie di *Plasmodium*: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi* (PAN) e l'identificazione specifica di *Plasmodium falciparum* (FALCI). Il test è un ausilio per la diagnosi della Malaria eseguito utilizzando un estratto di DNA ottenuto da un campione di sangue intero. Questo test non automatizzato è destinato all'uso diagnostico *in vitro* in laboratorio solo da parte di professionisti.

2. RIASSUNTO CLINICO

La malaria è una malattia potenzialmente letale che si diffonde principalmente attraverso la puntura di alcune zanzare *Anopheles* infette. Anche le trasfusioni di sangue e gli aghi contaminati possono trasmettere la malaria. È per lo più endemica nei Paesi tropicali, ma può essere importata attraverso viaggi e migrazioni. La malaria può essere prevenuta evitando le punture di zanzara e con un trattamento medico adeguato.

I primi sintomi più comuni della malaria sono febbre, mal di testa e brividi. I sintomi di solito iniziano entro 10-15 giorni dalla puntura di una zanzara infetta.

I sintomi possono essere lievi per alcune persone, soprattutto per coloro che hanno già avuto un'infezione da malaria. Poiché alcuni sintomi della malaria non sono specifici, è fondamentale sottoporsi a un test precoce.

Alcuni tipi di malaria possono causare gravi malattie e morte. I neonati, i bambini sotto i 5 anni, le donne in gravidanza, i viaggiatori e le persone affette da AIDS o immunodepresse in generale sono a maggior rischio. I sintomi gravi includono: estrema stanchezza e affaticamento, alterazione della coscienza, convulsioni multiple, respirazione difficoltosa, urine scure o sanguinolente, ittero (ingiallimento degli occhi e della pelle), sanguinamento anomalo, morte in casi estremi.

Le persone con sintomi gravi dovrebbero ricevere immediatamente cure di emergenza. Ottenere un trattamento precoce per la malaria lieve può impedire che l'infezione diventi grave.

L'infezione da malaria durante la gravidanza può anche causare un parto prematuro o il parto di un bambino con basso peso alla nascita.

Il rapporto epidemiologico annuale dell'ECDC per il 2021¹ fornisce dati sull'epidemiologia europea in seno all'Unione europea.

Dei 4.482 casi confermati per i quali è stato segnalato l'agente patogeno, 3.771 (84,1%) erano affetti da *P. falciparum*, 96 (2,1%) da *P. vivax*, 181 (4,0%) da *P. ovale*, 137 (3,1%) da *P. malariae*, uno da *P. knowlesi* e 296 (6,6%) da specie di *Plasmodium* non specificate. La mortalità è stata dell'1,1% tra tutti i 1.944 casi di malaria con esito noto. Dei 4.257 casi con status di importazione noto, il 99,7% era correlato ai viaggi.

Quasi tutti i casi di malaria segnalati dai paesi dell'UE/SEE per il 2021 sono stati importati. I paesi che riportano il maggior numero di casi hanno legami storici, economici, linguistici e culturali con aree endemiche, in particolare in Africa e nelle Americhe. La maggior parte dei casi di malaria importati in Francia e Spagna sono legati a rotte di viaggio dall'Africa occidentale. La stagionalità e la distribuzione per età dei casi in Europa riflettono molto probabilmente i modelli di viaggio verso i paesi endemici della malaria. La letteratura suggerisce che una percentuale sostanziale di casi di malaria importati nell'UE/SEE si verifica tra gli immigrati recenti provenienti da paesi endemici della malaria e i migranti più stanziali che hanno viaggiato per visitare amici e parenti nei paesi endemici della malaria.

In Europa, la chemiopprofilassi antimalarica è raccomandata solo per chi viaggia nei paesi endemici della malaria, che sono classificati in tre gruppi di rischio (rischio molto limitato di trasmissione della malaria, rischio di malaria non-*P. falciparum* e rischio di malaria *P. falciparum*) per determinare il regime farmacologico più efficace (vedere i requisiti e le raccomandazioni dell'OMS¹ per i viaggiatori internazionali, compreso un elenco dei paesi interessati, aggiornato al 2022).

3. PRINCIPIO DEL TEST

Il kit BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria contiene reagenti che consentono l'amplificazione isoterma in tempo reale LAMP (Loop-Mediated Amplification) per determinare la parassitemia positiva o negativa per *Plasmodium spp* (PAN) o *Plasmodium falciparum* nello specifico (FALCI). La sequenza di DNA target della versione PAN è una sequenza conservata del gene *cox* proveniente dai genomi *Plasmodium spp*. La sequenza di DNA target della versione FALCI è una sequenza specifica del gene *cox* del genoma del *Plasmodium falciparum*. Il kit contiene un pozzetto con un controllo interno endogeno (gene codificante RNasi P) per garantire il corretto funzionamento dell'estrazione e dell'amplificazione e valutare la qualità del campione.

LAMP è un metodo di amplificazione isoterma specifica di una sequenza nucleica con l'incorporazione di una colorazione fluorescente di acido nucleico durante l'amplificazione. Amplifica una sequenza target con tre o quattro serie di primer a una temperatura costante di +65°C.

BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria consente il test di un campione alla volta.

Un'analisi con BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria consiste nell'eseguire le seguenti fasi:

- Estrazione rapida del DNA dal sangue con il kit BIOSYNEX Blood Lysis;
- Amplificazione isoterma (LAMP) con il tampone di reazione e i primer distribuiti nelle microprovette (provetta del saggio), come mostrato nell'immagine sottostante.

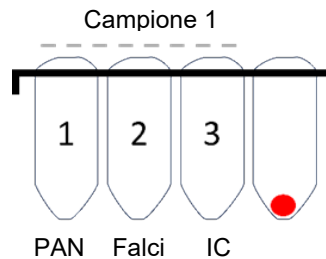


Figura 1: 1= PAN; 2= Falci; 3= Controllo interno; 4= Vuoto (perlina rossa)

Il test consente l'amplificazione di 2 sequenze mirate e di un controllo interno:

- PAN: target conservato in *Plasmodium spp* – posizione 1 sulla striscia di microprovette (vedi Figura 1);
- FALCI: target specifico di *Plasmodium falciparum* – posizione 2 sulla striscia di microprovette (vedi Figura 1);
- IC: gene codificato per RNasi P umana utilizzato come controllo interno per i processi di lisi e amplificazione – posizione 3 sulla striscia di microprovette (vedi Figura 1).

La linguetta (la striscia nera nella figura) e il pozzetto contenente la perlina rossa fungono da polarizzatori, garantendo il corretto orientamento della striscia. Per un corretto orientamento, la linguetta deve essere posizionata a sinistra e il pozzetto contenente la perlina rossa a destra quando i campioni vengono depositati e quando la striscia viene inserita nel lettore.

Il kit contiene un tampone di attivazione (rapporto 10µL campione per 30µL tampone di attivazione) contenente tutti i sali che consentono l'attivazione della reazione a +65°C.

Queste amplificazioni vengono eseguite in parallelo e il risultato dell'amplificazione si ottiene dopo un periodo compreso tra 3 e 25 minuti a seconda della parassitemia del campione analizzato.

Il test di amplificazione isoterma si basa sulla rilevazione, da parte del lettore BIOSYNEX AMPLIFLASH, della fluorescenza generata durante l'amplificazione del DNA target. Il dispositivo BIOSYNEX AMPLIFLASH Reader indica in tempo reale per ciascuna provetta se l'amplificazione è positiva (rilevamento del DNA target) o negativa (nessun rilevamento del DNA target).

4. MATERIALE RICHIESTO

Materiale fornito:

2 sacchetti di plastica, ciascuno contenente 12 strisce da 4 pozzetti (1 pozzetto contenente una sfera rossa e 3 contenenti le miscele master)

1 sacchetto di plastica contenente 24 strisce da 4 tappi

24 provette di tampone di attivazione

1 provetta di controllo positivo (CONTROL+, tappo rosso)

1 provetta di controllo negativo (CONTROL-, tappo verde)

Nota: con le provette fornite è possibile effettuare 5 reazioni di controllo.

Materiale richiesto ma non fornito:

- Kit di pretrattamento dei campioni BIOSYNEX Blood Lysis (rif. 3150077)
- Guanti monouso senza polvere
- Micropipette e puntali con filtro
- Vortex da banco
- Lettore BIOSYNEX AMPLIFLASH (Ref. 5150001)

5. PRECAUZIONI

- Seguire attentamente queste istruzioni per l'uso. La mancata osservanza di qualsiasi indicazione delle presenti istruzioni per l'uso può influire negativamente sulle prestazioni del test e avere conseguenze dannose.
- Seguire le buone pratiche di laboratorio e indossare guanti monouso da laboratorio senza polvere durante tutta la procedura di test.

- La gestione quotidiana di molti campioni e l'elevata sensibilità della tecnica LAMP possono, in assenza di precauzioni, generare risultati falsi positivi per contaminazione. Se possibile, l'estrazione pre-manipolazione della LAMP, post-LAMP e del DNA deve quindi essere eseguita in stanze separate. Indossare guanti monouso in ogni zona e cambiarli prima di spostarsi da una zona all'altra.
- Il test e i tappi sono monouso. Non riutilizzare. Non aprire le provette al termine del test.
- Non utilizzare il test se la linguetta di alluminio è aperta o danneggiata.
- Non utilizzare il kit in caso di rotture o perdite. In caso di danni alla sola confezione (senza rotture o perdite), il kit rimane utilizzabile.
- Proteggere il kit dalla luce.
- Centrifugare le provette prima di aprirle, aprendole una dopo l'altra e chiudendole bene tra una e l'altra per evitare qualsiasi contaminazione.
- Il CTRL+ contiene quantità significative di sequenze di DNA. Può quindi potenzialmente contaminare gli altri componenti del kit se non vengono seguite le buone pratiche di biologia molecolare. Per limitare questo rischio di contaminazione, si consiglia di conservare questo componente all'esterno del kit alla prima apertura del kit.
- I controlli negativi e positivi sono inclusi nel kit. Il test negativo serve come segno di una possibile contaminazione. Il controllo positivo serve a verificare la validità dei reagenti e del lettore. Ogni laboratorio deve definire il proprio sistema di controllo della qualità.
- Smaltire le parti sporche o i componenti vuoti del kit in un bidone della spazzatura adatto ai rifiuti biologici. Considerare la normativa locale sullo smaltimento biologico dei rifiuti.
- Il dispositivo contiene materiale di origine batterica o animale e deve essere maneggiato con cautela.
- Se, in relazione all'uso di BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria, si è verificato un decesso o un grave deterioramento della salute, ciò deve essere segnalato al produttore e all'autorità competente del proprio paese. In caso di dubbio, segnalarlo.
- Scheda di sicurezza disponibile su richiesta. Il riepilogo della sicurezza e delle prestazioni sarà disponibile online su Eudamed.

6. CONSIGLI D'USO

In considerazione del rischio significativo di contaminazione dell'apparecchiatura e dell'aria ambiente associato all'amplificazione isoterma, è importante osservare attentamente le raccomandazioni e le precauzioni indicate nelle istruzioni per l'uso.

- Assicurarsi sempre che i tappi delle provette di reazione siano ben chiusi prima di iniziare un protocollo di riscaldamento nell'incubatrice utilizzata.
- Al termine del programma, quando le strisce vengono rimosse dal lettore, posizionare le dita sui tappi per evitare che si aprano durante la rimozione. Togliere immediatamente dal lettore i guanti utilizzati per rimuovere le strisce usate avvolgendovi le microprovette prima di smaltirle nell'apposito cestino dei rifiuti.
- Pulire quotidianamente l'apparecchiatura e la postazione di lavoro con gli appositi detergenti e pulire mensilmente con isopropanolo secondo il protocollo fornito da Biosynex (fare riferimento al manuale d'uso del lettore BIOSYNEX AMPLIFLASH o dello strumento utilizzato).

7. STOCCAGGIO DEL KIT

Il kit viene spedito congelato. I componenti del kit devono arrivare congelati. Al ricevimento, conservare il kit a una temperatura pari o inferiore a -20°C . In queste condizioni, i reagenti sono stabili fino alla data di scadenza. Non utilizzare il kit né alcuno dei suoi componenti dopo la data di scadenza. Proteggere il kit e i reagenti dalla luce diretta. Non scongelare i componenti del kit se non quando necessario e solo prima dell'uso. I tubi di controllo possono essere conservati tra $+2^{\circ}\text{C}$ e $+8^{\circ}\text{C}$ fino alla data di scadenza. Nota: i tubi di controllo positivo e negativo possono subire fino a 5 cicli di congelamento e scongelamento.

8. RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Il DNA dei campioni di sangue intero raccolti in provette con EDTA o eparina, estratto con il kit BIOSYNEX Blood Lysis, deve essere utilizzato con il kit BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria.

I campioni di sangue intero possono essere prelevati immediatamente con BIOSYNEX Blood Lysis oppure entro 7 ore se conservati a temperatura ambiente ($+21^{\circ}\text{C}$ - $+30^{\circ}\text{C}$) o a $+4^{\circ}\text{C}$ per 5 giorni.

Evitare ripetuti cicli di congelamento/scongelamento del campione (è consentito un massimo di 1 ciclo).

I campioni trattati con il kit BIOSYNEX Blood Lysis (fase 1 della procedura di analisi descritta nella sezione 9) possono essere analizzati immediatamente o entro 7 giorni se conservati a una temperatura compresa tra $+4^{\circ}\text{C}$ e $+30^{\circ}\text{C}$ oppure a una temperatura compresa tra -20°C e -80°C per 3 mesi.

I campioni miscelati con il tampone di attivazione (fase 2 della procedura di prova descritta nella sezione 9) sono stabili per 2 ore a temperatura ambiente ($+21^{\circ}\text{C}$ - $+30^{\circ}\text{C}$). Trascorso questo tempo, riavviare la procedura di test.

Il trasporto di campioni clinici deve essere conforme alle normative locali per il trasporto di agenti infettivi.

9. PROCEDURA DEL TEST

Per eseguire un test o un controllo, prendi un tubo di tampone di attivazione, una striscia a 4 pozzetti e i tappi. L'uso dello strumento per eseguire un test è descritto nell'allegato, al paragrafo 15 di queste istruzioni per l'uso.

1. Lisi dei campioni e rilascio del DNA

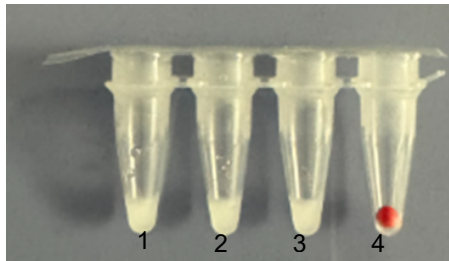
Per la lisi rapida dei campioni con il kit per l'analisi del sangue BIOSYNEX, fare riferimento al foglietto illustrativo di questo kit, 3150077 di riferimento. I controlli positivo e negativo sono pronti all'uso e non richiedono alcuna fase di estrazione preliminare.

2. Preparazione della miscela di attivazione

- Aprire la provetta del tampone di attivazione.
- Utilizzando una micropipetta dotata di un puntale filtrante, posto 10µL di lisato ottenuto nella fase precedente nel 30µL di tampone di attivazione. Omogeneizzare con pipettaggio su e giù o agitando la provetta.

3. Aggiunta della miscela di reazione alla striscia

- Estrarre la striscia contenente i 4 microtubi senza separarli e lasciarla scongelare.
- Orientare i pozzetti della striscia in base alla posizione dei polarizzatori (lingua a sinistra e pozzetto contenente la perlina rossa a destra); pozzetto #1 è il pozzetto prossimale.
- Togliere il foglio di alluminio e gettarlo via.



Microprovette da sinistra a destra: 1= PAN; 2= FALCI; 3= Controllo interno; 4= perlina rossa (Non aggiungere nulla al pozzetto)

- Pipettaggio 10µL di miscela di reazione con una micropipetta e puntale filtrato e dispensare i 10µL in ogni microprovetta della striscia.
 - Omogeneizzare per pipettaggio.
 - Chiudere i pozzetti con gli appositi tappi.
 - Tenere la striscia verticalmente e picchiettarla su una superficie piana per rimuovere eventuali bolle d'aria.
 - Senza indugio, posizionare la striscia nel lettore AMPLIFLASH nella direzione corretta.
- Il pozzetto contenente la perlina rossa permette di mantenere il corretto orientamento della striscia.

Note 1: I controlli forniti consentono di eseguire 5 reazioni.

10. ANALISI DEI DATI E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

C. Criteri di convalida dello studio

Nel kit sono forniti un controllo positivo e un controllo negativo. Ogni laboratorio deve definire la frequenza dei controlli di qualità che applica. I risultati attesi con ciascun controllo sono definiti nella tabella seguente:

Controllo	Target		
	PAN	FALCI	RNaseP
Controllo positivo	+	+	+
Controllo negativo	-	-	-

D. Interpretazione qualitativa (positiva o negativa)

L'interpretazione dei campioni di sangue è riportata nella tabella seguente:

Target			Interpretazione
PAN	FALCI	RNaseP	
+	+	+	Paziente con <i>Plasmodium falciparum</i> DNA specifico e può anche avere uno stato di co-infezione
+	+	-	
+	-	+	Paziente con DNA di <i>Plasmodium spp</i> diverso da quello di <i>P. Falciparum</i>
+	-	-	

-	-	+	Paziente senza DNA specifico di una qualsiasi delle 5 specie di <i>Plasmodium spp</i> rilevabili
-	-	-	Risultato non valido: scarsa qualità del campione, inibizione della reazione PCR o problemi durante l'esecuzione o il processo di test: eseguire un nuovo test o ricampionare

+ Risultati positivi - Risultati negativi

Nota: Quando si utilizza il lettore AMPLIFLASH, i pozzetti nelle posizioni 1, 2 e 3 possono apparire arancioni nel software Ampliflash della serie Gene o con il pulsante "!" pittogramma sul lettore. In questo caso, il test non è valido. Ripetere il test con un nuovo campione. Le posizioni da 5 a 8 del lettore non ospitano provette; quindi, un risultato non valido corrisponde al normale funzionamento.

11. PRESTAZIONI

• Sensibilità analitica

La sensibilità analitica della reazione di amplificazione isoterma del kit è stata determinata a partire dal DNA quantificato del 1° Standard Internazionale OMS per *Plasmodium falciparum* e dal DNA genomico quantificato di *Plasmodium falciparum* dell'ATCC (American Type Culture Collection). Il limite di rilevabilità (LoD) del kit BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria è definito come la concentrazione, in numero di copie/μL, che può essere rilevata almeno al 95%, su un campione specifico di DNA di *Plasmodium spp*. Ogni diluizione è stata testata 24 volte. I risultati determinati statisticamente sono presentati nella tabella seguente:

Target	Lod ₉₅	
	<i>P. falciparum</i> Standard dell'OMS	<i>P. falciparum</i> gDNA ATCC
FALCI	3,09 UI/reazione (0,127 UI/μL)	2,75 copie/reazione (1,1 copie/μL)
PAN	3,19 UI/reazione (0,123 UI/μL)	2,3 copie/reazione (0,92 copie/μL)

• Specificità analitica

La progettazione degli oligonucleotidi è stata convalidata *in silico* mediante allineamento BLAST. Il confronto delle sequenze ottenute mostra una rilevazione specifica del BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria sul suo target *Plasmodium spp*.

Nessun primer rileva il DNA diverso da quello mirato *Plasmodium spp*.

Reattività incrociata

Un pannello di 99 campioni di DNA e 42 campioni di RNA provenienti da una biobanca elencata nelle tabelle seguenti sono stati analizzati con il kit BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria. Per tutti questi campioni non è stata osservata alcuna amplificazione dei target (PAN o FALCI).

DNA	
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
Adenovirus 41	Herpes simplex 1
Adenovirus	Herpes simplex 2
<i>Aspergillus fumigatus</i>	HHV-6
<i>Bacillus cereus</i>	HHV-8
<i>Bartonella henselae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae (ndm-1)</i>
<i>Bartonella quintana</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
Virus BK	<i>Leishmania chagasi</i>
<i>Bordetella holmesii</i>	<i>Leishmania infantum</i>
<i>Borrelia afzelii</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Borrelia burgdorferi</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>
<i>Borrelia garinii</i>	<i>Mycobacterium avium</i>
<i>Brucella abortus</i>	<i>Mycobacterium intracellulare</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Mycobacterium kansasii</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>Candida auris</i>	<i>Mycobacterium ulcerans</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i>
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>
<i>Chlamydophila psittaci</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Neisseria meningitidis sg a</i>
<i>Coccidioides immitis</i>	<i>Neisseria meningitidis sg b</i>
<i>Coxiella burnetii</i>	Papillomavirus di tipo 16
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Papillomavirus di tipo 18
Citomegalovirus	<i>Parvovirus b19 (plasmide)</i>
<i>Enterococcus faecalis (vanb)</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
<i>Enterococcus faecium (vana)</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
Virus di Epstein-Barr	<i>Aeromonas caviae</i>

<i>Escherichia coli (eaec)</i>	<i>Aeromonas dhakensis</i>
<i>Escherichia coli (eiec)</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>
<i>Escherichia coli (epec)</i>	<i>Aeromonas veronii</i>
<i>Escherichia coli (etec)</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>
<i>Escherichia coli (vtec)</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Rickettsia conorii</i>	<i>Shigella boydii</i>
<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Salmonella typhi</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Shigella flexneri</i>	<i>Campylobacter upsaliensis</i>
<i>Stafilococco aureo (mecA+)</i>	<i>Plesiomonas shigelloides</i>
<i>Stafilococco aureo (mecA-)</i>	<i>Campylobacter coli</i>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli o111/nm</i>
<i>Toxoplasma gondii</i>	<i>Feto di Campylobacter</i>
<i>Treponema pallidum</i>	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>
<i>Trichomonas vaginalis</i>	Amplirun adenovirus 41
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Adenovirus tipo 40 (specie f) (ceppo: dugan)
<i>Ureaplasma parvum</i>	Adenovirus di tipo 04 (specie e)
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	Adenovirus tipo 20 (specie d)
<i>Virus della varicella-zoster</i>	Adenovirus di tipo 11 (specie b)
<i>Francisella tularensis</i>	Adenovirus tipo 02 (specie c)
<i>Gardnerella vaginalis</i>	Adenovirus tipo 31 (specie a)
<i>Haemophilus ducreyi</i>	-
<i>Haemophilus influenzae</i>	-

RNA		
Coronavirus oc43	Rotavirus	Parainfluenza 2
Coronavirus 229-e	Rosolia	Parainfluenza 3
Coronavirus sars (2003)	SARS-CoV-2	Parainfluenza 4 a
Coronavirus nl63	Virus dell'encefalite trasmessa dalle zecche	Virus respiratorio sinciziale (sottotipo a)
Coxsackie a6	Parainfluenza umana 1	Virus respiratorio sinciziale (sottotipo b)
Coxsackie b1	Influenza a h1	Virus del Nilo occidentale
Coxsackie b5	Influenza a h3	Virus della febbre gialla
Virus dengue 1	Influenza a h5	Virus Zika (lignaggio asiatico)
Virus dengue 2	Influenza b	Virus zika
Virus dengue 3	Morbillo	Virus chikungunya
Virus dengue 4	Mers coronavirus	Norovirus g1
Echovirus 5	Parotite	Norovirus g2
Enterovirus 68	Nuova influenza a h1n1	Sapovirus
Rhinovirus	Parainfluenza 1	Astrovirus

• Studio delle interferenze

La presenza di inibitori della PCR nel campione può indurre un'interferenza positiva o negativa sui risultati del test. I campioni di sangue intero, che di solito vengono raccolti in provette EDTA classiche (campioni di sangue EDTA utilizzati per sviluppare e convalidare il prototipo BIOSYNEX Blood Lysis = Lisi del sangue), in alcuni casi possono essere raccolti in provette di eparina e l'eparina potrebbe essere una fonte di inibizione. Anche il sangue intero con parametri ematologici e biochimici anomali potrebbe essere una fonte di inibizione.

I test di interferenza dell'eparina sul kit BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria sono stati eseguiti utilizzando campioni di sangue negativi addizionati o meno con campione di sangue positivo di *P. falciparum* dall'OMS STD. Non è stata dimostrata alcuna interferenza positiva o negativa.

I test di interferenza del sangue intero con parametri ematologici o biochimici anomali sul kit BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria sono stati eseguiti utilizzando campioni di sangue negativi addizionati o non quantificati con *P. falciparum* gDNA dall'ATCC. Non è stata dimostrata alcuna interferenza positiva o negativa per i seguenti parametri ematologici e biochimici:

- Bilirubina \leq 158,6 mg/L
- Trigliceridi \leq 8,29 g/L
- Leucociti \leq 13.880 cellule/m³
- Eritrociti \leq 6.300.000 cellule/m³

Ad oggi, i nostri studi clinici su campioni con sangue non hanno evidenziato alcuna interferenza sui risultati.

• **Precisione**

Ripetibilità e riproducibilità

I dati di ripetibilità per il kit BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria sono stati determinati su test replicati utilizzando campioni di sangue positivi e negativi, ciascuno eseguito 30 volte. Poiché non è stato effettuato alcun campione di sangue positivo di *P. knowlesi*, i risultati per questa specie sono stati ottenuti con la diluizione del DNA genomico purificato da BEI Resources. È stato mostrato un accordo del 100% su ciascuna ipotesi.

Risultati (min:sec)					
Campione:		PAN		FALCI	
		Media	DS	Media	DS
Campione negativo	-	N/A	-	N/A	-
<i>Plasmodium falciparum</i>	+++	03:18	00:10	04:08	00:17
	++	04:49	00:13	06:17	01:18
	+	06:11	00:27	07:33	00:36
<i>Plasmodium malariae</i>	++	07:31	00:20	N/A	-
	+	10:19	00:53	N/A	-
<i>Plasmodium ovale</i>	+++	04:50	00:09	N/A	-
	++	05:24	00:30	N/A	-
	+	07:59	00:37	N/A	-
<i>Plasmodium vivax</i>	++	06:01	00:12	N/A	-
	+	07:56	00:24	N/A	-
<i>Plasmodium knowlesi</i>	+++	05:32	00:17	N/A	-
	++	06:47	00:40	N/A	-
	+	06:53	00:55	N/A	-

I dati di riproducibilità tra giorni, tra lotti, tra laboratori e tra operatori per il kit BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria sono stati determinati su test replicati da campioni di sangue o DNA genomico positivi e negativi. È stato mostrato un accordo del 100% su ciascuna ipotesi.

Variabilità tra giorni, operatori, lotti e luoghi:

Sono stati testati controlli positivi e negativi. Sono state testate due diluizioni di gDNA dall'ATCC: 1 mezzo (++) a 100 copie/μL e 1 basso (+) a 2 copie/μL e due diluizioni dello standard OMS: 1 alto (+++) a 25000 UI/reazione e 1 basso (+) a 10 UI/reazione). È stato testato anche il campione negativo.

Variabilità tra giorni

Ogni campione viene testato sullo stesso lotto in duplice copia ogni giorno dallo stesso tecnico, per 5 giorni.

Variabilità tra operatori

Ogni campione viene testato sullo stesso lotto in duplice copia da due tecnici.

Variabilità tra lotti

Ogni campione viene testato in duplice copia su tre lotti.

Variabilità tra luoghi

Ogni campione viene testato in doppio nel primo luogo e in doppio nel secondo luogo.

PAN	CTRL+		Ctrl+-		ATCC gDNA ++		ATCC gDNA +		Standard OMS +++		Standard OMS +		Campione negativo	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS
Variabilità tra giorni	03:59	00:20	N/A	-	03:56	00:04	05:32	00:20	04:00	00:32	06:46	02:15	N/A	-
Variabilità tra operatori	03:42	00:10	N/A	-	04:02	00:10	07:25	01:24	04:05	00:42	06:22	00:17	N/A	-
Variabilità tra lotti	04:15	00:18	N/A	-	04:11	00:24	06:38	01:22	03:21	00:12	06:01	00:02	N/A	-
Variabilità tra luoghi	03:55	00:07	N/A	-	04:17	00:24	05:12	00:10	03:35	00:07	05:52	00:24	N/A	-

FALCI	CTRL+		Ctrl+-		ATCC gDNA ++		ATCC gDNA +		Standard OMS +++		Standard OMS +		Campione negativo	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS
Variabilità tra giorni	04:35	00:12	N/A	-	04:48	00:05	06:47	00:49	04:34	00:13	08:16	01:17	N/A	-
Variabilità tra operatori	04:30	00:21	N/A	-	04:50	00:00	07:30	01:17	04:42	00:17	07:27	00:17	N/A	-
Variabilità tra lotti	04:50	00:32	N/A	-	04:51	00:58	06:56	00:59	03:46	00:40	07:08	00:59	N/A	-
Variabilità tra luoghi	04:47	00:17	N/A	-	05:05	00:21	07:15	01:03	04:27	00:31	06:57	00:17	N/A	-
RNaseP - Controllo interno	CTRL+		Ctrl+-		ATCC gDNA ++		ATCC gDNA +		Standard OMS +++		Standard OMS +		Campione negativo	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS
Variabilità tra giorni	05:35	00:31	N/A	-	N/A	-	N/A	-	07:48	01:12	07:47	01:48	07:04	01:32
Variabilità tra operatori	05:37	00:10	N/A	-	N/A	-	N/A	-	06:20	00:07	06:17	00:03	06:15	00:07
Variabilità tra lotti	05:36	00:22	N/A	-	N/A	-	N/A	-	06:48	00:45	07:13	00:51	06:43	00:23
Variabilità tra luoghi	06:05	00:00	N/A	-	N/A	-	N/A	-	07:22	00:45	06:45	00:07	06:32	00:17

• Prestazioni cliniche

Le prestazioni cliniche del kit BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria sono state valutate su campioni clinici provenienti da diversi studi:

- Studio su campioni negativi di banche del sangue (Studio 1)
- Studio su campioni positivi e negativi provenienti da un centro ospedaliero (Studio 2)
- Studio su campioni positivi e negativi provenienti da un ospedale africano (Studio 3)

Campioni totali di tutti gli studi per campioni trattati con il kit BIOSYNEX Blood Lysis:

	Numero di campioni	Qualificazione relativa alla malaria	
		Campioni negativi	Campioni positivi (pozzetto PAN)
Studio 1:	30	30	0
Studio 2:	47	10	37
Studio 3:	56	20	36
Totale	133	60	73

Campioni con distinzione tra *P. falciparum* e altre specie di *Plasmodium*:

	Numero di campioni	Qualificazione relativa alla malaria			
		Campioni negativi	<i>P. falciparum</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. ovale</i>
Studio 1:	30	30	0	0	0
Studio 2:	47	10	33	2	2
Studio 3:	55	20	35*	0	0
Totale	132	60	68	2	2

*Un campione è stato qualificato positivo per *Plasmodium spp* e negativo per *Plasmodium falciparum*, pertanto non è stato considerato in questa tabella (qualificazione sconosciuta contro le specie malariche).

Quindi, i dati di tutti gli studi vengono uniti.

Di seguito sono presentati i risultati ottenuti con i 133 campioni di sangue di tutti gli studi.

La tabella di contingenza seguente mostra le prestazioni complessive su campioni di sangue intero.

BIOSYNEX AMPLIFLASH Malaria		Qualificazione del campione	
		Positivo	Negativo
	Positivo	73	0
	Negativo	0	60

Sensibilità: 100% (95%CI: 95.07-100%)

Specificità: 100% (95%CI: 94.04-100%)

Precisione: 100% (95%CI: 97.26-100%)

(CI: Intervallo di confidenza)

12. LIMITAZIONI

1. La mancata osservanza di qualsiasi indicazione delle istruzioni per l'uso può influire negativamente sulle prestazioni del test e/o invalidare il risultato del test.
2. Non si può escludere la possibilità di ottenere risultati falsi positivi o falsi negativi (ad esempio in caso di contaminazione accidentale, in caso di scarsa qualità del campione o nel caso in cui la procedura di test non venga seguita correttamente). Come per tutti i test diagnostici, i risultati devono essere considerati insieme ad altre informazioni cliniche a disposizione del medico.

13. LETTERATURA

1-Relazione di sorveglianza dell'ECDC: Malaria, Rapporto epidemiologico annuale per il 2021.
<https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/malaria-annual-epidemiological-report-2021>

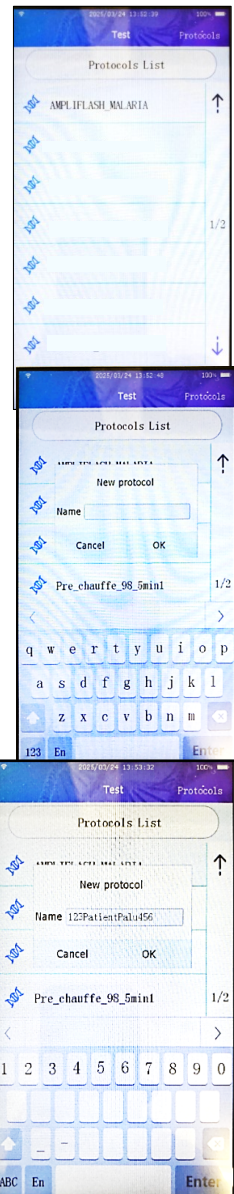
14. STORIA

Versione di registrazione	Paragrafo modificato	Modifica dettagli
V1	Tutti	Creazione del documento.

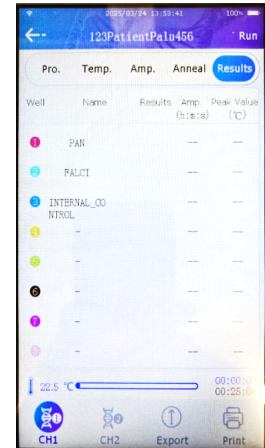
15. ALLEGATO §9 PROTOCOLLO DI TEST

Procedura alternativa senza l'uso del computer.

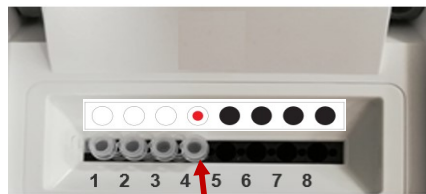
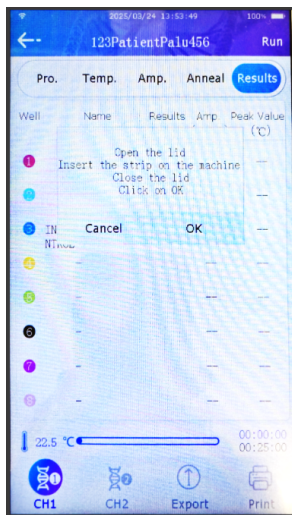
1. Scollegare la connessione USB tra lo strumento AMPLIFLASH Reader e il computer e avviare lo strumento utilizzando il pulsante ON/OFF sul lato sinistro. Si apre la schermata con l'elenco dei protocolli memorizzati sullo strumento.
2. Selezionare il protocollo "AMPLIFLASH Malaria" sul touch screen. Si apre la finestra "Nuovo protocollo".
3. Inserire manualmente l'ID paziente nella riga "Nome" e premere "OK".



- Viene visualizzato l'elenco dei target rilevati dal test. Selezionare "Esegui" in alto a destra dello schermo.



- Sullo schermo viene visualizzato un elenco di istruzioni corrispondenti a "Aprire il coperchio", "Inserire la striscia nella macchina", "Chiudere il coperchio" e "Cliccare su OK". Inserire la striscia



Perlina rossa

reattiva con l'orientamento corretto, chiudere il coperchio e selezionare "OK".

- I risultati possono essere osservati in tempo reale nelle schede "Amp." e "Risultati", consentendo di vedere in tempo reale l'aspetto delle curve di amplificazione e la rilevazione o meno dei target nei pozzetti, nonché il tempo di rilevamento del segnale positivo.
- Al termine dell'esecuzione, i risultati possono essere recuperati in formato .csv utilizzando una chiavetta USB inserita nella porta sul lato sinistro dello strumento e selezionando "Esportare" in basso a destra dello schermo. È possibile recuperare anche i vecchi test, compresi quelli effettuati tramite il software di controllo, andando nella scheda "Dati" in fondo alla schermata iniziale. Tutti i test effettuati sullo strumento vengono registrati lì e possono essere recuperati anche su una chiavetta USB secondo la stessa procedura. Si noti che l'esportazione dei risultati dei test dallo schermo, uno per uno, consente di recuperarli in formato foglio di calcolo, mentre l'esportazione di più risultati insieme dalla memoria interna sarà in formato "testo".