

Instrucciones de uso

RealStar[®] Chagas PCR Kit 1.0

04/2022 ES

RealStar[®]

Chagas PCR Kit 1.0

Para utilizar con

Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)
ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)
Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)



611013



96



04 2022



altona Diagnostics GmbH • Mörkenstr. 12 • D-22767 Hamburg

Contenido

1.	Uso indicado.....	6
2.	Componentes del kit.....	6
3.	Almacenamiento	6
4.	Material y dispositivos necesarios pero no proporcionados	7
5.	Información general.....	8
6.	Descripción del producto.....	10
6.1	Instrumentos PCR en tiempo real.....	11
7.	Advertencias y precauciones	12
8.	Procedimiento	13
8.1	Preparación de las muestras	13
8.2	Preparación del Master Mix	14
8.3	Preparación de la reacción	16
9.	Programación de los instrumentos PCR en tiempo real.....	17
9.1	Configuración	17
9.2	Detectores de fluorescencia (colorantes).....	17
9.3	Perfil de temperatura y detección de fluorescencia	19
10.	Análisis de datos.....	19
10.1	Validez de las series de pruebas diagnósticas	21
10.1.1	Serie válida de pruebas diagnósticas (cualitativa).....	21
10.1.2	Serie no válida de pruebas diagnósticas (cualitativa).....	21
10.2	Interpretación de los resultados	22
10.2.1	Análisis cualitativo.....	22
11.	Evaluación de rendimiento	22

11.1	Sensibilidad analítica	23
11.2	Especificidad analítica.....	24
11.3	Precisión	25
11.4	Evaluación del diagnóstico.....	26
12.	Limitaciones	27
13.	Control de calidad.....	28
14.	Asistencia técnica.....	28
15.	Bibliografía	28
16.	Marcas comerciales y aviso legal.....	29
17.	Explicación de los símbolos	30

1. Uso indicado

El RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 es un test diagnóstico *in vitro* basado en tecnología PCR en tiempo real para la detección cualitativa de ADN específico de *Trypanosoma cruzi*.

2. Componentes del kit

Tabla 1: Componentes del kit

Color de la tapa	Componente	Número de viales	Volumen [µl/vial]
Azul	Master A	8	60
Violeta	Master B	8	180
Verde	Internal Control	1	1000
Rojo	Positive Control	1	250
Blanco	Water (PCR grade)	1	500

Internal Control = control interno

Positive Control = control positivo

Water (PCR grade) = agua indicada para PCR

3. Almacenamiento

- El RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 se envía en hielo seco. Los componentes del kit deberían llegar congelados. Si uno o más componentes no estuvieran congelados en el momento de la recepción, o si la integridad de los tubos se ha puesto en peligro durante el envío, póngase en contacto con Altona Diagnostics GmbH para obtener ayuda.
- Todos los componentes deben almacenarse entre -25 °C y -15 °C tras su llegada.
- Debe evitarse la descongelación y congelación reiterada de los reactivos Master (más de dos veces), ya que podría repercutir en el rendimiento del producto. Los reactivos deben congelarse en alícuotas si se van a utilizar de manera intermitente.

- El almacenamiento entre +2 °C y +8 °C no debe superar un período de 2 horas.
- Proteja Master A y Master B de la luz.

4. Material y dispositivos necesarios pero no proporcionados

- Instrumento PCR en tiempo real apropiado (consulte el capítulo 6.1 Instrumentos PCR en tiempo real)
- Sistema o kit de extracción de ácido nucleico apropiado (consulte el capítulo 8.1 Preparación de las muestras)
- Centrífuga de sobremesa con un rotor para tubos de reacción de 2 ml
- Centrífuga con un rotor para microplacas, si se utilizan placas de reacción de 96 pocillos
- Agitador vortex
- Placas de reacción de 96 pocillos o tubos de reacción apropiados con su material de cierre (óptico) correspondiente
- Pipetas (ajustables)
- Puntas de pipetas con filtros (desechables)
- Guantes sin polvo (desechables)

NOTA



Asegúrese de que todos los instrumentos utilizados se instalen, se calibren, se comprueben y se mantengan conforme a las instrucciones y recomendaciones del fabricante.

NOTA



Se recomienda encarecidamente utilizar el rotor de 72 pocillos con los tubos de reacción de 0,1 ml adecuados, si se utiliza el Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research) o el Rotor-Gene® Q 5/6 plex (QIAGEN).

5. Información general

La enfermedad de Chagas es una infección parasitaria transmitida por vectores provocada por el *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). El parásito protozoario pertenece al orden Trypanosomatida, que engloba parásitos obligados unicelulares y flagelados. El mal de Chagas es endémico en América del Sur y Central pero se estima que existen unos 6 o 7 millones de personas infectadas en todo el mundo [1]. El protozoo se transmite a humanos a raíz del contacto con heces de insectos triatomíneos infectados, que se alimentan durante la noche mientras el huésped duerme. Las infecciones también pueden ocasionarse de forma oral [2], congénita [3] o mediante transfusiones de sangre contaminada o trasplantes de órganos [4,5]. La enfermedad de Chagas se manifiesta en dos fases: aguda y crónica. La fase aguda se prolonga durante alrededor de dos meses y, normalmente, se trata de una enfermedad febril autolimitada y asintomática que se caracteriza por una alta parasitemia en la sangre circulante. En caso de presentarse indicios o síntomas, estos suelen ser leves y pueden incluir: inflamación en el lugar de la infección, fiebre, fatiga, sarpullido, inflamación de párpados (signo de Romaña), dolor de cabeza, náuseas, diarrea o vómitos, inflamación de las glándulas, hígado o bazo agrandado, etc. [6]. Si la fase aguda no se diagnostica y no se trata, la infección persiste y puede avanzar a la fase crónica, que puede prolongarse toda la vida sin ocasionar síntomas, o bien evolucionar en una manifestación clínica, lo cual ocurre en el 10-30 % de los pacientes. Los signos y síntomas de la fase crónica de la enfermedad de Chagas pueden producirse entre 10 y 20 años después de la infección inicial, o bien no llegar a producirse nunca. Sin embargo, en casos graves, los indicios y síntomas de la enfermedad de Chagas pueden incluir: ritmo cardíaco irregular, insuficiencia cardíaca congestiva, paro cardíaco repentino, dificultad al tragar a causa de esófago agrandado, dolor abdominal o estreñimiento debido a colon agrandado [6]. No existe ningún criterio de referencia para diagnosticar la enfermedad de Chagas. Durante la fase aguda de la enfermedad, la carga de parásitos en la sangre circulante es elevada, por lo que la enfermedad de Chagas puede diagnosticarse examinando frotis de sangre con tinción de Giemsa a través del microscopio [7]. Actualmente se utiliza la combinación de tres ensayos PCR en tiempo real diferentes para obtener la detección molecular del ADN de *T. cruzi* en los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades

(CDC, por sus siglas en inglés). El diagnóstico molecular de la enfermedad de Chagas se realiza en caso de sospecha de transmisión a través de una transfusión de sangre o un trasplante, así como en caso de Chagas congénito. Esto también puede resultar útil para la detección temprana de *T. cruzi* en donaciones de sangre y receptores de órganos por trasplante a partir de donantes con enfermedad de Chagas crónica asintomática [8].

- [1] Organización Mundial de la Salud (OMS) Chagas disease (American trypanosomiasis) Ginebra: OMS, 2010.
- [2] Nobrega AA, García MH, Tatto E, Obara MT, Costa E, Sobel J, et al. Oral transmission of Chagas disease by consumption of acai palm fruit, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2009;15:653-5.
- [3] Gürtler RE, Segura EL, Cohen JE Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* infection in Argentina. *Emerg Infect Dis.* 2003;9:29-32.
- [4] Tropical Disease Research, Organización Mundial de la Salud. Insect vectors and human health. Report of the scientific working group meeting. Geneva. Organization. 2003;23-5.
- [5] Grant IH, Gold J, Wittner M, Tanowitz H, Nathan C, Mayer K, et al. Transfusion-associated acute Chagas disease acquired in the United States. *Ann Intern Med.* 1989;111:849-51.
- [6] Organización Mundial de la Salud (OMS) Chagas disease (American trypanosomiasis) (01/02/2018): Fact-Sheets –Chagas disease (American trypanosomiasis). [http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). Revisado el 02 de octubre de 2018.
- [7] Bonomo, R. y Salata, R. (2000). American Trypanosomiasis (Chagas's Disease: *Trypanosoma cruzi*). En R. Behrman, R. Kliegman, & H. Jenson, (Eds.), *Nelson Textbook of Pediatrics*. 16ª edición (pp. 1046-1048). Filadelfia: W. B. Saunders.
- [8] Alonso-Padilla J, Gallego M, Schijman AG, Gascon J. (2017). Molecular diagnostics for Chagas disease: up to date and novel methodologies. *Expert Rev Mol Diagn* 17(7):699-710.

6. Descripción del producto

El RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 es un test diagnóstico *in vitro* basado en tecnología PCR en tiempo real para la detección cualitativa de ADN específico de *Trypanosoma cruzi*.

El test incluye un sistema de amplificación heterólogo [Internal Control (control interno)] para identificar una posible inhibición de PCR y para confirmar la integridad de los reactivos del kit.

La tecnología de PCR en tiempo real utiliza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de secuencias objetivo específicas y sondas específicas de objetivos para la detección del ADN amplificado. Las sondas se marcan con fluoróforos reporter y quencher.

Las sondas específicas para el ADN de *T. cruzi* se marcan con el fluoróforo FAM™. La sonda específica para el Internal Control (control interno, IC) se marca con el fluoróforo JOE™.

El uso de sondas unidas a diferentes fluorocromos permite la detección paralela de ADN específico de *T. cruzi* y del Internal Control (control interno) en los canales de detección correspondientes del instrumento PCR en tiempo real.

La prueba consta de dos procesos en un solo ensayo de valoración de tubo:

- Amplificación de PCR del ADN objetivo y Internal Control (control interno)
- Detección simultánea de amplicones de PCR mediante sondas marcadas con fluoróforos

El RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 se compone de:

- Master A
- Master B
- Internal Control
- Positive Control
- Water (PCR grade)

Internal Control = control interno

Positive Control = control positivo

Water (PCR grade) = agua indicada para PCR

Master A y Master B contienen todos los componentes (tampón de PCR, ADN-polimerasa, sal magnésica, cebadores y sondas) para permitir la amplificación mediada por PCR y la detección de ADN específico de *T. cruzi* y el Internal Control (control interno) en una configuración de reacción.

6.1 Instrumentos PCR en tiempo real

El RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 se ha desarrollado y validado para usarse con los siguientes instrumentos PCR en tiempo real:

- Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
- VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)
- ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
- Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

7. Advertencias y precauciones

Lea detenidamente las instrucciones de uso antes de usar el producto.

- Antes del primer uso, compruebe el producto y sus componentes en cuanto a:
 - Integridad
 - Si el número, el tipo y el relleno están completos (consulte el capítulo 2. Componentes del kit)
 - Etiquetado correcto
 - Si ha llegado congelado
- El uso de este producto se limita a personal especialmente instruido y formado en las técnicas de PCR en tiempo real y en procedimientos de diagnóstico *in vitro*.
- Las muestras siempre se deben tratar como infecciosas y/o con peligro biológico de conformidad con los procedimientos de laboratorio seguros.
- Lleve guantes protectores desechables sin polvo, una bata de laboratorio y protección ocular al manipular las muestras.
- Evite la contaminación microbiana y por nucleasa (ADNasa/ARNasa) de las muestras y de los componentes del kit.
- Use siempre puntas de pipeta desechables libres de ADNasa/ARNasa con barreras para aerosol.
- Lleve siempre guantes protectores desechables sin polvo al manipular componentes del kit.
- Use zonas de trabajo separadas y segregadas para (i) la preparación de muestras, (ii) la configuración de la reacción y (iii) las actividades de amplificación/detección. El flujo de trabajo en el laboratorio debe realizarse de forma unidireccional. Lleve siempre guantes desechables en cada zona y cámbielos antes de entrar en una zona diferente.
- Dedique los suministros y el equipo a zonas de trabajo separadas y no los mueva de una zona a otra.
- Almacene el material positivo y/o potencialmente positivo separado de todos los demás componentes del kit.

- No abra las placas o los tubos de reacción después de la amplificación para evitar la contaminación con amplicones.
- Se pueden hacer pruebas de controles adicionales de conformidad con las directrices o los requisitos de las normativas locales, estatales y/o federales o de las organizaciones acreditadoras.
- No esterilice en autoclave los tubos de reacción después del PCR, ya que esto no degradará el ácido nucleico amplificado y se corre el riesgo de contaminar la zona de laboratorio.
- No use componentes del kit cuya fecha de caducidad haya expirado.
- Deseche la muestra y los residuos del ensayo de acuerdo con las normativas de seguridad locales.

8. Procedimiento

8.1 Preparación de las muestras

El ADN extraído es el material de partida para el RealStar® Chagas PCR Kit 1.0.

La calidad del ADN extraído afecta de forma significativa al rendimiento de todo el sistema del test. Se recomienda comprobar que el sistema utilizado para la extracción de ácido nucleico sea compatible con la tecnología de PCR en tiempo real. Los siguientes kits y sistemas son adecuados para la extracción de ácido nucleico:

- QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN)
- QIASymphony® (QIAGEN)
- NucliSENS® easyMAG® (bioMérieux)
- MagNA Pure 96 System (Roche)
- m2000sp (Abbott)
- Maxwell® 16 IVD Instrument (Promega)
- VERSANT® kPCR Molecular System SP (Siemens Healthcare)

También pueden resultar adecuados sistemas alternativos de extracción de ácido nucleico. La idoneidad del procedimiento de extracción de ácido nucleico para su uso con el RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 debe validarla el usuario.

Si se usa un procedimiento de preparación de la muestra basado en columna de centrifugación que incluya tampones de lavado con etanol, se recomienda encarecidamente realizar un paso de centrifugación adicional durante 1 minuto a aprox. 17 000 x g (~13 000 rpm) utilizando un nuevo tubo colector, antes de la elución del ácido nucleico.

PRECAUCIÓN



Si su sistema de preparación de pruebas utiliza tampones de lavado que contengan etanol, asegúrese de eliminar cualquier resto de etanol antes de la elución del ácido nucleico. El etanol es un potente inhibidor de la PCR en tiempo real.

PRECAUCIÓN



El uso de ARN portador es crucial para la eficiencia de la extracción y para la estabilidad del ácido nucleico extraído.

Si necesita más información o asistencia técnica en relación con el pretratamiento y la preparación de las muestras, póngase en contacto con nuestro soporte técnico (consulte el capítulo 14. Asistencia técnica).

8.2 Preparación del Master Mix

Todos los reactivos y muestras deben descongelarse del todo, mezclarse (pipeteando o aplicando un vortex suave) y centrifugarse brevemente antes de su uso.

El RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 contiene un Internal Control (control interno, IC) heterólogo, que puede utilizarse como control de inhibición de PCR o para controlar el procedimiento de preparación de muestras (extracción de ácido nucleico) y como control de inhibición de PCR.

- ▶ Si se utiliza el IC como control de inhibición de PCR, pero no como control para el procedimiento de preparación de las muestras, prepare el Master Mix de acuerdo con el siguiente esquema de pipeteo:

Número de reacciones (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Internal Control (control interno)	1 µl	12 µl
Volumen del Master Mix	21 µl	252 µl

- ▶ Si se utiliza el IC como control para el procedimiento de preparación de muestras y como control de inhibición de PCR, añada el IC durante el procedimiento de extracción de ácido nucleico.
- ▶ Sin importar qué método o sistema se utilice para la extracción de ácido nucleico, el IC **no debe** añadirse directamente al espécimen. El IC debe añadirse siempre a la mezcla de espécimen/Lysis Buffer (tampón de lisis). El volumen del IC que debe añadirse dependerá siempre y únicamente del volumen de la elución. Representa el 10 % del volumen de la elución. Por ejemplo, si se va a eluir el ácido nucleico en 60 µl de Elution Buffer (tampón de elución) o agua, deberán añadirse 6 µl del IC por muestra a la mezcla de espécimen/Lysis Buffer (tampón de lisis).
- ▶ Si se añadió el IC durante el procedimiento de preparación de las muestras, configure el Master Mix de acuerdo con el siguiente esquema de pipeteo:

Número de reacciones (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Volumen del Master Mix	20 µl	240 µl

PRECAUCIÓN

Si se añadió el IC [Internal Control (control interno)] durante el procedimiento de preparación de las muestras, al menos el control negativo debe incluir el IC.

PRECAUCIÓN

Sin importar qué método o sistema se utilice para la extracción de ácido nucleico, no añada nunca el IC directamente al espécimen.

8.3 Preparación de la reacción

- ▶ Pipeta 20 µl del Master Mix en cada pocillo necesario de una placa de reacción óptica de 96 pocillos apropiada o de un tubo de reacción óptico apropiado.
- ▶ Añada 10 µl de la muestra (eluido de la extracción de ácido nucleico) o 10 µl de los controles (control positivo o negativo).

Configuración de reacción	
Master Mix	20 µl
Muestra o control	10 µl
Volumen total	30 µl

- ▶ Asegúrese de que al menos se utilicen un control positivo y uno negativo por serie.
- ▶ Mezcle a fondo las mezclas y los controles con el Master Mix pipeteando hacia arriba y hacia abajo.
- ▶ Cierre la placa de reacción de 96 pocillos con las tapas adecuadas o una película adhesiva óptica y los tubos de reacción con las tapas adecuadas.
- ▶ Centrifugue la placa de 96 pocillos en una centrífuga con un rotor de placa de microtitulación durante 30 segundos a aproximadamente 1000 x g (~3000 rpm).

9. Programación de los instrumentos PCR en tiempo real

Para ver información básica en relación con la configuración y la programación de los diferentes instrumentos PCR en tiempo real, consulte el manual de usuario del instrumento en cuestión.

Para ver instrucciones de programación detalladas sobre el uso del RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 en instrumentos PCR en tiempo real específicos, póngase en contacto con nuestro soporte técnico (consulte el capítulo 14. Asistencia técnica).

9.1 Configuración

- Defina la siguiente configuración:

Configuración	
Volumen de reacción	30 µl
Índice de aumento	Predeterminado
Referencia pasiva	Ninguno

9.2 Detectores de fluorescencia (colorantes)

- Defina los detectores de fluorescencia (colorantes):

Objetivo	Nombre del detector	Marcador	Amortiguador de la fluorescencia
ADN específico de <i>T. cruzi</i>	<i>T. cruzi</i>	FAM™	(Ninguno)
Internal Control (control interno, IC)	IC	JOE™	(Ninguno)

En función del instrumento PCR en tiempo real, el canal de fluorescencia para detectar el fluoróforo JOE™ no se llama «JOE™», sino p. ej. «VIC™» o «Yellow». Consulte la tabla 2 para más información sobre el canal de fluorescencia que se debe seleccionar para la detección del Internal Control (control interno) incluido en el RealStar® Chagas PCR Kit 1.0.

Tabla 2: Canal de detección que se debe seleccionar para la detección del Internal Control (control interno) en función del instrumento PCR en tiempo real usado

Instrumento PCR en tiempo real	Canal de detección para el Internal Control (control interno)
Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems)	JOE™
Applied Biosystems™ 7500 Fast Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems)	JOE™
CFX96™ Real-Time PCR Detection System/ CFX96™ Dx System (Bio-Rad)	VIC™
CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System/ CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad)	VIC™
LightCycler® 480 Instrument II (Roche)	Ex: 498/533 nm; Em: 580 nm
Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)	JOE™
Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)	Yellow
Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)	Yellow
VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare)	JOE™

9.3 Perfil de temperatura y detección de fluorescencia

- Defina el perfil de temperatura y la adquisición de colorantes:

	Fase	Repeticiones de ciclo	Obtención	Temperatura [°C]	Tiempo [min:s]
Desnaturalización	Retención	1	-	95	2:00
Amplificación	Ciclo	45	-	95	0:15
			Sí	58	0:45
			-	72	0:15

10. Análisis de datos

Para ver información básica en relación con el análisis de datos en instrumentos PCR en tiempo real específicos, consulte el manual de usuario del instrumento en cuestión.

Para el análisis de los resultados de PCR en tiempo real, se debe establecer un umbral individualmente para cada canal de detección de fluorescencia. Para establecer el umbral, se debe arrastrar al área exponencial de la curva de amplificación mostrada en la figura 1. Para obtener más detalles sobre el establecimiento de un umbral, consulte el manual de usuario del instrumento PCR en tiempo real respectivo. El valor de ciclo de umbral (también llamado punto de cruce o ciclo de cuantificación) es el punto donde el umbral intersecta la curva de amplificación.

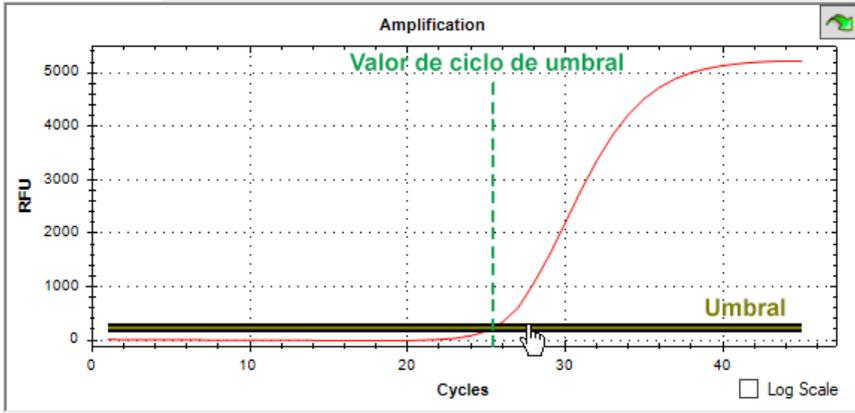


Figura 1: Establecimiento del umbral para un canal de detección de fluorescencia

Las señales positivas se representan mediante un número de ciclos. Cada valor numérico por encima de 0 y por debajo de 45 indica una señal positiva. En función del termociclador, el número de ciclos se indicará en C_t (ciclo de umbral), C_p (punto de cruce) o C_q (ciclo de cuantificación). Los resultados positivos normalmente presentan una curva sigmoidea (es decir, con forma de S). En cuanto a la representación específica de una señal positiva, consulte el manual de usuario del instrumento PCR en tiempo real respectivo.

Las señales negativas se representan, por ejemplo, como «N/A» (significa no disponible), ausencia de un valor numérico, indeterminado o ausencia de números digitales numéricos en general. En cuanto a la representación específica de una señal negativa, consulte el manual de usuario del instrumento PCR en tiempo real respectivo.

Para ver instrucciones detalladas sobre el análisis de los datos generados con el RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 en diferentes instrumentos PCR en tiempo real, póngase en contacto con nuestro soporte técnico (consulte el capítulo 14. Asistencia técnica).

10.1 Validez de las series de pruebas diagnósticas

10.1.1 Serie válida de pruebas diagnósticas (cualitativa)

Una serie de pruebas diagnósticas **cualitativa** es **válida** si se cumplen las siguientes condiciones de control:

ID de control	Canal de detección	
	FAM™	JOE™
Control positivo	$C_t < 37$	$C_t < 40$ o ningún C_t^*
Control negativo	Ningún C_t	$C_t < 40$

* La presencia o ausencia de una señal en el canal JOE™ no es relevante para la validez de la serie de pruebas.

10.1.2 Serie no válida de pruebas diagnósticas (cualitativa)

Una serie de pruebas diagnósticas **cualitativa** es **no válida** (i) si la serie no se ha completado o (ii) si no se cumple cualquiera de las condiciones de control para una serie de pruebas diagnósticas **válida**.

En caso de una serie de pruebas diagnósticas **no válida**, repita las pruebas utilizando el resto de ácidos nucleicos purificados o empiece de nuevo con las muestras originales.

10.2 Interpretación de los resultados

10.2.1 Análisis cualitativo

Canal de detección		Interpretación del resultado
FAM™	JOE™	
$C_t < 45^1$	Cualquier o ningún C_t^*	Se ha detectado ADN específico de <i>T. cruzi</i> .
Ningún C_t	$C_t < 40$	No se ha detectado ADN específico de <i>T. cruzi</i> . La muestra no contiene cantidades detectables de ADN específico de <i>T. cruzi</i> .
Ningún C_t	$C_t > 40$ o ningún C_t	Inhibición de PCR o fallo de reactivo. Repita la prueba con la muestra original o recoja y pruebe con una nueva muestra.

* No se requiere la detección del Internal Control (control interno) en el canal de detección de JOE™ para obtener resultados positivos en el canal de detección de FAM™. Una elevada carga de ADN de *T. cruzi* en la muestra puede dar lugar a una señal reducida o ausente del Internal Control (control interno).

¹ El *Trypanosoma rangeli* es una especie de *Trypanosoma* patógeno no humano que posee la misma prevalencia y ruta de transmisión que el *Trypanosoma cruzi*. A causa del diseño del ensayo, las muestras positivas en *Trypanosoma rangeli* generan un indicio positivo en el canal FAM™.

11. Evaluación de rendimiento

La evaluación del rendimiento del RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 se realiza mediante un producto PCR específico de *Trypanosoma cruzi*.

11.1 Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica del RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 se define como la concentración (copias/μl del eluido) de moléculas de ADN específico de *T. cruzi* que se pueden detectar con un índice de positividad del 95 %. La sensibilidad analítica se determinó mediante el análisis de una serie de dilución de un producto de PCR específico de *T. cruzi* que contiene la región objetivo (kDNA) usada por el RealStar® Chagas PCR Kit 1.0.

Tabla 3: Resultados de PCR utilizados para el cálculo de la sensibilidad analítica con respecto a la detección de ADN específico de *T. cruzi*

Conc. entrada [copias/μl]	Número de repeticiones	Número de positivos	Índice de éxito [%]
31,600	24	24	100,0
10,000	24	24	100,0
5,000	24	24	100,0
3,160	48	46	95,8
2,500	24	23	95,8
1,500	24	9	37,5
1,000	48	2	4,2
0,316	24	0	0,0
0,100	24	0	0,0
0,032	24	0	0,0
0,010	24	0	0,0
0,003	24	0	0,0

La sensibilidad analítica del RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 se determinó mediante análisis de probit:

- Para la detección de ADN específico de *T. cruzi*, la sensibilidad analítica es 2,8 copias/μl [intervalo de confianza (CI) del 95 %: 2,5-3,4 copias/μl]

11.2 Especificidad analítica

La especificidad analítica del RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 se asegura mediante la selección exhaustiva de los oligonucleótidos (cebadores y sondas). Los oligonucleótidos se verificaron mediante análisis de comparación de secuencias frente a las secuencias disponibles públicamente con el fin de asegurar la detección de todos los genotipos relevantes de *T. cruzi*.

La especificidad analítica del RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 se evaluó probando un panel de ARN/ADN genómicos extraído de patógenos relacionados con *T. cruzi* y otros patógenos que ocasionan síntomas similares al *T. cruzi*.

El RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 no mostró reacciones cruzadas con ninguno de los siguientes patógenos:

- Virus chikunguña
- Virus del dengue
- Virus de la inmunodeficiencia humana 1
- Virus de la gripe A
- Virus de la gripe B
- Virus del Nilo Occidental
- *Babesia microti*
- *Leishmania donovani*
- *Leishmania infantum*
- *Leishmania major*
- *Leishmania tropica*
- *Plasmodium falciparum*
- *Plasmodium vivax*
- *Plasmodium ovale*
- *Plasmodium malariae*
- *Plasmodium knowlesi*
- *Toxoplasma gondii*
- *Trypanosoma brucei*

11.3 Precisión

La precisión del RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 se determinó como variabilidad intraensayo (variabilidad dentro de un experimento), variabilidad interensayo (variabilidad entre diferentes experimentos) y variabilidad interlote (variabilidad entre diferentes lotes de producción). Se calculó la variabilidad total combinando los 3 análisis.

Los datos de variabilidad se expresan en términos de desviación estándar y coeficiente de variación basados en valores de ciclo de umbral (C_t). Se analizaron al menos 6 repeticiones por muestra para la variabilidad intraensayo y la variabilidad interensayo e interlote.

Tabla 4: Datos de precisión para la detección de ADN específico de *T. cruzi*

<i>T. cruzi</i>	Ciclo de umbral promedio (C_t)	Desviación estándar	Coficiente de variación [%]
Variabilidad intraensayo	26,82	0,11	0,40
Variabilidad interensayo	27,14	0,28	1,04
Variabilidad interlote	26,85	0,09	0,34
Variabilidad total	27,03	0,28	1,04

Tabla 5: Datos de precisión para la detección del Internal Control (control interno)

Internal Control (control interno)	Ciclo de umbral promedio (C_t)	Desviación estándar	Coficiente de variación [%]
Variabilidad intraensayo	24,91	0,08	0,31
Variabilidad interensayo	24,99	0,07	0,28
Variabilidad interlote	24,92	0,07	0,28
Variabilidad total	24,96	0,08	0,32

11.4 Evaluación del diagnóstico

El RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 se evaluó en un estudio comparativo con un ensayo de PCR kDNA convencional interno [basado en Norman *et al.* (2011) y Ramírez *et al.* (2015)]. Se analizaron retrospectivamente 55 muestras de sangre entera individuales.

El RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 se usó en una PCR kDNA convencional interna [basado en Norman *et al.* (2011) y Ramírez *et al.* (2015)] se usaron en combinación con el High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche).

Para el análisis cualitativo se excluyeron todas las muestras con un resultado no válido para uno o ambos ensayos.

Los resultados para las 55 muestras restantes figuran en la tabla 6.

Tabla 6: Resultados de la evaluación de la sensibilidad diagnóstica y la especificidad del RealStar® Chagas PCR Kit 1.0

		Ensayo de PCR kDNA convencional interno [basado en Norman <i>et al.</i> (2011) y Ramírez <i>et al.</i> (2015)]	
		POSITIVO	NEGATIVO
RealStar® Chagas PCR Kit 1.0	POSITIVO	27	0
	NEGATIVO	0	28

La sensibilidad y la especificidad de diagnóstico del RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 en comparación con el ensayo de PCR kDNA convencional interno [basado en Norman *et al.* (2011) y Ramírez *et al.* (2015)] para la detección de ADN de *Trypanosoma cruzi* en pacientes con enfermedad de Chagas aguda, reactiva o congénita fue del 100 % (intervalo de confianza: 87,23 % a 100 %) y del 100 % (intervalo de confianza: 87,66 % a 100 %), respectivamente.

12. Limitaciones

- Se requiere el cumplimiento estricto de las instrucciones de uso para obtener unos resultados óptimos.
- El uso de este producto se limita a personal especialmente instruido y formado en las técnicas de PCR en tiempo real y en procedimientos de diagnóstico *in vitro*.
- Unas buenas prácticas de laboratorio son esenciales para que este ensayo tenga un rendimiento adecuado. Deben extremarse las precauciones para preservar la pureza de los componentes del kit y las configuraciones de reacción. Todos los reactivos deben supervisarse atentamente para saber si tienen impurezas y contaminación. Los reactivos sospechosos deben descartarse.
- Es necesario realizar procedimientos correctos de recolección, transporte, almacenamiento y procesamiento para que este test tenga un rendimiento óptimo.
- Este ensayo no debe utilizarse directamente en la muestra. Deben emplearse métodos apropiados de extracción del ácido nucleico antes de utilizar este ensayo.
- La presencia de inhibidores de PCR, como p. ej., heparina, puede provocar una falsos negativos o resultados no válidos.
- Las posibles mutaciones dentro de las regiones objetivo del *T. cruzi* cubiertas por los cebadores o las sondas utilizados en el kit pueden provocar una o fallos al detectar la presencia del patógeno.

- La parasitemia muy baja asociada a la infección crónica *Trypanosoma cruzi* puede provocar falsos negativos.
- Como con cualquier prueba diagnóstica, los resultados del RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 deben interpretarse teniendo en consideración todos los hallazgos clínicos y de laboratorio.

13. Control de calidad

De acuerdo con el sistema de control de calidad con certificación ISO 13485 de Altona Diagnostics GmbH, cada lote del RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 se somete a pruebas con especificaciones predeterminadas para asegurar la calidad consistente del producto.

14. Asistencia técnica

Si necesita ayuda al cliente, póngase en contacto con nuestro soporte técnico:

email: support@altona-diagnostics.com

teléfono: +49-(0)40-5480676-0

15. Bibliografía

Versalovic, James, Carroll, Karen C., Funke, Guido, Jorgensen, James H., Landry, Marie Louise y David W. Warnock (ed). Manual of Clinical Microbiology. 10ª edición. ASM Press, 2011.

Cohen, Jonathan, Powderly, William G y Steven M Opal. Infectious Diseases, tercera edición. Mosby, 2010.

16. Marcas comerciales y aviso legal

RealStar® (altona Diagnostics); ABI Prism® (Applied Biosystems); NucliSENS®, easyMAG® (bioMérieux); CFX96™ (Bio-Rad); Maxwell® (Promega); MinElute®, QIAamp®, QIASymphony®, Rotor-Gene® (QIAGEN); FAM™, JOE™, VIC™ (Thermo Fisher Scientific); LightCycler® (Roche); VERSANT® (Siemens Healthcare); Mx 3005P™ (Stratagene).

Los nombres registrados, las marcas comerciales, etc. usados en este documento, incluso si no están marcados específicamente como tales, no se deben considerar privados de protección legal.

El RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 es un kit de diagnóstico con marcado CE conforme a la directiva europea de diagnóstico *in vitro* 98/79/EC.

Producto sin licencia de Health Canada y no aprobado ni autorizado por la FDA.

No disponible en todos los países.

© 2022 altona Diagnostics GmbH; todos los derechos reservados.

17. Explicación de los símbolos

Símbolo	Explicación
	Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>
	Código de lote
	Color del tapón
	Número de catálogo
	Contenido
	Número
	Componente
	Número mundial de artículo comercial
	Consultar instrucciones de uso
	Contiene suficiente para «n» tests/reacciones (rxns)
	Límite de temperatura
	Fecha de vencimiento
	Fabricante

Símbolo	Explicación
	<p>Precaución: Destaca instrucciones o procedimientos operativos que, si no se siguen correctamente, pueden provocar lesiones personales o afectar al rendimiento del producto. Póngase en contacto con el soporte técnico de Altona Diagnostics si necesita ayuda.</p>
	<p>Nota: Se ofrece al usuario información que es útil pero no esencial para la tarea en cuestión.</p>
	<p>Versión</p>

Notas:

Notas:

Notas:

always a drop ahead.

altona Diagnostics GmbH
Mörkenstr. 12
22767 Hamburg, Germany

phone +49 40 548 0676 0
fax +49 40 548 0676 10
e-mail info@altona-diagnostics.com

www.altona-diagnostics.com

