

*Proyecto Manual de instrucciones***WGne C. trachomatis RT Detection**

Para la detección de secuencias de ADN de *Chlamydia trachomatis* en muestras de hisopado endocervical u orina

FINALIDAD DE USO

Es un ensayo para la detección cualitativa de secuencias de ADN de la bacteria *Chlamydia trachomatis* mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en Tiempo Real. El ensayo utiliza como muestra ADN purificado a partir de muestras de hisopado endocervical u orina.

El producto debe ser utilizado por personal de salud autorizado (uso profesional) en laboratorios de análisis clínicos, clínicas médicas y hospitales.

Es un producto de uso manual, no automatizado, aunque requiere la utilización de un termociclador específico para PCR en tiempo real.

SIGNIFICACIÓN CLÍNICA

Chlamydia trachomatis es una bacteria cuya infección constituye la enfermedad de transmisión sexual (ETS) más frecuente en los países industrializados, y probablemente a nivel mundial. La mayor prevalencia de Infecciones de transmisión sexual (ITS) es entre los adolescentes y adultos jóvenes menores de 25 años y mujeres en edad reproductiva. Los factores de riesgo para ETS son edad, género, parejas sexuales múltiples o nuevas, la falta de uso de preservativo, condición socio-económica, presencia de otras enfermedades de transmisión sexual. Las manifestaciones predominantes causadas por las clamidias son secreción uretral y vaginal, dolor al orinar, picazón, sangrado vaginal, etcétera. La mayoría de los casos son asintomáticos (aproximadamente 70% en mujeres y 50% en hombres). Las infecciones no tratadas de *C. trachomatis* pueden provocar complicaciones graves. Hasta el 30% de las mujeres con infecciones por *C. trachomatis* no tratadas desarrollan enfermedad inflamatoria pélvica (PID) con consecuencias tales como infertilidad dolor pélvico crónico debilitante, o embarazo trombótico potencialmente mortal o ectópico. La infección por *C. trachomatis* durante el embarazo puede conducir a conjuntivitis y neumonía infantil y endometritis materna postparto. Entre los hombres, la uretritis es la enfermedad más común que resulta de la infección por *C. trachomatis*. Las complicaciones (como la epididimitis) afectan a una minoría de hombres infectados. Las infecciones por *C. trachomatis* del recto pueden ser resultado de relaciones sexuales anales no protegidas y suelen ser asintomáticas, pero pueden progresar a proctocolitis. Las infecciones oculares pueden dar lugar a conjuntivitis en neonatos y adultos. La

artritis reactiva adquirida sexualmente también ha sido reportada como una posible consecuencia de la infección por *C. trachomatis*.

El diagnóstico de la infección se apoya en un adecuado examen físico, pero la confirmación del diagnóstico se da principalmente por pruebas de laboratorio. La detección directa del patógeno se puede realizar empleando métodos: a) Microbiológicos (cultivo): actualmente no se recomienda debido a que presentan dificultades para mantener la viabilidad de los organismos durante el transporte y el almacenamiento. Además, son difíciles de normalizar, técnicamente exigentes, caros y relativamente poco sensibles. b) Inmunológicos (ELISAs o DFA): detectan una respuesta inmune sistémica a la infección (anticuerpos), y no se recomiendan debido a la falta de precisión para la detección de una infección activa. Tienen buena especificidad pero baja sensibilidad. c) Ensayos cualitativos de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT): son actualmente las únicas recomendadas para uso de rutina por organismos internacionales. Estas pruebas son más sensibles que las pruebas anteriores y tiene muy buena especificidad, por lo tanto son considerados los métodos de elección para el diagnóstico de la infección. Las NAAT han permitido una implementación y expansión significativas de los programas de cribado mediante la recolección menos invasiva de muestras (por ej. orina (primer chorro miccional)). El método de amplificación más empleado corresponde a real time PCR cualitativa. Los ensayos NAAT se recomiendan para la detección de infecciones urogenitales causadas por infecciones por *C. trachomatis* en mujeres y hombres con y sin síntomas. Actualmente no están sugeridas las muestras extragenitales (boca o recto). Estas pruebas han demostrado ser rentables para prevenir secuelas debidas a esta infección.

FUNDAMENTOS DEL MÉTODO

El **WGene *C. trachomatis* RT Detection** es un ensayo "in vitro" que comprende la amplificación por PCR en tiempo real y detección de secuencias específicas del ADN bacteriano. Este ensayo de detección cualitativa de secuencias del genoma y del plásmido críptico, se realiza a partir de muestras biológicas de origen urogenital (hisopados endocervical u orina) de individuos con sospecha de infecciones de transmisión sexual. El kit detecta dos regiones de ADN bacteriano: una genómica y otra perteneciente al plásmido críptico. El procedimiento completo consiste en la purificación del ADN bacteriano a partir de la muestra biológica, el cual luego se utiliza en la amplificación por PCR en tiempo real mediante una enzima *HotStart* ADN polimerasa utilizando sondas tipo TaqMan® para la detección. Durante la reacción de PCR, la actividad exonucleasa de la enzima provoca la degradación de la sonda tipo TaqMan® separándose el fluoróforo del *quencher*. El aumento de la señal de fluorescencia resultante por acumulación del ADN templado, es detectado por el instrumento de PCR en tiempo real: a) canal FAM para detección conjunta de los genes genómico *omcB* (codifica para la proteína B del complejo

de membrana externa) y plasmídico orf8 (codifica una proteína tipo recombinasa putativa); y b) canal HEX para la detección de ADN codificador de receptor de tirosina fosfatasa tipo N2 de rata (ptprn-2) como control interno exógeno (IC). Este control exógeno, previene la generación de resultados falsos negativos asociada con la posible pérdida de ADN molde durante la preparación de la muestra, y asegura la ausencia de inhibidores en la reacción de amplificación. El control interno (IC) debe ser adicionado a cada muestra antes del procedimiento de extracción del ADN.

Es necesario además incluir un Control Negativo de reacción (NC) para confirmar la ausencia de contaminación de los reactivos. Para esto se utiliza agua libre de nucleasas (reactivo Nuclease-free H₂O) como muestra. En caso de resultado positivo para este control, se debe repetir la prueba buscando previamente las posibles fuentes de contaminación y eliminándolas.

REACTIVOS PROVISTOS

PC *C. trachomatis*: Control Positivo que consiste en secuencias de ácidos nucleicos específicas de *C. trachomatis*. Presentación: liofilizado

Master Mix *C. trachomatis* (5x): mezcla de reacción para la amplificación/detección de los ADNs blanco. Contiene: KCl 250mM, MgCl₂ 15 mM, dNTPs 1mM, dUTP, UNG, *Hot Start* DNA polimerasa y aditivos tales como agentes reductores, estabilizantes y conservantes. Presentación: líquido

Oligo Mix *C. trachomatis*: mezcla de oligonucleótidos y sondas para la amplificación específica de las secuencias de *C. trachomatis* y del Control Interno (IC). Presentación: liofilizado

IC: Control Interno que consiste en ADN contenido secuencia de organismo no infectivo ausente en humanos. Presentación: Liofilizado

RNase/DNase-free H₂O: agua libre de nucleasas. Presentación: líquido

REACTIVOS Y EQUIPAMIENTO NO PROVISTOS

- Sistema comercial de purificación de ADN (mediante columnas de sílica o partículas magnéticas).

Nota: este producto fue validado con los siguientes sistemas comerciales (aunque pueden utilizarse otros sistemas comerciales):

- QIAamp DNA mini kit (QIAGEN, Cat: 51306)
- QUICK DNA Miniprep kit (Zymo Research, Cat: Z D3024-25)
- cobas x 480 Instrument (Roche, Cat: 05200890001)
- MagNA Pure 24 instrument (Roche, Cat: 7290519001)
- High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Cat: 11796828001)
- MagMAX DNA Multi-Sample Ultra Kit (Applied Biosystems, Cat: A25597)

- Micropipetas de volumen variable
- Tips con filtro libres de nucleasas

- Tubos de microcentrífuga (1,5 o 2 ml) libres de nucleasas
- Gradilla para tubos de 1,5 ml o 2 ml
- Guantes descartables látex, vinilo o nitrilo sin polvo
- Soporte de reacción acorde al Instrumento de PCR en tiempo real que se utilice (ej. microplacas con films ópticos, tubos de qPCR, etc.)
- Termociclador o instrumento de PCR en tiempo real: pueden utilizarse diferentes marcas comerciales, siempre que cuenten con canal de detección de fluorescencia para FAM y YAK/JOE/VIC. Nota: este producto fue validado en los siguientes termocicladores: CFX96® (Biorad), Rotor Gene Q® (Qiagen) y StepOne Plus®(Applied Biosystems).
- Agitador vórtex
- Microcentrífuga de mesa con rotor para tubos de 1,5 a 2 ml
- Recipiente para el descarte de material biológico
- Equipo de protección personal
- Baño de hielo o bloque frío (para tubos x 1,5 a 2 ml)
- Recipiente para el descarte de material biológico con hipoclorito de sodio 5 % recién diluido

PRECAUCIONES

- Los reactivos son para uso diagnóstico *in vitro*.
- Todas las muestras de pacientes deben manipularse como si fueran capaces de transmitir infección.
- Todos los componentes deben descongelarse completamente (una vez reconstituidos), homogeneizarse y centrifugarse brevemente antes de iniciar el ensayo. Luego se recomienda mantenerlos refrigerados, especialmente la mezcla de amplificación del ADN. Esta última debe homogeneizarse suavemente, evitando formación de espuma.
- No usar los reactivos luego de la fecha de vencimiento.
- No intercambiar reactivos de distintos lotes ni modificar los procedimientos del ensayo.
- No emplear reactivos de origen diferente al indicado.
- Todos los reactivos y las muestras deben descartarse de acuerdo a la normativa local vigente.
- Evitar que los componentes sufran contaminación microbiana o con nucleasas, cuando se introduzcan elementos dentro de los mismos.
- Es fundamental para el uso de este producto, contar con los conocimientos básicos en el manejo de técnicas moleculares para diagnóstico. Debido a la alta sensibilidad de la tecnología de amplificación, es necesario respetar las normas de trabajo indicadas para este tipo de análisis (áreas de procesamiento de muestras, pre y post amplificación, flujo del trabajo, uso de material apropiado, etc.).

ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

El kit se puede transportar en forma refrigerada (2-10°C). Una vez recibido, almacenar el kit completo a -20°C hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja.

Los reactivos liofilizados, una vez resuspendidos, también deben ser conservados a -20°C.

MUESTRA

ADN proveniente de muestras de hisopado endocervical u orina recolectada y transportadas según las siguientes recomendaciones:

Hisopados endocervicales: Los hisopos utilizados deben ser de fibra de dacrón o polímero similar y mango plástico o metálico (no usar hisopos de algodón o con mangos de madera, ya que está demostrado que inhiben la reacción de PCR). También pueden ser cepillos para citodiagnóstico. Colocar los hisopos en un tubo plástico estéril con tapa a rosca. Las muestras deben ser depositadas y transportadas en 0,5 ml de solución salina o PBS u otro medio de transporte adecuado para tal fin (como RPMI, 2SP, UTM). Si la muestra se procesará en el día o dentro de las 48 hs, conservar refrigerada a 4ºC. En caso contrario, congelar a -20ºC.

Orina: recolectar entre 10 y 15 ml del primer chorro miccional de orina en un recipiente estéril. Centrifugar por 30 min a 3000 g, descartar el sobrenadante. Realizar un par de lavados del pellet con buffer o solución salina. Si la extracción del ADN se realizará en el día o dentro de las 48 hs, conservar refrigerada a 4ºC. En caso contrario congelar a -20ºC.

Purificación del ADN:

El ADN se purifica según los requerimientos e instrucciones del fabricante del kit de extracción de ADN utilizado, el cual debe ser compatible con la metodología qPCR, asegurando una alta calidad del ADN purificado.

El control interno (IC) debe ser adicionado directamente a cada muestra antes del procedimiento de purificación del ADN. Agregar 5 ul de IC por muestra, luego del agregado del buffer de lisis a la muestra (salvo que en las instrucciones del fabricante del kit de extracción indique otra opción).

El procedimiento se realiza en condiciones de seguridad adecuadas para manejo de material infeccioso (según el documento *M29-Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections* del NCCLS).

Estabilidad e instrucciones de almacenamiento: Los ensayos moleculares son particularmente sensibles a las condiciones preanalíticas subóptimas, por lo cual la calidad de la muestra a utilizar es fundamental. Es recomendable conservar la muestra como se indica en el apartado MUESTRA hasta llevar a cabo la purificación del ácido nucleico.

No utilizar muestras con contaminación microbiana.

Si las muestras deben ser transportadas, deben embalarse siguiendo las especificaciones legales relativas al envío de material infeccioso.

Se aconseja que el ADN sea extraído preferentemente con sistemas comerciales que empleen columnas o partículas magnéticas, por su mayor grado de purificación y reproducibilidad en los resultados.

PROCEDIMIENTO COMPLETO DEL ENSAYO

1- Extracción del ADN (ver MUESTRA y Purificación del ADN)

2- Reconstitución de los reactivos liofilizados

Hacer una breve centrifugación de los mismos para evitar pérdidas al abrir los tubos.

En el área de pre-amplificación: Reconstituir el reactivo Oligo Mix *C. trachomatis* con el volumen de reactivo Nuclease-free H₂O indicado en el rótulo según presentación del producto (28 ul para 25 determinaciones, 55 ul para 50 determinaciones y 110 ul para 100 determinaciones). Homogeneizar con vórtex por 30 segundos, dejar 10 min a temperatura ambiente, volver a homogeneizar y hacer una breve centrifugación antes de su uso. Mantener el reactivo reconstituido refrigerado (en hielo o bloque frío) durante su uso. Guardar el reactivo reconstituido a -20ºC luego de su uso. Reconstituir el reactivo IC utilizando 500 µl del reactivo Nuclease-free H₂O. Homogeneizar con vórtex por 30 segundos, dejar 10 min a temperatura ambiente, volver a homogeneizar y hacer una breve centrifugación antes de su uso. Guardar el reactivo reconstituido a -20ºC luego de su uso.

En el área de amplificación: Reconstituir el reactivo PC *C. trachomatis* utilizando 500 µl del reactivo Nuclease-free H₂O. Homogeneizar con vórtex por 30 segundos, dejar 10 min a temperatura ambiente, volver a homogeneizar y hacer una breve centrifugación antes de su uso. Guardar el reactivo reconstituido a -20ºC luego de su uso.

3- Preparación de la mezcla de reacción

En el área de pre-amplificación: Descongelar los reactivos por completo y mezclar. El reactivo Master Mix *C. trachomatis* (5x), debe mezclarse suavemente evitando formación de espuma y colocarse inmediatamente en frío (hielo o bloque frío), una vez descongelado. Hacer una breve centrifugación del mismo para evitar pérdidas al abrir los tubos. Preparar la mezcla de reacción siguiendo las proporciones que indica la tabla, teniendo en cuenta el número de reacciones a realizar en el ensayo.

Nota: para evitar la contaminación cruzada, mezclar todos los componentes a temperatura ambiente para asegurar la activación de la enzima UNG. Cualquier amplicón que contenga uracilo, proveniente de una amplificación previa, será digerido por UNG.

Reactivos	Volumen por reacción (μ l)	Volumen por n reacciones (μ l)
Master Mix <i>C. trachomatis</i> (5x)	4	4 x n
Oligo Mix <i>C. trachomatis</i>	1	1 x n
Nuclease-free H₂O	10	10 x n

n = número de muestras clínicas a analizar + PC *C. trachomatis* + NC (Control Negativo) + 10%

Dispensar 15 μ l de la mezcla de reacción en cada tubo/pocillo de reacción.

Agregar 5 μ l de la muestra clínica o de los controles a los correspondientes pocillos/tubos de reacción, según lo siguiente:

- Muestras a analizar: 5 μ l de los ADN purificados correspondientes a cada muestra
- NC: 5 μ l del reactivo Nuclease-free H₂O
- PC: 5 μ l del reactivo PC *C. trachomatis*

El volumen final de reacción es de 20 μ l.

Se recomienda en todo momento, manipular las muestras en el área destinado para tal fin y el PC en el área de amplificación, para evitar contaminar el resto de los reactivos. Cerrar los tubos/pocillos de reacción e iniciar la reacción en el termociclador.

4- Programación del termociclador

Es necesario tener información básica respecto al manejo y programación del termociclador a utilizar, por lo cual se recomienda referirse al manual del instrumento correspondiente. Las condiciones generales para llevar a cabo la reacción qPCR, son las siguientes:

Condiciones generales	
Programa	Cuantificación absoluta
Volumen de reacción	20 μ l
Colorante de referencia pasivo*	No contiene
Tipo de enzima (Taq)	Hot Taq
Tipo de química	Sonda de hidrólisis

*Solo agregar en equipos que requieren colorantes pasivos

Detección	Detectores de fluorescencia
	Fluoróforo (absorción/emisión)
<i>C. trachomatis</i>	FAM (492 nm / 516 nm)
IC	HEX* (535 nm / 580 nm)

* El espectro de absorción/emisión es similar a JOE/VIC/JAK

Etapa	Programa de amplificación y detección			
	Temperatura	Tiempo (min:seg)	Ciclos	Adquisición
Desnaturalización Inicial/Activación Taq	95°C	3:00	1	-
Amplificación	95°C	0:05	40	Si*
	60°C	0:20		

*Los datos de fluorescencia se deben registrar durante el paso de extensión (60°C).

5- Análisis de los resultados

Es importante tener información básica respecto al procedimiento de análisis de datos del termociclador utilizado en la reacción de qPCR, por lo cual se recomienda referirse al manual del instrumento.

Para analizar las curvas de amplificación, ajustar la escala de fluorescencia para cada target a analizar (*C. trachomatis* o IC). Es necesario fijar correctamente los siguientes parámetros: línea de base (*baseline*) y valor umbral de fluorescencia (*threshold*). Estos parámetros pueden ser seleccionados de forma automática por el programa, de acuerdo al algoritmo que utiliza, o de forma manual.

Ambos parámetros influyen en la determinación del valor de Ct (ciclo que supera el valor umbral de fluorescencia) para cada muestra.

- La línea de base debe comprender los ciclos de PCR en los cuales la señal de fluorescencia se encuentra por debajo de los límites de detección del instrumento (normalmente un rango de valores de Ct desde 3 a 15).
- El valor umbral de fluorescencia se debe fijar en la fase exponencial de las curvas de amplificación de las muestras positivas para el templados que se analiza. Por lo general, se fija alrededor del 10% respecto a la fluorescencia máxima del *plateau* general de las curvas de amplificación.

6- Criterios de validación del ensayo:

Una vez definidos los parámetros anteriores, el ensayo se considera válido si se cumplen simultáneamente las siguientes condiciones:

Control	Detección en FAM™ (Ct)	Detección en HEX™ (Ct)
PC	≤ 33	-
NC	-	-

* Eventualmente se pueden observar señales inespecíficas para el PC en el canal HEX, que no poseen forma sigma y suelen aparecer en Ct > 34.

7- Interpretación de los resultados para las muestras clínicas

- Se considera **muestra detectable** para *C. trachomatis* cuando, en el canal de fluorescencia FAM se observa una curva de amplificación que cruza el umbral (*threshold*), dando lugar a un valor de Ct ≤ 40.
- Se considera **muestra no detectable** para *C. trachomatis* cuando, en el canal de fluorescencia FAM, la curva de fluorescencia no cruza el umbral dando lugar a la ausencia de Ct o lo cruza con un valor

de Ct > 40.

- Las muestras deben además detectar el IC, presentando una curva de amplificación en el canal HEX que cruce el umbral de fluorescencia con un Ct ≤ 34. Sin embargo, puede ocurrir para muestras detectables para *C trachomatis* (canal FAM), que se inhibía la amplificación del IC (no detectable en canal HEX), no invalidando el resultado (Ver nota 1 en la tabla que figura a continuación). En caso de que una muestra resulte de dudosa interpretación o inválida, se recomienda repetir el ensayo a partir de una nueva purificación del ADN o recolectar una nueva muestra del paciente.

Detección en FAM	Detección en HEX	Interpretación de la muestra del paciente	
Detectable (Ct ≤ 40)	Detectable (Ct ≤ 34) No detectable (Ct > 34) [1]	Válido	Presencia de ADN de <i>C trachomatis</i>
No detectable (Ct > 40)	Detectable (Ct ≤ 34)	Válido	ADN de <i>C trachomatis</i> no detectado
No detectable (Ct > 40)	No detectable (Ct > 34) [2]	Inválido	Repetir

[1] La detección del IC en el canal de HEX (HEX detectable) no es requerida para validar resultados detectables en el canal de FAM. Inhibición de la qPCR, problema con la purificación del ADN y/o en la recolección de la muestra clínica.

LIMITACIONES DEL ENSAYO

- Cualquier resultado diagnóstico obtenido con este kit debe ser interpretado en conjunto con otros hallazgos clínicos y/o de laboratorio.
- Los resultados negativos no descartan la infección por *C. trachomatis* y no deben ser la única base de decisión de manejo del paciente.
- Un resultado positivo indica la detección de ácido nucleico de *C. trachomatis*.
- Pueden surgir resultados falsos positivos debido a contaminación cruzada por *C. trachomatis*, ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de ADN bacteriano o contaminación debido a productos de PCR de reacciones anteriores.
- Los resultados falsos negativos pueden deberse a: recolección inadecuada de muestras; degradación del ADN bacteriano durante el envío/almacenamiento; la presencia de inhibidores de qPCR en la muestra, etc.

ESPECIFICACIONES DEL ENSAYO

1- Sensibilidad Analítica - Límite de Detección (LoD)

Se determinó la Sensibilidad Analítica del producto **W Gene *C. trachomatis* RT Detection** a partir de un panel de estándares preparados con concentraciones de alrededor del LoD de la prueba. Los estándares se generaron en ambas matrices biológicas (endocérvix y orina) a partir del ADN extraído de la cepa de referencia de *C. trachomatis* LGV/L2/434 de concentración conocida.

Se determinó el límite de detección (LoD) empleando muestras de ADN correspondientes a diferentes niveles de concentraciones de *C. trachomatis*, medidas por octuplicado a cada nivel durante 5 días consecutivos (tabla 1.1 y 1.2). Se evaluaron 40 réplicas de cada nivel de concentración, determinando el Índice de Positividad correspondiente siguiendo las recomendaciones de la guía CLSI EP-17.

Tabla 1.1: Determinación del límite de detección de W Gene *C. trachomatis* RT Detection en endocervix.

		ENDOCERVIX				
DÍAS\CONC.(genomas/rxn)		0.75	0.075	0.0075	7,5 x10 ⁻⁴	7,5 x10 ⁻⁵
1		8/8	8/8	5/8	2/8	0/8
2		8/8	8/8	5/8	4/8	0/8
3		8/8	8/8	7/8	2/8	0/8
4		8/8	8/8	5/8	0/8	0/8
5		8/8	8/8	3/8	0/8	0/8
TOTAL		40/40	40/40	25/40	8/40	0/40
% POSITIVOS		100	100	62,5	20	0

Tabla 1.2: Determinación del límite de detección de W Gene *C. trachomatis* RT Detection en orina.

		ORINA				
DÍAS\CONC.(genomas/rxn)		0.75	0.075	0.0075	7,5 x10 ⁻⁴	7,5 x10 ⁻⁵
1		8/8	8/8	4/8	0/8	0/8
2		8/8	8/8	4/8	1/8	0/8
3		8/8	8/8	6/8	3/8	0/8
4		8/8	8/8	6/8	2/8	0/8
5		8/8	8/8	3/8	1/8	0/8
TOTAL		40/40	40/40	23/40	7/40	0/40
% POSITIVOS		100	100	57,5	17,5	0

El análisis de regresión Probit de los datos determinó que el WGene *C. trachomatis* RT Detection presenta un LoD de 0,024 genomas/rxn (4,8 genomas/ml) tanto para endocérvix como para orina.

2- Precisión

2.1 - Repetibilidad y Precisión intra-laboratorio

La precisión se determinó a través de la evaluación de una muestra clínica positiva fuerte (MC-P), una muestra clínica positiva débil cercana al LoD (MC-LOD), una muestra negativa (MC-N) y el control positivo del kit (PC) mediante un estudio de $20 \times 2 \times 2$ (días x corridas x réplicas), según las recomendaciones de la guía CLSI EP05. La repetibilidad y precisión intra-laboratorio se determinó empleando el complemento de análisis estadístico para Microsoft Excel (Analyse-it v6.15). El análisis se realizó en el instrumento CFX96® (Biorad). Los parámetros obtenidos se resumen en la tabla 2.1.

El producto **WGene C. trachomatis RT Detection** presenta para todas las muestras evaluadas un coeficiente de variación (CV) <1 % (para el target específico de *C. trachomatis*) y < 2% para el Control interno (IC).

Tabla 2.1: Estudio de Repetibilidad y Precisión Intra-laboratorio

Target: genes específicos de *C. trachomatis* (canal FAM)

MUESTRA	Ct promedio	N	Repetibilidad		Presición Intra-Laboratorio	
			SD	CV	SD	CV
MC-P	28,74	80	0,168	0,6%	0,189	0,7%
MC-LOD	32,11	80	0,173	0,5%	0,18	0,6%
PC	30,16	80	0,192	0,6%	0,268	0,9%

N: número de réplicas, SD: desvío estándar, CV: coeficiente de variación, MC-P: muestra clínica positiva, MC-LOD: muestra clínica positiva cercana al LOD, PC: control positivo.

Target: control interno (IC), (canal HEX)

MUESTRA	Ct promedio	N	Repetibilidad		Presición Intra-Laboratorio	
			SD	CV	SD	CV
MC-P	28,91	80	0,313	1,1%	0,379	1,3%
MC-LOD	29,69	80	0,252	0,8	0,347	1,2%
MC-N	29,95	80	0,311	1%	0,409	1,4%

SD: desvío estándar, CV: coeficiente de variación, MC-P: muestra clínica positiva, MC-LOD: muestra clínica positiva cercana al LOD, MC-N: muestra clínica negativa.

2.2 - Precisión inter-laboratorio

La precisión se determinó a través de la evaluación de una muestra clínica positiva fuerte (MC-P), una muestra clínica positiva débil cercana al LoD (MC-LOD), una muestra negativa (MC-N) y el control positivo del kit (PC) mediante un estudio de $3 \times 5 \times 5$ (equipos x días x réplicas), según lo recomendado en la guía CLSI EP05. La precisión inter-laboratorio se determinó empleando el complemento de análisis estadístico para Microsoft Excel (Analyse-it v6.15). Los 3 equipos empleados fueron: CFX96 (Bio-rad), Step One Plus (Applied Biosystems), Rotor-Gene Q (Qiagen).

En la tabla 2.2 se muestra un resumen los valores de %CV obtenidos entre equipos (precisión inter-laboratorio).

El producto **WGene C. trachomatis RT Detection** presenta para todas las muestras evaluadas un coeficiente de variación inter-laboratorio < 5 %.

Tabla 2.2: Estudio de Precisión Inter-laboratorio

Target	Muestra	Ct promedio	Reproducibilidad	
			SD	CV
C. trachomatis	MC-P	27,93	1,25	4,5%
	MC-LOD	31,19	1,42	4,6%
	PC	29,33	1,25	3,9%
IC	MC-P	28,43	1,09	3,9%
	MC-LOD	29,35	0,84	2,9%
	MC-N	29,68	1,2	4%

SD: desvío estándar, CV: coeficiente de variación, MC-P: muestra clínica positiva, MC-LOD: muestra clínica positiva cercana al LOD, PC: control positivo, MC-N: muestra clínica negativa

3- Especificidad Analítica Análisis *in silico*

La exclusividad de cada secuencia de oligonucleótidos y sonda con su target del kit **WGene C. trachomatis RT Detection**, fue analizada *in silico* mediante NCBI blastn contra la base de datos RefSeq de arqueas, bacterias y virus (N=905889 secuencias analizadas), y/o que puedan estar presentes en la muestra clínica (ver Tabla 3.1) y contra la secuencia del genoma humano (Genome Reference Consortium Human Build 38 patch release 14, GRCh38.p14). Se definió como reactividad cruzada a la presencia de un par de cebadores y una sonda en una misma secuencia de un microorganismo que no sea el target específico, con una identidad nucleotídica superior al 80%. No se encontró reactividad cruzada con ningún microorganismo ni con el genoma humano.

Tabla 3.1: Patógenos incluidos en el análisis de especificidad analítica – *in silico*

Microorganismo	Número de acceso GenBank
<i>Citrobacter freundii</i>	NZ_CP033744.1
<i>Clostridium perfringens</i>	NZ_CP075979.1
<i>Enterococcus faecium</i>	NZ_CP038996.1
<i>Yersinia enterocolitica</i>	CP009456.1
<i>Neisseria gonorrhoea</i>	NZ_LOIB01000074.1
<i>Candida albicans</i>	NC_032089.1 - NC_032096.1
<i>Cryptococcus neoformans</i>	NC_006670.1, NC_006679.1 - NC_006687.1, NC_006691.1 - NC_006694.1
<i>Gardnerella vaginalis</i>	CP019058.1
<i>Haemophilus influenzae</i>	NZ_CP007470.1
<i>Lactobacillus brevis</i>	CP015338.1
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	CP102344.1
<i>Neisseria perflava</i>	CP079818.1
<i>Prevotella intermedia</i>	NZ_CP019300.1
<i>Providencia stuartii</i>	NZ_CP095443.1
<i>Staphylococcus aureus</i>	NC_007795.1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	NZ_CP035288.1
<i>Streptococcus pneumonia</i>	NZ_CP020549.1

<i>Streptococcus salivarius</i>	GCA_026262505.1
<i>Herpes simplex virus type 1</i>	X14112.1
<i>Herpes simplex virus type 2</i>	Z86099.2
<i>Trichomonas vaginalis</i>	CM044617.1 - CM044622.1
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	NC_005043.1
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	NZ_CP020000.1
<i>Moraxella osloensis</i>	NZ_CP014234.1
<i>Acinetobacter Iwoffii</i>	NZ_CP072549.1
<i>Bacteriodes caccae</i>	NZ_CP072258.1
<i>Bacteriodes fragilis</i>	NZ_CP069563.1
<i>Bifidobacillus longum</i>	NC_015067.1
<i>Kingella kingae</i>	NZ_JACBKV0000000000.1
<i>Ureaplasma parvum</i>	NC_010503.1

Ensayo *in vitro*

Se evaluaron ácidos nucleicos correspondientes a 18 microorganismos representativos del tracto genitourinario (endocervix u orina) (Tabla 3.2), que podrían presentar reactividad cruzada y generar resultados falsos positivos con el kit **WGene C. trachomatis RT Detection**. Se analizaron cada uno de estos ADN de microorganismos (aprox. 1×10^6 genomas/rxn) en hisopado endocervical y orina, tanto en presencia como en ausencia de *baja carga de C. trachomatis*.

Tabla 3.2: Patógenos incluidos en el análisis de especificidad analítica – *in vitro*

Patógeno identificado	Endocervix		Orina	
	Resultado <i>C trachomatis</i>	Resultado IC	Resultado <i>C trachomatis</i>	Resultado IC
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
<i>Enterococcus faecalis</i>	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
<i>Morganella morganii</i>	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
<i>Enterobacter cloacae</i>	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
<i>Streptococcus anginosus</i>	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
<i>Proteus mirabilis</i>	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
<i>Serratia marcescens</i>	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
<i>Mycoplasma genitalium</i>	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
<i>Mycoplasma hominis</i>	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
<i>HPV 16</i>	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
<i>HPV 18</i>	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
<i>Haemophilus ducreyi</i>	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo

El producto no presentó reactividad cruzada con ninguno de los patógenos evaluados.

Sustancias Potencialmente Interferentes

Se analizaron diferentes interferentes que podrían estar presentes en la muestra utilizada (dependiendo de la matriz). Se evaluaron muestras clínicas débiles para *Chamydia trachomatis* (con Ct>32 y 2,45 equivalentes genomas/reacción), en presencia y ausencia de cada uno de los potenciales interferentes por quintuplicado, siguiendo las recomendaciones de la guia del CLSI EP07. Para endocervix, las mayores concentraciones analizadas fueron: sangre (5%), mucina (0,8%), ADN humano (1000 ug/l), y productos vaginales comerciales (KY Lubricante Intimo Gel (0,25 %), Prime Sensual Excite Gel (0,25 %), Lomecan Vaginal Crema (0,25 %), Dermo Vagisil Desodorante Intimo (0,25 %)). Para orina, las mayores concentraciones analizadas fueron: sangre (5%), bilirrubina (10 mg/ml), mucina (0,2%), glucosa (10 mg/ml), urea (300 mM), ác. úrico (5 mM), Albúmina sérica (5%) y condiciones de pH 4 y 9. El análisis de las sustancias demostró que no hubo interferencia con la performance del producto **WGene C. trachomatis RT Detection** para la amplificación de ADN de *C. trachomatis*, ni de su control interno.

4- Inclusividad

Se evaluaron muestras clínicas positivas tipificadas para los diferentes genotipos de *C. trachomatis* (Tabla 4). El **WGene C. trachomatis RT Detection** detecta los distintos genotipos de *C. trachomatis* que infectan a seres humanos.

Tabla 4: Análisis de inclusividad con los diferentes genotipos de *C. trachomatis*.

Genotipo <i>C. trachomatis</i>	Resultado <i>C. trachomatis</i>	Resultado IC
A	Positivo	Positivo
B	Positivo	Positivo
D	Positivo	Positivo
E	Positivo	Positivo
F	Positivo	Positivo
G	Positivo	Positivo
H	Positivo	Positivo
I	Positivo	Positivo
K	Positivo	Positivo
L1	Positivo	Positivo
L2	Positivo	Positivo

La detectabilidad de todos los genotipos relevantes de infección por *C. trachomatis* en humanos está garantizada con el diseño de las secuencias de los cebadores y la sonda del producto **WGene C. trachomatis RT Detection**.

5- Validación Clínica

La validación clínica del **WGene Chamydia trachomatis RT Detection** se realizó mediante el análisis de 164 muestras clínicas provenientes de pacientes que presentaron síntomas clínicos compatibles con infecciones urogenitales. Todas las muestras fueron previamente testeadas con métodos utilizados habitualmente para el diagnóstico de infección por *C. trachomatis* (cobas 4800 CT/NG test (Roche), qPCR y PCR in house validadas clínicamente por las instituciones de Salud para diagnóstico).

De las 164 muestras clínicas analizadas, 62 resultaron positivas y 102 negativas para *C. trachomatis* (ver tabla 5.1).

Tabla 5.1: Tabla de contingencia 2 x 2 entre el **WGene C. trachomatis RT Detection** y ensayos de diagnóstico de referencia

		Método de referencia		TOTAL
		Positivo	Negativo	
WGene C. trachomatis RT Detection	Positivo	62	0	62
	Negativo	1	101	102
		TOTAL	63	101
				164

Los datos fueron analizados según lo recomendado por guía CLSI EP-12 para ensayos cualitativos. Como se observa en la Tabla 5.2, el producto **WGene C. trachomatis RT Detection**, presentó una sensibilidad estimada del 98,5 % (IC95: 91,8-99,7%) y una especificidad estimada del 100 % (IC95: 96,3-100,0%) con los métodos de referencia (criterio de diagnóstico) para la detección de *C. trachomatis*, en las muestras analizadas. El test mostró un valor predictivo positivo (VPP) del 100%, un valor predictivo negativo (VPN) del 99% y una exactitud diagnóstica del 99,4%.

Tabla 5.2: Concordancia entre el **WGene C. trachomatis RT Detection** y ensayos de diagnóstico de referencia.

WGene C. trachomatis RT Detection	SE (%)	ES (%)	VPP (%)	VPN (%)	Exactitud (%)
	98,5	100	100	99	99,4

SE: Sensibilidad, ES: Especificidad, VPP: Valor Predictivo Positivo, VPN: Valor Predictivo Negativo.

PRESENTACIONES

- Kit para 25 determinaciones (Código 1060084)
- Kit para 50 determinaciones (Código 1060085)
- Kit para 100 determinaciones (Código 1060086)

BIBLIOGRAFIA

- Burd EM (2010). Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. *Clin Microbiol Rev.* 23(3):550-76.
- Cakilci B, Gunduz M. Clinical Microbiology (Chapter 13) in Dorak MT (editor), (2006). Real-time PCR. ISBN 0-4153-7734-X.
- CLSI. Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline-Third Edition. CLSI document EP05-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.
- CLSI. Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline-Third Edition. CLSI document EP07-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
- CLSI. Measurement Procedure Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline-Third Edition. CLSI document EP09-A3; Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013.
- CLSI. User Protocol For Evaluation Of Qualitative Test Performance; Approved Guideline-Second Edition. CLSI document EP12-A2; Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
- CLSI. Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-Second Edition. CLSI document EP17-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
- CLSI. Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition. CLSI document M29-A4. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.
- Kessler HH. Molecular Diagnostics of Infectious Diseases (2010). ISBN 978-3-11-021485-7.
- Mackay IM (2007). Real-Time PCR in Microbiology, from diagnosis to characterization. Caister Academic Press. ISBN 978-1-904455-18-9.
- Meyer T. (2016). Diagnostic Procedures to Detect *Chlamydia trachomatis* Infections. *Microorganisms.* 4(3):25.
- Y. A. Vitrenko Y A, Deriabin O. (2018). A dual-target strategy for the detection of *Chlamydia trachomatis* by real-time PCR. *Biopolymers and Cell* 34(2):117-126
- Ma C, Du J, He W, Chen R, Li Y, Dou Y, Yuan X, Zhao L, Gong H, Liu P, Liu H. (2019). Rapid and accurate diagnosis of *Chlamydia trachomatis* in the urogenital tract by a dual-gene multiplex qPCR method. *J Med Microbiol.* 68(12):1732-1739.

TaqMan es marca registrada de Roche Molecular Systems, Inc.

StepOne es marca registrada de Applied Biosystems by Thermo Scientific.

Rotor Gene Q es marca registrada de Qiagen.

CFX es marca registrada de Bio Rad.

Proyecto Cajas

Wiener lab.

WGene *C. trachomatis* RT Detection



▽ 25

✗ -20°C

✗ 2-10°C (transporte)

[MD]

Cont.

1 x 110 uL Master Mix *C. trachomatis* (5x)

1 x → 28 uL Oligo Mix *C. trachomatis*

1 x → 500 uL IC

1 x → 500 uL PC *C. trachomatis*

1 x 1,85 mL Nuclease-free H₂O

Industria Argentina

[LOT]



[REF]



Wiener Laboratorios S.A.I.C.

Riobamba 2944

2000 Rosario – Argentina

<http://www.wiener-lab.com.ar>

Uso profesional exclusivo

Producto Autorizado A.N.M.A.T.

PM 1102-235

Dir. Téc.: Viviana E. Cétola

Bioquímica

Wiener lab.

WGene *C. trachomatis* RT Detection



▽ 50

✗ -20°C

✗ 2-10°C (transporte)



Cont.

1 x 220 uL Master Mix *C. trachomatis* (5x)

1 x → 55 uL Oligo Mix *C. trachomatis*

1 x → 500 uL IC

1 x → 500 uL PC *C. trachomatis*

1 x 1,85 mL Nuclease-free H₂O

Industria Argentina



Wiener Laboratorios S.A.I.C.

Riobamba 2944

2001 Rosario – Argentina

<http://www.wiener-lab.com.ar>

Uso profesional exclusivo

Producto Autorizado A.N.M.A.T.

PM 1102-235

Dir. Téc.: Viviana E. Cétola

Bioquímica

Wiener lab.

WGene *C. trachomatis* RT Detection



▽ 100

✗ -20°C

✗ 2-10°C (transporte)



Cont.

1 x 440 uL Master Mix *C. trachomatis* (5x)

1 x → 110 uL Oligo Mix *C. trachomatis*

1 x → 500 uL IC

1 x → 500 uL PC *C. trachomatis*

2 x 1,85 mL Nuclease-free H₂O

Industria Argentina



Wiener Laboratorios S.A.I.C.

Riobamba 2944

2002 Rosario – Argentina

<http://www.wiener-lab.com.ar>

Uso profesional exclusivo

Producto Autorizado A.N.M.A.T.

PM 1102-235

Dir. Téc.: Viviana E. Cétola

Bioquímica

WIENER Laboratorios S.A.I.C.


Dra. VIVIANA E. CETOLA
DIRECTORA TECNICA

Proyecto rótulos

Wiener lab.

WGene *C. trachomatis* RT Detection

Master Mix *C. trachomatis* (5x)

110 uL

↓ -20°C

MD

LOT

X

Wiener lab.

WGene *C. trachomatis* RT Detection

Master Mix *C. trachomatis* (5x)

220 uL

↓ -20°C

MD

LOT

X

Wiener lab.

WGene *C. trachomatis* RT Detection

Master Mix *C. trachomatis* (5x)

440 uL

↓ -20°C

MD

LOT

X

Wiener lab.

WGene *C. trachomatis* RT Detection

IC

→ 500 uL

↓ -20°C

 MD

 LOT

 X

Wiener lab.

PC *C. trachomatis*

PC *C. trachomatis*

→ 500 uL

↓ -20°C

 MD

 LOT

 X

Wiener lab.

WGene *C. trachomatis* RT Detection

Nuclease-free H₂O

1,85 mL

↓ -20°C

 MD

 LOT

 X

Wiener lab.

WGene *C. trachomatis* RT Detection

Olgo Mix *C. trachomatis* (x 25 det)

→ 28 uL

↓ -20°C

 **MD**

 **LOT**



Wiener lab.

WGene *C. trachomatis* RT Detection

Olgo Mix *C. trachomatis* (x 50 det)

→ 55 uL

↓ -20°C

 **MD**

 **LOT**



Wiener lab.

WGene *C. trachomatis* RT Detection

Olgo Mix *C. trachomatis* (x 100 det)

→ 110 uL

↓ -20°C

 **MD**

 **LOT**



WIENER Laboratorios S.A.I.C.


Dra. VIVIANA E. CETOLA
DIRECTORA TECNICA



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
AÑO DE LA DEFENSA DE LA VIDA, LA LIBERTAD Y LA PROPIEDAD

Hoja Adicional de Firmas
Anexo

Número:

Referencia: WIENER Laboratorios S.A.I.C.

El documento fue importado por el sistema GEDO con un total de 22 pagina/s.