

Sep
2021



Logix Smart™ ZDC (Zika, dengue, chikungunya)

LOGIX SMART™ ZDC (ZIKV, DENV, CHIKV)
CO-DIAGNOSTICS, INC.

REF ZDC-K-001

IVD

CE

CO-DIAGNOSTICS, INC. | 2401 Foothill Dr., Ste D, Salt Lake City, UT 84109 USA

Tabla de Contenido

1	Fabricante y Representante Autorizado	2
2	Uso Previsto	2
3	Descripción del Producto.....	2
4	Componentes del Kit	3
5	Almacenamiento, Manejo, y Disposición	3
6	Materiales Requeridos (No Incluidos).....	4
7	Información del Fondo.....	4
8	Accesorios (No Incluidos).....	5
8.1	Termociclador.....	5
8.2	Kit de Extracción.....	6
9	Advertencias y Precauciones	6
10	Información de Muestra	7
10.1	Recomendaciones de colección.....	7
10.2	Almacenamiento de Muestras	8
10.3	Manejo de Muestras	8
11	Procedimiento	8
11.1	Configuración de RT-PCR en tiempo real	8
11.2	Configuración de Control sin Plantilla.....	9
11.3	Configuración de la Muestra y Control Positivo.....	9
11.4	Configuración del Termociclador.....	9
12	Análisis de los Datos.....	10
12.1	Controles Positivos.....	10
12.2	Controles sin Plantilla	11
12.3	Interpretación de Resultados.....	12
13	Solución de Problemas	17
13.1	Estabilidad	17
13.2	Errores de Usuario	17
13.3	Resultados Inválidos	18
14	Evaluación del Rendimiento.....	19
15	Referencias	20
16	Leyenda de los Símbolos de Paquete	22

1 FABRICANTE Y REPRESENTANTE AUTORIZADO

**Fabricante:**

Co-Diagnostics, Inc
2401 S Foothill Dr. Ste D
Salt Lake City, UT 84109

Teléfono: +1 (801) 438-1036

Correo electrónico: info@co-dx.com

Sitio de web: www.co-dx.com

**Representante Autorizado:**

mdi Europa GmbH
Langenhagener Str. 71
D-30855 Hannover-Langenhagen
Germany

Teléfono: +49 511 39 08 95 30

Correo Electronico: info@mdi-europa.com

Sitio de web: www.mdi-europa.com

2 USO PREVISTO

El kit **Logix Smart™ ZDC (Zika, dengue, chikungunya)** es una prueba de diagnóstico *in vitro*, basada en la tecnología qPCR, destinada a la detección de virus Zika, serotipos 1-4 de dengue, y chikungunya en suero, plasma, o LCR recolectados junto con la orina para la detección de Zika, y suero o plasma para la detección de dengue o chikungunya durante las primeras etapas de estas enfermedades. La confirmación de la prueba serológica puede ser necesaria si el inicio de la infección ha pasado las primeras etapas de estas enfermedades.

3 DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

El kit de prueba **Logix Smart ZDC** es una reacción de PCR en tiempo real de transcripción inversa en un solo paso que se puede dividir en 3 etapas: preparación de la muestra, transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa con monitoreo en tiempo real. Prueba la presencia o ausencia de ácido ribonucleico (ARN) de Zika, serotipos 1-4 de dengue, y el virus de chikungunya en suero o plasma (recolectados junto con la orina) de pacientes con sospecha de infecciones virales de Zika, dengue o chikungunya durante las etapas agudas de la enfermedad. La prueba **Logix Smart ZDC** detecta el virus en 45 ciclos a partir de muestras de suero, plasma, y orina.

Cada kit de prueba **Logix Smart ZDC** consiste de los siguientes componentes:

- Mezcla maestra lista para usar, completo con control positivo interno de RNasaP para verificar la calidad de la muestra.

- Control positivo, para verificar el rendimiento de la mezcla maestra.
- Agua libre de nucleasas como control negativo para verificar que la mezcla maestra esté libre de contaminación.

4 COMPONENTES DEL KIT

Tabla 1 Componentes del Kit

Color de tapa	Componente	Símbolo	Número de catálogo individual	Descripción	Cantidad
Marrón	Mezcla Maestra Logix Smart ZDC	MM	ZDC-MM-001	Mezcla patentada de CoPrimers y reactivos de PCR	1x500µL (100 reacciones)
Rojo	Control Positivo Logix Smart ZDC	PC	ZDC-PC-001	Mezcla patentada de cebadores positivos	1x500µL (100 reacciones)
Transparente	Agua libre de Nucleasas	NTC	GEN-NF-001	Agua libre de DNasa/RNasa	1x500µL (100 reacciones)

5 ALMACENAMIENTO, MANEJO, Y DISPOSICIÓN

- El kit **Logix Smart ZDC** se envía en hielo seco. Los componentes del kit deben llegar congelados. Si uno o más de los componentes no se congelan al recibirlos o se comprometen durante el envío, comuníquese con su distribuidor para obtener ayuda.
- Todos los componentes deben almacenarse inmediatamente a -20°C o menos para evitar la degradación de los reactivos.
- Siempre trabajar con cada componente **Logix Smart ZDC** en hielo. Haga alícuotas, si es necesario, para evitar múltiples ciclos de congelación/descongelación.
- Si trabaja en un área propensa a cortes de energía, se recomienda tener un generador de respaldo para su congelador, así como un registro de datos de temperatura para garantizar que el kit de prueba **Logix Smart ZDC** permanezca congelado a -20°C.
- Se están recopilando los datos de estabilidad para el producto y se publicarán los resultados y se actualizarán las nuevas instrucciones de uso para reflejar las condiciones de estabilidad.
- Este producto no es un residuo biológico. Ver las hojas de datos de seguridad para la clasificación de peligro. La eliminación debe realizarse de acuerdo con las leyes y regulaciones regionales, nacionales, y locales aplicables.

6 MATERIALES REQUERIDOS (NO INCLUIDOS)

- Pipetas capaces de transferir 5µL
- hielo
- vórtice
- centrifugador
- Sistema de PCR en tiempo real con colorantes FAM (verde), Cal Fluor Red 610 (naranja), Cal Fluor Orange 560 (amarillo) y Quasar 670 (Rojo) o tubos y placas equivalentes y de acompañamiento y tapas.
- El kit de prueba **Logix Smart ZDC** se validó con CoDx Box™ (fabricado para Co-Diagnostics por BioMolecular Systems). Es el equipo recomendado para realizar la prueba.
- Gabinete de bioseguridad, idealmente instalación BSL-2.



Antes de realizar cualquier prueba o analizar cualquier muestra de paciente, verifique que todos los instrumentos se hayan instalado, calibrado, y mantenido correctamente. No utilice instrumentos con calibración obsoleta.

7 INFORMACIÓN DEL FONDO

El **virus Zika (ZIKV)** es parte de la familia Flaviviridae. Es un arbovirus propagado por la especie de mosquito Aedes. Los síntomas más comunes incluyen fiebre leve, erupción cutánea, conjuntivitis y dolor muscular y articular. Fue aislado por primera vez en 1947 en monos encontrados en el Bosque Zika en Uganda. Los primeros casos en humanos fueron en 1952 y, desde entonces, se han registrado brotes en África, América, Asia, y el Pacífico. Se pensaba que el virus del Zika no se transmitía endémicamente en las Américas hasta su aparición en Brasil en 2015. Hubo un aumento notable en los informes de casos de microcefalia congénita, lo que desencadenó la declaración de una emergencia internacional de salud pública (Araújo, et al., 2018). Este mismo estudio realizado en 2016 en Brasil encontró una correlación directa entre los casos de microcefalia y los casos de Zika. Otro estudio realizado en 2016 demostró que el ZIKV infecta y destruye las células madre neuronales humanas que se desarrollan como neuroesferas y organoides cerebrales. Estas observaciones ayudaron a consolidar el vínculo entre la infección fetal por ZIKV y el desarrollo de la microcefalia (Relich & Loeffelholz, 2017).

Debido a las graves secuelas neurológicas de este año (2018), la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó la revisión anual de enfermedades donde se ha aumentado la prioridad de las inversiones en I&D para el Zika (Organización Mundial de la Salud, 2018).

El **virus dengue (DENV)** es parte de la familia Flaviviridae. Es un arbovirus propagado por la especie de mosquito Aedes. Los síntomas más comunes van desde síntomas leves parecidos a la gripe hasta erupciones, manifestaciones hemorrágicas y moretones con facilidad. Los síntomas generalmente

ocurren de 4 a 7 días después de la picadura de un mosquito y duran de 3 a 10 días. Hay 4 genotipos/serotipos del virus de dengue (DENV1, DENV2, DENV3, y DENV4). La inmunidad se adquiere por largos períodos para cada tipo, aunque la inmunidad a un tipo no previene la infección de los otros tipos, lo que puede causar la infección del virus del dengue tan frecuente como cuatro veces por persona en áreas hiperendémicas. El espectro de la enfermedad varía desde asintomático, fiebre del dengue clásico, y fiebre del dengue grave o hemorrágica, que puede ser mortal (Wilder-Smith & Gubler, 2008). No existe un tratamiento específico para el dengue o el dengue grave, pero la detección temprana y el acceso a la atención médica adecuada reducen las tasas de mortalidad por debajo del 1%.

El **virus chikungunya (CHIKV)** es parte de la familia *Togaviridae*. Es un arbovirus propagado por la especie de mosquito *Aedes*. Los síntomas más comunes son fiebre, dolor, e hinchazón de las articulaciones, dolores de cabeza, dolor muscular, y erupciones cutáneas. Los síntomas generalmente ocurren de 3 a 7 días después de la picadura de un mosquito. Los pacientes pueden desarrollar una artropatía postaguda o crónica que dura de 21 a 90 días en casos agudos, y de tres meses a más de dos años en casos crónicos (OPS/OMS, 2017). Los linajes de chikungunya se dividen en dos ramas: África occidental (WA) y oriental/central/sudafricana (ESCA). Las cepas de África occidental están más relacionadas con pequeños brotes a nivel local en África. Las cepas del linaje oriental/central/sudafricana son las que se propagan en gran medida en todo el mundo (Silva & Dermody, 2017).

8 ACCESORIOS (NO INCLUIDOS)

8.1 Termociclador

Co-Diagnostics, Inc. puede, directamente o a través de programas de alquiler de reactivos, proporcionar el CoDx Box™ (fabricadas para Co-Diagnostics, Inc. por BioMolecular Systems). El kit de prueba **Logix Smart ZDC** también se puede usar en otros sistemas de PCR en tiempo real en tanto que los parámetros para ejecutar la prueba estén establecidos según lo establecido en el kit de prueba **Logix Smart ZDC**.

Se han utilizado y probado dos máquinas con el producto, el CoDx Box (BioMolecular Systems), y el Eco 48 (Cole-Parmer). De estos, solo el CoDx Box (BioMolecular Systems) ha sido validado con la versión actual del producto. Otros ejercicios de validación incluirán más pruebas de más termocicladores, así como la creación de protocolos específicos para esos termocicladores.

Se recomienda el CoDx Box a su facilidad de uso, tamaño pequeño, durabilidad, y rápida generación de informes. El software del CoDx Box fue desarrollado por BioMolecular Systems únicamente para Co-Diagnostics, Inc., y se ha verificado por uso con los productos de PCR en tiempo real de Co-Diagnostics, Inc., lo que simplifica la interpretación de los resultados. El CoDx Box lee la fluorescencia en tiempo real, generado a partir de los reactivos de PCR cargados en los tubos de reacción PCR de CoDx Box, amplifica el ARN del virus mediante ciclos térmicos mediante inducción magnética y muestra los datos de salida a través del software integrado. El CoDx Box está disponible con 48 pozos de reacción y 2 o 4 canales.

Otros productos de PCR en tiempo real de Co-Diagnostics, Inc. también utilizan el CoDx Box. El sistema Microsoft Surface™ Pro 4 (MSPRO-4) está disponible para el uso con el software del CoDx Box en un sistema operativo basado en Windows. El dispositivo de salida utilizado con el CoDx Box

puede ser una impresora o una computadora externa. Alternativamente, los resultados pueden ser registrados manualmente. El método de información se deja a la discreción del usuario.

8.2 Kit de Extracción

La calidad de la extracción del ARN de las muestras es esencial para el rendimiento de Logix Smart ZDC. El protocolo de extracción que se debe seguir debe realizarse siguiendo las instrucciones del fabricante o un protocolo validado internamente. El método de extracción validado con Logix Smart ZDC y recomendado por Co-Diagnostics, Inc. es el QIAamp Viral RNA Mini Kit.

- QIAamp Viral Mini Kit, Qiagen, Nú. Cat. 52904, para 50 extracciones
- QIAamp Viral Mini Kit, Qiagen, Nú. Cat. 52906, para 250 extracciones

Otras opciones de kit incluyen: sbeadex™ Livestock (LGC, Nú. Cat. 65000), QIAamp Min Elute Virus Spin Kit (Qiagen, Nú. Cat. 57704), ReliaPrep™ Blood gDNA Kit (Promega, A5081), MagNA Pure Compact RNA Isolation kit de extracción (Roche, Nú. Cat. 04802993001), Nuclisens (bioMérieux, Inc.) kit de extracción, aunque no se hayan realizado estudios de rendimiento de prueba con la iteración actual del kit de prueba Logix Smart ZDC.

Por favor, siempre usar la versión más reciente de este documento como más información que se agrega con estudios futuros. Se puede descargar de forma gratuita en:

<http://codiagnostics.com/resources/instructions-for-use/>

9 ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

¡Advertencia!



Los usuarios deben prestar atención a lo siguiente:

- Utilizar puntas de pipeta estériles con filtros.
- Tomar precauciones estándar al manipular muestras de pacientes, ya que pueden contener agentes infecciosos.
- Almacenar y extraer materiales positivos (muestras, controles, y amplicones) por separado de otros reactivos.
- Siempre usar agua libre de nucleasas, provista con este kit.
- Consultar las fichas de datos de seguridad apropiadas para la seguridad (FDS). La FDS para el kit de Logix Smart ZDC se proporciona con el envío. Si no se proporciona con el envío, la FDS se puede recuperar del sitio de web de Co-Diagnostics en el enlace: <http://co-dx.com/products/diagnostic-solutions/>
- Para evitar la contaminación, se requiere el uso de Buenas Prácticas de Laboratorio para Biología Molecular, que requiere un flujo de trabajo unidireccional y la separación de materiales negativos y positivos.

- No recoger muestras, para análisis de PCR de ácido nucleico, en heparina (tubo con tapa verde) o EDTA (tubo con tapa morado) ya que estos componentes son inhibidores de la PCR bien conocidos.
- Preferiblemente recoger la sangre entera en tubos separadores de suero.

10 INFORMACIÓN DE MUESTRA

La selección de la muestra, la recolección, el almacenamiento, y el manejo desempeñan un papel esencial en el desempeño de los ensayos de ácidos nucleicos. Por lo tanto, aquí se presenta información valiosa para ayudar a los laboratorios a desarrollar mejores procedimientos para el análisis de resultados y solucionar otros problemas.

Para obtener más información, visite los sitios web del CDC y la OMS en las siguientes direcciones:

- CDC, Pruebas para Zika: <https://www.cdc.gov/zika/symptoms/diagnosis.html>
- CDC, especímenes de dengue: <https://www.cdc.gov/ncezid/dvbd/specimensub/dengue-shipping.html>
- CDC, virus chikungunya: <https://www.cdc.gov/chikungunya/hc/diagnostic.html>
- Organización Mundial de la Salud (OMS), Pruebas de laboratorio para la infección del virus Zika:
https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204671/WHO_ZIKV_LAB_16.1_eng.pdf;jsessionid=2935A1D6A4788EA7148C5431A506941F?sequence=1
- OMS, dengue: <https://www.who.int/denguecontrol/en/>
- OMS, chikungunya: <https://www.who.int/emergencies/diseases/chikungunya/en/>

10.1 Recomendaciones de colección

Zika, dengue, y chikungunya han sido detectados en sangre total (también suero y plasma). La OMS recomienda el uso de sangre entera, suero, para ser recolectado junto con una muestra de orina de los pacientes que se analizarán (Organización Mundial de la Salud, 2016).

Pruebas de detección de ZIKV: Según Relich & Loeffelholz (2017), el ARN de ZIKV se puede detectar en el suero con pruebas de RT-PCR en tiempo real de 2 a 7 días después del inicio de los síntomas. Después de 7 días, la carga viral en la sangre comienza a disminuir. El ARN viral se puede detectar en la orina hasta 20 días, aunque se ha detectado en la orina en más de 20 días. El virus Zika se encontró en el semen 2 meses después del inicio de los síntomas. El mismo estudio también recomendó tener un resultado sólido y resolver el problema de la variabilidad de la carga viral y los días desde el inicio de la enfermedad, especialmente porque la aparición de la enfermedad puede ser difícil de determinar ya que algunas personas son asintomáticas, idealmente suero y orina debe ser probado al mismo tiempo.

Pruebas de detección de DENV: Se pueden encontrar en suero y plasma hasta 5 días después de la aparición de los síntomas. Después de este período, se pueden realizar ensayos de ácido nucleico junto con pruebas serológicas, ya que debido a la menor carga viral, el riesgo de negativos falsos es mayor.

Pruebas de detección de CHIKV: Pueden detectarse en suero o plasma hasta 8 días después del inicio de los síntomas. Después de este período, los ensayos de ácido nucleico pueden realizarse junto con las pruebas serológicas, ya que debido a la menor carga viral, el riesgo de negativos falsos es mayor.

- La Organización Mundial de la Salud recomienda registrar el nombre completo, la fecha de nacimiento, la información de contacto, y la hora y la fecha de recolección de la muestra del paciente. Además, también se podría coleccionar la siguiente información:
 - Síntomas, fecha de inicio, duración de los síntomas, contacto con casos conocidos del virus de Zika (y tipo de contacto, por ejemplo, lactancia materna, pareja sexual);
 - Historial de viaje completo (fechas, lugar, duración de la visita); y
 - Historial de vacunación, especialmente cualquier vacuna contra flavivirus, incluido el virus de la fiebre amarilla, el virus de la encefalitis japonesa, y el virus del dengue.

10.2 Almacenamiento de Muestras

Las muestras se conservan mejor refrigeradas a 2-8°C y se analizan dentro de las 48 horas. Si hay un retraso de más de 48 horas antes de analizar la sangre total, el suero debe separarse y almacenarse por separado. La OMS recomienda que todos los demás tipos de muestras se mantengan a -20°C hasta por 7 días. Para un almacenamiento de más de 7 días, las muestras deben congelarse a -70°C. (Organización Mundial de la Salud, 2016).

10.3 Manejo de Muestras

El análisis de la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) en muestras clínicas de pacientes con sospecha o confirmación de que están infectados por los virus Zika, dengue, o chikungunya, se debe realizar bajo las condiciones del nivel de bioseguridad 2 (BSL-2) como se describe en Manual de Bioseguridad de Laboratorio de la OMS, tercera edición. Cualquier prueba de la presencia de los virus Zika, dengue, o chikungunya debe realizarse en laboratorios debidamente equipados por personal capacitado en los procedimientos técnicos y de seguridad pertinentes. Se deben seguir las directrices nacionales sobre seguridad de la biotecnología en todas las circunstancias (Organización Mundial de la Salud, 2016).

11 PROCEDIMIENTO

11.1 Configuración de RT-PCR en tiempo real

- Toda la mezcla maestra de RT-PCR en tiempo real, el control positivo, el control sin plantilla (agua libre de nucleasas) y los tubos de muestra se deben girar brevemente antes de usarlos para eliminar la condensación o los residuos de los tapas especialmente después de mezclar o en almacén.
- Antes de comenzar la configuración, descongele todos los reactivos y muestras en **hielo** o en un bloque frío.

11.2 Configuración de Control sin Plantilla

- Descongelar **Logix Smart ZDC mezcla maestra (ZDC-MM-001, Master Mix, o MM)** en hielo.
- Agitar **mezcla maestra** por no más de 3 segundos, y luego centrifugar.
- Poner la **mezcla maestra** en hielo.
- Pipetear una parte alícuota de 5µL de **mezcla maestra** en tubos de PCR en hielo.
- Agregar 5µL **agua libre de nucleasas (GEN-NF-001 o Nuclease Free Water)** al pozo apropiado(s).

11.3 Configuración de la Muestra y Control Positivo

- Preparar las muestras de pacientes extraídas y el control positivo en un espacio separado de la mezcla maestra y el agua libre de nucleasas para evitar la contaminación.
- Descongelar ARN purificado y extraído en hielo (si está congelado).
- Agitar y centrifugar ARN extraído durante unos segundos.
- Agregar 5µL de muestra de ARN extraída a cada pozo usando una nueva punta entre cada muestra.
- Descongelar el **control positivo de Logix Smart (ZDC-PC-001, Positive Control, o PC)** en el hielo.
- Agitar y centrifugar el **control positivo** a los pozos apropiados durante unos segundos.
- Agregar 5µL de **control positivo** a los pozos apropiados.
- Colocar tapones en los tubos de acuerdo con el sistema en tiempo real que se esté utilizando.
- Colocar la placa/tubos en la máquina de PCR de tiempo real y comensar la ejecución.

11.4 Configuración del Termociclador

Programe el termociclador a las condiciones que se encuentran en la **Tabla 2** con un volume de reacción total de 10µL:

Tabla 2 Condiciones del Termociclador

Temperatura	Tiempo	Ciclos	Captura
45°C	15 minutos		N/A
95°C	2 minutos		N/A
95°C	3 segundos	50	N/A
55°C	32 segundos		FAM (verde) Cal Fluor Red 610 (naranja) Cal Fluor Orange 560 (amarillo) Quasar 670 (rojo)

- Cuando finalice la ejecución, asegúrese de que el archivo de ejecución esté guardado.
- Verificar que pasan los controles positivos y negativos.

- Si pasan los controles, interprete los resultados de la muestra. Si los controles fallan, la ejecución no es válida. Documentar la ejecución e iniciar la solución de problemas.

12 ANÁLISIS DE LOS DATOS

Los estudios de verificación y validación realizados para **Logix Smart ZDC (ZDC-K-001)** se realizaron siguiendo los ensayos de Buenas Prácticas de Laboratorio para Biología Molecular (Viana & Wallis, 2011). Si no se cumplen estas condiciones, el rendimiento mostrará una mayor variabilidad debido a los errores del usuario durante la realización del experimento.

12.1 Controles Positivos

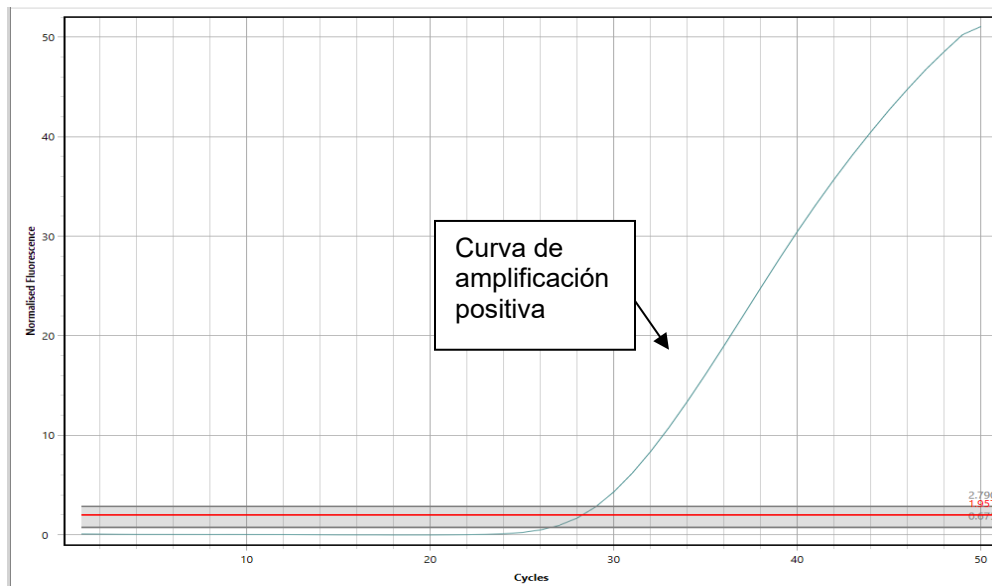


Figura 1: Amplificación de Control Positivo

Tabla 3: Rangos de Control Positivo para Valores de Umbral de Ciclo

Rango para Umbral de Ciclo Valores de Control Positivo*	
ZIKV (FAM)	26-29
DENGUE (CF560)	34-39
CHIKV (Q670)	24-27
IPC (CF610)	20-24
NTC	>45 or ninguna amplificación

ZIKV (FAM): Marcador de Zika Virus
 DENV (CF560): Marcador de Dengue Virus
 CHIKV (Q670): Marcador de Chikungunya Virus
 IPC (CF610): Marcador de RNasaP control positivo interno
 NTC: Control sin Plantilla

*Los valores de umbral del ciclo pueden variar ± 2 ciclos según la diferencia del instrumento.

Si el control positivo no muestra amplificación, entonces las pruebas no son válidas. La pérdida de amplificación para un control positivo es indicativo de la degradación de la mezcla maestra que puede resultar de que los reactivos estén a temperaturas superiores a -20°C durante más de una hora o se usen después de la fecha de vencimiento. El error de pipeteo también puede explicar la falta de amplificación del control positivo al pipetear el control en el pozo equivocado, faltar un pozo o pipetear una cantidad inadecuada de reactivo en un pozo de reacción.

12.2 Controles sin Plantilla

Los resultados del control sin plantilla deberían mostrar resultados como aparece a continuación:

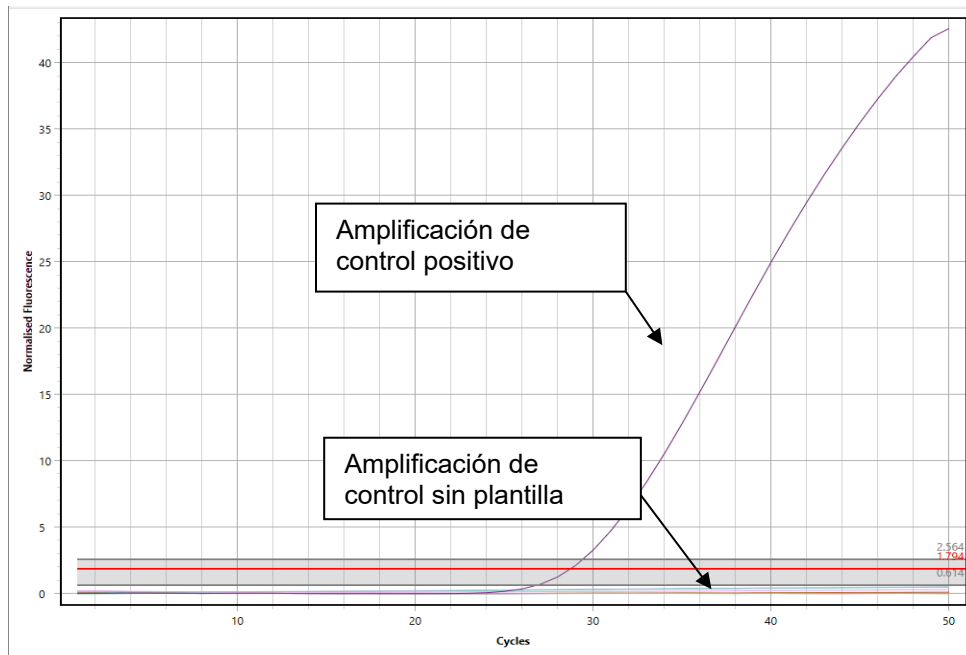


Figura 2: Amplificación de Control sin Plantilla

Ocasionalmente, el enlace ubicuo causará una amplificación sin control de plantilla en el canal del control positivo interno IPC (CF610) como aparece en la siguiente figura:

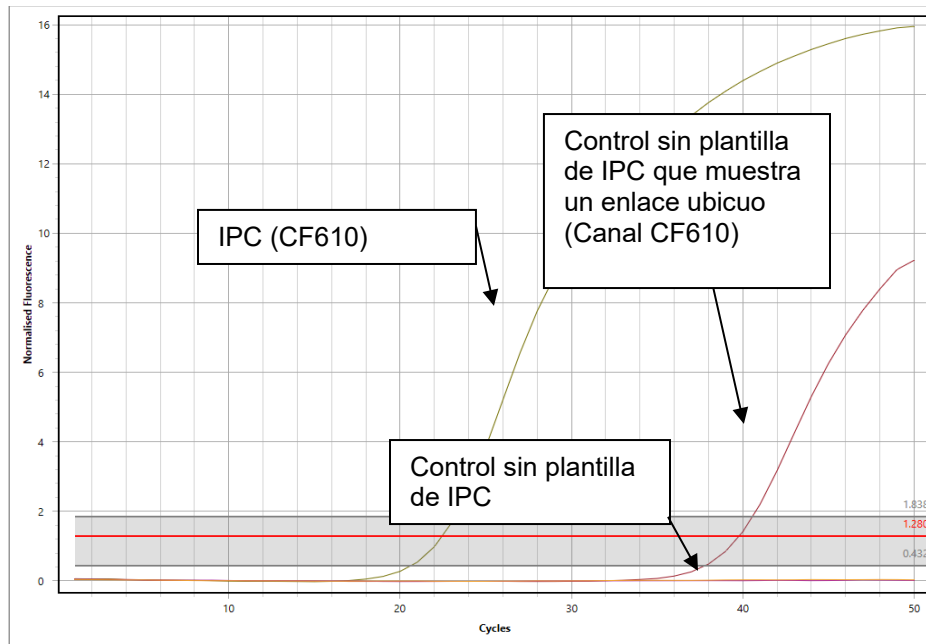


Figura 3: Enlace ubicuo de control sin plantilla en el canal IPC CF610

Si el control sin plantilla muestra cualquier amplificación de ZDC <45 ciclos, los resultados no son válidos y se debe repetir todo el experimento. La amplificación de ZDC en un control sin plantilla indica contaminación en uno o más de los reactivos o error de pipeteo. La amplificación de ZDC >45 ciclos está fuera del rango detectable y se considera negativa

12.3 Interpretación de Resultados

Después de que los controles han pasado, las muestras desconocidas se pueden interpretar según tres resultados posibles (las cifras pueden variar según la máquina utilizada y la cantidad de MM y la muestra).

- Positivo (Figura 4 y Figura 6)
- Negativo (**Error! Reference source not found.**)
- Negativo debido a material nuclear inadecuado (Figura 8)

Un resultado **positivo** mostrará una curva de amplificación o un valor de umbral de ciclo para ZIKV, DENV, o CHIKV en o por debajo de 45 ciclos. Las curvas de amplificación son mayores de 45 ciclos para ZDC están fuera de los límites de detección para el ensayo. Una muestra positiva tendrá las siguientes curvas en el canal respectivo del objetivo Y el canal IPC CF610.

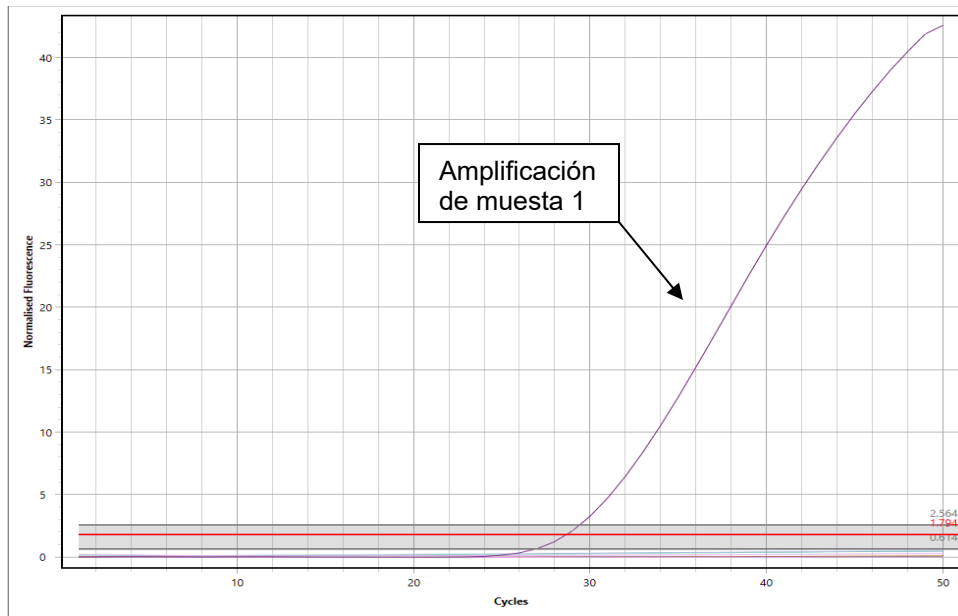


Figura 4: Muestra Positiva de ZDC en FAM/CF560/Q670

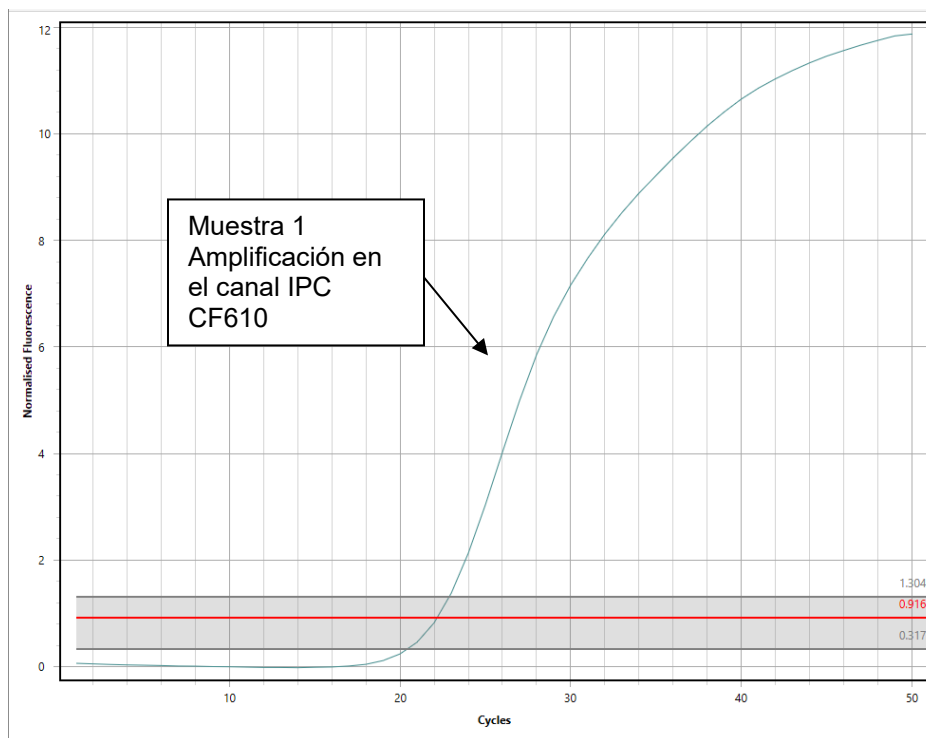


Figura 5: Muestra Positiva de ZDC en IPC CF610

La presencia de una curva para una muestra positiva en FAM/CF560/Q670 indica un resultado positivo. La amplificación del IPC (CF610) muestra que la extracción fue exitosa.

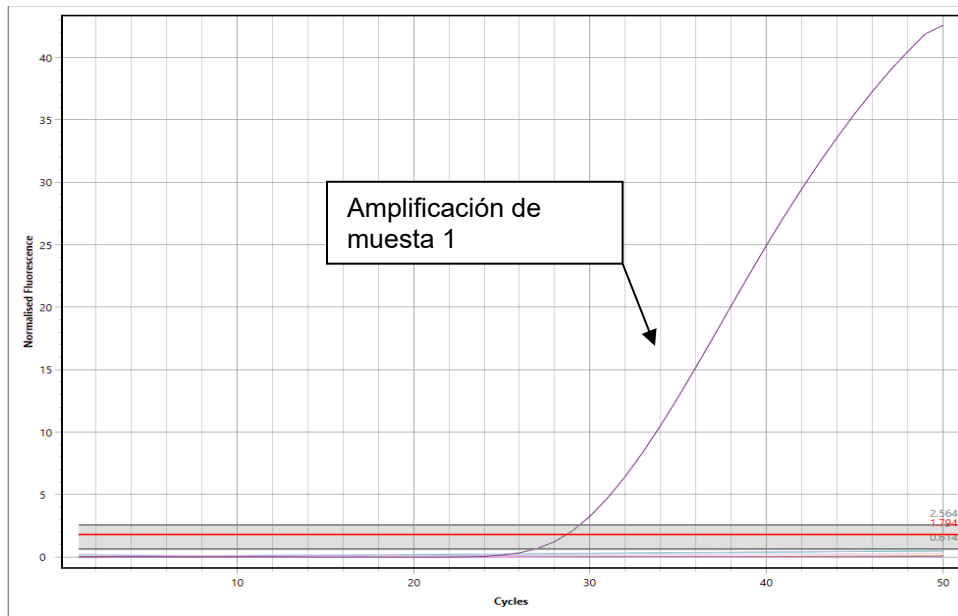


Figura 6: Muestra Positiva de ZDC en FAM/CF560/Q670

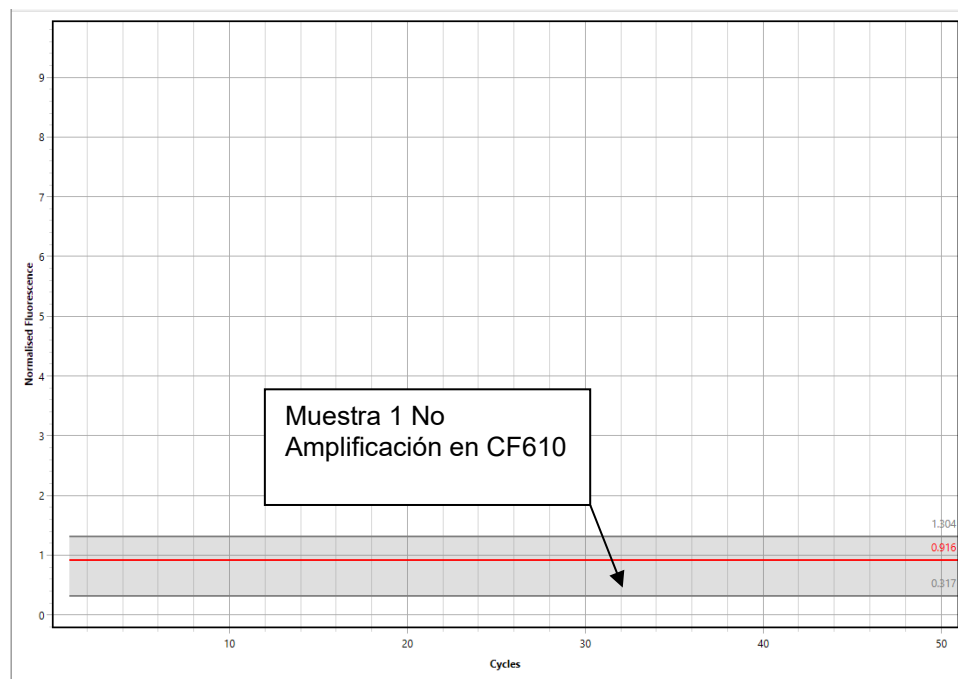


Figura 7: ZDC Muestra con no Amplificación en IPC CF610

La presencia de una curva para ZDC indica un resultado positivo incluso cuando el marcador RNasaP (IPC) es negativo. Esto ocurrirá cuando la concentración de ZDC sea mayor que la concentración de RNasaP o cuando se utilice lisados celulares o muestras extremadamente puras/estériles.

Un resultado negativo no mostrará amplificación para ZIKV, DENV, o CHIKV; sin embargo, ocasionalmente se produce una amplificación de más de 45 ciclos en los canales ZDC o RNasaP. Cualquier curva de amplificación mayor de 45 ciclos para ZDC está fuera de los límites de detección para el ensayo. Un resultado de muestra negativa tendrá la curva en *Figura 8*:

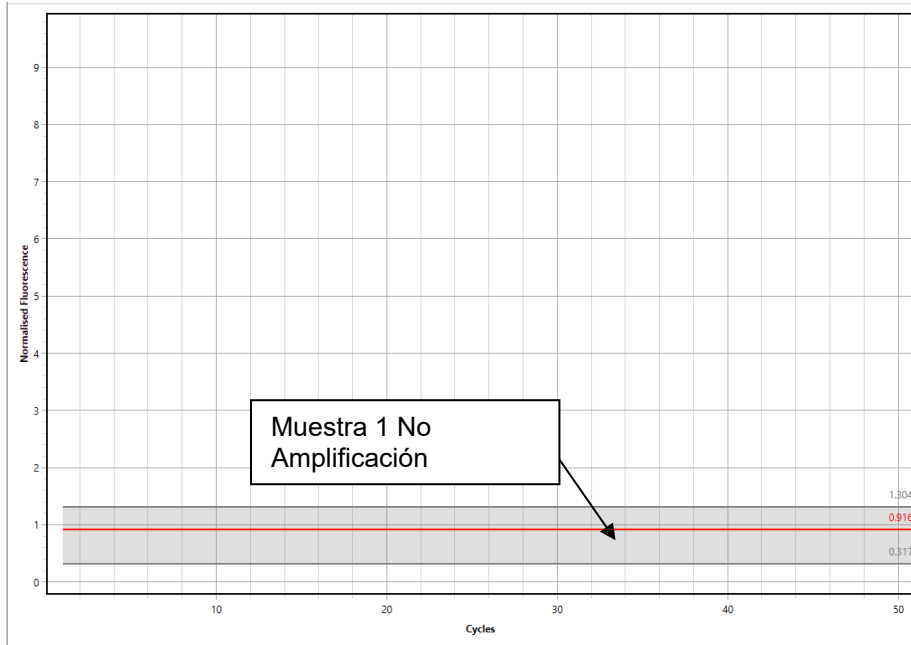


Figura 8: Negativo debido a Material Nuclear Inadecuado (FAM/CF560/Q670)

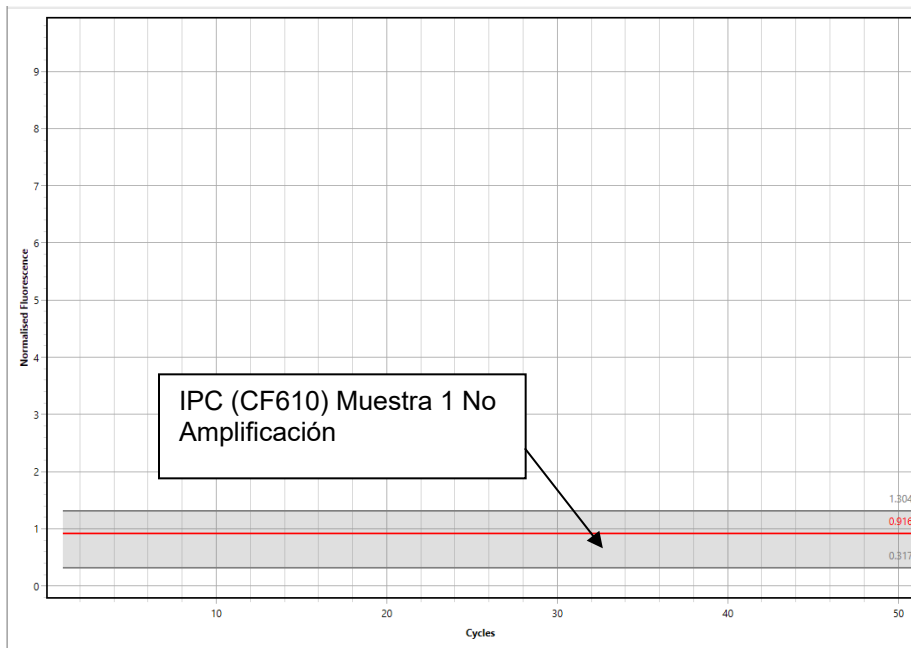


Figura 9: Negativo debido a Material Nuclear Inadecuado (IPC CF610)

Si el marcador de control RNaseP (IPC) también es negativo, el resultado es negativo debido a un material nuclear inadecuado. Esto puede resultar de un error humano en la preparación de la muestra, la degradación de la muestra, o un muestreo inadecuado. La prueba se puede repetir con una nueva muestra o se puede llamar negativa debido a un material nuclear inadecuado.

Las muestras obtenidas de cultivo o sitios estériles/puros (por ejemplo, LCR, orina, lisados celulares, etc.) pueden no contener el gen RNaseP humano. En tal caso, los dos marcadores negativos indican un resultado negativo verdadero para Zika, serotipos 1-4 de dengue, o chikungunya.

La interpretación de los resultados con valores del umbral de ciclo se puede traducir a la siguiente tabla:

Tabla 4 Interpretación de Resultados con Valores de Umbral de Ciclo

Marcador	Instrumento	Muestra	Control Positivo	Control sin Plantilla	Resultado Final	Razón Fundamental
ZIKV (FAM)	Negativo (-)	No hay amplificación a <45 ciclos en ninguna muestra: suero, plasma, LCR, u orina.	Control Positivo (PC) Siempre debe amplificar con el valor de umbral de ciclo que se describe en la Tabla 3 . Si el IPC no amplifica, consulte la solución de problemas.	Control sin Plantilla (NTC) No siempre se debe amplificar. Si hay alguna amplificación con NTC, consulte la resolución de problemas.	Negativo (-)	No se ha detectado ARN de ZIKV en ninguna de las muestras.
	Positivo (+)	Amplificación a <45 ciclos en cualquier muestra: suero, plasma, LCR, u orina.			Positivo (+)	Se ha detectado ARN de ZIKV con 99% de certeza* para suero/plasma, 92% para orina, y 95% para LCR.
DENV (CF560)	Negativo (-)	No hay amplificación a <45 ciclos en ninguna muestra: suero o plasma.			Negativo (-)	No se ha detectado ARN de DENV en ninguna de las muestras.
	Positivo (+)	Amplificación a <45 ciclos en cualquier muestra: suero o plasma.			Positivo (+)	Se ha detectado ARN de DENV con 100% de certeza* para suero/plasma.

Marcador	Instrumento	Muestra	Control Positivo	Control sin Plantilla	Resultado Final	Razón Fundamental
CHIKV (Q670)	Negativo (-)	No hay amplificación a <45 ciclos en ninguna muestra: suero o plasma.			Negativo (-)	No se ha detectado ARN de CHIKV en ninguna de las muestras.
	Positivo (+)	Amplificación a < 45 ciclos en cualquier muestra: suero o plasma.			Positivo (+)	Se ha detectado ARN de CHIKV con 100% de certeza* para suero y 99% para plasma.

*La certeza aquí revelada se refiere al valor predictivo negativo (VPN), que es la certeza de que un resultado positivo es positivo. Para los resultados de VPN para Logix Smart ZDC, consulte la **Tabla 6**.

13 SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

13.1 Estabilidad

La vida útil en tiempo real y acelerada, y los estudios de estabilidad en uso están actualmente en fase de prueba. La fecha de caducidad de este producto se ha establecido como 12 meses.

Utilice siempre la versión más reciente de este documento para las actualizaciones, ya que se agregará más información sobre la estabilidad cuando se completen los estudios.

13.2 Errores de Usuario

El ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica que utiliza ciclos de temperatura y una polimerasa de ADN para amplificar una o varias copias de un segmento de ADN o ARN. Las Buenas Prácticas de Laboratorio para el Diagnóstico de Biología Molecular (Viana & Wallis, 2011) son necesarias para el uso de este producto. Este producto no está destinado a ser utilizado por personal no capacitado.

Es esencial para el usuario tener algo de experiencia en biología molecular y estar familiarizado con la técnica de pipeteo adecuada para evitar errores, como salpicaduras, contaminación cruzada y errores en la selección de volúmenes. Las puntas de las pipetas deben reemplazarse después de cada pipeteo. Los guantes deben ser reemplazados a menudo. El equipo debe tener la calibración actualizada para las pipetas y los termocicladores, cuando corresponda.

Una capacitación de solo 90 minutos sobre buenas prácticas de laboratorio para pruebas de genética molecular (Centros para el Control y Prevención de Enfermedades, 2017) está disponible en el sitio

de web de los CDC en el siguiente enlace: <https://www.cdc.gov/labtraining/training-courses/good-lab-practices-molecular-genetics-testing.html>

13.3 Resultados Inválidos

El control positivo y el control sin plantilla se validan, fabrican, y prueban junto con el mezcla maestra. El propósito de estos controles es autenticar que el rendimiento del mezcla maestra, así como validar la técnica de usuario utilizada durante el experimento. Si el usuario tiene un uso inadecuado de las técnicas requeridas para realizar un ensayo de biología molecular, es más probable que el control positivo no lo amplifique o el control sin plantilla que muestre la amplificación.

13.3.1 Control Positivo no Amplificante

Ninguna amplificación del control positivo sugiere que la PCR no está funcionando. Esto podría ser el resultado de uno o varios factores, tales como: errores de pipeteo, degradación de la mezcla maestra, degradación del control positivo o se usaron los reactivos incorrectos. Sin más evidencia, es mejor ignorar los resultados de las muestras de pacientes y volver a realizar una investigación para identificar las causas posibles de error, y la prueba debe reprocesarse desde la extracción o no, según los resultados de la investigación y los riesgos identificados en el proceso.

13.3.2 Control sin Plantilla No Muestra Amplificación

Significa que por alguna razón (por ejemplo, contaminación por pipeteo, salpicaduras en la placa de PCR, contaminación del usuario), un error causó que el control sin plantilla (agua libre de nucleasas) se contaminó con el control positivo o con la muestra, porque es más probable que el mismo error podría haberle ocurrido a la muestra, no se puede confiar en los resultados, y la prueba se debe invalidar. Se debe realizar una investigación para identificar las causas posibles de error y la prueba debe reprocesarse desde la extracción o no, según los resultados de la investigación y los riesgos indentificados en el proceso.

14 EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO

La evaluación diagnóstica se basa únicamente en muestras clínicas sintéticas con suero, plasma, y orina utilizados para la matriz.

Tabla 5 Límite de detección de Logix Smart ZDC

Marcador	Muestra	Cepa	LDD
virus de Zika	Suero (virus fue agregado después de la extracción)	linaje asiático, PRVABC59	3.19 x10⁴ copias/mL
		africano, MR766	3.23 x10⁴ copias/mL
	Plasma (virus fue agregado antes de la extracción)	linaje asiático, PRVABC59	1.52 x10⁴ copias/mL
	Orina (virus fue agregado después de la extracción)	linaje asiático, PRVABC59	6.23 x10⁴ copias/mL
	LCR (virus fue agregado después de la extracción)	linaje asiático, PRVABC59	4.83 x10⁴ copias/mL
virus de chikungunya	Suero (virus fue agregado después de la extracción)	S27 Petersfield	1.03 x10³ copias/mL
	Plasma (virus fue agregado antes de la extracción)	R91064	4.27 x10³ copias/mL
virus de Dengue (serotipos 1-4)	Plasma (virus fue agregado después de la extracción)	Virus del dengue sintético y cuantitativo, serotipo 1 ARN	2.11 x10⁵ copias/mL
		N/A IDT (plantilla de ARN sintética)	8.21 x10⁴ copias/mL
		Dengue serotipo 2, Nueva Guinea C	9.08 x10⁴ copias/mL
		Dengue serotipo 3, H87	5.05 x10⁴ copias/mL
		Dengue serotipo 4, H241	2.69 x10⁵ copias/mL
	Plasma (virus fue agregado antes de la extracción)	Dengue serotipo 1, Hawái	4.03 x10² UFC/mL
		Dengue serotipo 2, Nueva Guinea C	7.27 x10² UFC/mL
		Dengue serotipo 3, H87	1.91 x10² UFC/mL
		Dengue serotipo 4, H241	6.13 x10² UFC/mL

Tabla 6 Precisión Diagnóstica de Logix Smart ZDC

	Zika				Dengue		Chikungunya	
	Suero	Plasma	Orina	LCR	Suero	Plasma	Suero	Plasma
Sensibilidad	97.20%	93.22%	91.43%	96.00%	97.96%	99.33%	98.97%	94.36%
Especificidad	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
Exactitud	1.00	0.99	0.96	0.98	1.00	1.00	1.00	0.99
PPV	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
NPV	0.99	0.99	0.92	0.95	1.00	1.00	1.00	0.99
MCC	0.98	0.96	0.92	0.95	0.99	0.99	0.99	0.96

Nota: PPV, Valor predictivo positivo; VAN, valor predictivo negativo; MCC, coeficiente de correlación de Matthews.

La especificidad analítica se realiza con pruebas húmedas y análisis en silico con microorganismos de interés que deben detectarse y el microorganismo relevante que no debe reaccionar de forma cruzada o interferir con el rendimiento de este producto. Especificidad también probó el rendimiento de la prueba **Logix Smart ZDC** con sustancias comunes que interfieren.

Logix Smart ZDC mostró una especificidad del 100% sin reaccionar de forma cruzada con otros microorganismos, ni tener un rendimiento alterado por estos microorganismos o sustancias interferentes. La única sustancia que actúa como interferencia fue la heparina, que es un inhibidor de la PCR bien conocido. Las advertencias sobre la heparina se han incluido en la sección de advertencia de este documento.

La prueba húmeda se realizó con el siguiente microorganismo: Virus del Nilo Occidental (VNO), Sarampión, Virus de Epstein-Barr, Virus de la Varicela-Zoster, Encefalitis Equina del Este, Encefalitis de San Luis, Encefalitis por garrapatas (TBEV), Influenza A H1, Influenza A H1N1, Influenza A H5, Influenza B, y Borrelia Burgdorferi.

El análisis en silico se ha realizado con el siguiente microorganismo: Lassa Virus (LASV), Leptospira, Rickettsias y Spondweni (SPOV).






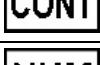







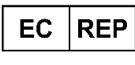

15 REFERENCIAS

Araújo, T. V., Ximenes, R. A., Miranda-Filho, D. d., Souza, W. V., Montarroyos, U. R., Melo, A. P., . . . Rodrigues, L. C. (2018, March 1). Association between microcephaly, Zika virus infection, and. *The Lancet Infectious Diseases*, 328–336. doi:[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30727-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30727-2)

Centers for Disease Control and Prevention. (2017, Oct 27). *CDC Laboratory Training: Good Laboratory Practices for Molecular Genetics Testing*. Retrieved Mar 5, 2019, from CDC: <https://www.cdc.gov/labtraining/training-courses/good-lab-practices-molecular-genetics-testing.html>

- Gourinat, A.-C., O'Connor, O., Calvez, E., Goarant, C., & Dupont-Rouzeyrol, M. (2015). Detection of Zika Virus in Urine. *Emerging Infectious Disease Journal*, 21(1), 84-86.
doi:dx.doi.org/10.3201/eid2101.140894.
- Relich, R. F., & Loeffelholz, M. (2017). Zika Virus. *Clinics in Laboratory Medicine*, 37(2), 253-267.
doi:10.1016/j.cll.2017.01.002
- Silva, L. A., & Dermody, T. S. (2017, Mar 1). Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. *The Journal of Clinical Investigation*, 127(3), 737-749. doi:10.1172/JCI84417
- Viana, R. V., & Wallis, C. L. (2011). Good Clinical Laboratory Practices (GLCP) for Molecular Based Tests Used in Diagnostic Laboratories. In D. I. Akyar, *Wide Spectra of Quality Control* (pp. 29-52). InTech. Retrieved from <http://www.intechopen.com/books/wide-spectra-of-quality-control/goodclinical-laboratory-practice-gclp-for-molecular-based-tests-used-in-diagnostic-laboratories>
- Wilder-Smith, A., & Gubler, D. J. (2008, Nov 1). Geographic Expansion of Dengue: The Impact of international Travel. *Medical Clinics of North America*, 92(6), 1377-1390.
- World Health Organization. (2016, March 23). *Laboratory testing for Zika virus infection*. Retrieved September 15, 2018, from World Health Organization:
http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204671/WHO_ZIKV_LAB_16.1_eng.pdf?sequence=1
- World Health Organization. (2016). Zika Strategic Reponse Plan.
- World Health Organization. (2018). *2018 Annual review of disease prioritized under the Research and Development Blueprint*. Retrieved September 15, 2018, from
<http://www.who.int/emergencies/diseases/2018prioritization-report.pdf?ua=1>

16 LEYENDA DE LOS SÍMBOLOS DE PAQUETE

Icono	Definición
	Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>
	Número de catalogo
	Código de lote
	Color de tapa
	Componente
	Contenido/Volumen
	Número
	Fecha de caducidad
	Contiene suficiente para 100 pruebas/reacciones
	Proteger de la luz
	Límite de temperatura
	Consulte las instrucciones de uso
	Fabricante
	Representante autorizado en la comunidad Europea
	Marcado CE para IVD de acuerdo con la Directiva de la UE 98/79/EC