

VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

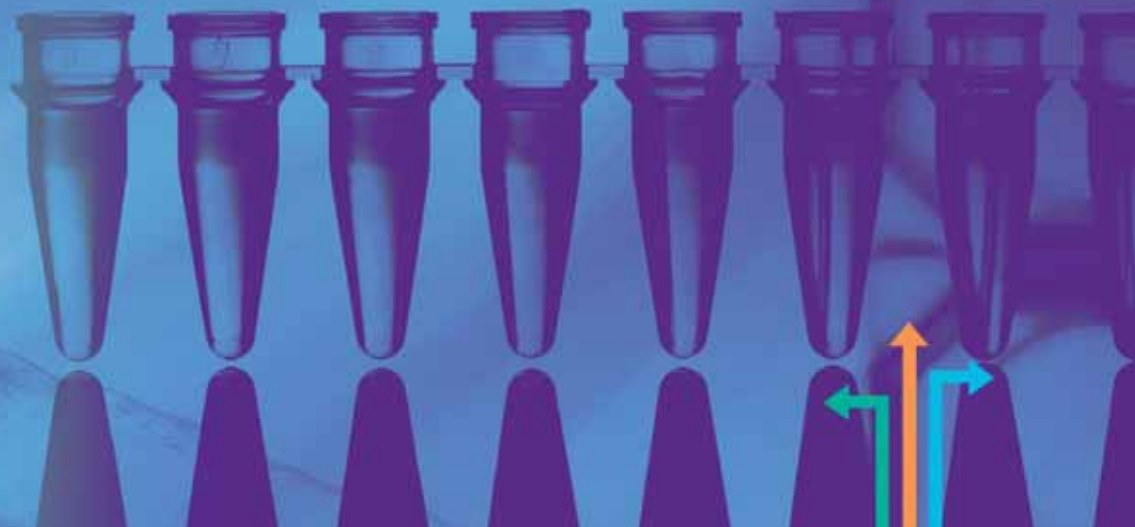
by CerTest
BIOTEC

Trypanosoma cruzi

Handbook for the following references/
Manual para las siguientes referencias:

VIASURE <i>Trypanosoma cruzi</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-CHA106L
VIASURE <i>Trypanosoma cruzi</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-CHA106H
VIASURE <i>Trypanosoma cruzi</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-CHA112L
VIASURE <i>Trypanosoma cruzi</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-CHA112H
VIASURE <i>Trypanosoma cruzi</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-CHA113L
VIASURE <i>Trypanosoma cruzi</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-CHA113H

For information purposes only



ENGLISH

1. Intended use

VIASURE *Trypanosoma cruzi* Real Time PCR Detection Kit is designed for detection of *Trypanosoma cruzi* in blood products from patients with clinical suspicion and/or symptoms of *Chagas disease*. This test is intended for use as an aid in the diagnosis of the *Trypanosoma cruzi* in combination with clinical and epidemiological risk factors. DNA is extracted from blood specimens, multiplied using Real Time amplification and detected using specific primers and a fluorescent reporter dye probe for *T. cruzi*.

2. Summary and Explanation

Chagas disease (CD), also known as American trypanosomiasis, is a potentially life-threatening illness caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). It is endemic in Latin America and spreading around the globe due to human migration. This microorganism is a hemoflagellate protozoan of the order *Kinetoplastida* and family *Trypanosomatidae*. *T. rangeli* is the second most common trypanosome species that infects humans in Latin-American countries, but it is a non-pathogenic parasite to humans and other mammals.

Trypanosoma cruzi is transmitted to humans by blood-sucking triatomine bugs, congenital transmission, blood transfusion, organ transplantation and by consuming food and juice contaminated with the parasite. Chagas disease to humans has two forms of transmission, natural and secondary transmissions. Natural transmission occurs when blood-sucking bugs from the triatominae subfamily eliminate the *T. cruzi* by feces or urine onto the skin of a human after feeding, which leads to scratch in the region because the feces or urine cause irritation. Thus, a small fissure is created in the skin that is sufficient for entry of the parasite into the bloodstream. Secondary transmission occurs by means of the transfusion, transplant, breastfeeding as well as during pregnancy.

Clinically, Chagas disease has two clinical phases: the acute early stage/phase (fatal for 2-8% of infected people) lasting up to 2 months which is characterized by fever and many circulating parasites in bloodstream but usually asymptomatic or unrecognized, and the chronic phase which can be classified into the indeterminate and determinate forms. The indeterminate stage may last for decades after infection, during which patients can transmit the parasite to others. The patient has evidence of immunity but remains infected. At this stage, infection is controlled, but the immune system does not prevent disease progression. Thirty to 40% of infected patients develop the chronic and symptomatic stage which causes cardiomyopathies and digestive tract pathologies.

Diagnosis is traditionally performed by serological methods based on different antigens (ELISA, IFA). Conversion to negative serology is currently the only test available to assess parasitological cure. However, this negative seroconversion can take years to decades after treatment to occur in adult population and is therefore not adequate as an endpoint for clinical trials. The polymerase chain reaction (PCR) could be the tool to amplify parasite DNA sequences with high specificity and sensitivity.

3. Principle of the procedure

VIASURE *Trypanosoma cruzi* Real Time PCR Detection Kit is designed for the diagnosis of the *Trypanosoma cruzi* in blood products. After DNA isolation, the identification of *Trypanosoma cruzi* is performed by a fragment



amplification in a repeated conserved region called satellite DNA using specific primers and a fluorescent-labelled probe.

VIASURE *Trypanosoma cruzi* Real Time PCR Detection Kit is based on 5' exonuclease activity of DNA polymerase. During DNA amplification, this enzyme cleaves the probe bound to the complementary DNA sequence, separating the quencher dye from the reporter. This reaction generates an increase in the fluorescent signal which is proportional to the quantity of the target template. This fluorescence could be measured on Real Time PCR platforms.

VIASURE *Trypanosoma cruzi* Real Time PCR Detection Kit contains in each well all the components necessary for real time PCR assay (specific primers/probes, dNTPs, buffer, polymerase) in a stabilized format, as well as an internal control to monitor PCR inhibition. *Trypanosoma cruzi* DNA targets are amplified and detected in FAM channel and the internal control (IC) in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used select the proper detection channel, see Annex 2).

4. Reagents provided

VIASURE *Trypanosoma cruzi* Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Table 1 and Table 2:

Reference	Reagent/Material	Description	Colour	Amount
VS-CHA1SL/ VS-CHA1SH	<i>Trypanosoma cruzi</i> 8-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	White	6/12 x 8-well strip
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
VS-CHA1C	<i>Trypanosoma cruzi</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
VS-NC1	Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	6/12 X 8-cap strip

Table 1. Reagents and materials provided in VIASURE *Trypanosoma cruzi* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-CHA106L, VS-CHA106H, VS-CHA112L and VS-CHA112H.



Reference	Reagent/Material	Description	Color	Amount
VS-CHA1PL/ VS-CHA1PH	<i>Trypanosoma cruzi</i> 96-well plate	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	White	1 plate
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
VS-CHA1C	<i>Trypanosoma cruzi</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
VS-NC1	Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing plate during thermal cycling	Transparent	12 X 8-cap strip

Table 2. Reagents and materials provided in VIASURE *Trypanosoma cruzi* Real Time PCR Detection Kit with Ref VS-CHA113L and VS-CHA113H.

5. Reagents and equipment to be supplied by the user

The following list includes the materials that are required for use but not included in the VIASURE *Trypanosoma cruzi* Real Time PCR Detection Kit.

- Real Time PCR instrument (thermocycler).
- DNA extraction kit.
- Centrifuge for 1.5 mL tubes and PCR-well strips or 96-well plate (if available).
- Vortexer.
- Micropipettes (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Filter tips.
- Powder-free disposable gloves.

VIASURE *Trypanosoma cruzi* Real Time PCR Detection Kit has been validated on the following equipments: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-Technology DTlite Real-Time PCR System, Rotor-Gene® Q (Qiagen), SmartCycler® (Cepheid), Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer, VIASURE 48 Real Time PCR System and VIASURE 96 Real Time PCR System. When using the Applied Biosystems 7500 Fast with strips it is recommend to place a plate holder to reduce the risk of crushed tube (Ref. PN 4388506).

To check thermocycler compatibility, see Annex 1, to check most common detection channels see Annex 2 and to check optical measurement exposure setting see Annex 3.

6. Transport and storage conditions

- The kits can be shipped and stored at 2-40°C until the expiration date which is stated on the label.
- Once the positive control has been re-suspended, store it at -20°C. We recommend to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles. Positive control has been validated as still being stable after 6 freeze-thaw cycles.
- Keep components away from sunlight.



7. Precautions for users

- The product is intended for use by professional users only, such as laboratory or health professionals and technicians, trained in molecular biological techniques.
- Do not use past expiration date.
- Do not use reagents if the protective pouches are open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if desiccant is not present or broken inside reagent pouches.
- Do not remove desiccant from reagent pouches once is open.
- Close protective pouches of reagents promptly with the zip seal after each use (if available, Ref. VS-CHA113L and VS-CHA113H). Remove any excess air in the pouches prior to sealing.
- Do not use reagents if the foil has been broken or damaged.
- Do not mix reagents from different envelopes and / or kits and / or lots and / or another supplier.
- Protect reagents against from humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- Design a unidirectional workflow. It should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Area. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposable gloves, goggles and mask. Do not eat, drink or smoke in the working area. Once you finish the test wash your hands.
- Specimens must be treated as potentially infectious, as well as all the reagents and materials that have been exposed to the samples and they must be handled according to the national safety regulations. Take necessary precautions during the collection, storage, treatment and disposal of samples.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.
- Consult safety data sheets, upon request.

8. Test procedure

8.1. DNA extraction

Perform the sample preparation according to the recommendations appearing in the instructions for use of the extraction kit used.

For DNA extraction from blood products you can use your manually or automatic routine optimized system. Also, you can use any commercially available DNA extraction kit and follow the manufacturer's instructions for use. We have validated the following extraction kits:

- Viasure RNA-DNA Extraction kit (VIASURE), recommended.
- Invisorb® Spin Universal Kit (Strattec).
- MagDEA Dx SV kit, using the magLEAD® 6gC instrument (Precision System Science Co.)



8.2. Lyophilized positive control

Trypanosoma cruzi Positive Control contains high copies of the template, the recommendation is to open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components. Reconstitute the lyophilized *Trypanosoma cruzi* Positive Control (red vial) by adding 100 µL of the supplied Water RNase/DNase free (white vial) and vortex thoroughly.

Once the positive control has been re-suspended, store it at -20°C. We recommend to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

8.3. PCR protocol

Determine and separate the number of required reactions including samples and controls. One positive and negative control must be included in each run for each assay. Peel off protective aluminium seal from plates or strips.

- 1) Reconstitute the number of wells you need.

Add 15 µL of Rehydration Buffer (blue vial) into each well.

- 2) Adding samples and controls.

Add 5 µL of DNA extracted from each sample, reconstituted *Trypanosoma cruzi* Positive Control (red vial) or Negative Control (violet vial) in different wells and close them with the provided caps. It is recommended to briefly centrifuge the 8-well strips or 96-well plate.

Load the plate or the strips in the thermocycler.

- 3) Set up the thermocycler (to check compatibility see Annex 1).

Program the thermocycler following the conditions listed below and start the run:

Cycles	Step	Time	Temperature
1	Polymerase activation	2 min	95°C
45	Denaturation	10 seg	95°C
	Annealing/Extension (Data collection*)	50 seg	60°C

Table 3. PCR protocol

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (*Trypanosoma cruzi*) and HEX, JOE or VIC channels (IC). Depending on the equipment used select the proper detection channel (see Annex 2). In the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne Plus™ Real-Time PCR System and Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System check that the passive reference option for ROX is none. In the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System select Ramp Speed Standard in Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.



9. Result interpretation

The use of positive and negative controls in each run, validate the reaction by checking the absence of signal in the negative control well and the presence of signal for *Trypanosoma cruzi* in the positive control well. Check Internal Control signal to verify the correct functioning of the amplification mix. The analysis of the samples is done by the software of the used real time PCR equipment itself according to manufacturer’s instructions.

Using the following table read and analyze the results:

<i>Trypanosoma cruzi</i> (FAM)	Internal control (HEX)	Negative Control	Positive Control	Interpretation
+	+/-	-	+	<i>Trypanosoma cruzi</i> Positive
-	+	-	+	<i>Trypanosoma cruzi</i> Negative
-	-	-	+	Experiment fail
+	+	+	-	Experiment fail

Table 4. Sample interpretation

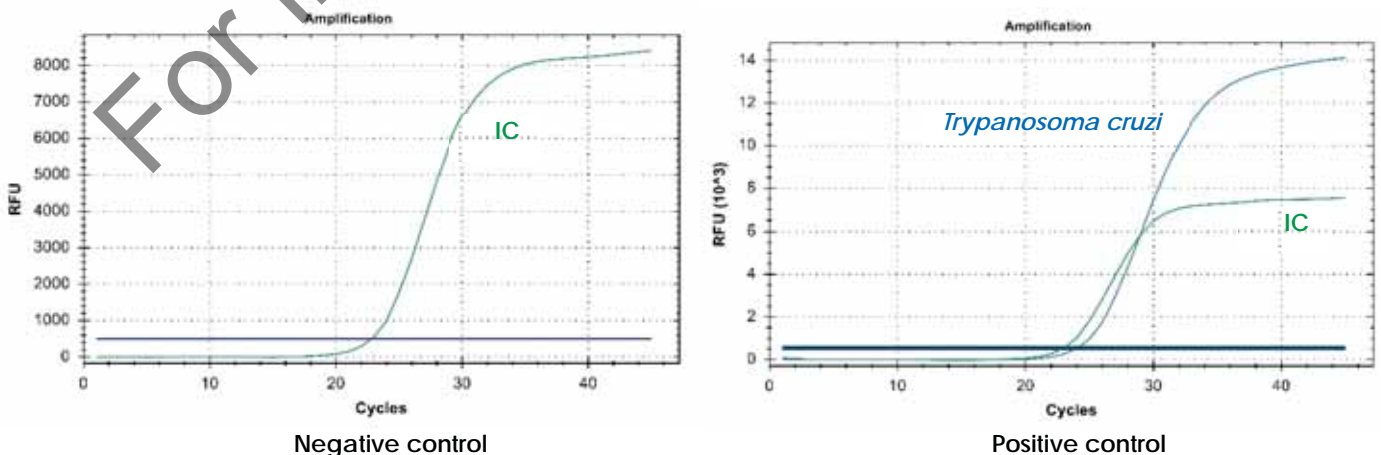
+: Amplification curve

-: No amplification curve

A sample is considered positive if the Ct value obtained is less than 40 and the internal control shows or not an amplification signal. Sometimes, the detection of internal control is not necessary because a high copy number of target can cause preferential amplification of target-specific nucleic acids

A sample is considered negative, if the sample shows no amplification signal in the detection system but the internal control is positive. An inhibition of the PCR reaction can be excluded by the amplification of internal control.

Figure 1. Correct run of negative and positive control run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System.



The result is considered invalid if there is signal of amplification in negative control or absence of signal in the positive well. We recommend to repeat the assay again.

In case of absence of internal control signal in sample wells we recommend to repeat the assay diluting the sample 1:10 or to repeat the extraction to check for possible problems of inhibition.

10. Limitations of the test

- The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.
- Although this assay can be used with other types of samples, it has been validated only with DNA extracted from blood products.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper extracted nucleic acid from clinical samples must be extracted. Unsuitable collection, storage and/or transport of specimens may give false negative results.
- Extremely low levels of target below the limit of detection might be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by *Trypanosoma cruzi* either by samples containing high concentrations of target DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.

11. Quality control

VIASURE *Trypanosoma cruzi* Real Time PCR Detection Kit contains a positive and a negative control that must be included in each run to correctly interpret the results. Also, the internal control (IC) in each well confirms the correct performance of the technique.

12. Performance characteristics

12.1. Clinical sensitivity and specificity

The clinical performance of VIASURE *Trypanosoma cruzi* Real Time PCR Detection Kit was evaluated using 12 spiked serum samples with different amount of DNA from *Trypanosoma cruzi* Y strain. DNA was isolated with "VIASURE RNA-DNA Extraction Kit" (Certest Biotec) and "MagDEA Dx SV kit" ((Precision System Science Co.) according to the manufacturer's instructions. All *T. cruzi* dilutions were correctly detected using VIASURE *Trypanosoma cruzi* Real Time PCR Detection kit.

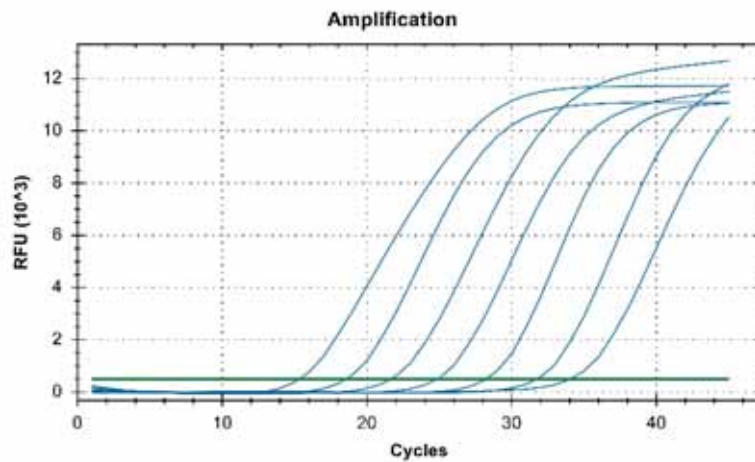
In conclusion, the results show a high sensitivity and specificity to detect *T. cruzi* using VIASURE *Trypanosoma cruzi* Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Analytical sensitivity

VIASURE *Trypanosoma cruzi* Real Time PCR Detection Kit has a detection limit of ≥ 10 DNA copies per reaction. (Figure 2).



Figure 2. Dilution series of *Trypanosoma cruzi* (10⁷-10¹ copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (channel FAM).



12.3. Analytical specificity

The specificity of the *Trypanosoma cruzi* assay was confirmed by testing a panel consisting of different microorganisms representing the most common transmission by ticks (through insect faeces), meningitis, tropical, immunocompromised and gastrointestinal pathogens. No cross-reactivity was detected between almost any of the following microorganisms tested.

Cross-reactivity testing					
<i>Borrelia burgdorferi</i> (IRS strain)	-	West Nile Virus (Heja)	-	Zika Virus (African strain)	-
<i>Coxiella burnetii</i> (Nine Mile Q strain)	-	West Nile Virus (NY99)	-	Zika Virus (Asian strain PF13/251013-18)	-
<i>Plasmodium falciparum</i> (3D7 strain)	-	West Nile Virus (Ug37)	-	Zika Virus (French Polynesian strain 11474/16)	-
<i>Rickettsia conorii</i> (Morocann strain)	-	Yellow Fever Virus (17D strain)	-	Dengue 1 virus strain Hawaii	-
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhi</i>	-	St Louis Encephalitis Virus	-	Dengue 2 virus strain New Guinea C	-
<i>Toxoplasma gondii</i> Type II	-	Epstein Barr virus	-	Dengue 3 virus strain H87	-
<i>Trypanosoma rangeli</i>	-	Chikungunya virus strain S27 Petersfield	-	Dengue 4 virus strain H241	-

Table 5. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

12.4. Analytical reactivity

The reactivity of VIASURE *Trypanosoma cruzi* Real Time PCR Detection Kit was evaluated against *Trypanosoma cruzi* Y strain showing positive results.



ANNEX 1

COMPATIBILITY WITH THE MOST COMMON REAL TIME PCR EQUIPMENT

Low profile strips can be used in all PCR thermocyclers equipped with a low profile block, like the systems listed in table A.1. High profile strips can be used in all PCR thermocyclers equipped with a high or regular profile block, like the systems listed in table A.2. If you do not find your thermocycler in the list below, please contact with your supplier.

Table A.1 LOW PROFILE BLOCK THERMOCYCLERS	
Manufacturer	Model
Agilent Technologies	AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Roche	LightCycler® 480 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	LightCycler® 96 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	Cobas z480 Analyzer ⁽⁴⁾

Table A.2 HIGH PROFILE BLOCK THERMOCYCLERS	
Manufacturer	Model
Abbott	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7900 HT Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7000 ⁽⁶⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7700 ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Analytik Jena Biometra	Optical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ Deep Well / CFX96™ Deep Well IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Bio-Rad	MyiQ™2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler ⁽²⁾
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System ⁽²⁾
Eppendorf	Mastercycler™ep realplex
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000P™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005P™ Real Time PCR System
VIASURE	VIASURE 48 Real Time PCR System ⁽²⁾
VIASURE	VIASURE 96 Real Time PCR System ⁽²⁾

(1) Select Ramp Speed "Standard".
 (2) See Annex 3 to check optical measurement exposure setting.
 (3) The product should be reconstituted following the appropriate procedure (see Test Procedure, section 8.3) and transferred into the specific tubes designed to perform on Rotor-Gene® Q or SmartCycler® instruments.
 (4) Shell Frame grid plate which fits in these Roche qPCR System is necessary.
 (5) No detection in Cy5 channel.
 (6) Detection in FAM and HEX channels only.

Table A1/A2. Compatible low and high profile Real Time PCR systems.



ANNEX 2

DETECTION CHANNELS FOR THE MOST COMMON REAL TIME PCR EQUIPMENT

The fluorescence detection channels for some of most common Real Time PCR Thermocyclers are specified in Table A3.

REAL-TIME PCR THERMOCYCLER	VIASURE CHANNEL	DETECTION CHANNEL	OBSERVATIONS
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Passive reference option for ROX must be none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Colour Compensation is required
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Passive reference option for ROX must be none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	In the Channel Setup, click on the "Gain Optimisation" button and then go to "Optimise Acquiring". The fluorescence Target Sample Range has to be between 5 and 10 FI for each channel. Also select the option "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Table A3: Detection fluorescence channels of different Real Time PCR systems.



ANNEX 3

OPTICAL MEASUREMENT EXPOSURE SETTING

Optical measurement parameters of some thermocyclers must be adjusted to be suitable for operation with "VIASURE Real Time PCR Detection Kits". Set exposition values as follow:

- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology) and VIASURE 96 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): FAM channel -150, HEX channel – 3000, ROX channel – 2000 and Cy5 channel - 1500.
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology) and VIASURE 48 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): FAM channel - 500, HEX channel - 500, ROX channel – 500 and Cy5 channel – 100.

For information purposes only



ESPAÑOL

1. Uso previsto

VIASURE *Trypanosoma cruzi* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la detección de *Trypanosoma cruzi* en productos derivados de la sangre procedentes de pacientes con sospecha clínica y/o síntomas de la enfermedad de Chagas. El uso previsto del test es facilitar el diagnóstico de infección producida por *Trypanosoma cruzi* en combinación con factores de riesgos clínicos y epidemiológicos. El DNA es extraído a partir de la sangre o derivados, amplificado posteriormente mediante PCR a tiempo real y detectado utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con una molécula fluorescente y otra apantalladora (*quencher*) para detectar *Trypanosoma cruzi*.

2. Introducción y explicación

La enfermedad de Chagas (CD), también conocida como tripanosomiasis americana, es una enfermedad potencialmente mortal causada por el protozoo parásito *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Es endémico en Latinoamérica y se está extendiendo por todo el mundo debido a la migración humana. Este microorganismo es un protozoo hemoflagelado del orden *Kinetoplastida* y familia *Trypanosomatidae*. *T. rangeli* es la segunda especie de tripanosoma más común que infecta a humanos en países latinoamericanos, pero es un parásito no patógeno para humanos y otros mamíferos.

El *Trypanosoma cruzi* se transmite a los humanos por chinches triatominos chupadores de sangre, transmisión congénita, transfusión de sangre, trasplante de órganos y por alimentos y jugos contaminados con el parásito. La enfermedad de Chagas para los humanos tiene dos formas de transmisión, transmisiones naturales y secundarias. La transmisión natural ocurre cuando los chupadores de sangre de la subfamilia *Triatominae* eliminan el *T. cruzi* por las heces o la orina en la piel de un ser humano después de la alimentación, lo que provoca arañazos en la región porque las heces o la orina causan irritación. Por lo tanto, se crea una pequeña fisura en la piel que es suficiente para la entrada del parásito en el torrente sanguíneo. La transmisión secundaria se produce por medio de la transfusión, el trasplante, la lactancia y durante el embarazo.

Clínicamente, la enfermedad de Chagas tiene dos fases cónicas: la etapa/fase temprana aguda (fatal para 2-8% de personas infectadas) que dura hasta dos meses y se caracteriza por fiebre y elevada carga de parásitos circulantes en el torrente sanguíneo pero generalmente asintomáticos o no reconocidos, y la fase crónica que puede clasificarse en formas indeterminadas y determinadas. La etapa indeterminada puede durar décadas después de la infección, durante la cual los pacientes pueden transmitir el parásito a otros. El paciente tiene evidencia de inmunidad pero permanece infectado. En esta etapa, la infección está controlada, pero el Sistema inmunitario no previene la progresión de la enfermedad. Entre el 30-40% de los pacientes infectados desarrollan la etapa crónica o determinada y sintomática que causa las miocardiopatías y las patologías del tracto digestivo.

El diagnóstico se realiza tradicionalmente mediante métodos serológicos basados en diferentes antígenos (ELISA, IFA). La conversión a la serología negativa es actualmente la única prueba disponible para evaluar la cura parasitológica. Sin embargo, esta seroconversión negativa puede tardar años o décadas después de que el



tratamiento ocurra en la población adulta y, por lo tanto, no es adecuada como criterio de valoración para los ensayos clínicos. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) podría ser la herramienta para amplificar las secuencias de DNA del parásito con alta especificidad y sensibilidad.

3. Procedimiento

VIASURE *Trypanosoma cruzi* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para el diagnóstico de *Trypanosoma cruzi* en productos derivados de la sangre. Tras el aislamiento del DNA, la identificación de *Trypanosoma cruzi* se lleva a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con fluorescencia que hibridan dentro de una región diana conservada llamada "satellite DNA".

VIASURE *Trypanosoma cruzi* Real Time PCR Detection Kit aprovecha la actividad 5' exonucleasa de la DNA-polimerasa. Durante la amplificación del DNA, esta enzima hidroliza la sonda unida a la secuencia de DNA complementaria, separando el fluoróforo del *quencher*. Esta reacción genera un aumento en la señal fluorescente proporcional a la cantidad de DNA diana. Esta fluorescencia se puede monitorizar en equipos de PCR a tiempo real.

VIASURE *Trypanosoma cruzi* Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPs, tampón, polimerasa) en formato estabilizado, así como, un control interno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa. Tras la reacción de amplificación, *Trypanosoma cruzi* se detecta en el canal FAM y el control interno (CI) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (seleccionar el canal de detección según el equipo utilizado, ver Anexo 2).

4. Reactivos suministrados

VIASURE *Trypanosoma cruzi* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en las Tablas 1 y 2:

Referencia	Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
VS-CHA1SL/ VS-CHA1SH	<i>Trypanosoma cruzi</i> 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	6/12 tiras de 8 pocillos
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
VS-CHA1C	<i>Trypanosoma cruzi</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
VS-NC1	Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	6/12 tiras de 8 tapones

Tabla 1. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Trypanosoma cruzi* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-CHA106L, VS-CHA106H, VS-CHA112L y VS-CHA112H.



Referencia	Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
VS-CHA1PL/ VS-CHA1PH	<i>Trypanosoma cruzi</i> 96-well plate	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	1 placa
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
VS-CHA1C	<i>Trypanosoma cruzi</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
VS-NC1	Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	12 tiras de 8 tapones

Tabla 2. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Trypanosoma cruzi* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-CHA113L y VS-CHA113H.

5. Material requerido y no suministrado

La siguiente lista incluye los materiales que se requieren para el uso pero que no se incluyen en VIASURE *Trypanosoma cruzi* Real Time PCR Detection Kit.

- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador).
- Kit de extracción de DNA.
- Centrífuga para tubos de 1.5 mL. y para tiras de tubos de PCR o placas de 96 pocillos (si está disponible).
- Vórtex.
- Micropipetas (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.

VIASURE *Trypanosoma cruzi* Real Time PCR Detection Kit ha sido validado en los siguientes equipos: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-Technology DTlite Real-Time PCR System, Rotor-Gene® Q (Qiagen), SmartCycler® (Cepheid), Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer, VIASURE 48 Real Time PCR System y VIASURE 96 Real Time PCR System. Cuando se utiliza el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para reducir el riesgo de aplastar el tubo (Ref. PN 4388506).

Para verificar la compatibilidad de los termocicladores, consulte el Anexo 1, para verificar los canales de detección más comunes, consulte el Anexo 2 y para verificar la configuración de la exposición de medición óptica, ver Anexo 3.

6. Condiciones de transporte y almacenamiento

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.



- Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación. Se ha validado la estabilidad del control positivo tras 6 ciclos de congelación y descongelación.
- Proteger los componentes de la luz.

7. Precauciones para el usuario

- El producto está destinado para uso exclusivo de usuarios profesionales, como profesionales o técnicos de laboratorio y sanitarios, entrenados en técnicas de biología molecular.
- No se recomienda usar el kit después de la fecha de caducidad.
- No utilizar los reactivos si los sobres o las bolsas que protegen los tubos están abiertos o dañados en el momento que se reciben.
- No utilizar los tubos de reacción si el material desecante que se incluye en cada sobre de aluminio no está o está dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio que contienen los tubos de reacción una vez abiertos.
- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los tubos de reacción con el cierre zip inmediatamente después de cada uso (si está disponible, Ref. VS-CHA113L y VS-CHA113H). Antes de cerrar los sobres eliminar cualquier exceso de aire.
- No utilizar los tubos de reactivos si el aluminio protector está roto o dañado.
- No mezclar reactivos de diferentes sobres y/o kits y/o lotes y/u otro proveedor.
- Proteger los reactivos de la humedad. Una exposición prolongada a la humedad puede afectar al rendimiento del producto.
- Diseñar un flujo de trabajo unidireccional. Se debe comenzar en el área de extracción y después pasar al área de amplificación y de detección. No poner en contacto las muestras, equipos y reactivos utilizados en un área con la zona en la que se realizó el paso anterior.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber o fumar en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos.
- Las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas, así como los reactivos que han estado en contacto con las muestras y deben ser gestionadas según la legislación sobre residuos sanitarios nacional. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.
- Consulte las hojas de seguridad, previa solicitud.



8. Procedimiento del test

8.1. Extracción de DNA

Realizar la preparación de la muestra de acuerdo con las recomendaciones que aparecen en las instrucciones de uso del kit de extracción utilizado.

Para la extracción de DNA a partir de productos derivados de la sangre, puede utilizar su sistema optimizado de rutina manual o automático. Además, se puede usar cualquier kit de extracción de DNA disponible en el mercado y seguir las instrucciones de uso del fabricante. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

- Viasure RNA-DNA Extraction kit (VIASURE), recomendado.
- Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec).
- MagDEA Dx SV kit, using the magLEAD® 6gC instrument (Precision System Science Co.)

8.2. Control positivo liofilizado

El vial de *Trypanosoma cruzi* Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir *Trypanosoma cruzi* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 100 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex. Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

8.3. Protocolo PCR

Determinar y separar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles. En cada serie de muestras para cada uno de los ensayos a analizar se deben incluir un control positivo y uno negativo. Retirar el aluminio protector de las placas o tiras.

- 1) Reconstituir el número de pocillos que sean necesarios.

Añadir 15 µL del Rehydration buffer (vial azul) en cada pocillo.

- 2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de DNA extraído de cada muestra, de *Trypanosoma cruzi* Positive Control reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial morado) en diferentes pocillos y cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Se recomienda centrifugar brevemente las tiras de 8 pocillos o las placas de 96 pocillos.

Colocar la placa o las tiras en el termociclador.

- 3) Configurar el termociclador. (para verificar la compatibilidad, consulte el Anexo 1).



Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:

Ciclos	Etapa	Tiempo	Temperatura
1	Activación de la polimerasa	2 min	95°C
45	Desnaturalización	10 seg	95°C
	Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	50 seg	60°C

Tabla 3. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (*Trypanosoma cruzi*) y HEX, JOE o VIC (Control Interno). Dependiendo del equipo a utilizar seleccionar el canal de detección adecuado (ver Anexo 2). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System y Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System comprobar que la opción del control pasivo ROX está desactivada. En el termociclador Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System seleccionar Ramp Speed Standard en el menú Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

9. Interpretación de resultados

El uso de los controles positivo y negativo junto con cada serie de muestras a analizar, valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo del control negativo y la presencia de una señal en el pocillo de control positivo de *Trypanosoma cruzi*. Comprobar la emisión de la señal del control interno para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación. El análisis de las muestras se realiza con el software propio del equipo de PCR a tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. Con ayuda de la siguiente tabla, leer y analizar los resultados:

<i>Trypanosoma cruzi</i> (FAM)	Control Interno (HEX)	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+/-	-	+	<i>Trypanosoma cruzi</i> Positivo
-	+	-	+	<i>Trypanosoma cruzi</i> Negativo
-	-	-	+	Inválido
+	+	+	-	Inválido

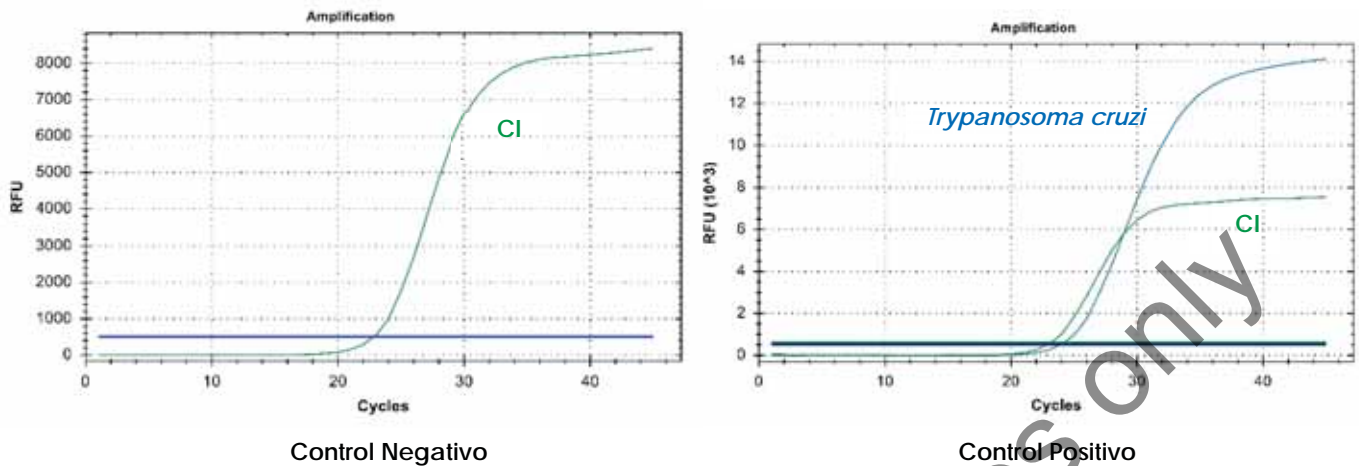
Tabla 4. Interpretación
 +: curva de amplificación
 -: sin curva de amplificación

Una muestra se considera positiva, si el valor Ct obtenido es menor de 40 y el control interno muestra o no una gráfica de amplificación. En ocasiones, la detección del control interno no es necesaria, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última.

Una muestra se considera negativa, si no se detecta una curva de amplificación por encima del valor umbral, y el control interno si la presenta. La inhibición de la reacción de PCR puede ser excluida por la amplificación del control interno.



Figura 1. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System.



El resultado se considera inválido si se observa una gráfica de amplificación en el control negativo o ausencia de señal en el pocillo del control positivo. En ese caso, se recomienda repetir el ensayo.

En caso de ausencia de la señal de control interno en los pocillos de muestra, se recomienda repetir el ensayo diluyendo la muestra 1:10 o repetir la extracción para descartar posibles problemas de inhibición.

10. Limitaciones del test

- El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.
- Este ensayo se podría utilizar con diferentes tipos de muestras, aunque sólo ha sido validado con DNA extraído de productos derivados de la sangre.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el ácido nucleico deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas. Una forma inadecuada de recolección, almacenaje y/o transporte de las muestras puede dar lugar a falsos negativos.
- Se puede detectar un bajo número de copias molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con *Trypanosoma cruzi* ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de DNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.

11. Control de calidad

VIASURE *Trypanosoma cruzi* Real Time PCR Detection Kit contiene controles positivo y negativo que deben ser incluidos en cada ensayo para interpretar correctamente los resultados. Además, el control interno (CI) en cada pocillo confirma el correcto funcionamiento de la técnica.



12. Características del test

12.1. Sensibilidad y especificidad clínica

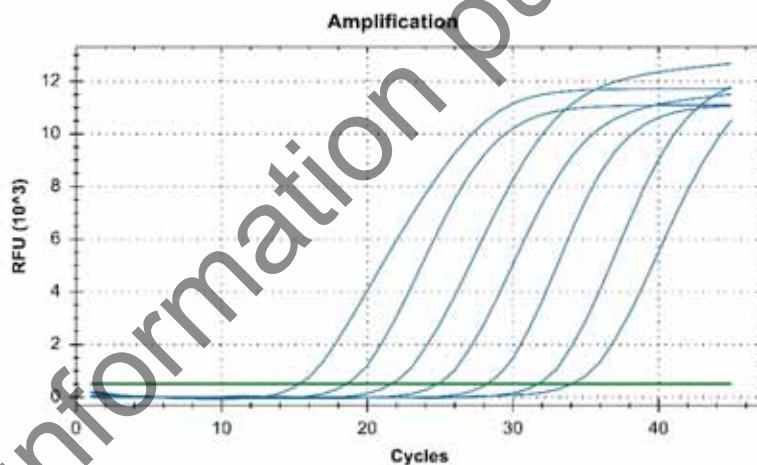
Se evaluaron 12 muestras de suero contaminadas con diferentes cantidades de DNA de la cepa Y de *Trypanosoma cruzi* utilizando VIASURE *Trypanosoma cruzi* Real Time PCR Detection Kit. El DNA fue aislado utilizando "VIASURE RNA-DNA Extraction Kit" (Certest Biotec) y "MagDEA Dx SV kit" (Precision System Science Co.), siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Todas las diluciones de *T. cruzi* se detectaron correctamente con VIASURE *Trypanosoma cruzi* Real Time PCR Detection kit.

En conclusión, los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar *T. cruzi* utilizando VIASURE *Trypanosoma cruzi* Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Sensibilidad analítica

VIASURE *Trypanosoma cruzi* Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de DNA por reacción. (Figura 2).

Figura 2. Diluciones seriadas de un estándar de *Trypanosoma cruzi*. (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (canal FAM).



12.3. Especificidad analítica

La especificidad del ensayo de *Trypanosoma cruzi* fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos que representan los patógenos transmitidos por insectos (heces del insecto infectadas), meningitis, tropicales, inmunocomprometidos y gastrointestinales más comunes. No se detectaron reacciones cruzadas con ninguno de los siguientes microorganismos testados.



Prueba de reacción cruzada					
<i>Borrelia burgdorferi</i> (cepa IRS)	-	Virus West Nile (Heja)	-	Virus Zika (cepa African)	-
<i>Coxiella burnetii</i> (cepa Nine Mile Q)	-	Virus West Nile Virus (NY99)	-	Virus Zika Virus (cepa Asian PF13/251013-18)	-
<i>Plasmodium falciparum</i> (cepa 3D7)	-	Virus West Nile Virus (Ug37)	-	Virus Zika Virus (cepa French Polynesian 11474/16)	-
<i>Rickettsia conorii</i> (cepa Morocann)	-	Virus Yellow Fever (cepa 17D)	-	Virus Dengue 1 cepa Hawaii	-
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhi</i>	-	Virus St Louis Encephalitis	-	Virus Dengue 2 cepa New Guinea C	-
<i>Toxoplasma gondii</i> Tipo II	-	Virus Epstein Barr	-	Virus Dengue 3 cepa H87	-
<i>Trypanosoma rangeli</i>	-	Virus Chikungunya cepa S27 Petersfield	-	Virus Dengue 4 cepa H241	-

Tabla 5. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.

12.4. Reactividad analítica











La reactividad de VIASURE *Trypanosoma cruzi* Real Time PCR Detection Kit se evaluó frente a *Trypanosoma cruzi* cepa Y, mostrando un resultado positivo.

13. Bibliography/Bibliografía

1. Duffy T. *et al.* Analytical Performance of a Multiplex Real-Time PCR Assay Using TaqMan Probes for Quantification of *Trypanosoma cruzi* Satellite DNA in Blood Samples. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 2013 7(1): e2000.
2. Aguiar JC. *et al.* Using FT-IR spectroscopy for the identification of the *T. cruzi*, *T. rangeli*, and the *L. chagasi* species. *Experimental Parasitology*. 2018;192:46-51.
3. Scarim CB. *et al.* Current advances in drug discovery for Chagas disease. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2018; 824-838.
4. Martinez I. *et al.* Diagnóstico molecular de la enfermedad de Chagas. *Gaceta Médica de México* 2013;149:363-5.
5. [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))
6. <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/>
7. Elisabeth Ferrer. Técnicas moleculares para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Artículo de revisión biomedicine.
8. <http://www.infochagas.org>



14. Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico in vitro

	<p><i>In vitro</i> diagnostic device Producto para diagnóstico <i>in vitro</i></p>		<p>Keep dry Almacenar en lugar seco</p>		<p>Use by Fecha de caducidad</p>		<p>Manufacturer Fabricante</p>		<p>Batch code Número de lote</p>
	<p>Consult instructions for use Consultar las instrucciones de uso</p>		<p>Temperature limitation Limitación de temperatura</p>		<p>Contains sufficient for <n> test Contiene <n> test</p>		<p>Sample diluent Diluyente de muestra</p>		<p>Catalogue number Número de referencia</p>

For information purposes only



ANEXO 1

COMPATIBILIDAD DE LOS EQUIPOS A TIEMPO REAL MÁS COMUNES

Las tiras de bajo perfil pueden usarse en todos los termocicladores equipados con un bloque de perfil bajo, como los sistemas listados en la tabla A.1. Las tiras de perfil alto pueden usarse en todos los termocicladores PCR equipados con bloque de perfil alto o normal (high profile), como los sistemas listados en la tabla A.2. Si no encuentra su termociclador en la siguiente lista, por favor póngase en contacto con su proveedor.

Tabla A.1 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE BAJO PERFIL	
Fabricante	Modelo
Agilent Technologies	AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Roche	LightCycler® 480 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	LightCycler® 96 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	Cobas z480 Analyzer ⁽⁴⁾

Tabla A.2 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE PERFIL ALTO	
Fabricante	Modelo
Abbott	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7900 HT Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7000 ⁽⁶⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7700 ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Analytik Jena Biometra	Optical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ Deep Well / CFX96™ Deep Well IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Bio-Rad	MyiQ™2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler ⁽²⁾
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System ⁽²⁾
Eppendorf	Mastercycler™ep realplex
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000P™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005P™ Real Time PCR System
VIASURE	VIASURE 48 Real Time PCR System ⁽²⁾
VIASURE	VIASURE 96 Real Time PCR System ⁽²⁾

(1) Seleccionar Ramp Speed "Standard".
 (2) Ver Anexo 3 para la configuración de los valores de exposición.
 (3) El producto se debe reconstituir siguiendo el procedimiento adecuado (ver Procedimiento del test, sección 8.3) y transvasar a los tubos específicos diseñados para emplearse con los instrumentos Rotor-Gene® Q o SmartCycler®.
 (4) Se necesita un soporte especial que ajuste con estos equipos Roche de PCR a tiempo real.
 (5) No lectura en canal Cy5.
 (6) Lectura solo en canales FAM y HEX.

Tabla A1/A2. Equipos compatibles de PCR a tiempo real más comunes.



ANEXO 2

CANALES DE DETECCIÓN DE LOS EQUIPOS A TIEMPO REAL MÁS COMUNES

Los canales de fluorescencia de algunos de los termocicladores a tiempo real más comunes se especifican en la Tabla A3.

TERMOCICLADORES A TIEMPO REAL	CANAL VIASURE	CANAL DE DETECCIÓN	OBSERVACIONES
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	Durante la configuración de los canales (Channel Setup), presione el botón "Gain Optimisation" y después vaya a "Optimise Acquiring". La fluorescencia del apartado Target Sample Range tiene que estar entre 5 y 10 FI para cada canal. Además, marque la opción "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Tabla A3: Canales de detección de fluorescencia de diferentes equipos de PCR a Tiempo Real.



ANEXO 3

CONFIGURACIÓN DE LOS VALORES DE EXPOSICIÓN

Los parámetros de exposición de algunos termocicladores deben ajustarse para su adecuación y correcto funcionamiento con los test "VIASURE Real Time PCR Detection Kits". Establecer los valores de exposición de la siguiente manera:

- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology) y VIASURE 96 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -150, canal HEX - 3000, canal ROX - 2000 y canal Cy5 -1500.
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology) y VIASURE 48 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -500, canal HEX - 500, canal ROX - 500 y canal Cy5 - 100.

For information purposes only



- CFX™ and IQ5™ are registered trademarks of Bio-Rad Laboratories.
- ABI®, QuantStudio™, StepOnePlus™ and ViiA™ are registered trademarks of Thermo Fisher Scientific Inc.
- LightCycler® is a registered trademark of Roche.
- Mx3000P™, Mx3005™ and AriaMx are registered trademarks of Agilent Technologies.
- Mastercycler™ is a registered trademark of Eppendorf.
- Rotor-Gene®Q is a registered trademark of Qiagen.
- SmartCycler® is a registered trademark of Cepheid.

Revision: September 2018

For information purposes only



For information purposes only



CerTest Biotec, S.L.
Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J, Nº1
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)
www.certest.es



VIASURE online

F-362 rev01

VIASURE



Real Time PCR Detection Kits

CerTest
BIOTEC