

Validación del termociclador TEMPER en ensayos basados en la amplificación de ácidos nucleicos por reacción en cadena de la polimerasa

✉ Anny Armas¹, Iria García¹, Enny Morales², Vivian Alonso², Idania González¹, Jorge G Martínez-Casado³, Yenitse Perea¹, Yaimé González¹

¹Laboratorio de Biología Molecular. Subdirección de Inmunoquímica. Centro de Inmunoensayo (CIE) Calle 134 y Ave. 25, Apartado Postal 6653, Cubanacán, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba

Fax: (53-7) 208 6800; E-mail: iqbmolecular2@cie.sld.cu

²Departamento de Aseguramiento y Control de la Calidad (CIE)

³Subdirección de Instrumentación (CIE)

RESUMEN

El termociclador es un equipo que permite realizar, de manera automática, los cambios cíclicos de temperatura que ocurren en la reacción en cadena de la polimerasa (RCP). En este artículo se exponen los resultados de la etapa de calificación del funcionamiento de la serie cero del termociclador TEMPER (Centro de Inmunoensayo, CIE), según sus especificaciones de operación. Se emplearon dos sistemas comerciales para evaluar el funcionamiento de dos termocicladores del modelo TEMPER, fabricados en el CIE: TEMPER 1 y TEMPER 2. El equipo que se usó como referencia fue el termociclador comercial PTC 150 (MJ Research). Al ensayar muestras positivas y negativas al virus de la hepatitis C (VHC), se evaluó la precisión intraensayo e interensayo del equipo y la concordancia entre los resultados, mediante el empleo del UMELOSA HCV CUALITATIVO. Por último, se evaluó la exactitud en los resultados mediante el sistema cuantitativo AMPLICOR HBV MONITOR™ Test (Roche Diagnostics), con el empleo muestras estándares de concentraciones conocidas del virus de hepatitis B (VHB). Al evaluar los equipos TEMPER 1 y TEMPER 2 y el termociclador de referencia PTC 150, la eficiencia del funcionamiento fue del 100%, la concordancia en uno de los montajes fue de 95.8%, la concordancia (precisión interensayo) fue de 97.9%. Al ensayar muestras positivas y negativas al VHC, provenientes de pacientes, mediante el UMELOSA® HCV CUALITATIVO, la concordancia fue del 100%. Se evidenció exactitud en los resultados, cuyos valores estaban dentro de rangos válidos, reportados en la literatura (límites de aceptación de 0.5 log₁₀ copias de genomas virales) en el ensayo de estándares a diferentes concentraciones de ácido dextrirribonucleico (ADN) del VHB. Los resultados de este estudio avalan el empleo del TEMPER en el diagnóstico y otras aplicaciones relacionadas con la tecnología de amplificación de ácidos nucleicos mediante la RCP.

Palabras claves: termociclador, secuenciador térmico, precisión, exactitud, RCP

Biotecnología Aplicada 2006;23:305-310

ABSTRACT

Validation of the TEMPER thermocycler in nucleic acid amplification by polymerase chain reaction. The thermocycler is a programmable cycling incubator that automatically performs the cyclic changes in temperature required for Polymerase Chain Reaction (PCR). In this paper we present the results of the Operational Qualification (OQ) of TEMPER thermocyclers (Center for Immunoassays, CIE). OQ is carried out to ensure that they meet the previously defined functional and performance specifications. The performance of two thermocycler models produced at CIE: TEMPER 1 and TEMPER 2 were evaluated using two commercial diagnostic systems. The commercial thermocycler PTC150 (MJ Research) was used as reference equipment. Intra-assay and inter-assay precision, and the agreement among data sets obtained with different equipment, were estimated using the UMELOSA® Cualitativo HCV Test (CIE). The accuracy of the results was assessed with the quantitative AMPLICOR HBV MONITOR™ Test (Roche Diagnostics), using Hepatitis B Virus (HBV) calibrated standards. Both devices showed 100% performance efficiency; and the agreement with the PTC150 thermocycler were 95.8% and 97.9% for within and between assay precision, respectively. When positive and negative HCV samples were evaluated with UMELOSA® HCV CUALITATIVO, a 100% within assay precision among thermocyclers was documented. Moreover, the values of HBV DNA standards agreed with the previously reported ranges, which demonstrate the high accuracy of the test (tolerance limits of 0.5 log₁₀ viral genome copies). The results indicate that TEMPER thermocyclers can be successfully used for diagnostic purposes or other applications involving PCR amplification of nucleic acids.

Key words: thermal cycler, precision, accuracy, PCR

Introducción

La calificación de un equipo, según las regulaciones de la *Food and Drug Administration* (FDA), es el proceso global que asegura que un instrumento es apropiado para el uso al cual está destinado [1]. Este proceso se divide en cuatro etapas: calificación del diseño, calificación de la instalación, calificación de la operación o funcionamiento del equipo y

calificación del funcionamiento consistente de este [1].

En la calificación del diseño se establecen las especificaciones de la operación y el funcionamiento del equipo. La calificación de la instalación es la etapa en la cual se ejecuta y documenta la instalación en el lugar seleccionado. La calificación de la operación o

1. Equipment Validation and Qualification. 2005. [Sitio en Internet]. Disponible en: <http://www.labcompliance.com>. Último acceso: 10 febrero 2006.

funcionamiento de un equipo es el proceso para probarlo en el sitio seleccionado, y así asegurar que funcionará de acuerdo con sus especificaciones de funcionamiento. La última etapa es la calificación del funcionamiento consistente del equipo, en la cual se determina si funciona de modo consistente para su empleo en la rutina [1].

El termociclador o secuenciador térmico es un equipo que permite la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) de forma eficiente y rápida, mediante la realización automática y cíclica de los cambios de temperatura que se requieren para la amplificación de una cadena de ácido desoxirribonucleico (ADN), a partir de una enzima termoestable. La RCP posibilita que una pequeña cantidad de moléculas de ADN sea amplificada muchas veces, de manera exponencial. Esta metodología es comúnmente empleada en laboratorios médicos y de investigaciones biológicas, con una gran variedad de aplicaciones, entre ellas, la detección de la expresión de genes y de enfermedades hereditarias, la identificación de huellas genéticas, la clonación de genes, las pruebas de paternidad, la informática del ADN y el diagnóstico de enfermedades infecciosas [2].

Los termocicladores se emplean para ampli-ficaciones cualitativas o para cuantificar la cantidad de ADN amplificado. Los resultados de estas técnicas de amplificación tienen un impacto sustancial en nuestra sociedad, por lo que se debe asegurar que los termocicladores sean precisos, exactos y uniformes, con el fin de obtener resultados confiables [3]. En los ensayos de certificación en el Centro de Inmunoensayo (CIE) se evaluaron estos parámetros, a partir de un protocolo elaborado por el Departamento Central de Aseguramiento y Control de la Calidad, el cual contempla las etapas para validar los nuevos modelos de equipos que se han desarrollado [4]. Estas etapas son: ensayos de certificación, pruebas de seguridad, caracterización funcional y pruebas de terreno.

En este artículo se describen los resultados de diferentes pruebas analíticas bajo condiciones controladas de uso, que forma parte de la caracterización funcional del nuevo equipo. Esta fase constituye un proceso de calificación de la operación o funcionamiento del instrumento, según sus especificaciones de operación, en el sitio seleccionado [1].

Para evaluar el funcionamiento de dos termocicladores del modelo TEMPER, fabricados en el CIE: TEMPER 1 y TEMPER 2 [5], se emplearon dos sistemas comerciales basados en la amplificación de ácidos nucleicos, mediante la RCP.

En la caracterización funcional del TEMPER, se utilizó el termociclador comercial PTC 150, de la firma MJ Research [6], como equipo de referencia. Su diseño y las especificaciones técnicas son muy similares a las del TEMPER [7], y es ampliamente utilizado en la técnica de RCP [6].

En los ensayos de certificación, luego de haber demostrado que el termociclador TEMPER es preciso, exacto y uniforme [7], se evaluaron los parámetros de precisión intraensayo e interensayo y la concordancia en los resultados, con el empleo del ensayo UMELOSA® HCV CUALITATIVO (CIE) [8, 9]. La exactitud en los resultados se evaluó mediante el sistema cuantitativo AMPLICOR HBV MONITOR™ Test (Roche Diagnostics) [10].

Materiales y métodos

A. Termocicladores empleados

Termocicladores de la serie cero TEMPER 1 (Nº de serie 030001) y TEMPER 2 (Nº de serie 030002) (CIE) [5, 7]

Rango térmico: de 0 a 105 °C.

Exactitud: ± 0.3 °C después de 30 segundos a 90 °C.

Precisión en el control: ± 0.1 °C.

Homogeneidad térmica: ± 0.5 °C de pozo a pozo durante los 30 segundos de alcanzada la temperatura programada.

Velocidad de rampa: para una variación de temperatura entre 50 y 95 °C en el bloque, la rampa máxima para el calentamiento es de 3 °C/s y para el enfriamiento es de 1 °C/s.

Rango térmico de la tapa caliente: desde temperatura ambiente hasta 115 °C.

Capacidad de muestras: 25 tubos de 0.2 mL.

Termociclador comercial PTC 150 (MJ Research) [6]

Rango térmico: de -9 a 105 °C.

Exactitud: ± 0.3 °C.

Precisión en el control: ± 0.1 °C.

Homogeneidad térmica: ± 0.3 °C.

Velocidad de rampa: para el calentamiento, la rampa máxima es de 2.4 °C/s y para el enfriamiento es de 1.2 °C/s.

Capacidad de muestras: 25 tubos de 0.2 mL.

B. Sistemas utilizados

Para la evaluación del funcionamiento de los termocicladores, se utilizaron los siguientes estuches comerciales:

1. UMELOSA® HCV CUALITATIVO (CIE) [8, 9]: ensayo comercial para la detección del ARN del VHC en suero o plasma humano. Consta de cuatro pasos fundamentales:

- Extracción del ARN de la muestra, a partir de suero o plasma, mediante lisis de los viriones con agentes caotrópicos; precipitación del ARN en isopropanol y posteriores lavados del ARN con etanol al 75% y acetona, hasta la resuspensión final en agua libre de ribonucleasas (RNasa).

- Transcripción inversa (TI) del ARN molde, para generar ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) y su amplificación por RCP, con el empleo de iniciadores específicos (TI-RCP) y un termociclador.

- Amplificación de un segmento del fragmento previamente amplificado, con el empleo de iniciadores internos, uno de los cuales está marcado con biotina (RCP anidada), y un termociclador.

- Hibridación del producto amplificado con una sonda específica y su detección por fluorescencia en una placa de tiras, con el empleo del conjugado estreptavidina-fosfatasa alcalina. Para la detección se usa un fluorímetro que lee ultramicropelículas, en el que la luz que incide es de 365 nm y emite a una longitud de onda de 450 nm.

2. Erlich HA. PCR Technology. Principles and applications for DNA amplification. Macmillan Publishers Ltd; 1989.

3. Mobile Temperature Acquisition System (MTAS). Basic Information. CYCLERtest-Products. 2004. [Sitio en Internet] disponible en: <http://www.cyclertest.com>. Último acceso: 4 agosto 2005.

4. Departamento Central de Aseguramiento y Control de la Calidad. Centro de Inmunoensayo. Norma de proceso: "Fases del Protocolo de Validación de Nuevos Equipos". La Habana, Cuba; 1999.

5. Gentile JF, Herrera H, Pico JF, Valdés JA, Sánchez N. Centro de Inmunoensayo. Sistema de control de temperatura para la unidad de atemperación de un termociclador. Oficina Cubana de la Propiedad Industrial, Ciudad de La Habana, Cuba. No. 22973; 2 de junio de 2004.

6. Brush M. Up on blocks. A profile of thermal cycler with interchangeable blocks. The Scientist 1998;12:21-3.

7. Gentile J, Ferreira A, Alfonso J, Herrera H, Rodríguez A, Méndez J, Mora MN, Armas A, Fernández AK, González Y, Morales E, Alonso V, García I, González I. Validación del diseño del termociclador Temper para su aplicación en laboratorios de diagnóstico molecular. In: Congreso Latino-Americano de Ingeniería Biomédica, XIX Congreso Brasileiro de Engenharia Biomédica, de 22 a 25 de setembro de 2004, João Pessoa, Brasil.

8. González YJ, González I, Viña A, Armas A, García I, Solís RL. Desarrollo de un sistema de diagnóstico molecular para la detección cualitativa del ARN del virus de la hepatitis C. Biotecnología Aplicada 2003;20:122-5.

9. González-Pérez I, González YJ, Armas A, Viña-Rodríguez A, Medina A, Trujillo N, et al. Validation of a nested PCR assay UMELOSA® HCV CUALITATIVO for detection of Hepatitis C Virus. Biologicals 2003;31:55-61.

10. Roche Molecular Systems. Instructivo del ensayo AMPLICOR HBV MONITOR™ Test. Branchburg, NJ, USA, 2002.

2. AMPLICOR HBV MONITOR™ Test, Roche Diagnostics [10]: ensayo comercial para la cuantificación del ADN del VHB en suero o plasma humano. Se basa en cuatro procesos principales:

- Preparación de la muestra mediante lisis de los viriones presentes en el suero o plasma y adición de un agente neutralizante para proporcionar condiciones tampón apropiadas para la amplificación por RCP.

- Amplificación simultánea por RCP del ADN objetivo del VHB y el ADN del estándar interno, con el empleo de iniciadores específicos, uno de los cuales está marcado con biotina. La amplificación se realiza mediante un termociclador.

- Hibridación de los productos amplificados a sondas oligonucleótidas específicas. Después de la amplificación por RCP, el amplicón del VHB y el de estándar interno son inmovilizados en una microplaca revestida de estreptavidina. Después de la hibridación, el amplicón bicatenario se desnaturaliza químicamente y la cadena no biotinilada (no conjugada) se extrae por lavado, para dejar un ADN monocatenario conjugado a la microplaca.

- Detección de los productos amplificados ligados a la sonda, por determinación colorimétrica. Después del paso anterior se favorece la hibridación al amplicón inmovilizado de las sondas oligonucleótidas marcadas con dinitrofenilo (DNP). Luego del paso de lavado, se adiciona el conjugado fosfatasa alcalina-anti DNP. De seguido, se adiciona sustrato que contiene para-nitrofenilfosfato, y la fosfatasa alcalina cataliza la formación de un complejo coloreado. La intensidad de la reacción de color se mide a 405 nm con un lector automático de microplacas.

C. Muestras empleadas

Las muestras estándares se prepararon a partir de diluciones a un plasma positivo a 1.38×10^6 UI/mL de ARN del VHC, cuantificado con el estuche cuantitativo AMPLICOR HCV MONITOR™ Test version 2.0 (Roche Diagnostics). Para los experimentos se emplearon las siguientes diluciones:

- 750 UI/mL de ARN del VHC, que representan aproximadamente 7 veces el límite de detección (LD) del UMELOSA HCV CUALITATIVO (LD 95% = 101.7 UI/mL con intervalo de confianza entre 81 a 162.8 UI/mL de ARN del VHC [9]).

- 6200 UI/mL de ARN del VHC, representa aproximadamente 61 veces el LD 95% del UMELOSA HCV CUALITATIVO [9].

Se emplearon, además, muestras de sueros negativas y positivas al VHC, provenientes de pacientes en fase inicial y final del tratamiento antiviral, las cuales se confirmaron con el empleo del estuche cualitativo AMPLICOR HCV Test version 2.0 (Roche Diagnostics).

Los estándares de carga viral conocida del VHB suministrados en el estuche AMPLICOR HBV MONITOR™ Test (Roche Diagnostics) con valores de 10, 100, 1 000, 10 000 y 1000 000 copias/reacción del VHB, se emplearon en el ensayo de exactitud.

D. Ensayos realizados

Evaluación de la precisión intraensayo e interensayo del UMELOSA HCV CUALITATIVO con el empleo de los termocicladores TEMPER 1, TEMPER 2 y PTC 150

En este experimento se evaluó la precisión intraensayo mediante el empleo de un estándar secundario de baja concentración del VHC (750 UI/mL de ARN del VHC). El estándar se ubicó en las 24 posiciones de los tres equipos y en la posición restante se colocó un control negativo. Este ensayo se repitió en dos ocasiones (los días y los operarios fueron diferentes), para evaluar la precisión interensayo. El objetivo de la prueba fue comprobar que el ensayo UMELOSA HCV CUALITATIVO era reproducible, independientemente del termociclador empleado y de las pequeñas diferencias de temperatura que existen entre dos puntos del bloque de los termocicladores.

Se extrajo el ARN viral a partir de 24 alícuotas de la muestra estándar secundaria y una alícuota de control negativo del ensayo, con el empleo del sistema UMELOSA® HCV CUALITATIVO [8]. Los 24 ARN extraídos de cada muestra estándar se mezclaron y homogeneizaron en un vial. Se realizó la transcripción inversa-RCP y la RCP anidada, de acuerdo con el procedimiento que se emplea en el UMELOSA® HCV CUALITATIVO [8]. Para estos dos pasos se utilizaron los termocicladores TEMPER 1, TEMPER 2 y el equipo de referencia. Por último, se realizó la detección de la señal de fluorescencia, mediante hibridación en ultra-microplacas.

Por ser un ensayo cualitativo, la precisión se evaluó mediante el porcentaje de concordancia [11].

Evaluación de la concordancia en los resultados

La concordancia entre los resultados se evaluó al ensayar controles positivos a dos concentraciones de ARN del VHC conocidas (750 UI/mL y 6 200 UI/mL). Estas se consideran concentraciones con baja carga de ARN del virus de la hepatitis C, teniendo en cuenta que la sensibilidad requerida, para la detección del ARN del VHC en donaciones individuales, por los ensayos cualitativos basados en técnicas de amplificación de ácidos nucleicos por RCP, es de 5 000 UI/mL según entidades regulatorias europeas, como el Instituto Paul Ehrlich, de Alemania [12].

Además, se evaluó la concordancia entre los resultados al ensayar muestras clínicas en los dos equipos, TEMPER 1 y TEMPER 2, y en el equipo control PTC 150. De cada concentración de control positivo se ensayaron 8 réplicas en los tres termocicladores y 60 muestras clínicas en total, de ellas 37 negativas y 23 positivas al VHC. Los pasos de extracción, amplificación y detección se realizaron de acuerdo con los procedimientos del ensayo UMELOSA® HCV CUALITATIVO [8].

Evaluación de la exactitud del AMPLICOR HBV MONITOR™ Test con el empleo de los termocicladores TEMPER 2 y PTC 150

La exactitud en los resultados se evaluó a partir del método cuantitativo AMPLICOR HBV MONITOR®

11. Broughton PMG, Bergonzi C, Lindstedt G, Loeber JG, Malan PG. Guidelines for the evaluation of diagnostic kits. Part 2. General principles and outline procedures for the evaluation of kits for qualitative tests; 1987.

12. Gerold Z. Assessment of Validation Studies from a Fractionator's Point of View. *Biologicals* 1999;27:295-301.

Test, Roche Diagnostics [10]. Se procesaron cinco estándares de carga viral conocida del VHB, suministrados en el estuche con valores de 10, 100, 1 000, 10 000 y 1 000 000 copias/reacción del VHB. Estos se amplificaron mediante el procedimiento descrito en el manual de usuario del estuche comercial [10]. Para ello se empleó el TEMPER 2, con el cual se amplificaron dos réplicas de cada muestra estándar y una réplica con el equipo control PTC 150. Para el análisis de los resultados, se halló la media del logaritmo (\log_{10}) de las copias por reacción para cada muestra estándar, que se amplificó con el empleo del TEMPER 2, las cuales se compararon con el \log_{10} de las copias por reacción esperadas para cada muestra estándar. La diferencia entre estos valores permitió evaluar la exactitud (cualidad de aproximación de una muestra a su valor real) del ensayo cuantitativo, en el que se utilizó el termociclador TEMPER, así como el equipo de referencia en los pasos de amplificación por RCP de los estándares suministrados en el estuche comercial. Con el objetivo de detectar algún problema de manipulación durante la ejecución de la técnica, se realizó el mismo análisis de exactitud del ensayo para el equipo de referencia PTC 150.

Resultados y discusión

Evaluación de la precisión intraensayo e interensayo del UMELOSA HCV CUALITATIVO con el empleo de los termocicladores TEMPER 1, TEMPER 2 y PTC 150

La precisión de un ensayo cualitativo no puede ser expresada de la misma manera que para los ensayos cuantitativos, medibles mediante el coeficiente de variación. Una posible medida de la precisión en los ensayos cualitativos puede ser el grado de concordancia de los resultados de una serie de réplicas, utilizando la misma muestra [11].

La precisión de un ensayo puede estar afectada por factores como el tiempo, la técnica, los analistas y los equipos, entre otras causas [11].

La precisión intraensayo e interensayo del UMELOSA HCV CUALITATIVO se evaluó por el porcentaje de concordancia en los resultados al analizar una muestra positiva al ARN del VHC con baja carga viral (750 UI/mL de ARN del VHC). En el paso de amplificación se emplearon los termocicladores TEMPER 1, TEMPER 2 y PTC 150.

En la primera evaluación de la precisión intraensayo se obtuvo el 100% de concordancia entre los resultados, al ensayar, de manera repetida, la muestra positiva a 750 UI/mL de ARN del VHC, independientemente del termociclador empleado y de las pequeñas diferencias de temperatura que se presentan entre dos posiciones del bloque de los termocicladores (tabla 1).

Sin embargo, en el segundo montaje, que permitió evaluar tanto la precisión intraensayo (24 réplicas) como interensayo (con días y operarios diferentes), se obtuvo un resultado negativo, a partir de una de las 24 réplicas del control positivo, amplificadas por el TEMPER 2 (tabla 1), lo que significó el 95.8% de concordancia, como resultado de la precisión intraensayo con el empleo del TEMPER 2. En el análisis de precisión interensayo (tabla 2) se obtuvo el 97.9% de concordancia al emplear este mismo equipo.

Tabla 1. Evaluación de la precisión intra-ensayo del UMELOSA HCV CUALITATIVO con el empleo de los termocicladores TEMPER 1, TEMPER 2 y el equipo de referencia PTC-150

Equipo utilizado	Número de réplicas de la muestra positiva (750 UI/mL de ARN del VHC) ensayadas	Resultado + (Porcentaje de concordancia)	
		Montaje 1*	Montaje 2*
PTC-150	24	24 (100%)	24 (100%)
TEMPER 1	24	24 (100%)	24 (100%)
TEMPER 2	24	24 (100%)	23 (95.8%)

* En los montajes 1 y 2 se ensayaron 24 réplicas de una muestra positiva con baja concentración de ARN del virus de hepatitis C (750 UI/mL, 7 veces el límite de detección del 95% del UMELOSA HCV CUALITATIVO), la cual se ubicó en 24 posiciones de los tres termocicladores. Cada montaje se realizó en días diferentes y por operarios diferentes.

El resultado falso negativo en el segundo experimento de precisión con el TEMPER 2, pudo estar relacionado con el calentamiento no uniforme del bloque, la técnica de detección empleada y los errores de operación o del operario.

El calentamiento no uniforme del bloque de un termociclador puede llevar a resultados falsos negativos para muestras que son realmente positivas. Esto es especialmente importante cuando se realizan ensayos de RCP para el diagnóstico o cuantificación de agentes infecciosos, en los que se emplean múltiples muestras, pues el resultado puede estar influenciado por el comportamiento de este parámetro [3]. Se conoce que en el termociclador TEMPER, la uniformidad de la temperatura (máxima diferencia de temperatura entre dos pozos) es de ± 0.5 °C [7], valor que es aceptado en las técnicas de diagnóstico por RCP y que caracteriza a varios equipos que se comercializan en el mundo [6].

Como la uniformidad de la temperatura en el TEMPER 2 se demostró en los ensayos de certificación de este, con valores bajos, comparables a los del equipo de referencia (PTC 150) y otros termocicladores comerciales [6], se considera que el termociclador TEMPER 2 no fue el causante de los valores de precisión intraensayo (segundo montaje) e interensayo obtenidos con este equipo (95.8% y 97.9%, respectivamente).

Además, se demostró que la etapa de detección del producto amplificado del UMELOSA® HCV CUALITATIVO [8] no fue la causante de la discordancia en el resultado de la muestra. Esto se comprobó mediante la repetición de la misma muestra amplificada en otra placa de ultramicroelosa con reactivos diferentes, y se obtuvo nuevamente un resultado negativo.

La técnica analítica empleada (UMELOSA HCV CUALITATIVO) ha sido validada por los resultados satisfactorios en cuanto a su precisión lo cual sucedió en todos los casos en que se ensayó un control positivo de baja carga viral, independientemente del operario y de los lotes de reactivos empleados [9].

En toda técnica analítica, siempre que no sea totalmente automatizada, existe el riesgo de que el

Tabla 2. Análisis de la precisión inter-ensayo del UMELOSA HCV CUALITATIVO, con el empleo de los termocicladores TEMPER 1, TEMPER 2 y el equipo de referencia PTC-150

Equipo utilizado	Número de muestras positivas (750 UI/mL de ARN del VHC) analizadas	Resultado (+)	Porcentaje de concordancia (%)
PTC-150	48	48	100
TEMPER 1	48	48	100
TEMPER 2	48	47	97.9

operario cometa errores de manipulación. De modo que el resultado negativo que se obtuvo para una de las 24 réplicas amplificadas de la muestra positiva en el TEMPER 2, pudo deberse a este tipo de errores, los cuales traen como consecuencia la no amplificación del ácido nucleico. También pudo deberse a la presencia de otros factores de la operación, que hayan causado la degradación del ARN, tales como la presencia de ribonucleasas en el tubo o en la punta que se utilizó para la transferencia del ARN al tubo de reacción en el ocurriría la RCP.

Los errores de manipulación pueden afectar la precisión de un ensayo, específicamente los debidos a la manipulación de la pipeta y en el momento de la adición de los reactivos [14]. La preparación de las muestras para la RCP es un proceso que requiere múltiples pasos con micropipetas, los cuales podrían ocasionar resultados falsos negativos y problemas de contaminación de las muestras por el fenómeno de *carryover* [2]. Teniendo en cuenta que los errores de manipulación pueden existir en este tipo de técnicas y que pueden afectar la precisión de un ensayo, estos valores de precisión intraensayo e interensayo (95.8% y 97.9%, respectivamente) con el empleo del TEMPER 2, se consideran válidos y pueden incrementarse en la medida en que se realicen más réplicas del control positivo [11].

Evaluación de la concordancia en los resultados

Para la evaluación de concordancia entre los resultados, se emplearon muestras positivas y negativas al VHC, así como diferentes concentraciones conocidas de ARN del VHC, obtenidas a partir de diluciones de trabajo de un control positivo alto (1.38 x 10⁶ UI/mL de ARN del VHC). Las dos concentraciones de trabajo, con diferencias de log₁₀ mayores de 0.5 log₁₀ UI/mL de ARN del VHC, se amplificaron en los tres termocicladores (TEMPER 1, TEMPER 2 y el termociclador de referencia PTC 150), al igual que las muestras negativas y positivas al VHC provenientes de pacientes. Para las diferentes concentraciones de ARN del VHC ensayadas, con el empleo de los tres termocicladores, se obtuvo el 100% de concordancia (tabla 3). Un resultado similar se obtuvo cuando se ensayaron las 60 muestras clínicas, de ellas 23 correspondían a muestras positivas de pacientes y 37 muestras negativas al VHC (tabla 4).

Evaluación de la exactitud del AMPLICOR HBV MONITOR™ Test con el empleo de los termocicladores TEMPER 2 y PTC 150

En mediciones o ensayos analíticos, la exactitud se define como cuán cerca del valor real está un valor promedio medido o calculado [14]. La exactitud del ensayo cuantitativo AMPLICOR HBV MONITOR™ Test se evaluó mediante los estándares de carga viral de VHB conocidas, los cuales se amplificaron en posiciones aleatorias del bloque del TEMPER 2 y PTC 150. Se halló la media del logaritmo (log₁₀) de las copias por reacción de cada estándar, que se amplificó con el empleo del TEMPER 2 y se comparó cada valor con el log₁₀ de las copias por reacción esperadas de cada estándar. Igualmente, se compararon los valores de log₁₀ de las copias por reacción de cada estándar, que se amplificó con el PTC 150 con el log₁₀ de las copias por reacción

Tabla 3. Análisis de la concordancia entre los resultados al ensayar 8 réplicas de dos concentraciones bajas de ARN del virus de hepatitis C (750 y 6 200 UI/mL) ubicadas en posiciones aleatorias del bloque de los equipos TEMPER 1, TEMPER 2 y el termociclador de referencia PTC 150

Equipo utilizado	Muestras positivas a 750 UI/mL de ARN del VHC (n = 8)		Muestras positivas a 6200 UI/mL de ARN del VHC (n = 8)	
	Resultado (+)	Porcentaje de Concordancia (%)	Resultado (+)	Porcentaje de Concordancia (%)
PTC-150	8		8	
TEMPER 1	8	100	8	100
TEMPER 2	8		8	

Tabla 4. Análisis de la concordancia en los resultados al ensayar muestras negativas y positivas al ARN del virus de hepatitis C (VHC) de pacientes con el empleo de los termocicladores TEMPER 1, TEMPER 2 y el termociclador de referencia PTC 150, en el paso de amplificación de las muestras

Equipo utilizado	Muestras negativas al VHC (n = 37)		Muestras positivas al VHC (n = 23)	
	Resultado (-)	Porcentaje de Concordancia (%)	Resultado (+)	Porcentaje de Concordancia (%)
PTC-150	37		23	
TEMPER 1	37	100	23	100
TEMPER 2	37		23	

esperadas de cada estándar. Los resultados se muestran en la tabla 5.

Para ensayos de carga viral de VHB, VIH-1 y VHC, se han reportado límites de aproximadamente 0.5 log₁₀ de aceptación de las diferencias entre el log₁₀ de las copias de genomas esperadas y las obtenidas [15-18], de modo que una diferencia mayor representa un cambio significativo. Teniendo en cuenta que la máxima diferencia que se obtuvo entre la media logarítmica de las copias/reacción de VHB esperadas y las obtenidas fue de 0.2 log₁₀, resultado que se obtuvo para el estándar de copia 10 con el empleo del TEMPER 2 (tabla 5), se concluye que se logró una buena exactitud durante la ejecución del ensayo AMPLICOR® HBV MONITOR Test con el empleo de los termocicladores TEMPER 2 y PTC 150. Los límites de aceptación estuvieron por debajo de 0.5 log₁₀ de las copias/reacción, para todas las concentraciones de estándares del VHB ensayadas (tabla 5).

En la caracterización funcional del TEMPER, con el objetivo de evaluar el desempeño de este equipo en ensayos de detección cualitativa de ácidos nucleicos o de cuantificarlos en una muestra determinada, se obtuvo una buena precisión intraensayo e interensayo. También hubo concordancia entre los resultados tras el empleo de controles positivos a diferentes concentraciones de ARN del VHC, y muestras

13. PCR Cycloer Validation-Extended Information. CYCLERest-Products. 2004. [Sitio en Internet]. Disponible en: <http://www.cyclertest.com>. Último acceso: 4 agosto 2005.

14. Wild D. The immunoassay handbook. The Macmillan Press Ltd. Concepts; 1994:84-5.

15. Joseph DC Yao, Marcel GHM Beld, Lynette LEO, et al. Multicenter Evaluation of the VERSANT Hepatitis B Virus DNA 3.0 Assay. Journal of Clinical Microbiology 2004;42:800-6.

16. Gilbert N, Corden S, Ijaz S, Grant PR, et al. Comparison of commercial assays for the quantification of HBV DNA load in health care workers: calibration differences. Journal of Virological Methods 2002; 100:37-47.

17. Dailey PJ, Hayden D. The AIDS Knowledge base. Viral load Assays: Methodologies, variables, and interpretation. 1996.

18. Schirm J, Van Loon AM, Valentine-Thon E, Klapper PE, Reid J, Cleator GM. External Quality Assessment Program for Qualitative and Quantitative Detection of Hepatitis C Virus RNA in Diagnostic Virology. Journal of Clinical Microbiology 2002;40:2973-80.

Tabla 5. Evaluación de la exactitud del ensayo cuantitativo AmpliCor HBV Monitor Test con el empleo del TEMPER 2 y el termociclador PTC 150, como equipo de referencia, para la amplificación de los estándares de concentración conocida de ADN del virus de hepatitis B (desde 10 hasta 10⁶ copias/reacción)

Copias/reacción esperadas	Log ₁₀ copias/reacción esperadas	Media del log ₁₀ copias/reacción obtenidas	
		TEMPER 2	Log ₁₀ copias/reacción obtenidas PTC 150
10	1.00	0.80	1.10
10 ²	2.00	1.85	2.0
10 ³	3.00	3.10	3.0
10 ⁴	4.00	4.00	3.9
10 ⁶	6.00	6.00	6.1

negativas y positivas a este virus. Se pudo constatar que con el TEMPER no solo se logra un resultado negativo o positivo para una muestra que realmente es negativa o positiva a una entidad viral determinada, sino que, además, este se puede emplear con seguridad en ensayos cuantitativos, en los que es importante obtener la concentración de una muestra clínica con exactitud.

En todos los ensayos se empleó un termociclador comercial, validado para el diagnóstico y las

investigaciones de laboratorio, y en todos los casos se obtuvieron resultados similares entre el empleo de este equipo de referencia y las dos series cero de termocicladores evaluadas. Ello permite aseverar que el termociclador TEMPER, desarrollado y producido por el CIE, es un equipo confiable, que se puede emplear en técnicas de detección y cuantificación de ácidos nucleicos o en aplicaciones similares, donde sea necesario amplificar ácidos nucleicos, mediante la reacción en cadena de la polimerasa.

Recibido en september de 2005. Aprobado en april de 2006.