

Manual de uso del kit *artus*[®] HBV RG PCR

 24 (ref. 4506263)

 96 (ref. 4506265)

Versión 1



Diagnóstico *in vitro* cuantitativo

Para utilizar con los instrumentos Rotor-Gene[®] Q



4506263, 4506265



1046920ES



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,

ALEMANIA

R4

MAT

1046920ES



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN es el proveedor líder de tecnologías innovadoras para la preparación de muestras y ensayos de biología molecular que permiten el aislamiento y la detección del contenido de cualquier muestra biológica. Nuestros productos y servicios de vanguardia y máxima calidad garantizan el éxito desde la muestra hasta el resultado.

QIAGEN sienta las bases de excelencia en los siguientes campos:

- Purificación de ADN, ARN y proteínas.
- Ensayos de ácidos nucleicos y proteínas.
- Investigación con microARN y ARNi.
- Automatización de tecnologías de preparación de muestras y ensayos de biología molecular.

Nuestra misión es ayudarle a superar sus retos y a alcanzar un éxito excepcional. Para más información, visite www.qiagen.com.

Índice

Contenido del kit	6
Símbolos	6
Almacenamiento	7
Uso previsto	7
Limitaciones del uso del producto	7
Advertencias y precauciones	8
Control de calidad	8
Introducción	9
Principio	9
Información sobre el patógeno	9
Características del rendimiento	10
Equipo y reactivos que debe suministrar el usuario	20
Notas importantes	21
Precauciones generales	21
Recogida, almacenamiento y transporte de las muestras	21
Aislamiento del ADN	23
Control interno	23
Ajuste del umbral para el análisis de PCR	24
Cuantificación	24
Protocolo: PCR y análisis de los datos	26
Guía para la resolución de problemas	36
Referencias citadas	39
Información para pedidos	40

Contenido del kit

artus HBV RG PCR Kit			(24)	(96)
N.º de referencia			4506263	4506265
Número de reacciones			24	96
Azul	HBV RG/TM Master (mezcla maestra HBV RG/TM Master)		2 x 12 reacciones	8 x 12 reacciones
Rojo	HBV RG/TM QS 1* (1 x 10 ⁵ UI/μl)	QS	200 μl	200 μl
Rojo	HBV RG/TM QS 2* (1 x 10 ⁴ UI/μl)	QS	200 μl	200 μl
Rojo	HBV RG/TM QS 3* (1 x 10 ³ UI/μl)	QS	200 μl	200 μl
Rojo	HBV RG/TM QS 4* (1 x 10 ² UI/μl)	QS	200 μl	200 μl
Rojo	HBV RG/TM QS 5* (1 x 10 ¹ UI/μl)	QS	200 μl	200 μl
Verde	HBV RG/TM IC [†]	IC	1.000 μl	2 x 1.000 μl
Blanco	Agua (de calidad para PCR)		1.000 μl	1.000 μl
	Manual de uso		1	1

* Estándar de cuantificación.

† Control interno.

Símbolos



<N>

Contiene reactivos suficientes para <n> ensayos



Fecha de caducidad



Producto sanitario para diagnóstico *in vitro*



Número de referencia



Número de lote



Número de material

	Componentes
	Contiene
	Número
	Número mundial de artículo comercial (<i>Global Trade Item Number</i>)
	Limitación de temperatura
	Fabricante
	Consultar instrucciones de uso
	Nota importante

Almacenamiento

Los componentes del kit *artus* HBV RG PCR deben almacenarse a una temperatura de $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Deben evitarse los ciclos repetidos de descongelación y congelación (> 2), ya que pueden reducir la sensibilidad del ensayo. Si se piensa utilizar los reactivos de forma intermitente, deberán congelarse en fracciones alícuotas. La conservación a $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ no debe superar un período de cinco horas.

Uso previsto

El kit *artus* HBV RG PCR es una prueba de amplificación de ácidos nucleicos *in vitro* para la cuantificación del ADN del virus de la hepatitis B (VHB) en plasma humano. Este kit para pruebas diagnósticas utiliza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *polymerase chain reaction*) y está configurado para usarse con los instrumentos Rotor-Gene Q.

Limitaciones del uso del producto

Todos los reactivos deben utilizarse exclusivamente para diagnóstico *in vitro*.

Este producto debe ser utilizado exclusivamente por personal que haya recibido formación y preparación específicas en los procedimientos de diagnóstico *in vitro*.

Para obtener resultados óptimos con la PCR es necesario un cumplimiento estricto del manual del usuario.

Debe prestarse atención a las fechas de caducidad impresas en la caja y en las etiquetas de todos los componentes. No utilice componentes caducados.

Aunque poco frecuentes, las mutaciones en el interior de las regiones altamente conservadas del genoma viral cubiertas por los *primers* y/o por la sonda del kit pueden producir en estos casos una subcuantificación o un fallo de la detección de la presencia del virus. La validez y el rendimiento del diseño del ensayo se revisan a intervalos regulares.

Advertencias y precauciones

Siempre que trabaje con productos químicos, utilice una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y gafas protectoras. Si desea obtener más información, consulte las fichas de datos de seguridad (SDS, *safety data sheets*) correspondientes. Dichas fichas están disponibles online en un formato PDF cómodo y compacto en www.qiagen.com/safety, donde podrá encontrar, ver e imprimir la ficha de datos de seguridad de cada kit de QIAGEN® y de cada componente del kit.

Elimine los desechos de las muestras y del ensayo de conformidad con la normativa local en materia de seguridad.

Control de calidad

En cumplimiento del sistema de gestión de calidad con certificación ISO de QIAGEN, cada lote del kit *artus* HBV RG PCR se analiza en relación con las especificaciones predeterminadas para garantizar la uniformidad de la calidad de los productos.

Introducción

El kit *artus* HBV RG PCR es un sistema listo para usar para la detección del ADN del VHB mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en los instrumentos Rotor-Gene Q. La mezcla maestra HBV RG/TM Master contiene los reactivos y las enzimas necesarios para la amplificación específica de una región de 134 pb del genoma del VHB, así como para la detección directa del amplicón específico en el canal de fluorescencia Cycling Green de los instrumentos Rotor-Gene Q o Rotor-Gene 6000 o en el canal Cycling A.FAM™ del instrumento Rotor-Gene 3000.

Además, el kit *artus* HBV RG PCR contiene un segundo sistema de amplificación heterógeno para identificar una posible inhibición de la PCR. Esto se detecta como un control interno (IC) en el canal de fluorescencia Cycling Yellow de los instrumentos Rotor-Gene Q o Rotor-Gene 6000 o en el canal A.JOE™ del instrumento Rotor-Gene 3000. El límite de detección de la PCR analítica del VHB (consulte el apartado “Sensibilidad analítica” en la página 10) no se ve disminuido. Se suministran controles positivos externos (HBV RG/TM QS 1-5), que permiten determinar la cantidad de ADN viral. Para obtener más información, consulte el apartado “Cuantificación” en la página 24.

Principio

La detección de patógenos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se basa en la amplificación de regiones específicas del genoma de los patógenos. Con la PCR en tiempo real, el producto amplificado se detecta mediante colorantes fluorescentes. Estos suelen estar ligados a sondas oligonucleotídicas que se unen específicamente al producto amplificado. La monitorización de las intensidades de fluorescencia durante la serie de PCR (es decir, en tiempo real) permite detectar y cuantificar el producto que se acumula sin tener que volver a abrir los tubos de reacción una vez finalizada la serie de PCR*.

Información sobre el patógeno

El virus de la hepatitis B (VHB) se transmite principalmente a través de la sangre o de los hemoderivados. Sin embargo, también son posibles las transmisiones sexual, oral y perinatal. Tras un período de malestar general caracterizado por pérdida de apetito, vómitos y problemas abdominales, en el 10-20% aproximadamente de los pacientes se desarrolla fiebre, exantema (erupción cutánea) y problemas musculares y articulares reumáticos. Transcurridos 2-14 días aparece ictericia, que puede acompañarse de prurito. En el 1% aproximadamente de todos los pacientes infectados se produce una hepatitis fulminante que a menudo es mortal. En el 5-10% de los pacientes con hepatitis B se desarrolla una inflamación hepática crónica que puede evolucionar a cirrosis hepática o a carcinoma hepático primario.

* Mackay, I.M. (2004) Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. **10**, 190.

Características del rendimiento

Sensibilidad analítica

Se evaluaron el límite de detección analítica y el límite de detección analítica teniendo en cuenta la purificación (límites de sensibilidad) para el kit *artus* HBV RG PCR. El límite de detección analítica teniendo en cuenta la purificación se determina utilizando muestras clínicas positivas para el VHB con un método de extracción concreto. Por el contrario, el límite de detección analítica se determina sin muestras clínicas e independientemente del método de extracción seleccionado utilizando un estándar de una concentración conocida.

Para determinar la sensibilidad analítica del kit *artus* HBV RG PCR se realizaron diluciones seriadas desde 10 hasta un valor nominal de 0,0003 UI de VHB/ μ l y se analizaron con el kit *artus* HBV RG PCR en instrumentos Rotor-Gene. El ensayo se realizó en tres días diferentes por octuplicado. Los resultados se determinaron mediante un análisis probit. El límite de detección analítica del kit *artus* HBV RG PCR en combinación con el instrumento Rotor-Gene 3000 es de 0,02 UI/ μ l ($p = 0,05$). Esto significa que existe una probabilidad del 95% de que se detecten 0,02 UI/ μ l.

La equivalencia entre los instrumentos Rotor-Gene 3000 y Rotor-Gene Q/6000 se demostró sobre la base de especificaciones técnicas confirmadas mediante comparación del rendimiento analítico. Se realizaron análisis probit con ambos sistemas en paralelo. El límite de detección analítica en los instrumentos Rotor-Gene Q/6000 se encuentra dentro del intervalo de confianza del instrumento Rotor-Gene 3000. Por consiguiente, el kit *artus* HBV RG PCR puede utilizarse para la detección de ADN del VHB en los instrumentos Rotor-Gene Q/6000 con una sensibilidad similar.

La sensibilidad analítica teniendo en cuenta la purificación (kit QIAamp® DSP Virus) del kit *artus* HBV RG PCR se determinó mediante diluciones seriadas del 1.º estándar internacional para el VHB (OMS) de 158 a un valor nominal de 0,4 UI del VHB por mililitro añadido a muestras clínicas de plasma. Estas se sometieron a extracción de ADN con el kit QIAamp DSP Virus (volumen de extracción: 0,5 ml; volumen de elución: 26 μ l). Cada una de las 7 diluciones se analizó con el kit *artus* HBV RG PCR en 3 días diferentes y por octuplicado. Los resultados se determinaron mediante un análisis probit. En la figura 1 se muestra una representación gráfica del análisis probit. El límite de detección analítica teniendo en cuenta la purificación del kit *artus* HBV RG PCR en combinación con el instrumento Rotor-Gene 3000 es de 3,8 UI/ml ($p = 0,05$). Esto significa que existe una probabilidad del 95% de que se detecten 3,8 UI/ml.

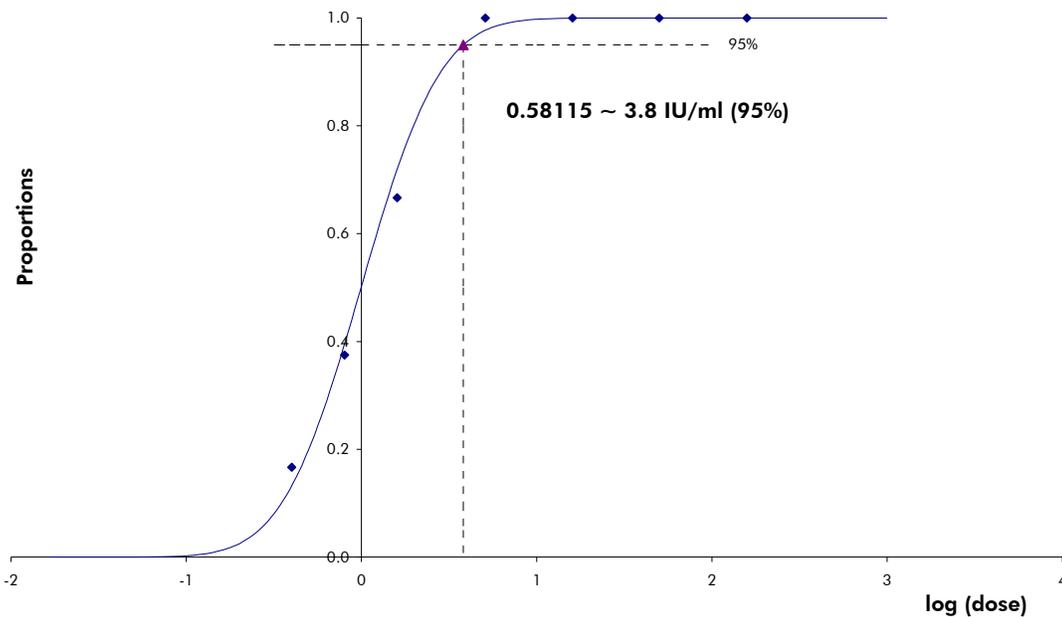


Figura 1. Análisis probit: VHB (Rotor-Gene 3000). Sensibilidad analítica teniendo en cuenta la purificación (kit QIAamp DSP Virus, QIAGEN) del kit *artus* HBV RG PCR en el instrumento Rotor-Gene 3000.

Especificidad

La especificidad del kit *artus* HBV RG PCR se asegura ante todo mediante la selección de los *primers* y de las sondas, así como mediante la selección de condiciones estrictas para la reacción. Los *primers* y las sondas se comprobaron con respecto a posibles homologías con todas las secuencias publicadas en los bancos de genes por medio de un análisis de comparación de secuencias. De este modo se ha asegurado la detección de todos los genotipos relevantes mediante una alineación de la base de datos y mediante una serie de PCR en instrumentos Rotor-Gene con los genotipos siguientes (consulte la tabla 1).

Tabla 1. Análisis de la especificidad de los genotipos relevantes.

Virus	Genotipo	Origen	VHB (Cycling Green o A.FAM)	Control interno (Cycling Yellow o A.JOE)
VHB	A (EE. UU.)	Teragenix*	+	+
VHB	B (Indonesia)	Teragenix	+	+
VHB	C (Indonesia)	Teragenix	+	+
VHB	C (Venezuela)	Teragenix	+	+
VHB	D (EE. UU.)	Teragenix	+	+
VHB	E (Costa de Marfil)	Teragenix	+	+
VHB	F (Venezuela)	Teragenix	+	+
VHB	G (EE. UU.)	Teragenix	+	+
VHB	H (Nicaragua)	Teragenix	+	+

* Teragenix Corporation, Florida, Estados Unidos.

Para los análisis ulteriores de la especificidad se utilizaron cepas del VHB con diferencias de secuencia conocidas en la región precore del genoma del VHB (HBV Pre-Core Mutant Panel [conjunto de pruebas analíticas para mutantes precore del VHB], Teragenix, Florida, Estados Unidos). Las 9 cepas de mutantes precore de este conjunto de pruebas analíticas se pudieron detectar con el kit *artus* HBV RG PCR.

Además, la especificidad se validó con 100 muestras de plasma VHB-negativas diferentes. Estas no generaron ninguna señal con los *primers* y las sondas específicos del VHB, que se incluyen en la mezcla maestra HBV RG/TM.

Se analizó la posible reactividad cruzada del kit *artus* HBV RG PCR mediante el grupo de control indicado en la tabla 2 (página 14). Ninguno de los patógenos analizados mostró reactividad. No se produjo ninguna reactividad cruzada en el caso de infecciones mixtas.

Intervalo lineal

El intervalo lineal (medición analítica) del kit *artus* HBV RG PCR se determinó mediante el análisis de diluciones seriadas de un estándar de cuantificación del VHB que variaban entre 1×10^8 UI/ μ l y 1×10^{-2} UI/ μ l. Las diluciones seriadas

se calibraron frente al 1.^{er} estándar internacional para el ADN del VHB de la OMS.

Cada dilución se analizó en duplicados ($n = 8$ para concentraciones $\geq 1 \times 10^0$ UI/ μ l; $n = 16$ para concentraciones $< 1 \times 10^0$ UI/ μ l) con el kit *artus* HBV RG PCR en instrumentos Rotor-Gene.

Tabla 2. Análisis de la especificidad del kit con patógenos con posible reactividad cruzada.

Grupo de control	VHB (Cycling Green o Cycling A.FAM)	Control interno (Cycling Yellow o Cycling A.JOE)
Virus del herpes humano 1 (virus del herpes simple 1)	-	+
Virus del herpes humano 2 (virus del herpes simple 2)	-	+
Virus del herpes humano 3 (virus de la varicela-zóster)	-	+
Virus del herpes humano 4 (virus de Epstein-Barr)	-	+
Virus del herpes humano 5 (citomegalovirus)	-	+
Virus del herpes humano 6	-	+
Virus de la inmunodeficiencia humana 1	-	+
Virus de la hepatitis A	-	+
Virus de la hepatitis C	-	+
Parvovirus B19	-	+
Virus de la fiebre amarilla	-	+
Virus linfotrópico humano de linfocitos T tipos 1 y 2	-	+
Virus Coxsackie B3	-	+
Virus del dengue 1-4	-	+
<i>Escherichia coli</i>	-	+

El intervalo lineal del kit *artus* HBV RG PCR se determinó para cubrir concentraciones desde 0,02 UI/ μ l hasta al menos 1×10^8 UI/ μ l (figura 2).

Suponiendo que se usa el kit QIAamp DSP Virus para la extracción de ADN, el kit *artus* HBV RG PCR cubre un intervalo lineal desde 1,1 UI/ml hasta al menos 4×10^9 UI/ml.

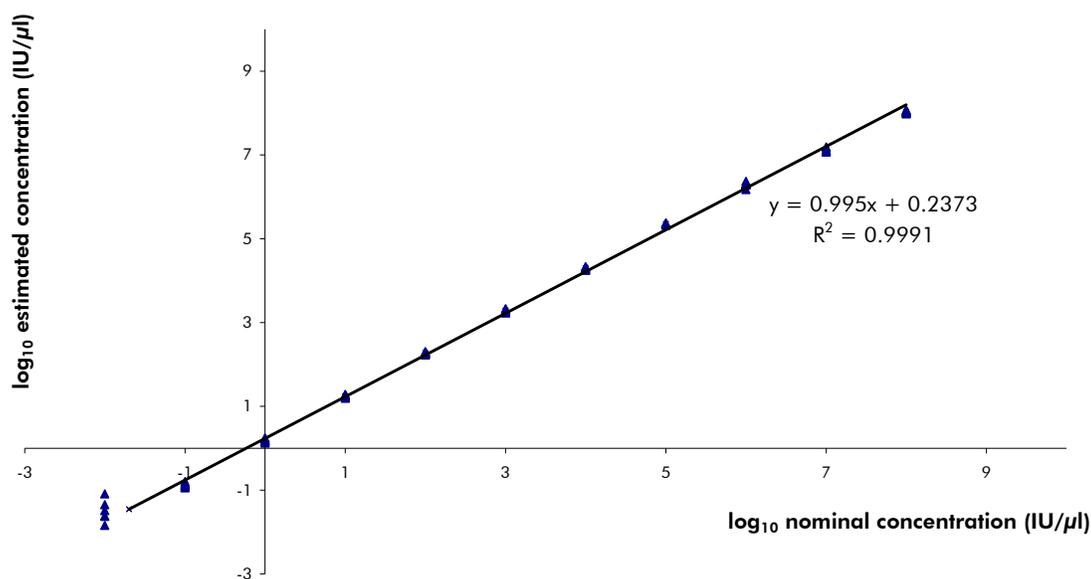


Figura 2. Intervalo lineal del kit *artus* HBV RG PCR. Cálculo del intervalo lineal. La línea recta se determinó mediante una regresión lineal del log₁₀ de las concentraciones calculadas con el log₁₀ de las concentraciones nominales. En la figura se incluye la ecuación de la línea de regresión.

Precisión

Los datos de precisión del kit *artus* HBV RG PCR permiten la determinación de la varianza total del ensayo. La varianza total consta de la variabilidad intraensayo (variabilidad de múltiples resultados de muestras de la misma concentración en un único experimento), la variabilidad interensayo (variabilidad de múltiples resultados del ensayo generados en diferentes instrumentos del mismo tipo por diferentes operadores en un mismo laboratorio) y la variabilidad interlote (variabilidad de múltiples resultados del ensayo con diferentes lotes). Los datos obtenidos se utilizaron para determinar la desviación estándar, la varianza y el coeficiente de variación para la PCR específica del patógeno y para la PCR del control interno.

Se obtuvieron datos de precisión del kit *artus* HBV RG PCR utilizando el estándar de cuantificación de menor concentración (QS 5; 10 UI/μl). El análisis se realizó por octuplicado. Los datos de precisión se calcularon según los valores de C_T de las curvas de amplificación (C_T: umbral del ciclo, consulte la tabla 3 en la página 16). Además, se determinaron los datos de precisión para los resultados cuantitativos en UI/μl mediante los valores de C_T correspondientes (tabla 4). En función de estos resultados, la dispersión estadística de cualquier muestra existente con la concentración mencionada es del 1,29% (C_T) o del 8,99% (concentración) y del 1,87% (C_T) para la detección

del control interno. Estos valores se basan en la totalidad de los valores individuales de las variabilidades determinadas.

Tabla 3. Datos de precisión en función de los valores de C_T .

	Desviación estándar	Varianza	Coefficiente de variación (%)
Variabilidad intraensayo: HBV RG/TM QS 5	0,09	0,01	0,32
Variabilidad intraensayo: Control interno	0,10	0,01	1,06
Variabilidad interensayo: HBV RG/TM QS 5	0,14	0,02	0,49
Variabilidad interensayo: Control interno	0,29	0,08	1,00
Variabilidad interlote: HBV RG/TM QS 5	0,38	0,15	1,39
Variabilidad interlote: Control interno	0,62	0,39	2,23
Varianza total: HBV RG/TM QS 5	0,36	0,13	1,29
Varianza total: Control interno	0,52	0,27	1,87

Tabla 4. Datos de precisión en función de los resultados cuantitativos (en UI/ μ l).

	Desviación estándar	Varianza	Coefficiente de variación (%)
Variabilidad intraensayo: HBV RG/TM QS 5	0,93	0,87	9,28
Variabilidad interensayo: HBV RG/TM QS 5	0,79	0,63	7,92
Variabilidad interlote: HBV RG/TM QS 5	1,03	1,05	10,21
Varianza total: HBV RG/TM QS 5	0,90	0,81	8,99

Robustez

La verificación de la robustez permite determinar la tasa de fracaso total del kit *artus* HBV RG PCR. Para verificar la robustez se añadieron 0,05 UI/ μ l de volumen de elución de ADN de control del VHB (aproximadamente tres veces la concentración del límite de sensibilidad analítica) a 100 muestras de plasma VHB-negativas. Tras la extracción con el kit QIAamp DSP Virus (consulte el apartado "Aislamiento del ADN" en la página 23), estas muestras se analizaron con el kit *artus* HBV RG PCR. La tasa de fracaso para todas las muestras de VHB fue del 0%. Además, la robustez del control interno se evaluó mediante la purificación y el análisis de 100 muestras de plasma VHB-negativas. La tasa de fracaso total fue del 0%. No se observaron inhibiciones. Por lo tanto, la robustez del kit *artus* HBV RG PCR es del $\geq 99\%$.

Reproducibilidad

Los datos de reproducibilidad permiten evaluar de forma regular el rendimiento del kit *artus* HBV RG PCR y comparar su eficiencia con la de otros productos. Estos datos se obtienen por medio de la participación en programas de competencia establecidos.

Evaluación diagnóstica

En un estudio realizado en dos laboratorios independientes se comparó el kit *artus* HBV RG PCR con el ensayo COBAS[®] TaqMan[®] HBV. Para ello se analizaron 287 muestras retrospectivas y prospectivas de plasma.

El ADN del VHB para el análisis con el kit *artus* HBV RG PCR se aisló utilizando el kit QIAamp DSP Virus, y el análisis se realizó en el instrumento Rotor-Gene 3000. Para el análisis comparativo con el ensayo COBAS TaqMan HBV, el ADN del VHB se aisló conforme a las instrucciones del fabricante proporcionadas en el prospecto. Los resultados obtenidos con el kit *artus* HBV RG PCR se compararon con los del ensayo COBAS TaqMan HBV.

En todas las muestras de plasma, el kit *artus* HBV RG PCR mostró una sensibilidad diagnóstica del 100% y una especificidad diagnóstica del 97% en comparación con los resultados obtenidos con el ensayo COBAS TaqMan HBV como ensayo de referencia. Estos resultados se representan en la tabla 5.

Tabla 5. Resultados del estudio de validación comparativo.

		Ensayo COBAS TaqMan HBV		
		+	-	Total
Kit <i>artus</i> HBV RG PCR	+	186	3	189
	-	0	98	98

Un posterior análisis de las 3 muestras con resultados discordantes confirmó los resultados del kit *artus* HBV RG PCR. Por consiguiente, cabe suponer que la discrepancia se basa en una sensibilidad mayor del kit *artus* HBV RG PCR.

La correlación de los resultados cuantitativos de ambos sistemas de análisis se analizó mediante regresión lineal. Los resultados de ambos kits se muestran de forma comparativa en la figura 3.

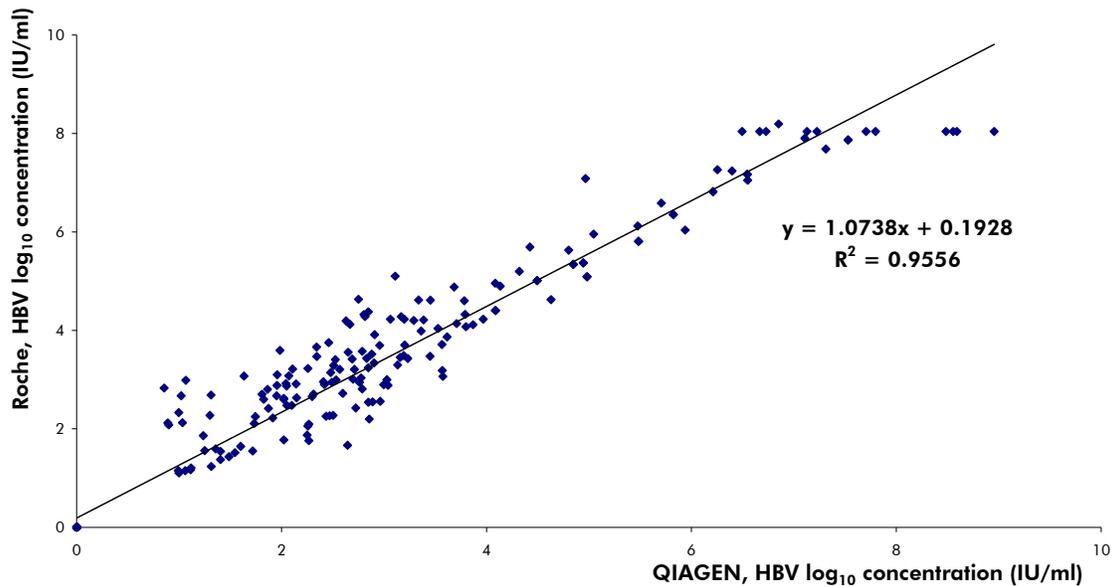


Figura 3. Comparación del ensayo COBAS TaqMan HBV (Roche, VHB; con purificación de las muestras con el sistema High Pure) con el kit *artus* HBV RG PCR (QIAGEN, VHB; con purificación de las muestras con el kit QIAamp DSP Virus). La correlación de los resultados cuantitativos de ambos sistemas de análisis (tabla 5) se analizó mediante regresión lineal. Los resultados de ambos kits se muestran en un gráfico de dispersión XY con escala logarítmica.

Equipo y reactivos que debe suministrar el usuario

Siempre que trabaje con productos químicos, utilice una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y gafas protectoras. Si desea obtener más información, consulte las fichas de datos de seguridad (SDS) correspondientes que el proveedor del producto pone a su disposición.

- Kit de aislamiento de ADN (consulte el apartado “Aislamiento del ADN” en la página 23)
- Pipetas (ajustables)*
- Puntas de pipeta estériles con filtro
- Agitador vorticial*
- Centrifugadora de mesa* con rotor para tubos de reacción de 2 ml
- Instrumento Rotor-Gene Q o Rotor-Gene* con canales de fluorescencia para Cycling Green y Cycling Yellow o con canales de fluorescencia para Cycling A.FAM y Cycling A.JOE
- Software Rotor-Gene Q, versión 1.7.94 (software Rotor-Gene 6000, versión 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94; software Rotor-Gene 3000, versión 6.0.23) o superior
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (tubos en tira y tapas, 0,1 ml), para uso con un rotor de 72 pocillos (n.º de referencia 981103 o 981106)
- De forma alternativa: PCR Tubes, 0.2 ml (tubos de PCR, 0,2 ml), para uso con un rotor de 36 pocillos (n.º de referencia 981005 o 981008)
- Bloque de refrigeración (Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes [bloque de carga para 72 tubos de 0,1 ml], n.º de referencia 9018901, o Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes [bloque de carga para 96 tubos de 0,2 ml], n.º de referencia 9018905)

* Asegúrese de que los instrumentos hayan sido verificados y calibrados siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Notas importantes

Precauciones generales

El usuario debe tener en cuenta siempre las siguientes indicaciones:

- Utilice puntas de pipeta estériles con filtro.
- Almacene y extraiga los materiales positivos (muestras, controles positivos y amplicones) por separado de todos los demás reactivos y añádalos a la mezcla de reacción en un área separada espacialmente.
- Descongele por completo todos los componentes a temperatura ambiente (15-25 °C) antes de comenzar un ensayo.
- Una vez descongelados, mezcle los componentes (mediante pipeteo ascendente y descendente repetido o mediante agitación vorticial de pulsos) y centrifugue brevemente.
- Trabaje con rapidez y mantenga los componentes en hielo o en el bloque de refrigeración (bloque de carga de 72/96 pocillos).

Recogida, almacenamiento y transporte de las muestras

i Todas las muestras deben tratarse como material potencialmente infeccioso.

i Diversos estudios actuales consideran el plasma con ácido etilendiaminotetracético (EDTA) y el plasma con citrato como los materiales de muestra más adecuados para la detección del VHB. Por consiguiente, recomendamos utilizar estos materiales con el kit *artus* HBV RG PCR.

La validación interna del kit *artus* HBV RG PCR se realizó utilizando muestras de plasma humano con EDTA. No se han validado otros materiales de muestra. Por favor, utilice exclusivamente el kit de aislamiento de ácidos nucleicos recomendado (consulte el apartado "Aislamiento del ADN" en la página 23) para la preparación de las muestras.

Cuando se utilizan ciertos materiales de muestra es preciso seguir estrictamente las instrucciones específicas relativas a la recogida, el transporte y el almacenamiento.

Recogida de las muestras

Cada extracción de sangre ocasiona una lesión de los vasos sanguíneos (arterias, venas y capilares). Solamente debe utilizarse material inocuo y estéril. Para la extracción de sangre se dispone de material desechable adecuado. Para las punciones venosas no deben utilizarse agujas capilares demasiado finas. La extracción de sangre venosa debe realizarse en las regiones

adecuadas de la flexura del codo, el antebrazo o el dorso de la mano. La sangre debe extraerse con tubos de recogida de muestras estándar (tubo de tapón rojo de Sarstedt o tubo equivalente de otro fabricante). Debe extraerse un volumen de 5-10 ml de sangre con EDTA. Los tubos deben mezclarse con un agitador de varilla inmediatamente después de la recogida de la muestra (8 veces, sin agitar).

i No deben utilizarse muestras de sujetos tratados con heparina (consulte el apartado “Sustancias causantes de interferencias” en la página más adelante).

Almacenamiento de las muestras

La sangre completa debe separarse en plasma y componentes celulares mediante centrifugación durante 20 minutos a 800-1.600 x g en un plazo de 6 horas. El plasma aislado debe transferirse a tubos de polipropileno estériles. La sensibilidad del ensayo puede verse reducida si se congelan las muestras de forma sistemática o si se almacenan durante un período de tiempo mayor. El ADN encapsulado del virus es estable durante días si se almacena a 4 °C, durante semanas si se almacena a –20 °C e incluso durante meses y años si se almacena a –70 °C*.

Transporte de las muestras

Como norma, el material de muestra debe transportarse en un recipiente de transporte inastillable. De esta manera puede evitarse el peligro potencial de infección a causa de una fuga de la muestra. Las muestras deben transportarse de acuerdo con las instrucciones locales y nacionales para el transporte de material patógeno[†].

Las muestras deben enviarse en el plazo de 6 horas. No recomendamos almacenar las muestras en el lugar de extracción. Es posible enviar por correo las muestras, siguiendo las instrucciones legales para el transporte de material patógeno. Recomendamos realizar el transporte de las muestras por mensajería. Las muestras de sangre deben enviarse refrigeradas (entre 2 °C y 8 °C) y el plasma separado debe enviarse ultracongelado (entre –15 °C y –30 °C).

* Arbeitskreis Blut, V17 (09.1997), Bundesgesundheitsblatt 11/1997, p. 452–456.

[†] International Air Transport Association (IATA, Asociación internacional para el transporte aéreo). *Dangerous Goods Regulations* (Reglamentación sobre mercancías peligrosas).

Sustancias causantes de interferencias

Las concentraciones elevadas de bilirrubina (≤ 15 mg/dl) y lípidos (≤ 800 mg/dl) y las muestras hemolizadas no influyen en el sistema. La heparina (≥ 10 UI/ml) afecta a la PCR. No deben utilizarse muestras recogidas en tubos que contengan heparina como anticoagulante. Tampoco deben utilizarse muestras de pacientes tratados con heparina.

Aislamiento del ADN

El kit QIAamp DSP Virus (QIAGEN, n.º de referencia 60704) está validado para la purificación de ADN viral a partir de plasma humano para utilizarse con el kit *artus* HBV RG PCR. Realice la purificación del ADN viral conforme a las instrucciones descritas en el manual de uso del kit QIAamp DSP Virus (*QIAamp DSP Virus Kit Handbook*).

i La utilización de ARN transportador es esencial para la eficiencia de la extracción y, por consiguiente, para el rendimiento en la obtención de ADN/ARN. Para aumentar la estabilidad del ARN transportador suministrado con el kit QIAamp DSP Virus, recomendamos seguir la información referente a la reconstitución y el almacenamiento del ARN transportador que se proporciona en el manual de instrucciones (“Preparación de reactivos y tampones”).

i El control interno del kit *artus* HBV RG PCR puede utilizarse directamente en el procedimiento de aislamiento (consulte el apartado “Control interno” más adelante). Asegúrese de procesar al mismo tiempo una muestra de plasma negativa durante la purificación. La señal del control interno correspondiente sirve como base para evaluar la purificación.

Control interno

Se suministra un control interno (HBV RG/TM IC). Esto permite al usuario controlar el procedimiento de aislamiento del ADN y comprobar una posible inhibición de la PCR. Para esta aplicación, añada el control interno a la etapa de aislamiento en una proporción de 0,1 μ l por 1 μ l de volumen de elución. Por ejemplo, usando el kit QIAamp DSP Virus, el ADN se eluye en 60 μ l de tampón de elución (AVE). Por lo tanto, deben añadirse inicialmente 6 μ l del control interno. La cantidad de control interno utilizada depende únicamente del volumen de elución.

i El control interno y el ARN transportador (consulte el apartado “Aislamiento del ADN” en la página 23) deben añadirse únicamente a la mezcla del tampón de lisis y el material de muestra o directamente al tampón de lisis.

El control interno no debe añadirse directamente al material de muestra. Si se añade al tampón de lisis, tenga en cuenta que la mezcla de control interno y tampón de lisis-ARN transportador debe prepararse en fresco y usarse inmediatamente (el almacenamiento de la mezcla a temperatura ambiente o en el frigorífico durante solamente unas horas puede causar el fallo del control interno y una reducción de la eficiencia de la extracción).

i No añada el control interno ni el ARN transportador directamente al material de muestra.

Para considerar que la purificación ha tenido éxito, el valor de C_T del control interno de una muestra de plasma negativa que se ha procesado durante la purificación (kit QIAamp DSP Virus) debe ser de $C_T = 29 \pm 3$ (umbral: 0,03) con los instrumentos Rotor-Gene Q. La dispersión indicada se debe a la varianza del instrumento y de la purificación. Una desviación mayor indica un problema en la purificación. En ese caso, la purificación debe comprobarse y, en caso necesario, validarse una segunda vez. Si tiene cualquier otra duda o si encuentra problemas, póngase en contacto con el servicio técnico de QIAGEN.

El control interno también puede utilizarse exclusivamente para comprobar una posible inhibición de la PCR. Para esta aplicación, añada el control interno directamente a la mezcla maestra HBV RG/TM Master, tal como se describe en el paso 2b del protocolo (página 27).

Ajuste del umbral para el análisis de PCR

La configuración óptima del umbral para una combinación dada de instrumento Rotor-Gene Q y kit *artus* RG PCR debe establecerse de manera empírica probando las distintas combinaciones, ya que se trata de un valor relativo que depende del flujo de trabajo diagnóstico global. Como punto de partida, el umbral puede definirse en un valor preliminar de 0,04 para el análisis de la primera serie de PCR, pero este valor deberá ajustarse en un análisis comparativo de las siguientes series del flujo de trabajo. El umbral debe ajustarse manualmente, justo encima de la señal de fondo de los controles negativos y las muestras negativas. El valor medio del umbral que se obtenga de estos experimentos es el que muy probablemente funcione para la mayoría de las series futuras, pero el usuario deberá revisar a intervalos periódicos el valor umbral generado. Por regla general, el valor umbral oscilará entre 0,03 y 0,05. Este deberá redondearse para no exceder los 3 decimales.

Cuantificación

Los estándares de cuantificación (HBV RG/TM QS 1-5) incluidos se tratan como muestras previamente purificadas y se utiliza el mismo volumen (20 μ l). Para generar una curva de estándares con los instrumentos Rotor-Gene Q, los 5

estándares de cuantificación deben utilizarse y definirse en el cuadro de diálogo "Edit Samples" (Editar muestras) como estándares con las concentraciones especificadas (consulte el manual del usuario del instrumento).

ⓘ Los estándares de cuantificación se definen como UI/ μ l*. Para convertir los valores determinados mediante la curva de estándares en UI/ml de material de muestra debe utilizarse la siguiente ecuación:

$$\text{Resultado (UI/ml)} = \frac{\text{resultado (UI/\mu l)} \times \text{volumen de elución (\mu l)}}{\text{Volumen de muestra (ml)}}$$

Como norma, debe introducirse en la ecuación anterior el volumen de muestra inicial. Esto debe tenerse en cuenta cuando se ha cambiado el volumen de muestra antes de la extracción de ácidos nucleicos (p. ej., reduciendo el volumen mediante centrifugación o aumentando el volumen mediante adición hasta el volumen necesario para el aislamiento).

* El estándar se ha calibrado utilizando el 1.^{er} estándar internacional para el VHB (OMS).

Protocolo: PCR y análisis de los datos



Cuestiones importantes antes de comenzar

- Antes de comenzar el procedimiento, lea el apartado “Notas importantes” en las páginas 21-24.
- Dedique tiempo suficiente a familiarizarse con el instrumento Rotor-Gene Q antes de iniciar el protocolo. Consulte el manual del usuario del instrumento.
- Asegúrese de que se incluya al menos un estándar de cuantificación y un control negativo (agua de calidad para PCR) para cada serie de PCR. Para generar una curva de estándares, utilice los 5 estándares de cuantificación suministrados (HBV RG/TM QS 1–5) para cada serie de PCR.

Lo que hay que hacer antes de comenzar

- Asegúrese de que se ha preenfriado el bloque de refrigeración (accesorio del instrumento Rotor-Gene Q) a 2-8 °C.
- Antes de cada uso, todos los reactivos deben ser descongelados completamente, mezclados (mediante pipeteo ascendente y descendente repetido o mediante agitación vorticial rápida) y centrifugados brevemente.

Procedimiento

- 1. Coloque el número deseado de tubos de PCR en los adaptadores del bloque de refrigeración.**
- 2. Si va a utilizar el control interno para supervisar el procedimiento de aislamiento del ADN y comprobar una posible inhibición de la PCR, siga el paso 2a. Si va a utilizar el control interno exclusivamente para comprobar una posible inhibición de la PCR, siga el paso 2b.**
 - 2a. El control interno ya se ha añadido a la etapa de aislamiento (consulte el apartado “Control interno” en la página 23). En este caso, prepare una mezcla maestra según se indica en la tabla 6.**

Tabla 6. Preparación de la mezcla maestra (control interno utilizado para supervisar el aislamiento del ADN y comprobar una posible inhibición de la PCR).

Número de muestras	1	12
HBV RG/TM Master	30 μ l	360 μ l
HBV RG/TM IC	0 μ l	0 μ l (cada una)
Volumen total	30 μl	360 μl (cada una)

- 2b. El control interno debe añadirse directamente a la mezcla maestra HBV RG/TM. En este caso, prepare una mezcla maestra según se indica en la tabla 7.**

La mezcla de reacción contiene generalmente todos los componentes necesarios para la PCR excepto la muestra.

Tabla 7. Preparación de la mezcla maestra (control interno utilizado exclusivamente para comprobar una posible inhibición de la PCR).

Número de muestras	1	12
HBV RG/TM Master	30 μ l	360 μ l
HBV RG/TM IC	2 μ l	24 μ l
Volumen total	32 μl*	384 μl*

* El aumento de volumen causado por la adición del control interno se ignora al preparar el ensayo de PCR. La sensibilidad del sistema de detección no se ve afectada.

- 3. Pipetee 30 μ l de la mezcla maestra en cada tubo de PCR. A continuación, añada 20 μ l del ADN eluido de la muestra (consulte la tabla 8). En correspondencia, deben usarse 20 μ l de al menos uno de los estándares de cuantificación (HBV RG/TM QS 1-5) como control positivo y 20 μ l de agua (agua de calidad para PCR) como control negativo.**

Tabla 8. Preparación del ensayo de PCR

Número de muestras	1	12
Mezcla maestra	30 μ l	30 μ l (cada una)
Muestra	20 μ l	20 μ l (cada una)
Volumen total	50 μl	50 μl (cada una)

4. **Cierre los tubos de PCR. Asegúrese de que el anillo de bloqueo (accesorio del instrumento Rotor-Gene) está colocado en la parte superior del rotor para prevenir la apertura accidental de los tubos durante el procesamiento.**
5. **Para la detección de ADN del VHB, cree un perfil de temperatura siguiendo los pasos que se indican a continuación.**

Configuración de los parámetros generales del ensayo	Figuras 4, 5, 6
Activación inicial de la enzima <i>hot-start</i> (arranque en caliente)	Figura 7
Amplificación del ADN	Figura 8
Ajuste de la sensibilidad de los canales de fluorescencia	Figura 9
Inicio de la serie	Figura 10

Todas las especificaciones hacen referencia al software Rotor-Gene Q, versión 1.7.94, al software Rotor-Gene 6000, versiones 1.7.65, 1.7.87 o 1.7.94, y al software Rotor-Gene 3000, versión 6.0.23. Puede encontrar más información acerca de la programación de los instrumentos Rotor-Gene en el manual del usuario del instrumento. En las ilustraciones, estos valores de configuración aparecen recuadrados en negro. Se incluyen ilustraciones para los instrumentos Rotor-Gene Q. En caso de que se requieran valores diferentes para el instrumento Rotor-Gene 3000, estas diferencias se describen en el texto.

6. En primer lugar, abra el cuadro de diálogo “New Run Wizard” (Asistente para nueva serie) (figura 4). Marque la casilla “Locking Ring Attached” (Anillo de bloqueo acoplado) y haga clic en “Next” (Siguiete).

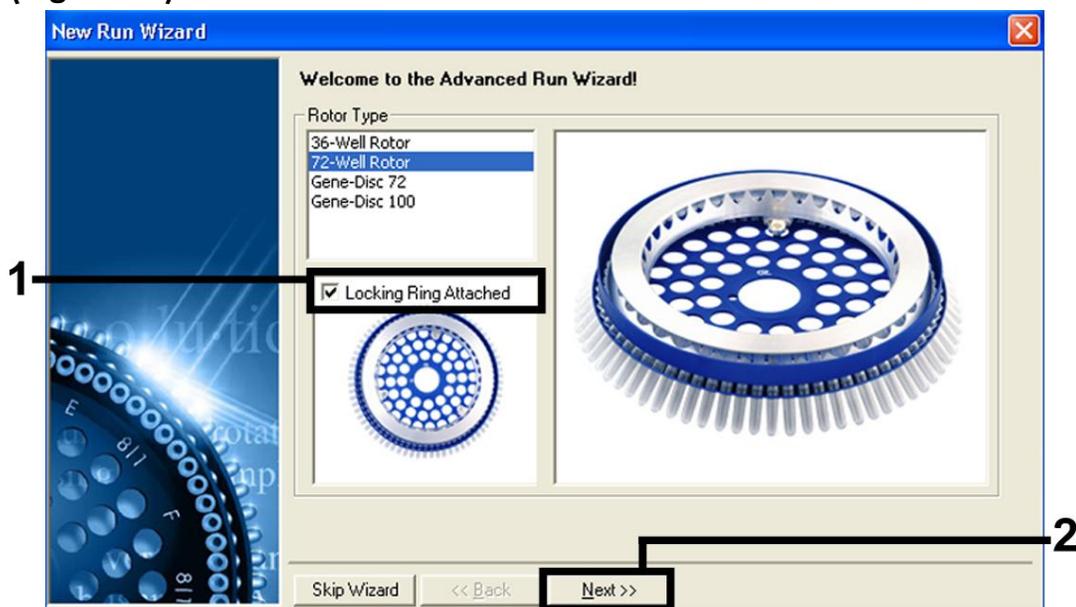


Figura 4. Cuadro de diálogo “New Run Wizard”.

7. Seleccione 50 en el campo “Reaction Volume (μL):” (Volumen de reacción [μL]) y haga clic en “Next” (figura 5).

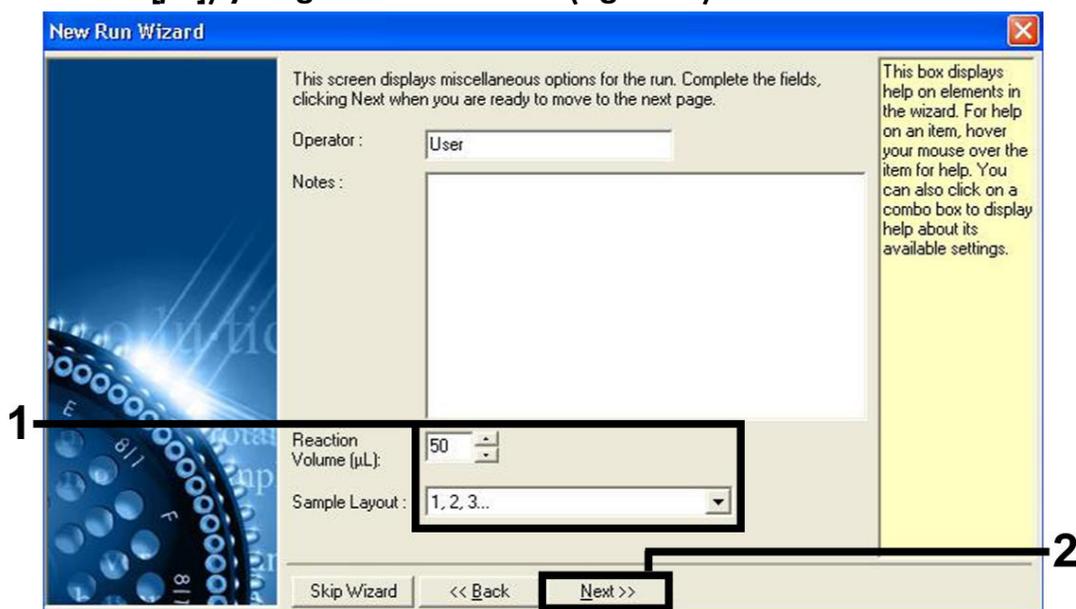


Figura 5. Configuración de los parámetros generales del ensayo.

8. Haga clic en el botón "Edit Profile" (Editar perfil) en el siguiente cuadro de diálogo "New Run Wizard" (figura 6) y programe el perfil de temperatura tal como se muestra en las figuras 6-8.

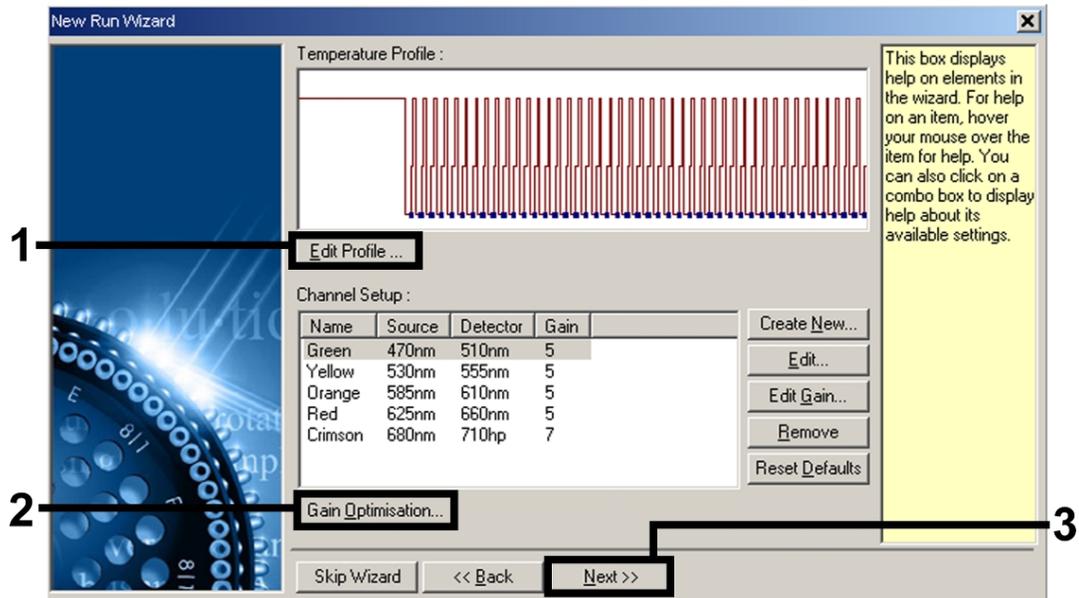


Figura 6. Edición del perfil.

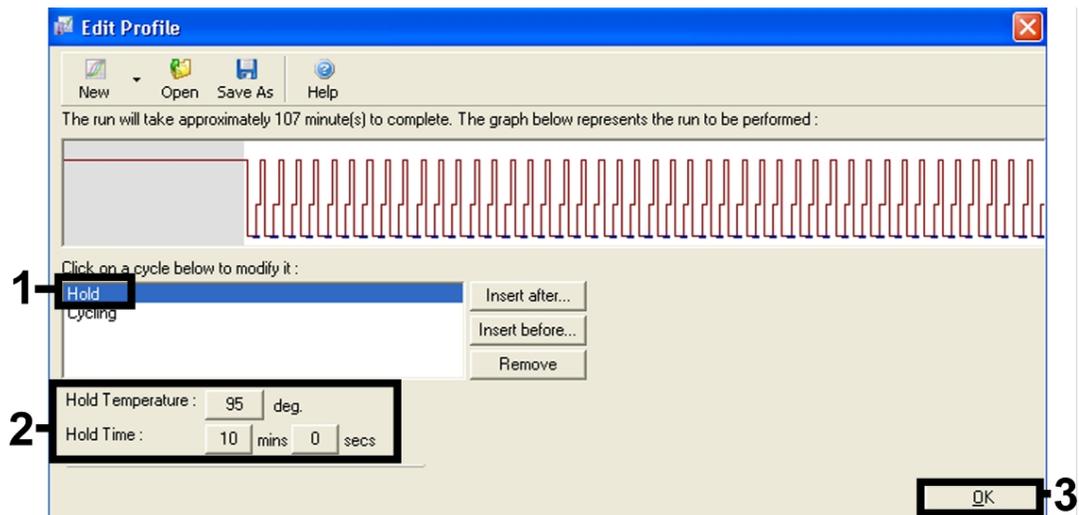


Figura 7. Activación inicial de la enzima *hot-start*.

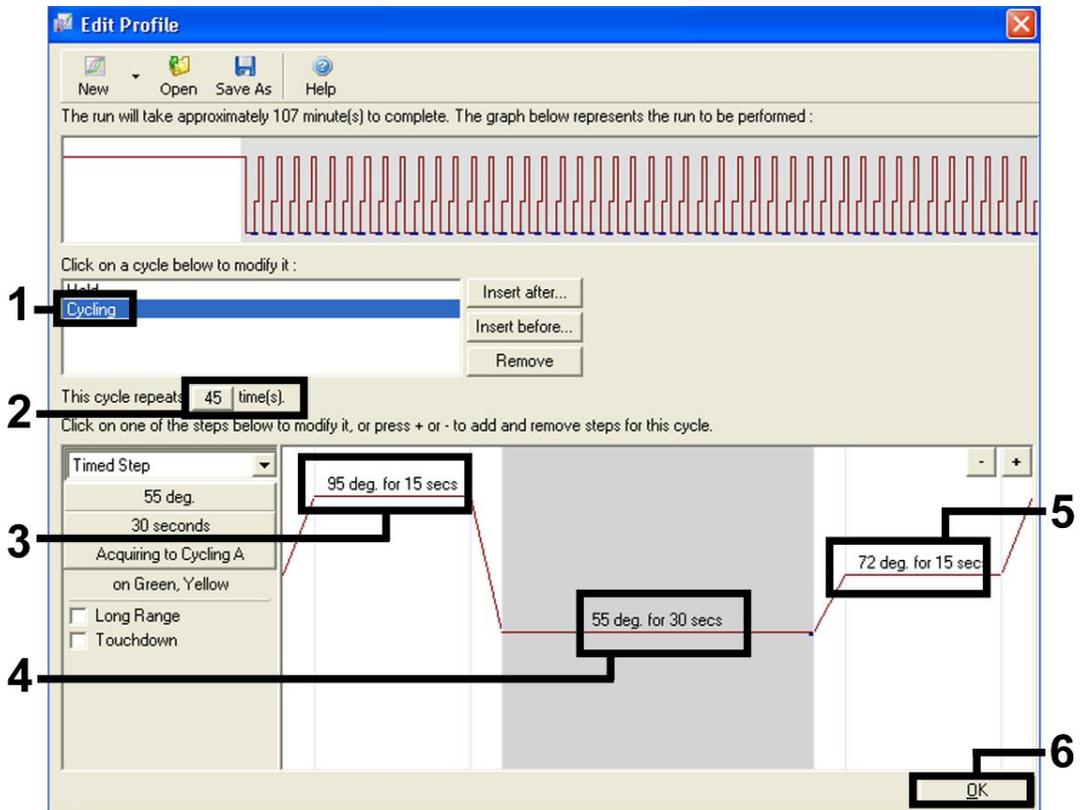


Figura 8. Amplificación del ADN. Tenga en cuenta que, en el instrumento Rotor-Gene 3000, el software definirá los colorantes fluorescentes como "FAM/Sybr, JOE".

9. El intervalo de detección de los canales de fluorescencia debe determinarse según las intensidades de fluorescencia de los tubos de PCR. Haga clic en "Gain Optimisation" (Optimización de ganancia) en el cuadro de diálogo "New Run Wizard" (consulte la figura 6) para abrir el cuadro de diálogo "Auto-Gain Optimisation Setup" (Configuración de la optimización de ganancia automática). Configure la temperatura de calibración en 55 para que coincida con la temperatura de apareamiento del programa de amplificación (figura 9).

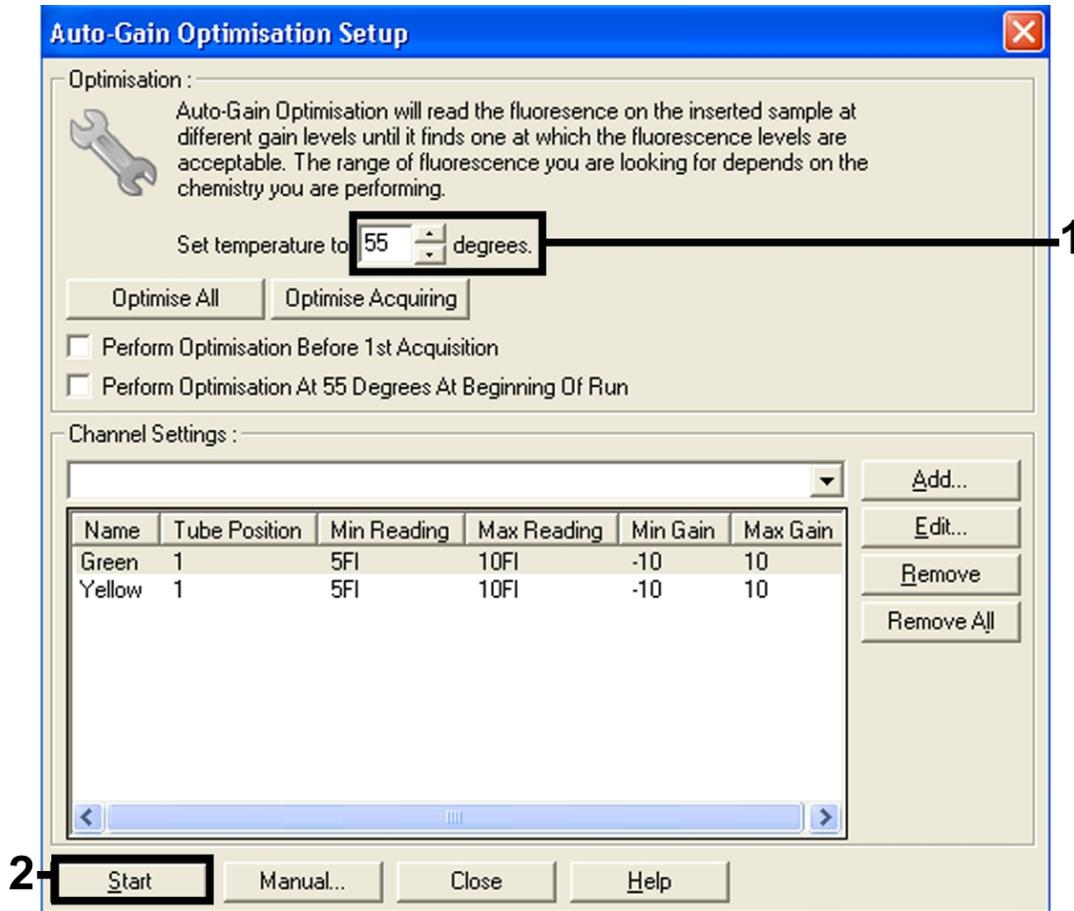


Figura 9. Ajuste de la sensibilidad de los canales de fluorescencia. Tenga en cuenta que, en el instrumento Rotor-Gene 3000, el software definirá los colorantes fluorescentes como "FAM/Sybr" y "JOE".

- 10. Los valores de ganancia determinados por la calibración de los canales se guardan automáticamente y se muestran en la última ventana de menú del procedimiento de programación (figura 10). Haga clic en "Start Run" (Iniciar serie).**

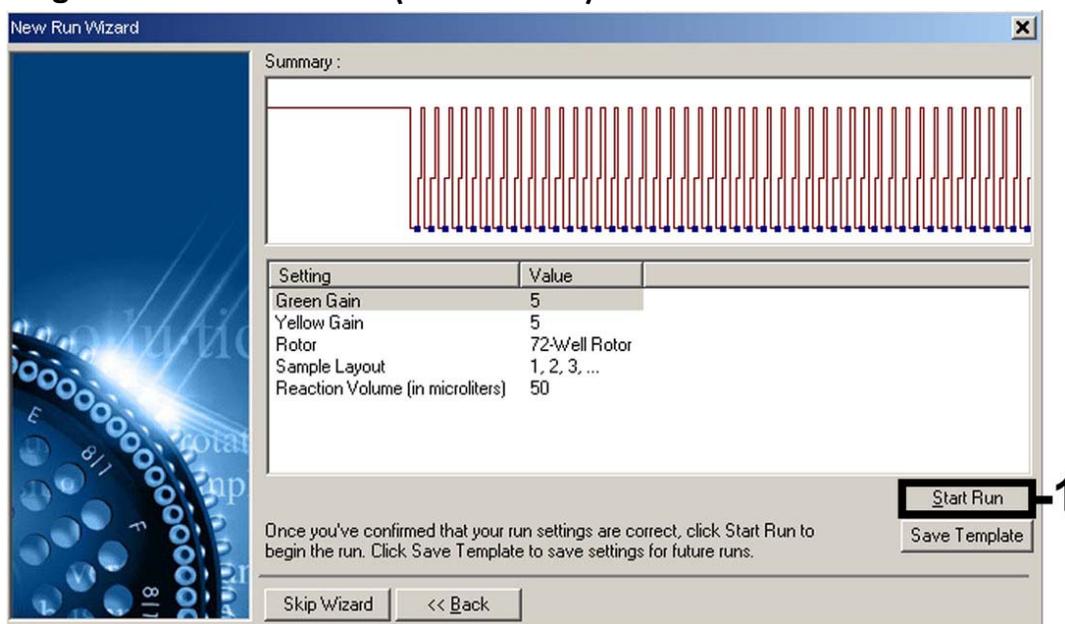


Figura 10. Inicio de la serie. Tenga en cuenta que, en el instrumento Rotor-Gene 3000, el software definirá los colorantes fluorescentes como "FAM/Sybr" y "JOE".

- 11. Cuando haya finalizado la serie, analice los datos. Son posibles los siguientes resultados (11a, 11b y 11c).**

En las figuras 11 y 12 se presentan ejemplos de reacciones de PCR positivas y negativas.

- 11a. Se detecta una señal en el canal de fluorescencia Cycling Green. El resultado del análisis es positivo: la muestra contiene ADN del VHB.**

En este caso, la detección de una señal en el canal Cycling Yellow no es imprescindible, ya que las concentraciones altas iniciales de ADN del VHB (señal positiva en el canal Cycling Green) pueden dar lugar a una reducción o a la ausencia de señal de fluorescencia del control interno en el canal Cycling Yellow (competición).

i Tenga en cuenta que, en el instrumento Rotor-Gene 3000, los canales relevantes son Cycling A.FAM para la señal positiva y Cycling A.JOE para el control interno.

11b. No se detecta una señal en el canal de fluorescencia Cycling Green. Al mismo tiempo, aparece una señal procedente del control interno en el canal Cycling Yellow. En la muestra no hay ADN del VHB detectable. Puede considerarse negativa.

En el caso de una PCR negativa del VHB, la señal detectada del control interno descarta la posibilidad de una inhibición de la PCR.

i Tenga en cuenta que, en el instrumento Rotor-Gene 3000, los canales relevantes son Cycling A.JOE para el control interno y ausencia de señal para Cycling A.FAM.

11c. No se detecta una señal en los canales Cycling Green o Cycling Yellow. No puede determinarse un resultado.

Puede encontrar información acerca de las fuentes de error y su solución en el apartado "Guía para la resolución de problemas" en la página 36.

i Tenga en cuenta que, en el instrumento Rotor-Gene 3000, los canales relevantes son Cycling A.FAM y Cycling A.JOE.

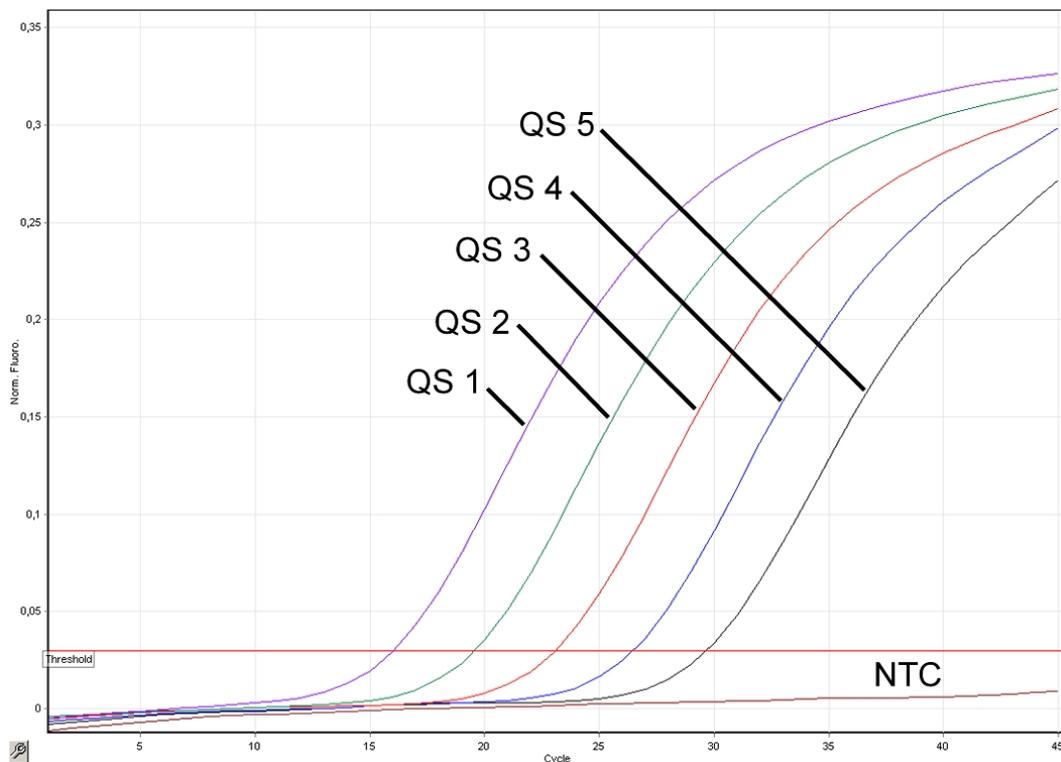


Figura 11. Detección de los estándares de cuantificación (HBV RG/TM QS 1-5) en el canal de fluorescencia Cycling Green. NTC: control sin molde (control negativo).

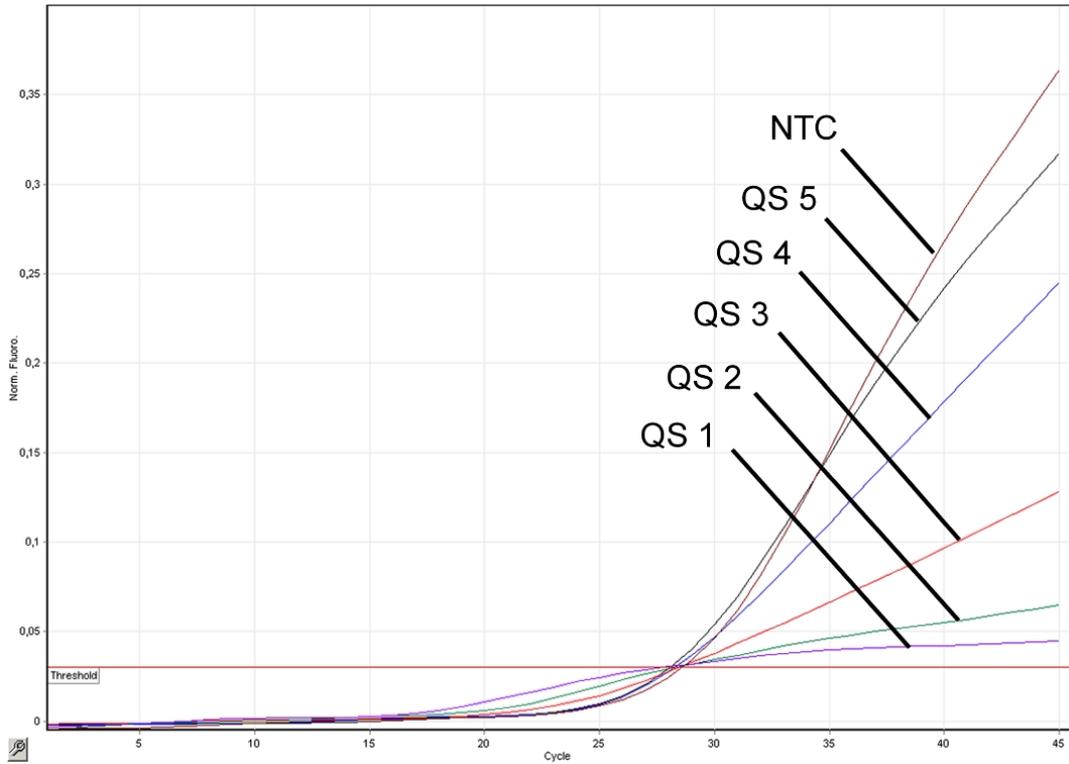


Figura 12. Detección del control interno (IC) en el canal de fluorescencia Cycling Yellow con amplificación simultánea de los estándares de cuantificación (HBV RG/TM QS 1-5). NTC: control sin molde (control negativo).

Guía para la resolución de problemas

Esta guía de resolución de problemas le será de utilidad para resolver los problemas que puedan surgir. Para obtener más información, consulte también la página de preguntas frecuentes de nuestro Centro de Asistencia Técnica: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Los científicos del servicio técnico de QIAGEN estarán siempre encantados de responder a cualquier pregunta que tenga sobre la información y los protocolos de este manual, así como sobre las tecnologías para el tratamiento de muestras y ensayos de biología molecular (encontrará la información de contacto en la contracubierta o en www.qiagen.com).

Comentarios y sugerencias

Ausencia de señal con controles positivos (HBV RG/TM QS 1-5) en el canal de fluorescencia Cycling Green o Cycling A.FAM

- | | |
|---|---|
| a) El canal de fluorescencia seleccionado para el análisis de los datos de PCR no cumple el protocolo |  Para el análisis de los datos, seleccione el canal de fluorescencia Cycling Green o Cycling A.FAM para la PCR analítica del VHB y el canal de fluorescencia Cycling Yellow o Cycling A.JOE para la PCR del control interno. |
| b) Programación incorrecta del perfil de temperatura del instrumento Rotor-Gene |  Compare el perfil de temperatura con el protocolo. Consulte el apartado "Protocolo: PCR y análisis de los datos" en la página 26. |
| c) Configuración incorrecta de la PCR |  Compruebe los pasos de trabajo por medio del esquema de pipeteo y repita la PCR en caso necesario. Consulte el apartado "Protocolo: PCR y análisis de los datos" en la página 26. |
| d) Las condiciones de almacenamiento de uno o más componentes del kit no cumplan las instrucciones indicadas en el apartado "Almacenamiento" (página 7) |  Compruebe las condiciones de almacenamiento y la fecha de caducidad (consulte la etiqueta del kit) de los reactivos y utilice un kit nuevo en caso necesario. |

Comentarios y sugerencias

- e) El kit *artus* HBV RG PCR ha caducado  Compruebe las condiciones de almacenamiento y la fecha de caducidad (consulte la etiqueta del kit) de los reactivos y utilice un kit nuevo en caso necesario.

Señal débil o ausente del control interno de una muestra de plasma negativa sometida a purificación con el kit QIAamp DSP Virus ($C_T = 29 \pm 3$; umbral, 0,03) en el canal de fluorescencia Cycling Yellow o Cycling A.JOE y ausencia simultánea de una señal en el canal Cycling Green o Cycling A.FAM

- a) Las condiciones de la PCR no cumplen el protocolo  Compruebe las condiciones de la PCR (véase anteriormente) y repita la PCR con los valores de configuración corregidos en caso necesario.
- b) Se produjo la inhibición de la PCR  Asegúrese de que está utilizando el método de aislamiento recomendado y siga exactamente las instrucciones del fabricante.
- c) Se perdió ADN durante la extracción  Si se ha añadido el control interno a la extracción, la ausencia de una señal del control interno puede indicar la pérdida de ADN durante la extracción. Asegúrese de que está utilizando el método de aislamiento recomendado (consulte el apartado "Aislamiento del ADN" en la página 23) y siga exactamente las instrucciones del fabricante.
- d) Las condiciones de almacenamiento de uno o más componentes del kit no cumplían las instrucciones indicadas en el apartado "Almacenamiento" (página 7)  Compruebe las condiciones de almacenamiento y la fecha de caducidad (consulte la etiqueta del kit) de los reactivos y utilice un kit nuevo en caso necesario.

Comentarios y sugerencias

- e) El kit *artus* HBV RG PCR ha caducado
- ① Compruebe las condiciones de almacenamiento y la fecha de caducidad (consulte la etiqueta del kit) de los reactivos y utilice un kit nuevo en caso necesario.

Señales con los controles negativos en el canal de fluorescencia Cycling Green o Cycling A.FAM de la PCR analítica

- a) Se produjo contaminación durante la preparación de la PCR
- ① Repita la PCR con nuevos reactivos en duplicados.
 - ① Si es posible, cierre los tubos de PCR inmediatamente después de añadir la muestra que se desea analizar.
 - ① Asegúrese de pipetear en último lugar los controles positivos.
 - ① Asegúrese de descontaminar el espacio de trabajo y los instrumentos a intervalos regulares.
- b) Se produjo contaminación durante la extracción
- ① Repita la extracción y la PCR de la muestra que se desea analizar utilizando nuevos reactivos.
 - ① Asegúrese de descontaminar el espacio de trabajo y los instrumentos a intervalos regulares.

Referencias citadas

QIAGEN mantiene una amplia y actualizada base de datos online de publicaciones científicas en las que se utilizan los productos de QIAGEN. Las exhaustivas opciones de búsqueda permiten al usuario encontrar los artículos que necesita, ya sea mediante una búsqueda sencilla de una palabra clave o especificando la aplicación, el área de investigación, el título, etc.

Para obtener una lista bibliográfica completa, visite la base de datos bibliográfica online de QIAGEN en www.qiagen.com/RefDB/search.asp o póngase en contacto con el servicio técnico de QIAGEN o con su distribuidor local.

Información para pedidos

Producto	Contenido	N.º ref.
artus HBV RG PCR Kit (24)	Para 24 reacciones: mezcla maestra, 5 estándares de cuantificación, control interno, agua (de calidad para PCR)	4506263
artus HBV RG PCR Kit (96)	Para 96 reacciones: mezcla maestra, 5 estándares de cuantificación, control interno, agua (de calidad para PCR)	4506265
Kit QIAamp DSP Virus: para purificación de ácidos nucleicos virales a partir de plasma humano para diagnóstico <i>in vitro</i>		
QIAamp DSP Virus Kit	Para 50 preparaciones: columnas QIAamp MinElute® Spin, tampones, reactivos, tubos, extensores de columna y conectores VacConnectors	60704
Rotor-Gene Q MDx: para análisis de PCR en tiempo real validado para diagnóstico <i>in vitro</i> en aplicaciones clínicas		
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Termociclador para PCR en tiempo real con 5 canales (verde, amarillo, naranja, rojo, carmesí), ordenador portátil, software, accesorios, garantía de 1 año para piezas y mano de obra, instalación y formación	9002023
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	Termociclador para PCR en tiempo real con 5 canales (verde, amarillo, naranja, rojo, carmesí), ordenador portátil, software, accesorios, garantía de 1 año para piezas y mano de obra, instalación y formación no incluidas	9002022
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Termociclador para PCR en tiempo real y analizador de disociación de alta resolución con 5 canales (verde, amarillo, naranja, rojo y carmesí) más un canal HRM, ordenador portátil, software, accesorios, garantía de 1 año para piezas y mano de obra, instalación y formación	9002033

Producto	Contenido	N.º ref.
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Termociclador para PCR en tiempo real y analizador de disociación de alta resolución con 5 canales (verde, amarillo, naranja, rojo y carmesí) más un canal HRM, ordenador portátil, software, accesorios, garantía de 1 año para piezas y mano de obra, instalación y formación no incluidas	9002032
Rotor-Gene Q MDx 6plex System	Instrumento para PCR en tiempo real con 6 canales (azul, verde, amarillo, naranja, rojo, carmesí), ordenador portátil, software, accesorios, garantía de 1 año para piezas y mano de obra, instalación y formación	9002043
Rotor-Gene Q MDx 6plex Platform	Instrumento para PCR en tiempo real con 6 canales (azul, verde, amarillo, naranja, rojo, carmesí), ordenador portátil, software, accesorios, garantía de 1 año para piezas y mano de obra, instalación y formación no incluidas	9002042
Rotor-Gene Q MDx 2plex System	Termociclador para PCR en tiempo real con 2 canales (verde, amarillo), ordenador portátil, software, accesorios, garantía de 1 año para piezas y mano de obra, instalación y formación	9002003
Rotor-Gene Q MDx 2plex Platform	Termociclador para PCR en tiempo real y analizador de disociación de alta resolución con 2 canales (verde, amarillo) más un canal HRM, ordenador portátil, software, accesorios, garantía de 1 año para piezas y mano de obra, instalación y formación no incluidas	9002002

Producto	Contenido	N.º ref.
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM System	Termociclador para PCR en tiempo real y analizador de disociación de alta resolución con 2 canales (verde, amarillo) más un canal HRM, ordenador portátil, software, accesorios, garantía de 1 año para piezas y mano de obra, instalación y formación	9002013
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM Platform	Termociclador para PCR en tiempo real y analizador de disociación de alta resolución con 2 canales (verde, amarillo) más un canal HRM, ordenador portátil, software, accesorios, garantía de 1 año para piezas y mano de obra, instalación y formación no incluidas	9002012
Rotor-Gene Q: para un rendimiento sobresaliente en la PCR en tiempo real		
Rotor-Gene Q 5plex System	Termociclador para PCR en tiempo real con 5 canales (verde, amarillo, naranja, rojo, carmesí), ordenador portátil, software, accesorios, garantía de 1 año para piezas y mano de obra, instalación y formación	9001640
Rotor-Gene Q 5plex Platform	Termociclador para PCR en tiempo real con 5 canales (verde, amarillo, naranja, rojo, carmesí), ordenador portátil, software, accesorios, garantía de 1 año para piezas y mano de obra, instalación y formación no incluidas	9001570
Rotor-Gene Q 5plex HRM System	Termociclador para PCR en tiempo real y analizador de disociación de alta resolución con 5 canales (verde, amarillo, naranja, rojo y carmesí) más un canal HRM, ordenador portátil, software, accesorios, garantía de 1 año para piezas y mano de obra, instalación y formación	9001650

Producto	Contenido	N.º ref.
Rotor-Gene Q 5plex HRM Platform	Termociclador para PCR en tiempo real y analizador de disociación de alta resolución con 5 canales (verde, amarillo, naranja, rojo y carmesí) más un canal HRM, ordenador portátil, software, accesorios, garantía de 1 año para piezas y mano de obra, instalación y formación no incluidas	9001580
Rotor-Gene Q 6plex System	Instrumento para PCR en tiempo real con 6 canales (azul, verde, amarillo, naranja, rojo, carmesí), ordenador portátil, software, accesorios, garantía de 1 año para piezas y mano de obra, instalación y formación	9001660
Rotor-Gene Q 6plex Platform	Instrumento para PCR en tiempo real con 6 canales (azul, verde, amarillo, naranja, rojo, carmesí), ordenador portátil, software, accesorios, garantía de 1 año para piezas y mano de obra, instalación y formación no incluidas	9001590
Rotor-Gene Q 2plex System	Termociclador para PCR en tiempo real con 2 canales (verde, amarillo), ordenador portátil, software, accesorios, garantía de 1 año para piezas y mano de obra, instalación y formación	9001620
Rotor-Gene Q 2plex Platform	Termociclador para PCR en tiempo real y analizador de disociación de alta resolución con 2 canales (verde, amarillo) más un canal HRM, ordenador portátil, software, accesorios, garantía de 1 año para piezas y mano de obra, instalación y formación no incluidas	9001550

Producto	Contenido	N.º ref.
Rotor-Gene Q 2plex HRM System	Termociclador para PCR en tiempo real y analizador de disociación de alta resolución con 2 canales (verde, amarillo) más un canal HRM, ordenador portátil, software, accesorios, garantía de 1 año para piezas y mano de obra, instalación y formación	9001630
Rotor-Gene Q 2plex HRM Platform	Termociclador para PCR en tiempo real y analizador de disociación de alta resolución con 2 canales (verde, amarillo) más un canal HRM, ordenador portátil, software, accesorios, garantía de 1 año para piezas y mano de obra, instalación y formación no incluidas	9001560
Accesorios de Rotor-Gene Q		
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Bloque de aluminio para preparación manual de reacciones con una pipeta monocanal en 72 tubos de 0,1 ml	9018901
Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes	Bloque de aluminio para preparación manual de reacciones en una matriz estándar de 8 x 12 con 96 tubos de 0,2 ml	9018905
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 tiras de 4 tubos y tapas para 1.000 reacciones	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 tiras de 4 tubos y tapas para 10.000 reacciones	981106
PCR Tubes, 0.2 ml (1000)	1.000 tubos de pared fina para 1.000 reacciones	981005
PCR Tubes, 0.2 ml (10000)	10 x 1.000 tubos de pared fina para 1.000 reacciones	981008

Si desea obtener información actualizada sobre la licencia y las exenciones de responsabilidad específicas del producto, consulte el manual o la guía del usuario del kit de QIAGEN correspondiente. Los manuales y las guías del usuario de los kits de QIAGEN están disponibles en www.qiagen.com o pueden solicitarse al servicio técnico de QIAGEN o al distribuidor local.

La compra de este producto permite al comprador utilizarlo para la realización de servicios de diagnóstico *in vitro* en seres humanos. Por la presente no se otorga ninguna patente general ni ninguna otra licencia de ningún tipo distinta de este derecho específico de uso derivado de la compra.

Marcas comerciales: QIAGEN®, QIAamp®, *artus*®, MinElute®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); COBAS®, TaqMan® (Roche Group); FAM™, JOE™, SYBR® (Life Technologies Corporation).

El kit *artus* HBV RG PCR y el kit QIAamp DSP Virus son kits de diagnóstico con el marcado CE conforme a la Directiva Europea 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico *in vitro*. No disponible en todos los países.

Acuerdo de licencia limitada

La utilización de este producto implica por parte de cualquier comprador o usuario del kit *artus* HBV RG PCR la aceptación de los siguientes términos:

1. El kit *artus* HBV RG PCR puede utilizarse exclusivamente de acuerdo con las especificaciones del *Manual de uso del kit artus HBV RG PCR* y empleando únicamente los componentes contenidos en el kit. QIAGEN no ofrece licencia alguna bajo ninguna de sus propiedades intelectuales para utilizar o incorporar los componentes contenidos en este kit con componentes no incluidos en el mismo, excepto según se describe en el *Manual de uso del kit artus HBV RG PCR* y en protocolos adicionales disponibles en www.qiagen.com.
2. Aparte de las licencias expresamente especificadas, QIAGEN no garantiza que este kit ni su(s) uso(s) no infrinjan los derechos de terceros.
3. Este kit y sus componentes tienen licencia para un solo uso y no pueden ser reutilizados, reacondicionados ni revendidos.
4. QIAGEN renuncia específicamente a cualquier otra licencia, explícita o implícita, distinta de las licencias expresamente especificadas.
5. El comprador y el usuario del kit aceptan no realizar ni permitir a otros realizar ningún paso que pueda conducir a acciones que hayan sido prohibidas en las especificaciones anteriores o que pueda facilitarlas. QIAGEN se reserva el derecho de emprender acciones legales ante cualquier tribunal para el cumplimiento de las prohibiciones especificadas en este Acuerdo de licencia limitada, y recuperará todos los gastos derivados de la investigación y de los costes del juicio, incluidos los honorarios de abogacía, en cualquier acción emprendida para hacer cumplir este Acuerdo de licencia limitada o cualquier otro derecho de propiedad intelectual en relación con este kit y con sus componentes.

Para obtener los términos actualizados de la licencia, visite www.qiagen.com.

© 2009-2014 QIAGEN, reservados todos los derechos.

www.qiagen.com

Australia ■ Orders 1-800-243-800 ■ Fax 03-9840-9888 ■ Technical 1-800-243-066

Austria ■ Orders 0800-28-10-10 ■ Fax 0800-28-10-19 ■ Technical 0800-28-10-11

Belgium ■ Orders 0800-79612 ■ Fax 0800-79611 ■ Technical 0800-79556

Brazil ■ Orders 0800-557779 ■ Fax 55-11-5079-4001 ■ Technical 0800-557779

Canada ■ Orders 800-572-9613 ■ Fax 800-713-5951 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

China ■ Orders 86-21-3865-3865 ■ Fax 86-21-3865-3965 ■ Technical 800-988-0325

Denmark ■ Orders 80-885945 ■ Fax 80-885944 ■ Technical 80-885942

Finland ■ Orders 0800-914416 ■ Fax 0800-914415 ■ Technical 0800-914413

France ■ Orders 01-60-920-926 ■ Fax 01-60-920-925 ■ Technical 01-60-920-930 ■ Offers 01-60-920-928

Germany ■ Orders 02103-29-12000 ■ Fax 02103-29-22000 ■ Technical 02103-29-12400

Hong Kong ■ Orders 800 933 965 ■ Fax 800 930 439 ■ Technical 800 930 425

Ireland ■ Orders 1800 555 049 ■ Fax 1800 555 048 ■ Technical 1800 555 061

Italy ■ Orders 800-789-544 ■ Fax 02-334304-826 ■ Technical 800-787980

Japan ■ Telephone 03-6890-7300 ■ Fax 03-5547-0818 ■ Technical 03-6890-7300

Korea (South) ■ Orders 080-000-7146 ■ Fax 02-2626-5703 ■ Technical 080-000-7145

Luxembourg ■ Orders 8002-2076 ■ Fax 8002-2073 ■ Technical 8002-2067

Mexico ■ Orders 01-800-7742-639 ■ Fax 01-800-1122-330 ■ Technical 01-800-7742-436

The Netherlands ■ Orders 0800-0229592 ■ Fax 0800-0229593 ■ Technical 0800-0229602

Norway ■ Orders 800-18859 ■ Fax 800-18817 ■ Technical 800-18712

Singapore ■ Orders 1800-742-4362 ■ Fax 65-6854-8184 ■ Technical 1800-742-4368

Spain ■ Orders 91-630-7050 ■ Fax 91-630-5145 ■ Technical 91-630-7050

Sweden ■ Orders 020-790282 ■ Fax 020-790582 ■ Technical 020-798328

Switzerland ■ Orders 055-254-22-11 ■ Fax 055-254-22-13 ■ Technical 055-254-22-12

UK ■ Orders 01293-422-911 ■ Fax 01293-422-922 ■ Technical 01293-422-999

USA ■ Orders 800-426-8157 ■ Fax 800-718-2056 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

