

# Manual de uso del kit *artus*<sup>®</sup> HI Virus-1 RG RT-PCR

 24 (ref. 4513263)  
 96 (ref. 4513265)

Versión 1



Diagnóstico *in vitro* cuantitativo

Para utilizar con los instrumentos Rotor-Gene<sup>®</sup> Q



4513263, 4513265



1049310ES



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724

Hilden, ALEMANIA

R5



1049310ES



## **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](http://www.qiagen.com).



# Índice

<b>Contenido del kit</b>	<b>6</b>
<b>Símbolos</b>	<b>6</b>
<b>Almacenamiento</b>	<b>7</b>
<b>Uso previsto</b>	<b>7</b>
<b>Limitaciones del uso del producto</b>	<b>8</b>
<b>Advertencias y precauciones</b>	<b>8</b>
<b>Control de calidad</b>	<b>8</b>
<b>Introducción</b>	<b>9</b>
Principio	9
Información sobre el patógeno	9
Características del rendimiento	10
<b>Equipo y reactivos que debe suministrar el usuario</b>	<b>21</b>
<b>Notas importantes</b>	<b>22</b>
Precauciones generales	22
Recogida, almacenamiento y transporte de las muestras	22
Aislamiento del ARN	24
Control interno	25
Ajuste del umbral para el análisis de PCR	25
Cuantificación	26
<b>Protocolo: PCR y análisis de los datos</b>	<b>28</b>
<b>Guía para la resolución de problemas</b>	<b>38</b>
<b>Referencias citadas</b>	<b>41</b>
<b>Información para pedidos</b>	<b>42</b>

## Contenido del kit

<b>artus HI Virus-1 RG RT-PCR Kit</b>		<b>(24)</b>	<b>(96)</b>
<b>N.º de referencia</b>		<b>4513263</b>	<b>4513265</b>
<b>Número de reacciones</b>		<b>24</b>	<b>96</b>
Azul	HI Virus-1 RG Master A (mezcla maestra HI Virus-1 RG A)	2 x 12 reacciones	8 x 12 reacciones
Violeta	HI Virus-1 RG Master B (mezcla maestra HI Virus-1 RG B)	2 x 12 reacciones	8 x 12 reacciones
Rojo	HI Virus-1 RG QS1* (1x 10 <sup>4</sup> UI/μl)	<b>QS</b> 200 μl	200 μl
Rojo	HI Virus-1 RG QS 2* (1x 10 <sup>3</sup> UI/μl)	<b>QS</b> 200 μl	200 μl
Rojo	HI Virus-1 RG QS 3* (1x 10 <sup>2</sup> UI/μl)	<b>QS</b> 200 μl	200 μl
Rojo	HI Virus-1 RG QS 4* (1x 10 <sup>1</sup> UI/μl)	<b>QS</b> 200 μl	200 μl
Verde	HI Virus-1 RG IC <sup>†</sup>	<b>IC</b> 1000 μl	2 x 1000 μl
Blanco	Agua (de calidad para PCR)	1.000 μl	1000 μl
	Manual de uso	 1	1

\* Estándar de cuantificación.

† Control interno.

## Símbolos



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
	Clorhidrato de guanidina
	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* HI Virus-1 RG RT-PCR deben almacenarse a una temperatura de -30°C a -15°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 °C no debe superar un período de cinco horas.

## Uso previsto

El kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR es una prueba de amplificación de ácidos nucleicos *in vitro* para la cuantificación del ARN del virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1) en plasma humano. Este kit para pruebas diagnósticas utiliza la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR, *reverse transcription polymerase chain reaction*) y está configurado para usarse con los instrumentos Rotor-Gene Q. El ensayo puede cuantificar el ARN del VIH-1 en el intervalo de 120 – 1 x 10<sup>8</sup> VIH-1 UI/ml. Se han validado para usarse en el ensayo las muestras de plasma que contienen los subtipos A-H del grupo M.

**i** El kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR no puede utilizarse con los instrumentos Rotor-Gene Q 2plex.

El kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR está indicado para usarse junto con la presentación clínica y otros marcadores de laboratorio para determinar el pronóstico de la enfermedad y como apoyo para evaluar la respuesta viral al tratamiento antirretroviral medida por los cambios de los niveles de ARN del VIH-1 en plasma con EDTA. El kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR no está indicado para usarse como prueba de cribado del VIH ni como prueba diagnóstica para confirmar la presencia de infección por el VIH.

## 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 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) correspondientes. Dichas fichas están disponibles online en un formato PDF cómodo y compacto en [www.qiagen.com/safety](http://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* HI Virus-1 RG RT-PCR se analiza en relación con las especificaciones predeterminadas para garantizar la uniformidad de la calidad de los productos.

## Introducción

El kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR es un sistema listo para usar para la detección de ARN del VIH-1 mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en los instrumentos Rotor-Gene Q. La mezcla maestra HI Virus-1 RG Master A y B contiene los reactivos y las enzimas necesarios para la transcripción inversa y la amplificación específica de una región de 93 pb del genoma del VIH-1, 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™ (origen 470 nm, detector 510 nm) del instrumento Rotor-Gene 3000.

Además, el kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR contiene un segundo sistema de amplificación heterógena para identificar una posible inhibición de la PCR. Se detecta como un control interno (IC) en el canal de fluorescencia Cycling Orange de los instrumentos Rotor-Gene Q, Rotor-Gene 6000 o A.ROX™ (origen 585 nm, detector 610 nm) del instrumento Rotor-Gene 3000. El límite de detección de la RT-PCR analítica del VIH-1 (consulte el apartado "Sensibilidad analítica" en la página 10) no se ve disminuido. Se suministran controles positivos externos (HI Virus-1 RG QS 1–4), que permiten determinar la cantidad de ARN viral. Para obtener más información, consulte el apartado "**Cuantificación**" en la página 26.

## 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 inmunodeficiencia humana (VIH) es un retrovirus que causa el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Hay dos tipos de VIH responsables de las infecciones en el ser humano, el VIH-1 y el VIH-2, que se diferencian en su virulencia y su prevalencia. La mayoría de los casos de SIDA descritos en el mundo se han atribuido al VIH-1. La infección por el VIH tiene

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

lugar por la transferencia de sangre, líquido vaginal, leche materna y otros líquidos corporales infectados. En estos líquidos corporales, el VIH está presente tanto en forma de partículas libres del virus como en forma de virus dentro de células inmunitarias infectadas. Las tres principales vías de transmisión son el coito sin protección, las agujas contaminadas y la transmisión de una madre infectada a su hijo durante el parto o a través de la leche materna.

El VIH infecta fundamentalmente las células del sistema inmunitario humano, como los linfocitos T colaboradores (concretamente los linfocitos CD4<sup>+</sup>). La infección por el VIH causa niveles bajos de linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Cuando el número de linfocitos T CD4<sup>+</sup> disminuye por debajo de un nivel crítico, se pierde la inmunidad celular y el cuerpo se vuelve progresivamente más susceptible a las infecciones oportunistas.

Los síntomas del SIDA se manifiestan en una fase avanzada de la infección por el VIH, cuando el sistema inmunitario deprimido no puede combatir las infecciones oportunistas. En esta fase, la persona infectada presenta cada vez más síntomas provocados por estas infecciones. Las infecciones más comunes son la diarrea crónica por *Cryptosporidium*, las infecciones oculares inducidas por citomegalovirus, la neumonía por *Pneumocystis*, la toxoplasmosis y la tuberculosis, así como las infecciones por organismos del complejo *Mycobacterium avium*. Además, también es frecuente el desarrollo de diferentes tipos de cáncer, como el cáncer invasivo del cuello uterino, el sarcoma de Kaposi o el linfoma. Hasta la fecha no existe una cura para el SIDA y se cree que la mayoría de las personas infectadas con el VIH morirá finalmente de una enfermedad asociada al SIDA. Sin embargo, los avances en los tratamientos contra el VIH y contra el SIDA, incluidos los que combaten el virus en sí y los que previenen o tratan las infecciones oportunistas, han mejorado radicalmente la esperanza y la calidad de vida de muchos pacientes con infección por el VIH o con SIDA.

## Características del rendimiento

### Sensibilidad analítica

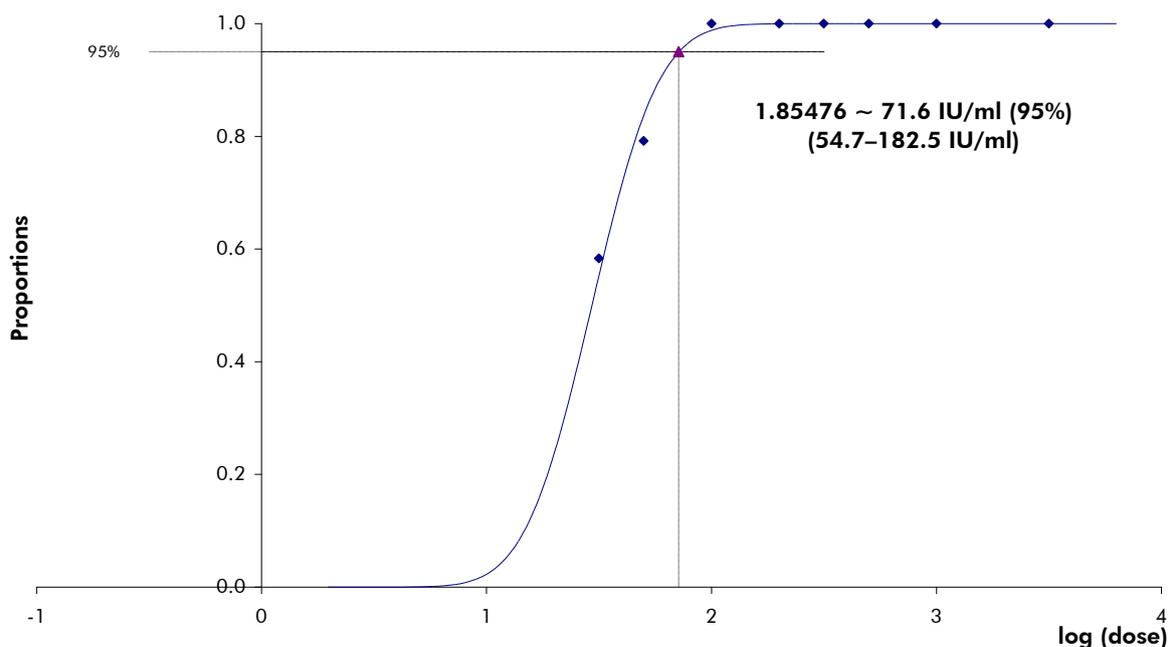
Se evaluaron el límite de detección analítica y el límite de detección analítica teniendo en cuenta la purificación (límites de sensibilidad) para el kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR. El límite de detección analítica teniendo en cuenta la purificación se determina utilizando muestras clínicas positivas para el VIH con un método de extracción concreto. Por el contrario, el límite de detección analítico se determina independientemente del método de extracción seleccionado utilizando un estándar de una concentración conocida.

Para determinar la sensibilidad analítica del kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR se realizaron diluciones seriadas de estándares desde 0,0316 hasta 31,6 UI\*/µl y

se analizaron con el kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR en un instrumento Rotor-Gene 3000. 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* HI Virus-1 RG RT-PCR en combinación con el instrumento Rotor-Gene 3000 es de 4,5 UI/ $\mu$ l ( $p = 0,05$ ). Esto significa que existe una probabilidad del 95% de que se detecten 4,5 UI/ $\mu$ l.

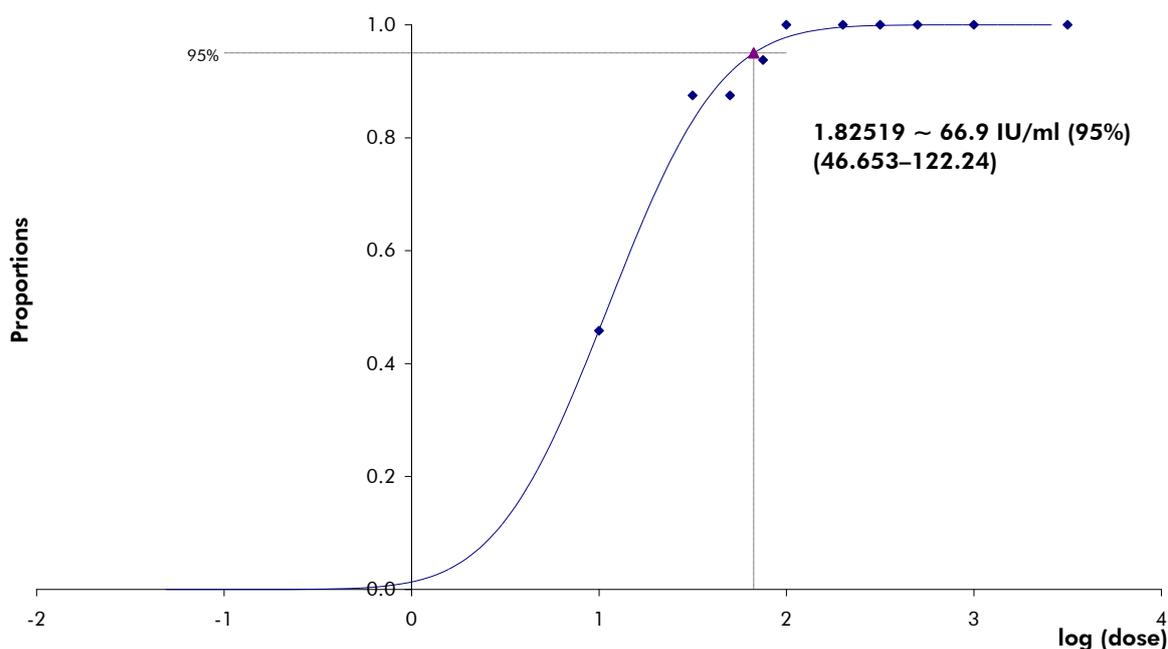
\* El estándar es un ARN transcrito *in vitro*, cuya concentración se ha calibrado usando el 2.º estándar internacional para el VIH (OMS).

La sensibilidad analítica teniendo en cuenta la purificación (kit QIAamp® DSP Virus, QIAGEN) del kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR en instrumentos Rotor-Gene se ha determinado mediante diluciones seriadas del 2.º estándar internacional para el ARN del VIH-1 de la OMS en ensayos de tecnología de amplificación de ácidos nucleicos (NAT) (código NIBSC 97/650) de 10 hasta 3160 UI/ml de VIH añadidos a muestras clínicas de plasma. Estas se sometieron a extracción de ARN con el kit QIAamp DSP Virus (QIAGEN, volumen de extracción: 0,5 ml, volumen de elución: 25 µl). Cada una de las diluciones se analizó con el kit *artus* HI Virus-1 RG RT-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* HI Virus-1 RG RT-PCR en combinación con el instrumento Rotor-Gene 3000 es de 71,6 UI/ml ( $p = 0,05$ ). Esto significa que existe una probabilidad del 95% de que se detecten 71,6 UI/ml.



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

El límite de detección analítica teniendo en cuenta la purificación del kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR en combinación con el instrumento Rotor-Gene 6000 es de 66,9 UI/ml ( $p = 0,05$ ). Esto significa que existe una probabilidad del 95% de que se detecten 66,9 UI/ml.



**Figura 2. Análisis probit: HI Virus-1 (Rotor-Gene 6000).** Sensibilidad analítica teniendo en cuenta la purificación (kit QIAamp DSP Virus, QIAGEN) del kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR en el instrumento Rotor-Gene 6000.

## Especificidad

La especificidad del kit *artus* HI Virus-1 RG RT-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).

Además, la especificidad se validó con 100 muestras de plasma VIH-negativas diferentes. Estas no generaron ninguna señal con los *primers* y las sondas específicos del VIH, incluidos en la mezcla maestra HI Virus-1 RG Master.

Se analizó la posible reactividad cruzada del kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR mediante el grupo de control indicado en la tabla 2. Ninguno de los patógenos analizados mostró reactividad. No se produjo ninguna reactividad cruzada en el caso de infecciones mixtas.

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

<b>Virus</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Origen</b>	<b>VIH (FAM)</b>	<b>Control interno (ROX)</b>
HI Virus-1	A	NIBSC*	+	+
HI Virus-1	B	NIBSC	+	+
HI Virus-1	C	NIBSC	+	+
HI Virus-1	D	NIBSC	+	+
HI Virus-1	E	NIBSC	+	+
HI Virus-1	F	NIBSC	+	+
HI Virus-1	G	NIBSC	+	+
HI Virus-1	H	NIBSC	+	+

\* National Institute for Biological Standards and Control, Hertfordshire.

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

<b>Grupo de control</b>	<b>VIH (Cycling Green o Cycling A.FAM)</b>	<b>Control interno (Cycling Orange o Cycling A.ROX)</b>
Virus de la hepatitis A	-	+
Virus de la hepatitis B	-	+
Virus de la hepatitis C	-	+
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 5 (citomegalovirus)	-	+

Continuación de la tabla en la página siguiente

**Tabla 2. Continuación**

<b>Grupo de control</b>	<b>VIH (Cycling Green o Cycling A.FAM)</b>	<b>Control interno (Cycling Orange o Cycling A.ROX)</b>
Virus linfotrópico humano de linfocitos T tipos 1 y 2	–	+
Enterovirus	–	+
Parvovirus B19	–	+
Fiebre amarilla	–	+
<i>Aspergillus flavus</i>	–	+
<i>Aspergillus fumigatus</i>	–	+
<i>Candida albicans</i>	–	+
<i>Chlamydia trachomatis</i>	–	+
<i>Cryptosporidium parvum</i>	–	+
<i>Filobasidiella neoformans</i>	–	+
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	–	+
<i>Pneumocystis carinii</i>	–	+
<i>Staphylococcus</i> sp.	–	+
<i>Streptococcus agalactiae</i>	–	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	–	+
<i>Streptococcus pyogenes</i>	–	+

**Intervalo lineal**

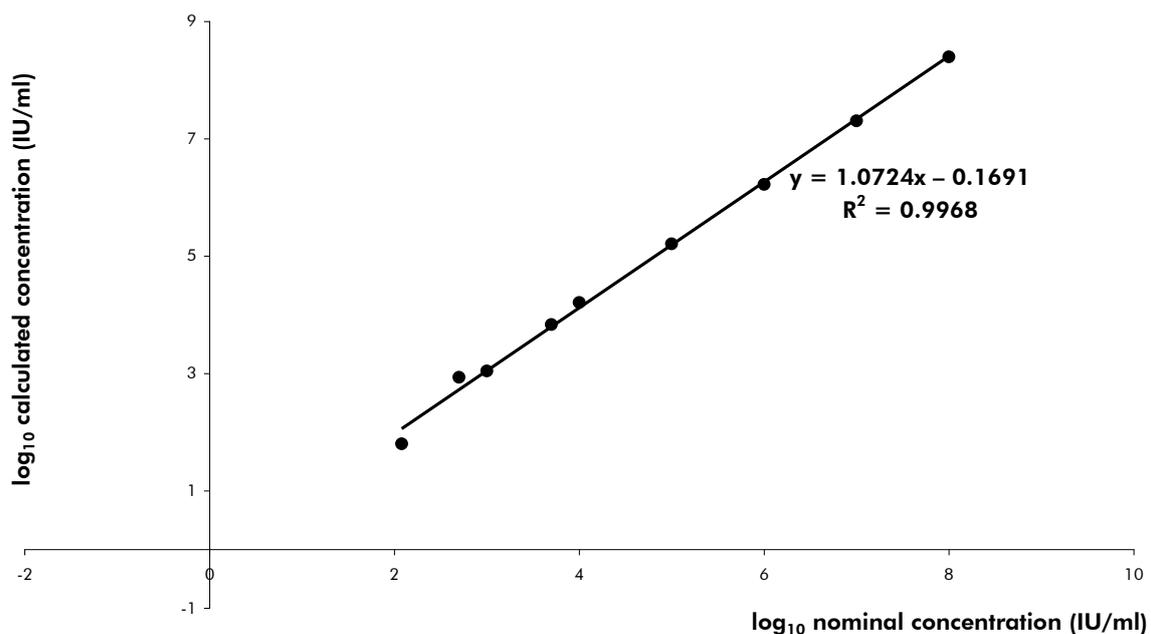
El intervalo lineal (medición analítica) del kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR se determinó mediante el análisis de diluciones seriadas de un VIH transcrito *in vitro* que variaban entre  $1 \times 10^8$  UI/ $\mu$ l y  $1 \times 10^{-2}$  UI/ $\mu$ l. Las diluciones seriadas

han sido calibradas frente al estándar internacional para el ARN del VIH de la OMS.

Cada dilución se analizó en duplicados ( $n = 8$ ) con el kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR Kit en instrumentos Rotor-Gene.

El intervalo lineal del kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR se ha determinado para cubrir concentraciones desde 5 UI/ $\mu$ l hasta al menos  $1 \times 10^8$  UI/ $\mu$ l.

El intervalo lineal teniendo en cuenta la purificación del kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR se determinó mediante el análisis de diluciones seriadas del panel para cuantificación OptiQuant HIV-1 RNA Quantification Panel desde  $1 \times 10^8$  UI/ml hasta 120 UI/ml. La purificación se realizó en duplicados con el kit QIAamp DSP Virus (volumen de extracción: 0,5 ml, volumen de elución: 25  $\mu$ l). Cada una de las 9 muestras fue analizada con el kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR. El intervalo lineal teniendo en cuenta la purificación del kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR se determinó para cubrir concentraciones desde 120 UI/ml hasta al menos  $1 \times 10^8$  UI/ml (consulte la figura 3).



**Figura 3. Intervalo lineal del kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR.** Cálculo del intervalo lineal. La línea recta se determinó mediante una regresión lineal del  $\log_{10}$  de las concentraciones calculadas con el  $\log_{10}$  de las concentraciones nominales. En la figura se incluye la ecuación de la línea de regresión.

## Precisión

Los datos de precisión del kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR se han obtenido con instrumentos Rotor-Gene y permiten determinar 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 han obtenido datos de precisión del kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR utilizando el estándar de cuantificación de menor concentración (QS4; 10 UI/ $\mu$ l). 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 función de estos resultados, la dispersión estadística total de cualquier muestra existente con la concentración mencionada es del 1,66% ( $C_T$ ) y del 2,15% ( $C_T$ ) 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  $C_T$ .**

	Valor de $C_T$	Desviación estándar	Coficiente de variación (%)
Variabilidad intraensayo: HI Virus-1 RG QS 4	35,62	0,45	1,26
Variabilidad intraensayo: Control interno	31,24	0,18	0,58
Variabilidad interensayo: HI Virus-1 RG QS 4	35,75	0,56	1,55
Variabilidad interensayo: Control interno	31,65	0,36	1,13
Variabilidad interlote: HI Virus-1 RG QS 4	35,40	0,61	1,73
Variabilidad interlote: Control interno	31,20	0,55	1,76
Varianza total: HI Virus-1 RG QS 4	35,58	0,59	1,66

Varianza total:	31,40	0,67	2,15
Control interno			

## Robustez

La verificación de la robustez permite determinar la tasa de fracaso total del kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR. Se añadieron 4,5 UI/ $\mu$ l de volumen de elución de ARN de control del VIH (tres veces la concentración del límite de sensibilidad analítico) a 100 muestras de plasma VIH-negativas. Tras la extracción con el kit QIAamp DSP Virus, estas muestras se analizaron con el kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR. La tasa de fracaso para todas las muestras de VIH fue del 0%.

Además, la robustez del control interno se evaluó mediante la purificación y el análisis de 100 muestras de plasma VIH-negativas. La tasa de fracaso total fue del 0%. No se observaron inhibiciones. Por lo tanto, la robustez del kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR es del  $\geq 99\%$ .

## Reproducibilidad

Los datos de reproducibilidad permiten evaluar de forma regular el rendimiento del kit *artus* HI Virus-1 RG RT-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

El kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR se evaluó en un estudio. Para la comparación del kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR con el COBAS® TaqMan® HIV-1, 241 muestras de plasma fueron analizadas de forma retrospectiva. Todas las muestras se analizaron previamente con un resultado positivo o negativo utilizando el ensayo COBAS TaqMan HIV-1 para diagnóstico sistemático.

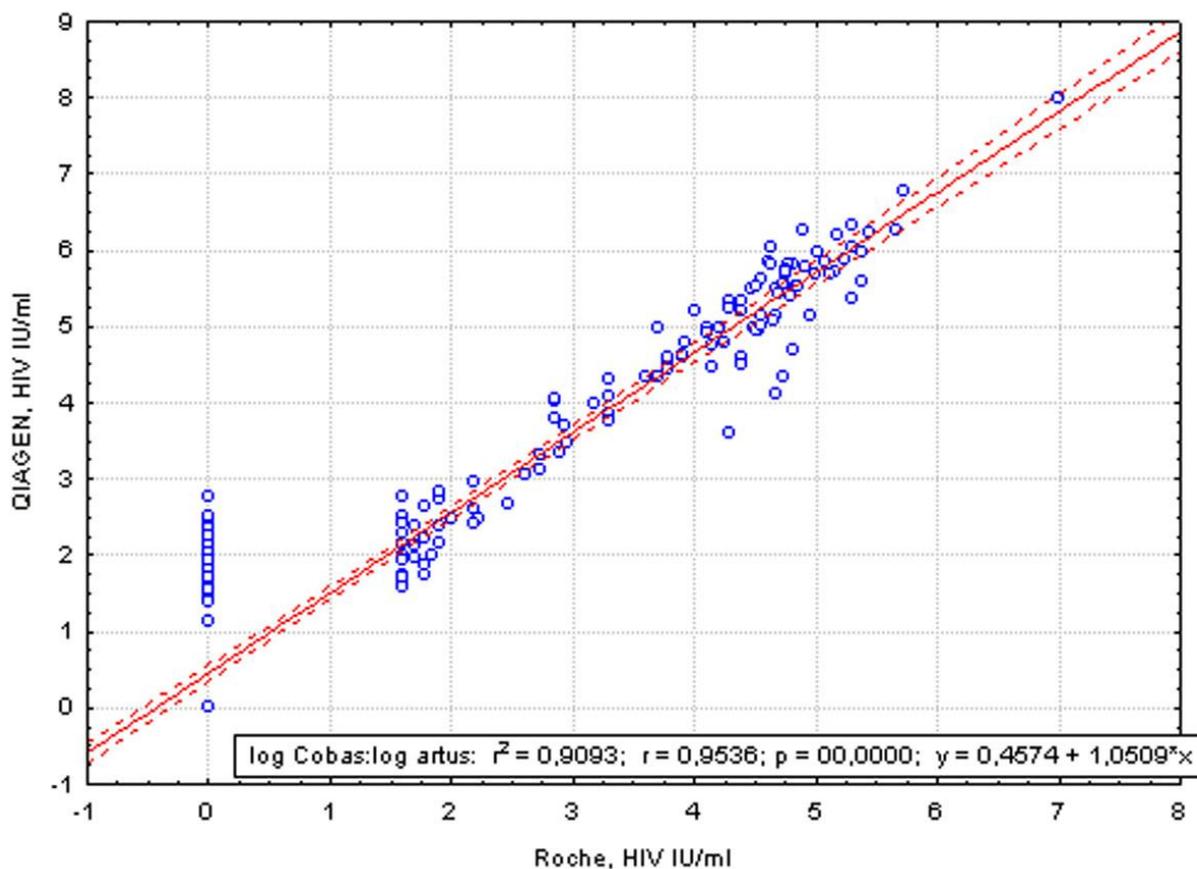
El ARN del VIH para el análisis con el kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR se aisló utilizando el kit QIAamp DSP Virus, y el análisis se realizó en el instrumento Rotor-Gene 6000. Para el análisis comparativo con el ensayo COBAS TaqMan HIV-1, el ARN del VIH se aisló conforme a las instrucciones del fabricante proporcionadas en el prospecto. Los resultados obtenidos con el kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR se compararon con los obtenidos con el ensayo COBAS TaqMan HIV-1 (consulte la tabla 4 y la figura 4).

105 de 126 muestras que tuvieron un resultado positivo con el ensayo COBAS TaqMan HIV-1 tuvieron también un resultado positivo con el kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR. 113 de 115 muestras que tuvieron un resultado negativo con el ensayo COBAS TaqMan HIV-1 tuvieron también un resultado negativo con el kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR.

Si se toman como referencia los resultados del ensayo COBAS TaqMan HIV-1, la sensibilidad diagnóstica es del 98,1% y la especificidad diagnóstica del 84,3%.

**Tabla 4. Resultados de las 241 muestras de plasma con EDTA analizadas de forma retrospectiva**

		Ensayo COBAS TaqMan HIV-1		
		+	-	Total
<b>Kit <i>artus</i> HI Virus-1 RG RT-PCR</b>	+	105	21	126
	-	2	113	115



**Figura 4. Comparación del ensayo COBAS TaqMan HIV-1 (Roche, VIH; con purificación de las muestras con el sistema ) con el kit *artus* (QIAGEN, VIH; con purificación de las muestras con el kit QIAamp DSP Virus). La correlación de los resultados cuantitativos de ambos sistemas de análisis (tabla 4) 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, *safety data sheets*) correspondientes que el proveedor del producto pone a su disposición.

- Kit de aislamiento de ARN (consulte el apartado “**Aislamiento del ARN**” en la página 24)
- 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 Orange o con canales de fluorescencia para Cycling A.FAM y Cycling A.ROX
- 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.

† El kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR no puede utilizarse con los instrumentos Rotor-Gene Q 2plex.

# 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

 Todas las muestras deben tratarse como material potencialmente infeccioso.

Sólo se permite la utilización de los materiales de muestra indicados a continuación, para los que se deben observar estrictamente las normas e instrucciones especiales relativas al la recogida, el transporte y el almacenamiento.

 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 VIH. Por consiguiente, recomendamos utilizar estos materiales con el kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR.

La validación interna del kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR se ha llevado a cabo utilizando muestras de plasma humano con EDTA. No se han validado otros materiales de muestra. Por favor, utilice exclusivamente el kit de aislamiento de ARN recomendado (consulte el apartado "**Aislamiento del ARN**" en la página 24) 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 venopunciones 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 24).

## 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 ARN 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 se recomienda 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 ( $\leq 15$  mg/dl) y lípidos ( $\leq 800$  mg/dl) y las muestras hemolizadas no influyen en el sistema. La heparina ( $\geq 10$  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 ARN

El kit QIAamp DSP Virus (QIAGEN, n.º de referencia 60704) está validado para la purificación de ARN viral a partir de plasma humano para utilizarse con el kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR. Realice la purificación del ARN 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”).

Antes de comenzar cada extracción, debe prepararse una mezcla de tampón de lisis y ARN transportador (y de control interno, cuando proceda; consulte el apartado “Control interno” más adelante) en fresco conforme al esquema de pipeteo mostrado en la tabla 5.

**Tabla 5. Esquema de pipeteo para utilizar con el kit QIAamp DSP Virus**

Número de muestras	1	12
Tampón de lisis (AL)*	550 $\mu$ l	6600 $\mu$ l
ARN transportador (1 $\mu$ g/ $\mu$ l)	6,2 $\mu$ l	74,4 $\mu$ l
<b>Volumen total</b>	<b>556,2 <math>\mu</math>l</b>	<b>6674,4 <math>\mu</math>l</b>
<b>Volumen por extracción</b>	<b>500 <math>\mu</math>l</b>	<b>500 <math>\mu</math>l (cada una)</b>

\* Contiene clorhidrato de guanidina; consulte el manual de uso del kit QIAamp DSP Virus (*QIAamp DSP Virus Kit Handbook*) para ver la información sobre seguridad.

**i** Utilice la mezcla preparada en fresco de tampón de lisis y ARN transportador inmediatamente para la extracción. No se puede almacenar la mezcla.

**i** El control interno del kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR puede utilizarse directamente en el procedimiento de aislamiento (consulte el apartado “Control interno” más adelante).

## Control interno

Se suministra un control interno (HI Virus-1 RG IC). Esto permite al usuario controlar el procedimiento de aislamiento del ARN y comprobar una posible inhibición de la PCR. Para esta aplicación, añada el control interno durante el aislamiento en una proporción de 0,1  $\mu$ l por 1  $\mu$ l de volumen de elución. Por ejemplo, usando el kit QIAamp DSP Virus, el ARN se eluye en 60  $\mu$ l de tampón de elución (AVE). Por lo tanto, deben añadirse inicialmente 6  $\mu$ l del control interno.

**i** El control interno y el ARN transportador (consulte el apartado “Aislamiento del ARN” en la página 24) 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.

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 HI Virus-1 RG Master A y HI Virus-1 RG Master B, tal como se describe en el paso 2b del protocolo (página 29).

## 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 (HI Virus-1 RG QS 1–4) incluidos se tratan como muestras previamente purificadas y se utiliza el mismo volumen (20  $\mu$ l). Para generar una curva de estándares con los instrumentos Rotor-Gene Q, los 4 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).

① Los estándares de cuantificación se definen como UI/ $\mu$ 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).

### **Factor de conversión**

1 UI/ml equivale a 0,50 copias/ml para la detección de ARN del VIH-1 en el instrumento Rotor-Gene Q en combinación con una preparación manual de la muestra con el kit QIAamp DSP Virus. El factor de conversión es una estimación basada en un factor promedio a lo largo del intervalo dinámico del ensayo.

\* El estándar se ha calibrado utilizando el estándar internacional para el VIH (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 22-26.
- 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 4 estándares de cuantificación suministrados (HI Virus-1 RG QS 1–4) 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 ARN 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 25). En este caso, prepare una mezcla maestra según se indica en la tabla 6.**

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

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

<b>Número de muestras</b>	<b>1</b>	<b>12</b>
HI Virus-1 RG Master A (mezcla maestra HI Virus-1 RG A)	12 $\mu$ l	144 $\mu$ l
HI Virus-1 RG Master B (mezcla maestra HI Virus-1 RG B)	18 $\mu$ l	216 $\mu$ l
HI Virus-1 RG IC	0 $\mu$ l	0 $\mu$ l
<b>Volumen total</b>	<b>30 <math>\mu</math>l</b>	<b>360 <math>\mu</math>l</b>

**2b. El control interno debe añadirse directamente a la mezcla de HI Virus-1 Master A y HI Virus-1 Master B. 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).**

<b>Número de muestras</b>	<b>1</b>	<b>12</b>
HI Virus-1 RG Master A (mezcla maestra HI Virus-1 RG A)	12 $\mu$ l	144 $\mu$ l
HI Virus-1 RG Master B (mezcla maestra HI Virus-1 RG B)	18 $\mu$ l	216 $\mu$ l
HI Virus-1 RG IC	2 $\mu$ l	24 $\mu$ l
<b>Volumen total</b>	<b>32 <math>\mu</math>l*</b>	<b>384 <math>\mu</math>l*</b>

\* 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  $\mu$ l de la mezcla maestra en cada tubo de PCR. A continuación, añada 20  $\mu$ l del ARN eluido de la muestra (consulte la tabla 8). En correspondencia, deben usarse 20  $\mu$ l de al menos uno**

de los estándares de cuantificación (HI Virus-1 RG QS 1–4) como control positivo y 20  $\mu\text{l}$  de agua (agua de calidad para PCR) como control negativo.

**Tabla 8. Preparación del ensayo de PCR**

<b>Número de muestras</b>	<b>1</b>	<b>12</b>
Mezcla maestra	30 $\mu\text{l}$	30 $\mu\text{l}$ (cada una)
Muestra	20 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$ (cada una)
<b>Volumen total</b>	<b>50 <math>\mu\text{l}</math></b>	<b>50 <math>\mu\text{l}</math> (cada una)</b>

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 ARN del VIH-1, cree un perfil de temperatura siguiendo los pasos que se indican a continuación.

<b>Configuración de los parámetros generales del ensayo</b>	<b>Figuras 5, 6, 7</b>
<b>Transcripción inversa del ARN</b>	<b>Figura 8</b>
<b>Activación inicial de la enzima <i>hot-start</i> (arranque en caliente)</b>	<b>Figura 9</b>
<b>Amplificación del ADNc</b>	<b>Figura 10</b>
<b>Ajuste de la sensibilidad de los canales de fluorescencia</b>	<b>Figura 11</b>
<b>Inicio de la serie</b>	<b>Figura 12</b>

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 negrita. 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 5). Marque la casilla "Locking Ring Attached" (Anillo de bloqueo acoplado) y haga clic en "Next" (Siguiete).

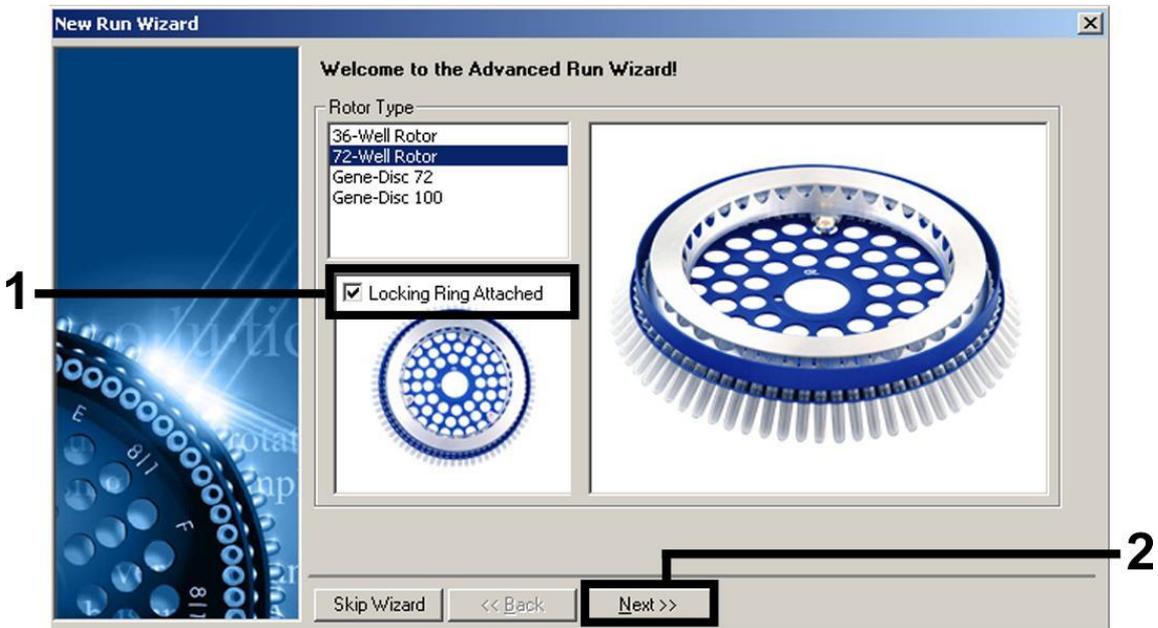


Figura 5. Cuadro de diálogo "New Run Wizard".

7. Seleccione 50 en el campo "Reaction Volume ( $\mu\text{L}$ ):" (Volumen de reacción [ $\mu\text{L}$ ]) y haga clic en "Next" (figura 6).

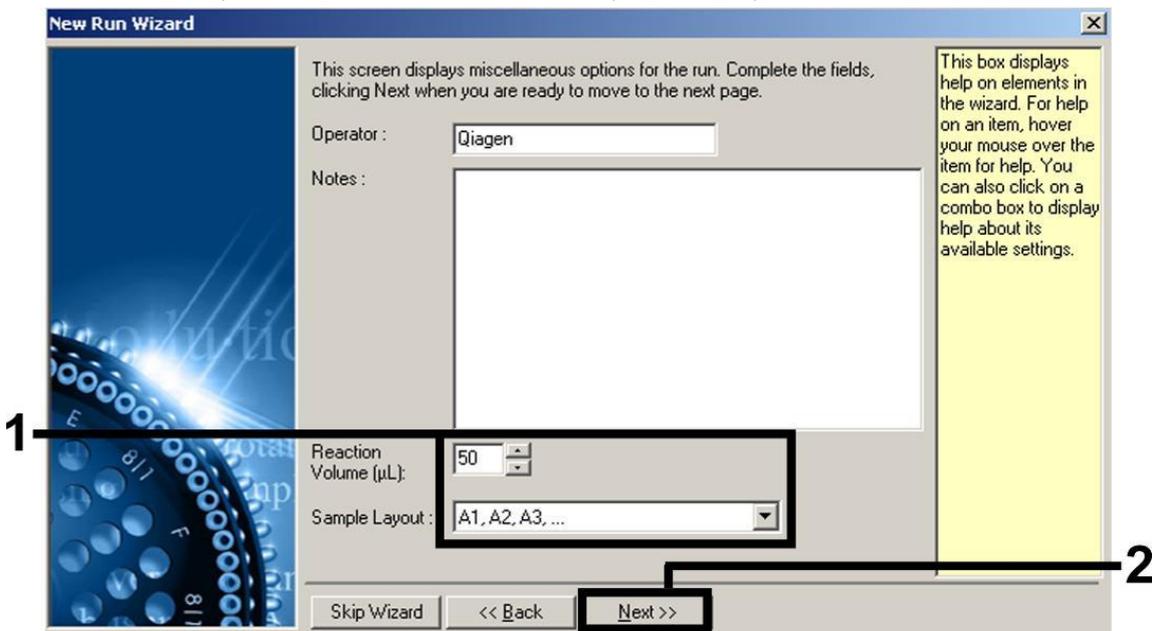


Figura 6. Configuración de los parámetros generales del ensayo.

8. Haga clic en el botón "Edit Profile" (Editar perfil) en el siguiente cuadro de diálogo "New Run Wizard" (figura 7) y programe el perfil de temperatura tal como se muestra en las figuras 7-10.

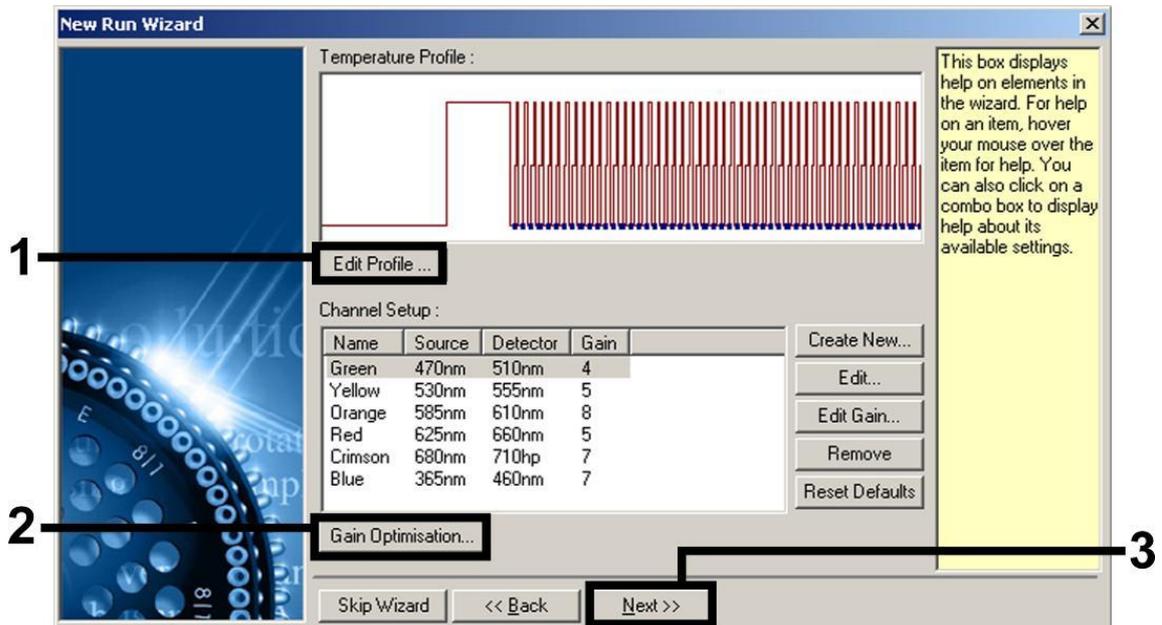


Figura 7. Edición del perfil.

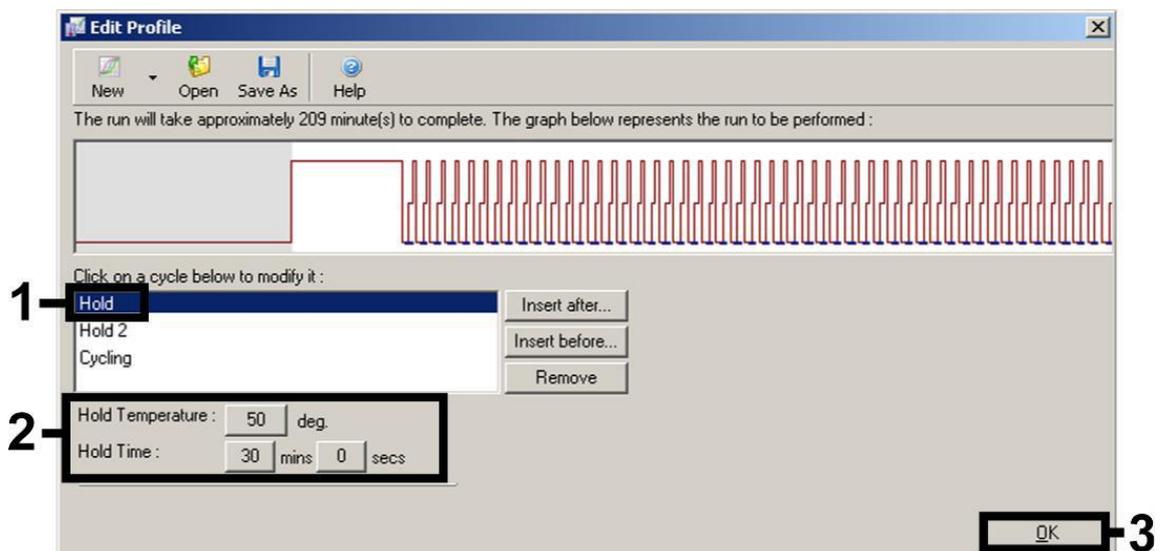
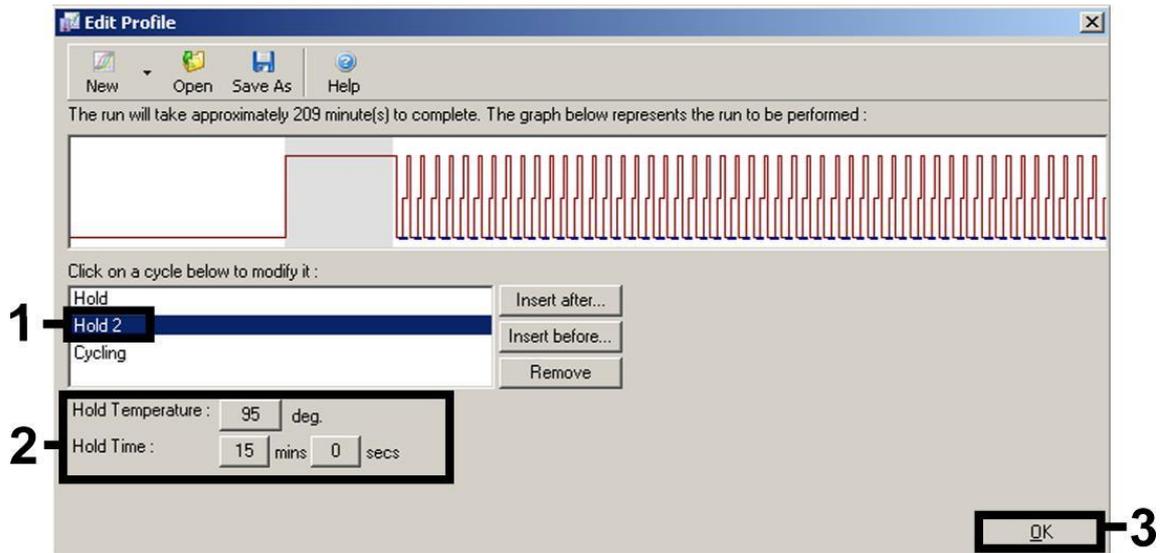
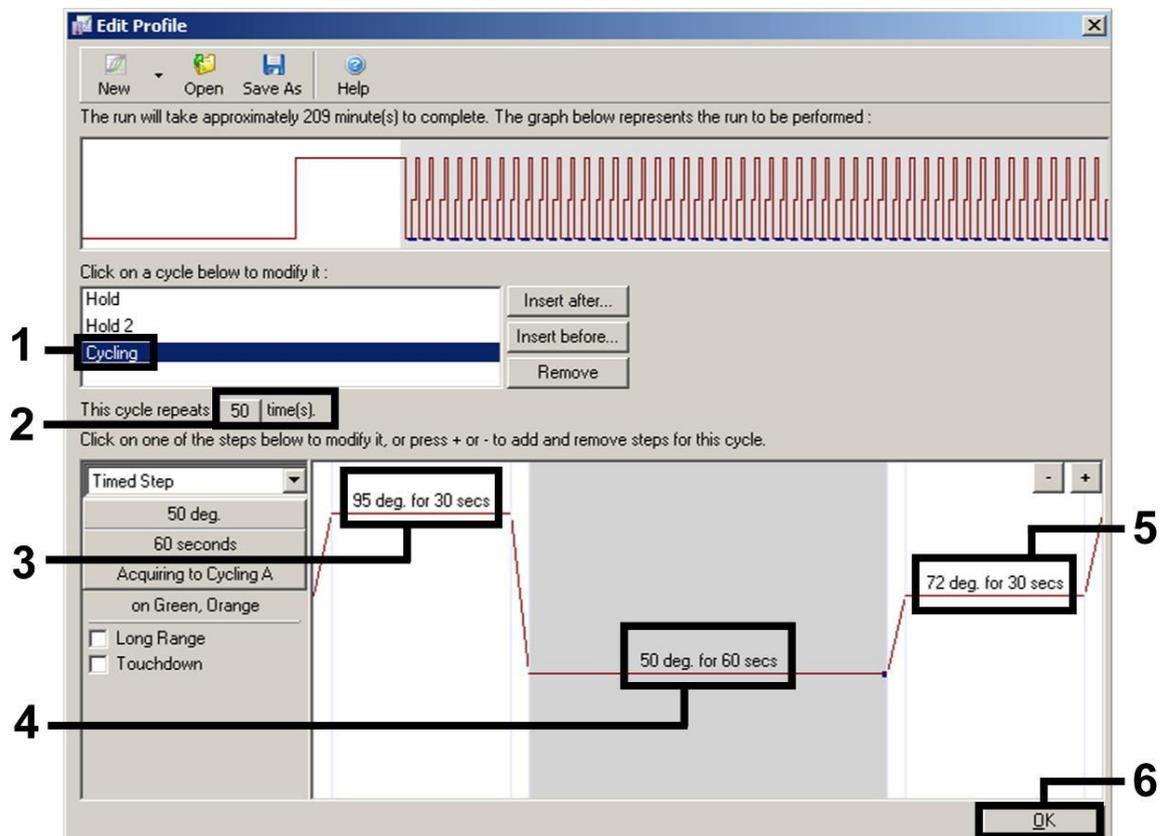


Figura 8. Transcripción inversa del ARN.



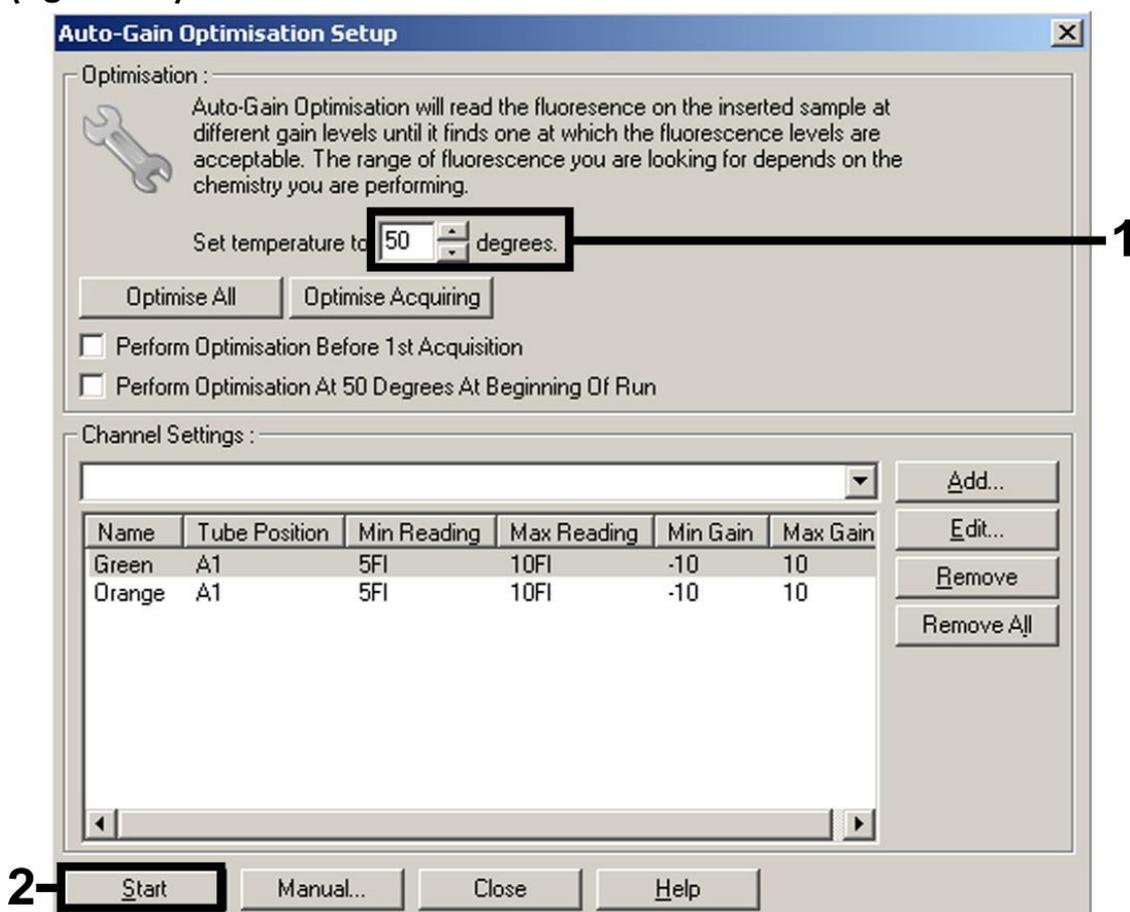
**Figura 9. Activación inicial de la enzima *hot-start*.**



**Figura 10. Amplificación del ADNc.** Tenga en cuenta que, en el instrumento Rotor-Gene 3000, el software definirá los colorantes fluorescentes como "FAM/Sybr, ROX".

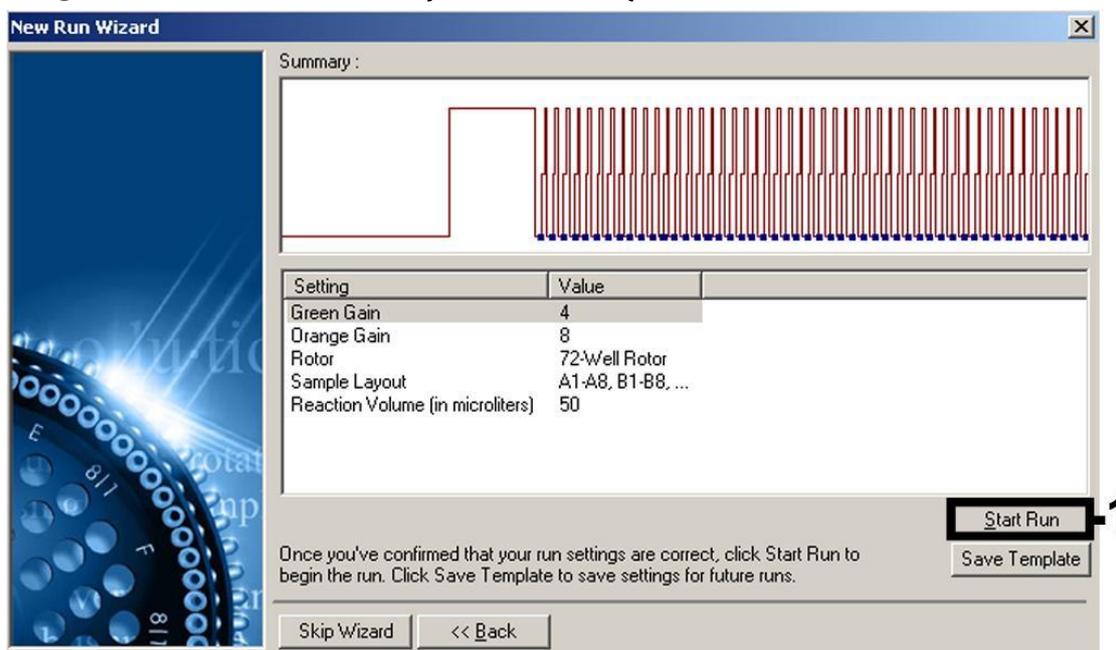
9. El intervalo de detección de los canales de fluorescencia debe determinarse según las intensidades de fluorescencia de los tubos de PCR. Haga clic en "Gain Optimisation" (Optimización de ganancia) en el cuadro de diálogo "New Run Wizard" (consulte la figura 7) para abrir el cuadro de diálogo "Auto-Gain Optimisation Setup" (Configuración de la optimización de ganancia automática). Configure la temperatura de calibración en 50 para que coincida

con la temperatura de apareamiento del programa de amplificación (figura 11).



**Figura 11. 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 "ROX".

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 12). Haga clic en "Start Run" (Iniciar serie).



**Figura 12. Inicio de la serie.** Tenga en cuenta que, en el instrumento Rotor-Gene 3000, el software definirá los colorantes fluorescentes como "FAM/Sybr" y "ROX".

### 11. . Son posibles los siguientes resultados (11a, 11b y 11c).

En las figuras 13 y 14 se presentan ejemplos de reacciones de PCR positivas y negativas.

La tabla 9 muestra una guía para la interpretación de los resultados cuantitativos.

#### 11a. Se detecta una señal en el canal de fluorescencia Cycling Green.

El resultado del análisis es positivo: la muestra contiene ARN del VIH1.

En este caso, la detección de una señal en el canal Cycling Orange no es imprescindible, ya que las concentraciones altas iniciales de ARN del VIH-1 (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 Orange (competición).



Tenga en cuenta que, en el instrumento Rotor-Gene 3000, los canales relevantes son Cycling A.FAM para la señal positiva y Cycling A.ROX 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 Orange. En la muestra no hay ARN del VIH-1 detectable. Puede considerarse negativa.**

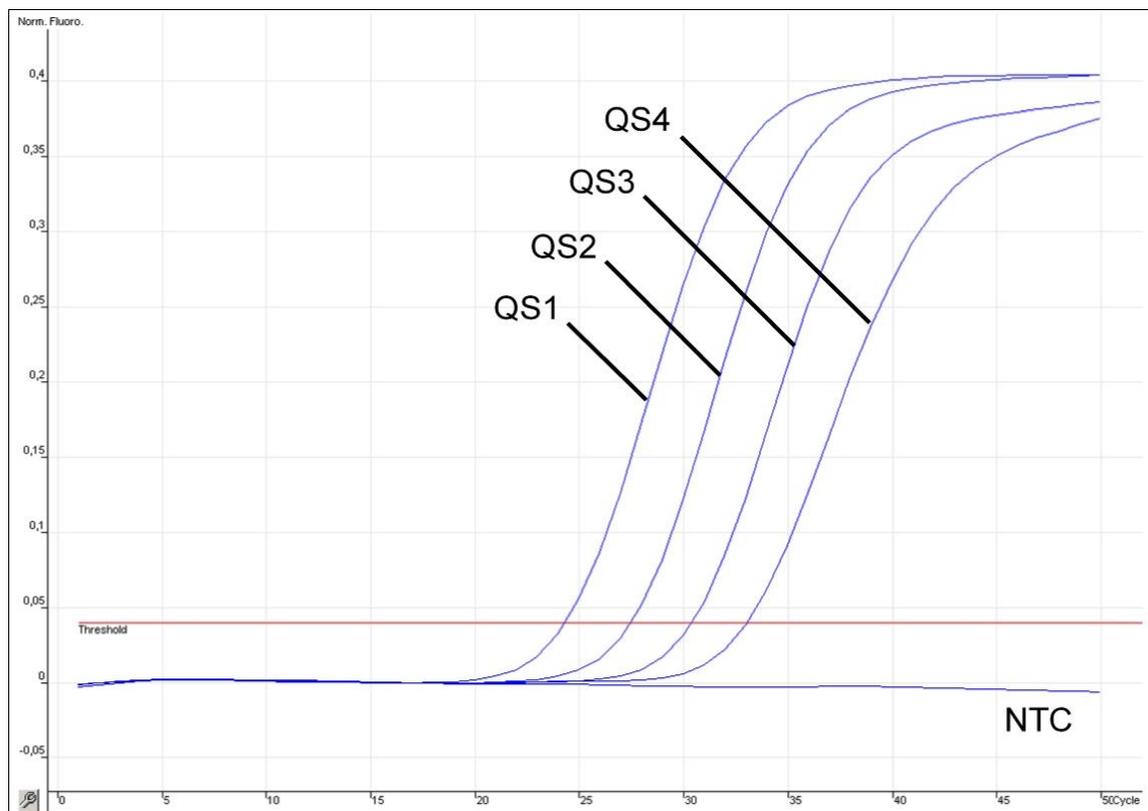
En el caso de una RT-PCR negativa del VIH-1, la señal detectada del control interno descarta la posibilidad de una inhibición de la RT-PCR.

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

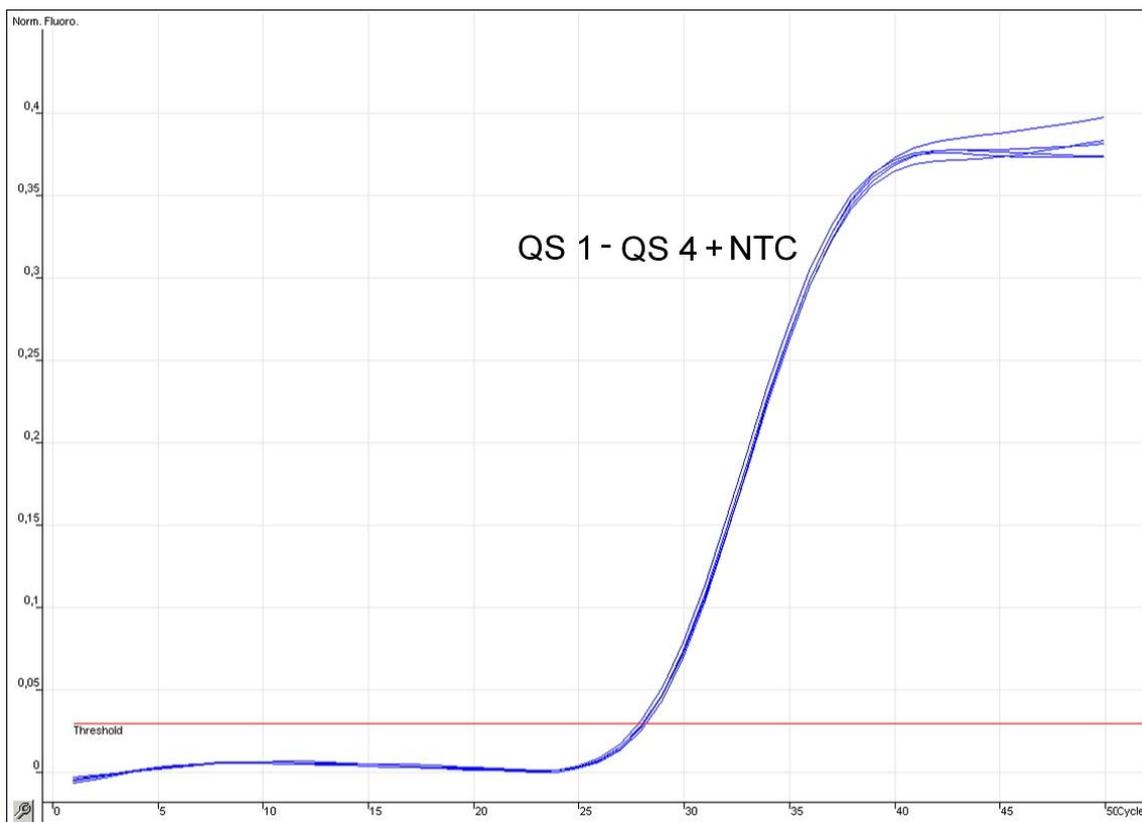
**11c.No se detecta una señal en los canales Cycling Green o Cycling Orange. No puede determinarse un resultado.**

Puede encontrar información acerca de las fuentes de error y su solución en el apartado **“Guía para la resolución de problemas”** en la página 38.

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



**Figura 13. Detección de los estándares de cuantificación (HI Virus-1 RG QS 1–4) en el canal de fluorescencia Cycling Green. NTC: control sin molde (control negativo).**



**Figura 14.** Detección del control interno (IC) en el canal de fluorescencia Cycling Orange con amplificación simultánea de los estándares de cuantificación (HI Virus-1 RG QS 1-4). NTC: control sin molde (control negativo).

**Tabla 9. Interpretación de los resultados cuantitativos**

Resultado	Interpretación
ARN VIH >72 UI/ml	El resultado se encuentra dentro del intervalo de prueba determinado. La probabilidad de detección de ARN del VIH es >95%. El resultado del test positivo está garantizado estadísticamente.
ARN VIH <72 UI/ml	El resultado se encuentra fuera del intervalo de prueba determinado. La reproducibilidad del resultado positivo no está garantizada.
ARN HIV negativo	No se ha detectado ARN de VIH.

# 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](http://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](http://www.qiagen.com)).

## Comentarios y sugerencias

---

### Ausencia de señal con controles positivos (HI Virus-1 RG QS 1–4) 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 RT-PCR analítica del VIH-1 y el canal de fluorescencia Cycling Orange o Cycling A.ROX para la RT-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 28.
- 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 28.
- 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* HI Virus-1 RG RT-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 ausencia de señal del control interno en el canal de fluorescencia Cycling Orange o Cycling A.ROX con ausencia simultánea de 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 ARN 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 ARN durante la extracción. Asegúrese de que está utilizando el método de aislamiento recomendado (consulte el apartado "**Aislamiento del ARN**" en la página 24) 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.
- e) El kit *artus* HI Virus-1 RG RT-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.

## Comentarios y sugerencias

---

### 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](http://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.
<i>artus</i> HI Virus-1 QSRGQ Kit (24)	Para 24 reacciones: 2 mezclas maestras, 4 estándares de cuantificación, control interno y agua (de calidad para PCR)	4513263
<i>artus</i> HI Virus-1 QSRGQ Kit (96)	Para 96 reacciones: 2 mezclas maestras, 4 estándares de cuantificación, control interno y agua (de calidad para PCR)	4513265
<b>Kit QIAamp DSP Virus: para purificación de ácidos nucleicos virales a partir de plasma humano para diagnóstico <i>in vitro</i></b>		
QIAamp DSP Virus Kit	Para 50 preparaciones: columnas QIAamp MinElute® Spin, tampones, reactivos, tubos, extensores de columna y conectores VacConnectors	60704
<b>Rotor-Gene Q MDx: para análisis de PCR en tiempo real validado para diagnóstico <i>in vitro</i> en aplicaciones clínicas</b>		
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

<b>Producto</b>	<b>Contenido</b>	<b>N.º ref.</b>
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
<b>Rotor-Gene Q: para un rendimiento sobresaliente en la PCR en tiempo real</b>		
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

<b>Producto</b>	<b>Contenido</b>	<b>N.º ref.</b>
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
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
<b>Accesorios de Rotor-Gene Q</b>		
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 1000 reacciones	981103

<b>Producto</b>	<b>Contenido</b>	<b>N.º ref.</b>
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 1000 tubos de pared fina para 1000 reacciones	981008

Para 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](http://www.qiagen.com) o pueden solicitarse al servicio técnico de QIAGEN o al distribuidor local.

Esta página se ha dejado intencionadamente en blanco.

Esta página se ha dejado intencionadamente en blanco.



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™, ROX™ (Life Technologies Corporation); SYBR® (Molecular Probes, Inc.).

El kit *artus* HI Virus-1 RG RT-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* HI Virus-1 RG RT-PCR la aceptación de los siguientes términos:

1. El kit *artus* HI Virus-1 RG RT-PCR puede utilizarse exclusivamente de acuerdo con las especificaciones del *Manual de uso del kit artus HI Virus-1 RG RT-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 HI Virus-1 RG RT-PCR* y en protocolos adicionales disponibles en [www.qiagen.com](http://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](http://www.qiagen.com).

© 2015 QIAGEN, reservados todos los derechos.

[www.qiagen.com](http://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)

