

Manual del kit *artus*[®] C. trachomatis Plus RG PCR



24 (N.º catálogo 4559263)



96 (N.º catálogo 4559265)

Versión 1

IVD

Diagnóstico cualitativo in vitro

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



REF

4559263, 4559265



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALEMANIA

R7 **MAT** 1046969ES



QIAGEN Tecnología para tratamiento de muestras y ensayos de biología molecular

QIAGEN es líder en tecnología de tratamiento de muestras y ensayos de biología molecular, permitiéndole la purificación y detección en cualquier muestra biológica. La alta calidad de nuestros productos y servicios le garantiza el éxito desde la muestra hasta el resultado.

QIAGEN fija estándares en:

- Purificación de ADN, ARN y proteínas
- Ensayos con ácidos nucleicos y proteínas
- Investigación con micro ARN y ARNi
- Automatización de tecnologías de tratamiento de muestras y de biología molecular

Nuestra misión es ayudarle a resolver retos y alcanzar éxitos. Para mayor información, visite www.qiagen.com.

Contenido

Contenido del kit	4
Símbolos	4
Almacenamiento	5
Uso indicado	5
Limitaciones de uso del producto	5
Advertencias y precauciones	6
Control de calidad	7
Introducción	7
Principio	7
Información acerca del agente patógeno	8
Características del ensayo	8
Equipo y reactivos que deben ser suministrados por el usuario	19
Notas importantes	20
Precauciones generales	20
Toma, almacenamiento y transporte de las muestras	20
Purificación del ADN	23
Control interno	30
Protocolo: PCR y análisis de datos	31
Guía de resolución de problemas	41
Información de pedidos	44

Contenido del kit

<i>artus C. trachomatis Plus RG PCR Kit</i>		(24)	(96)
N.º catálogo		4559263	4559265
Número de reacciones		24	96
Azul	C. trachomatis Plus RG Master	2 x 12 reacciones	8 x 12 reacciones
Amarillo	C. trachomatis Plus LC/RG Mg-Sol* Mg-Sol	400 µl	400 µl
Rojo	C. trachomatis Plus LC/RG Positive Control	200 µl	200 µl
Verde	C. trachomatis Plus RG IC† IC	1000 µl	2 x 1000 µl
Blanco	Water (PCR grade)	1000 µl	1000 µl
<i>artus C. trachomatis Plus RG PCR Kit Handbook</i> (inglés)		1	1

* Solución de magnesio.

† Control interno.

Símbolos



<N>

Contiene reactivo suficiente para <N> muestras



Utilizado por



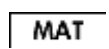
Dispositivo de diagnóstico médico in vitro



Número de catálogo










Número de lote



Número del producto



Componentes

	Contiene
	Número
	Número mundial de artículo comercial
	Limitación de temperatura
	Fabricante
	Consultar instrucciones de uso
	Precaución

Almacenamiento

Los componentes del kit *artus C. trachomatis Plus RG PCR* deben almacenarse de -15 a -30 °C y pueden ser utilizados hasta la fecha indicada en la etiqueta. Evite congelarlos y descongelarlos repetidamente (más de 2 veces), ya que puede disminuir su sensibilidad. En caso de no usarlos regularmente, es recomendable dividir los reactivos en alícuotas. Si fuera necesario almacenar los componentes de 2 a 8 °C, el período de tiempo no debe superar las cinco horas.

Uso indicado

El kit *artus C. trachomatis Plus RG PCR* es una prueba de amplificación de ácidos nucleicos *in vitro* para la detección de ADN de *Chlamydia trachomatis* en muestras de orina, de semen o de hisopos (oftálmicos, endocervicales o uretrales) humanas. 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 de uso del producto

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

El producto debe ser usado únicamente por personal familiarizado con los procedimientos de diagnóstico *in vitro*.

Para obtener un resultado óptimo de la PCR es necesario el seguimiento estricto de las instrucciones del manual de uso.

Debe prestar atención a las fechas de caducidad presentes en la caja y en las etiquetas de todos los componentes del kit. No use componentes caducados.

Aunque poco frecuentes, las mutaciones en el interior de las regiones altamente conservadas del genoma bacteriano 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 de las bacterias. La validez y el rendimiento del diseño del ensayo se revisan a intervalos regulares. El kit *artus C. trachomatis* Plus RG PCR es capaz de detectar cepas portadoras del plásmido críptico, así como las nuevas cepas variantes suecas que presentan una delección en el plásmido críptico. El kit no detecta variantes de *C. trachomatis* sin plásmido críptico.

Un resultado negativo de la prueba no descarta la posibilidad de infección, ya que los resultados de la prueba pueden verse afectados por una recogida inadecuada de la muestra, un error técnico, la mezcla de muestras o el número de microorganismos presentes en la muestra, que puede ser inferior a la sensibilidad de la prueba.

Advertencias y precauciones

Cuando trabaje con productos químicos, use siempre una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y gafas de protección. Para más información, consulte las correspondientes hojas de datos de seguridad (SDS). Estas hojas están disponibles en formato PDF en www.qiagen.com/safety, donde podrá encontrar, consultar e imprimir las SDS para cada kit de QIAGEN® y para cada componente del kit.

Para obtener información sobre seguridad relativa al kit de purificación empleado, consulte el manual del kit correspondiente. Para obtener información sobre seguridad relativa a los instrumentos, consulte el manual del usuario del instrumento correspondiente.

Desesche las pruebas y los ensayos según los reglamentos de seguridad local.

Control de calidad

De acuerdo con el sistema de gestión de calidad de QIAGEN, certificado ISO, cada lote del kit *artus C. trachomatis* Plus RG PCR se analiza conforme a especificaciones predeterminadas para asegurar una calidad constante del producto.

Introducción

El kit *artus C. trachomatis* Plus RG PCR es un sistema listo para usar para la detección de ADN de *C. trachomatis* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en los instrumentos Rotor-Gene Q. La mezcla maestra *C. trachomatis* Plus RG Master contiene reactivos y enzimas para la amplificación específica de una región de 111 pb del plásmido críptico de *C. trachomatis*. Los reactivos también permiten la detección específica del amplicón en el canal de fluorescencia Cycling Green de los instrumentos Rotor-Gene Q MDx, Rotor-Gene Q y Rotor-Gene 6000 o en el canal Cycling A.FAM™ del instrumento Rotor-Gene 3000.

Además, el kit *artus C. trachomatis* Plus RG PCR contiene un segundo sistema de amplificación heterólogo para comprobar si se produce inhibición de la PCR. Esto se detecta como control interno (CI) en el canal de fluorescencia Cycling Yellow en el Rotor-Gene Q MDx, Rotor-Gene Q y Rotor-Gene 6000 o el A.JOE™ en el Rotor-Gene 3000. Con lo cual, el límite de detección de la PCR analítica del *C. trachomatis* no se ve afectado (véase "Sensibilidad analítica", página 8). Se suministra además un control positivo externo (*C. trachomatis* Plus LC/RG Positive Control).

Principio

La detección de patógenos mediante la PCR se basa en la amplificación de regiones específicas del genoma de los patógenos. En la PCR a tiempo real el producto amplificado se detecta con la ayuda de fluorocromos. Éstos están acoplados a sondas de oligonucleótidos que se van ligando específicamente a la secuencia que se amplifica. La detección de las intensidades de la fluorescencia en el transcurso de la PCR a tiempo real hace posible la detección y la cuantificación del producto, sin necesidad de volver a abrir los tubos de reacción tras realizar la PCR.*

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

Información acerca del agente patógeno

Las bacterias del género *Chlamydia* (*C.*) tienen gran importancia epidemiológica. *C. trachomatis* (serovariedades D-L) es una de las causas más frecuentes de enfermedad de transmisión sexual (ETS) en el mundo. Los 16 serotipos de *C. trachomatis* causan diferentes enfermedades: Los serotipos A, B, Ba y C causan tracoma, una enfermedad crónico-recidiva de las conjuntivas y de la córnea, muy extendida en el trópico. Los serotipos D - K causan infecciones urogenitales transmitidas por contacto sexual e infecciones oculares, así como infecciones en neonatos tras la transmisión perinatal. Los serotipos LGV I – III son los causantes del linfogranuloma venéreo, una enfermedad de transmisión sexual, que se observa principalmente en el trópico.

El tracoma aparece exclusivamente en países tropicales con condiciones higiénicas deficientes. Representa la principal enfermedad ocular a nivel mundial y tras las cataratas es la segunda causa de ceguera. Se estima que alrededor de 150 millones de personas están infectadas en todo el mundo, causando ceguera a alrededor de seis millones de ellas. En los países industrializados *Chlamydia* es la principal causa bacteriana de infecciones urogenitales. En Alemania, el número de nuevas infecciones genitales anuales asciende aproximadamente a 300.000. La incidencia del linfogranuloma venéreo (linfogranuloma inguinal, enfermedad de Durand-Nicolas-Favre) se está reduciendo a nivel mundial. No obstante, esta enfermedad de transmisión sexual es todavía endémica en Asia, África, América del Sur y partes del Caribe.

Características del ensayo

Sensibilidad analítica

El límite de detección analítico y el límite de detección analítico considerando el sistema de purificación (límites de sensibilidad) fueron determinados para el kit *artus C. trachomatis Plus RG PCR*. El límite de detección analítico considerando la purificación se realiza usando muestras clínicas positivas para el *C. trachomatis* en combinación con un sistema de purificación de ácidos nucleicos determinado. Por otro lado el límite de detección analítico se determina independientemente del sistema de purificación, usando un serovar de concentración conocida.

Para determinar la sensibilidad analítica del kit *artus C. trachomatis Plus RG PCR* se realizaron diluciones seriadas de 10 a 0,003 y de 6,6 a 0,0006 equivalentes de genoma bacteriano (en inglés, bacteria genome equivalents)/ μ l (be/ μ l) del serovar E de *C. trachomatis* y se analizaron con los sistemas Rotor-

Gene utilizando el kit *artus* C. trachomatis Plus RG PCR. Los ensayos se realizaron en tres días diferentes por octuplicado. Los resultados se determinaron mediante un análisis probit cuyo representación gráfica se muestra en la Fig. 1. El límite de detección del kit *artus* C. trachomatis Plus RG PCR en combinación con el Rotor-Gene Q MDx/Q/6000 y el Rotor-Gene 3000 es de 0,04 y 0,2 be/ μ l ($p = 0,05$), respectivamente. Esto significa que hay un 95 % de posibilidades de que se detecten 0,04 be/ μ l o 0,2 be/ μ l.

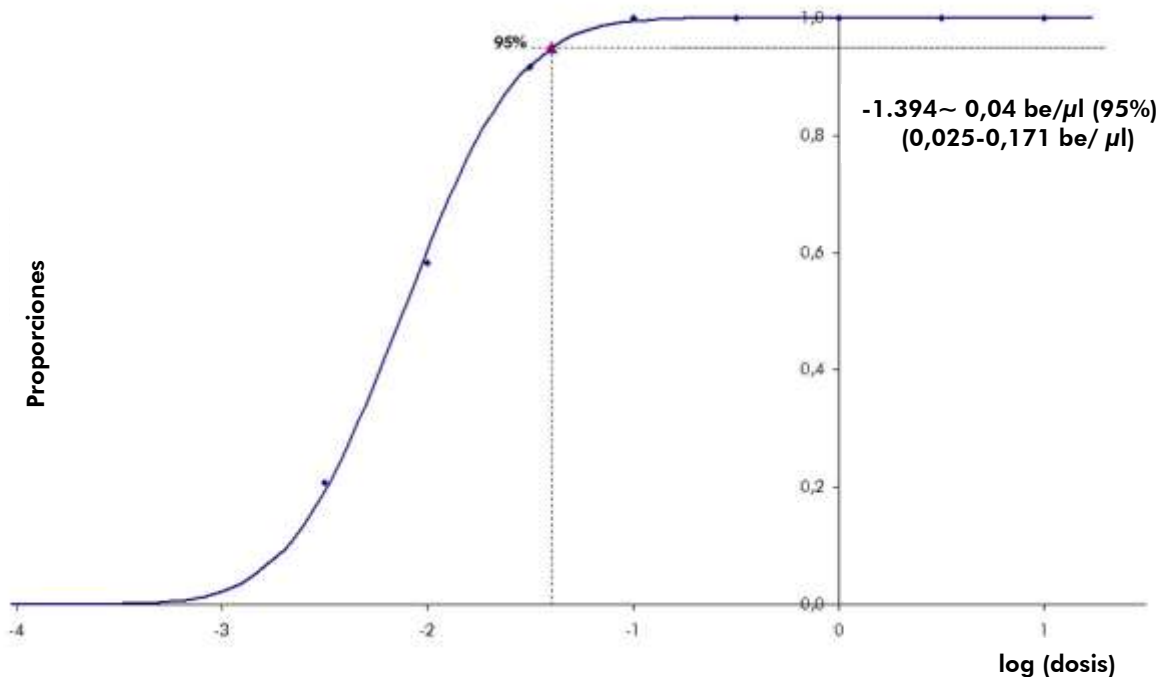


Figura 1. Análisis probit: *C. trachomatis* (Rotor-Gene 6000). Sensibilidad analítica del kit *artus* C. trachomatis Plus RG PCR en el Rotor-Gene 6000.

La sensibilidad analítica incluyendo el método de purificación (QIAamp[®] DNA Mini Kit, QIAGEN) del kit *artus* C. trachomatis RG PCR utilizando los sistemas Rotor-Gene se calculó mediante diluciones seriadas del serovar E de *C. trachomatis* de 6,6 a 0,0006 be/ μ l en muestras clínicas de hisopos. Éstas fueron sometidas a una purificación del ADN con el kit QIAamp DNA Mini (volumen de extracción: 200 μ l, volumen de elución: 100 μ l). Cada una de las 8 diluciones fue analizada en tres días diferentes por octuplicado con la ayuda del kit *artus* C. trachomatis Plus RG PCR. El resultado se determinó con un análisis probit cuyo análisis gráfico se muestra en la Figura 2. Por consiguiente el límite de detección analítico, incluyendo el método de purificación utilizando el Rotor-Gene 3000 del kit *artus* C. trachomatis Plus RG PCR es de 300 be/ml ($p = 0,05$). Esto significa que hay un 95 % de posibilidades de que se detecten 300 be/ml.

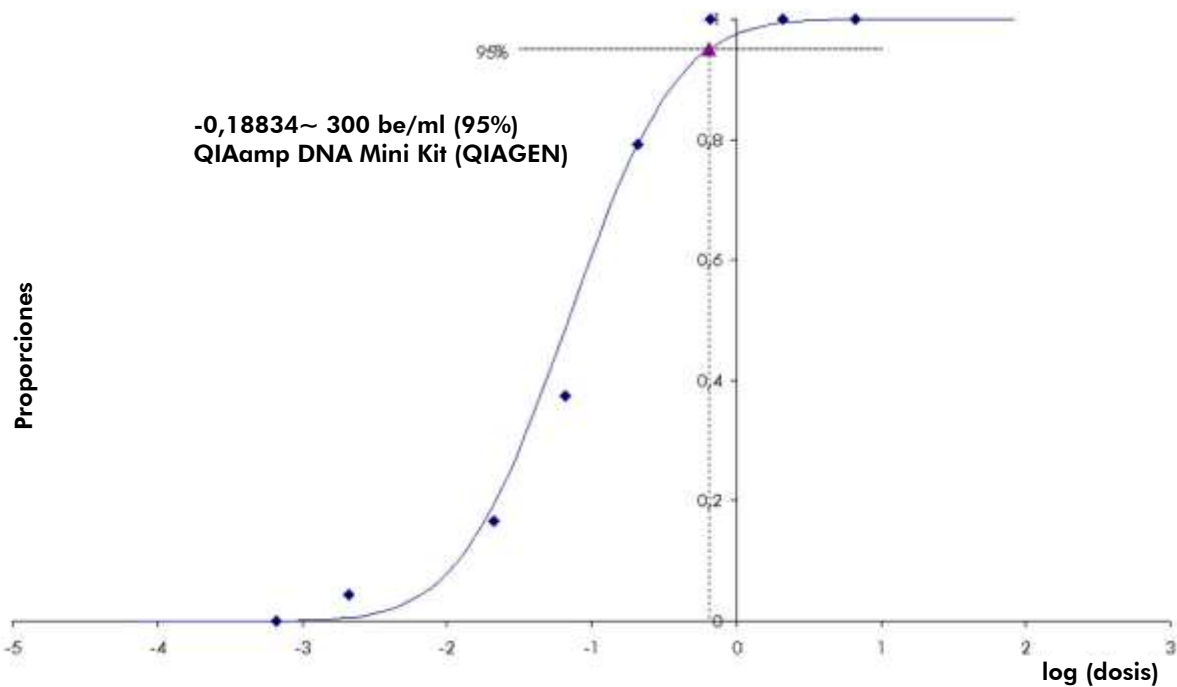


Figura 1. Análisis probit: *C. trachomatis* (Rotor-Gene 3000). Sensibilidad analítica del *artus C. trachomatis* Plus RG PCR incluyendo el método de purificación (QIAamp DNA Mini Kit, QIAGEN) utilizando el Rotor-Gene 3000.

En el caso de la sensibilidad analítica del kit *artus C. trachomatis* Plus RG PCR en comparación con la purificación realizada con el kit QIAamp Viral RNA Mini (QIAGEN) utilizando los sistemas Rotor-Gene, es de esperar una sensibilidad comparable a la observada en el caso del kit QIAamp DNA Mini dado que las pérdidas después de la purificación de ambos sistemas varían entre un 0,3 y 1,8%.

Especificidad

La esmerada selección de los cebadores y sondas junto con las más rigurosas condiciones de reacción garantizan la especificidad del kit *artus C. trachomatis* Plus RG PCR. Los cebadores y sondas se controlaron mediante un análisis de comparación de secuencias, en cuanto a posibles homologías con otras secuencias publicadas en diferentes bancos de datos. La detectabilidad de todos los serovares relevantes (véase Tabla 1) ha sido garantizada mediante un análisis de comparación de secuencias y PCR en los sistemas Rotor-Gene.

La especificidad fue evaluada con 30 muestras de orina, 100 de hisopos y 30 de semen distintas negativas para *C. trachomatis*. Éstas no generaron ninguna señal con los cebadores ni con las sondas específicas de *C. trachomatis* incluidos en la *C. trachomatis* Plus RG Master.

Tabla 1. Análisis de la especificidad del kit frente a serovares relevantes

<i>Chlamydia</i>	Serovar	Cepa	<i>C. trachomatis</i> (Cycling Green o A.FAM)	Control interno (Cycling Yellow o A.JOE)
<i>C. trachomatis</i>	A	ATCC* (VR-571B)	+	+
<i>C. trachomatis</i>	B	ATCC (VR-573)	+	+
<i>C. trachomatis</i>	Ba	ATCC (VR-347, prep 1)	+	+
<i>C. trachomatis</i>	C	ATCC (VR-572)	+	+
<i>C. trachomatis</i>	D	ATCC (VR-885)	+	+
<i>C. trachomatis</i>	E	ATCC (VR-348B)	+	+
<i>C. trachomatis</i>	F	ATCC (VR-346)	+	+
<i>C. trachomatis</i>	G	ATCC (VR-878)	+	+
<i>C. trachomatis</i>	H	ATCC (VR-879)	+	+
<i>C. trachomatis</i>	I	ATCC (VR-880)	+	+
<i>C. trachomatis</i>	J	ATCC (VR-886)	+	+
<i>C. trachomatis</i>	K	ATCC (VR-887)	+	+

* American Type Culture Collection.

La tabla continúa en la página siguiente.

Tabla 1. Continuación

<i>Chlamydia</i>	Serovar	Cepa	<i>C. trachomatis</i> (Cycling Green o A.FAM)	Control interno (Cycling Yellow o A.JOE)
<i>C. trachomatis</i>	LGV I	ATCC (VR-901B)	+	+
<i>C. trachomatis</i>	LGV II	ATCC (VR-902B)	+	+
<i>C. trachomatis</i>	LGV II	ATCC (VR-577)	+	+
<i>C. trachomatis</i>	LGV III	ATCC (VR-903)	+	+

Para la determinación de la especificidad del kit *artus C. trachomatis* Plus RG PCR se llevó a cabo un análisis de las reacciones cruzadas de un grupo control, como se muestra en la Tabla 2. Ninguno de los agentes patógenos sometidos a la prueba resultó reactivo.

Tabla 2. Análisis de especificidad del kit frente a posibles reacciones cruzadas con diferentes patógenos

Grupo de control	<i>C. trachomatis</i> (Cycling Green o Cycling A.FAM)	Control interno (Cycling Yellow o Cycling A.JOE)
<i>Acinetobacter</i> spp.	-	+
<i>Bordetella pertussis</i>	-	+
<i>Candida albicans</i>	-	+
<i>Candida glabrata</i>	-	+
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	-	+
<i>Chlamydia psittaci</i>	-	+
<i>Enterobacter cloacea</i>	-	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	+

La tabla continúa en la página siguiente.

Tabla 2. Continuación

Grupo de control	<i>C. trachomatis</i> (Cycling Green o Cycling A.FAM)	Control interno (Cycling Yellow o Cycling A.JOE)
<i>Escherichia coli</i>	–	+
<i>Gardnerella vaginalis</i>	–	+
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	–	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	–	+
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	–	+
<i>Proteus mirabilis</i>	–	+
<i>Proteus vulgaris</i>	–	+
<i>Salmonella enteritides</i>	–	+
<i>Salmonella typhimurium</i>	–	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	–	+
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	–	+
<i>Streptococcus pyogenes</i>	–	+
Herpes simplex virus 1 y 2	–	+

Precisión

Los datos de precisión para el kit *artus C. trachomatis* Plus RG PCR se han analizado para los sistemas Rotor-Gene y permiten la determinación de la varianza total del ensayo. Esta varianza total consiste en la determinación de la intra-variabilidad del ensayo (variabilidad entre muestras de igual concentración dentro de un mismo ensayo), la inter-variabilidad del ensayo (variabilidad interna del laboratorio debido al empleo por parte de distintas personas de distintos aparatos del mismo tipo) y la inter-variabilidad de lotes (variabilidad debido a la utilización de distintos lotes). Los datos obtenidos se utilizan para calcular la desviación estándar, la varianza y el coeficiente de variación tanto para la PCR específica del patógeno como para la del control interno.

Estos datos se determinaron para el kit *artus C. trachomatis* Plus RG PCR utilizando el serovar E de *C. trachomatis* cuya concentración se aproxima a tres

veces el límite de sensibilidad (2,1 be/μl, considerando la purificación, 0,66 be/ μl sin considerar el método de purificación). Los análisis se realizaron por octuplicado. Los datos de precisión fueron calculados en base a los valores de C_T de las curvas de amplificación (C_T: threshold cycle, véase Tabla 3). Acorde con estos resultados, la dispersión total de una muestra cualquiera de concentración dada es 2,45 % (C_T) y 1,87% (C_T) considerando el método de purificación (QIAamp DNA Mini Kit, Tabla 4), y 3,34% (C_T) y 2.13% (C_T) considerando el método de purificación (QIAamp DNA Mini Kit) para la detección del control interno. Estos valores se basan en el conjunto de todos los valores individuales de las variabilidades determinadas.

Tabla 3: Datos de precisión basados en los valores de C_T

	Desviación estándar	Varianza	Coefficiente de variabilidad (%)
Intra-variabilidad del ensayo: <i>C. trachomatis</i> serovar E (0,66 be/μl)	0,38	0,14	1,23
Intra-variabilidad del ensayo: Control interno	0,05	0,01	0,36
Inter-variabilidad del ensayo: <i>C. trachomatis</i> serovar E (0,66 be/μl)	0,58	0,33	1,90
Inter-variabilidad del ensayo: Control interno	1,08	1,18	4,80
Inter-variabilidad de lotes: <i>C. trachomatis</i> serovar E (0,66 be/μl)	0,46	0,21	1,47
Inter-variabilidad de lotes: Control interno	0,39	0,15	1,74
Varianza total: <i>C. trachomatis</i> serovar E (0,66 be/μl)	0,64	0,41	2,45
Varianza total: Control interno	0,85	0,72	3,34

Tabla 4. Datos de precisión basados en basados en los valores de C_T considerando el método de purificación con el kit QIAamp DNA Mini

	Desviación estándar	Varianza	Coefficiente de variabilidad (%)
Intra-variabilidad del ensayo: <i>C. trachomatis</i> serovar E (2,1 be/ μ l)	0,33	0,11	1,06
Intra-variabilidad del ensayo: Control interno	0,27	0,07	1,12
Inter-variabilidad del ensayo: <i>C. trachomatis</i> serovar E (2,1 be/ μ l)	0,49	0,11	1,09
Inter-variabilidad del ensayo: Control interno	0,49	0,24	2,07
Inter-variabilidad de lotes: <i>C. trachomatis</i> serovar E (2,1 be/ μ l)	0,58	0,34	1,83
Inter-variabilidad de lotes: Control interno	0,31	0,09	1,33
Varianza total: <i>C. trachomatis</i> serovar E (2,1 be/ μ l)	0,58	0,34	1,87
Varianza total: Control interno	0,50	0,25	2,13

Robustez

El análisis de la robustez permite la determinación de la tasa de error total del kit *artus C. trachomatis* Plus RG PCR. 100 muestras de hisopos, 30 de orina y 30 de semen negativas para *C. trachomatis* fueron mezcladas con 2,1 be/ μ l por volumen de elución de ADN control de *C. trachomatis* (aprox. tres veces la concentración del límite de sensibilidad analítico). Tras la purificación usando

el kit QIAamp DNA Mini (muestras de semen e hisopos) y el kit QIAamp Viral RNA Mini (muestras de orina), las muestras fueron analizadas con el kit *artus C. trachomatis* Plus RG PCR. Para todas las muestras de *C. trachomatis* la tasa de error fue del 0 %. La robustez del control interno fue comprobada adicionalmente mediante la purificación y el análisis de 100 muestras de hisopos, 30 de orina y 30 de semen negativas para *C. trachomatis*. La tasa de error total fue del 0 %. No fueron detectadas inhibiciones. Por lo tanto, la robustez del kit *artus C. trachomatis* Plus RG PCR es de ≥ 99 %.

Reproducibilidad

Los datos de reproducibilidad permiten una valoración regular del rendimiento del kit *artus C. trachomatis* Plus RG PCR así como su comparación con otros productos. Estos datos se obtienen mediante la evaluación de diferentes estudios.

Evaluación diagnóstica

El kit *artus C. trachomatis* Plus RG PCR ha sido evaluado en cuatro estudios.

Evaluación diagnóstica 1: Comparación de muestras de hisopos a orina con el COBAS® Amplicor® CT/NG Assay

En el estudio comparativo del kit *artus C. trachomatis* Plus RG PCR con el COBAS Amplicor CT/NG Assay, 107 muestras de hisopo y orina retrospectivas fueron analizadas.

En este estudio, la sensibilidad diagnóstica del kit *artus C. trachomatis* Plus RG PCR fue de un 98%. No se observaron inhibiciones.

La especificidad diagnóstica del kit *artus C. trachomatis* Plus RG PCR fue del 100%. La muestra discrepante (Tabla 5) había sido analizada previamente positivamente con dos sistemas de detección de *C. trachomatis*, con el instrumento LightCycler® 2.0 y con COBAS Amplicor CT/NG Assay (*artus* versus COBAS Amplicor). La pérdida en las muestras dado al almacenamiento lleva a un desplazamiento del límite de detección en ambos sistemas. Por lo tanto los resultados discrepantes observados en ambas muestras no se deben a amplificaciones o detecciones inespecíficas (ni en caso del kit *artus* PCR ni por parte del COBAS Amplicor assay).

Tabla 5. Resultados del estudio comparativo 1

		COBAS Amplicor CT/NG Assay		
		+	-	Total
<i>artus</i>	+	47	1	48
<i>C. trachomatis</i> Plus RG PCR Kit	-	1	58	59

Evaluación diagnóstica 2: Comparación de muestras de semen con el Cobas Amplicor CT/NG Assay

En el estudio comparativo del kit *artus C. trachomatis* Plus RG PCR con el COBAS Amplicor CT/NG Assay, 65 muestras de semen prospectivas fueron analizadas.

Para las 65 muestras de semen hubo una correlación del 100% del kit *artus C. trachomatis* Plus RG PCR comparado con el COBAS Amplicor Assay. La tasa de inhibición fue del 0%. La sensibilidad diagnóstica fue del 100%.

La especificidad diagnóstica del kit *artus C. trachomatis* Plus RG PCR fue del 100% (Tabla 6).

Tabla 6. Resultados del estudio comparativo 2

		COBAS Amplicor CT/NG Assay		
		+	-	Total
<i>artus</i>	+	16	0	16
<i>C. trachomatis</i> Plus RG PCR Kit	-	0	49	49

Evaluación diagnóstica 3: Comparación de muestras de hisopo y orina con el LCx® and Aptima® **Combo 2™ Assay**

Para la comparación del kit *artus C. trachomatis* Plus RG PCR con un sistema LCR (del inglés, ligase chain reaction, LCx® CT Assay) y un TMA (del inglés, transcription mediated amplification, APTIMA Combo 2 Assay), 234 muestras retrospectivas de hisopo y orina fueron analizados.

En este estudio, la correlación del LCR (LCx CT Assay) y Aptima Combo 2 Assay con el kit *artus* C. trachomatis Plus RG PCR fue del 98% para las muestras retrospectivas de hisopo y orina.

La especificidad diagnóstica del kit *artus* C. trachomatis Plus RG PCR fue del 99% (Tabla 7).

Tabla 7. Resultados del estudio comparativo 3

		LCx/Aptima Combo 2		Total
		+	-	
<i>artus</i> C. trachomatis Plus RG PCR Kit	+	104	1	105
	-	2	127	129

Evaluación diagnóstica 4: Análisis de hisopos oculares

100 muestras de hisopos oculares fueron analizadas de forma retrospectiva con el kit *artus* C. trachomatis Plus RG PCR.

Para las 100 muestras retrospectivas de hisopos oculares, la sensibilidad diagnóstica del kit *artus* C. trachomatis Plus RG PCR fue de 100%.


La especificidad diagnóstica del kit *artus* C. trachomatis Plus RG PCR fue del 100% (Tabla 8).

Tabla 8. Resultados del estudio comparativo 4

		Resultado esperado		Total
		+	-	
<i>artus</i> C. trachomatis Plus RG PCR Kit	+	5	0	5
	-	0	95	95

Equipo y reactivos que deben ser suministrados por el usuario

Cuando trabaje con productos químicos, use siempre una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y gafas de protección. Para más información, consulte las correspondientes hojas de datos de seguridad de materiales (SDS), que podrá obtener del proveedor.

- Kit de purificación del ADN (véase “Purificación del ADN”, página 23)
 - Pipetas (graduables)*
 - Puntas de pipeta estériles con filtro
 - Agitador vortex*
 - Centrífuga de mesa* con rotor para tubos de reacción de 2 ml
 - Rotor-Gene Q MDx, Rotor-Gene Q o Rotor-Gene Instrument* con canales de fluorescencia Cycling Green y Cycling Yellow o con canales de fluorescencia Cycling A.FAM y Cycling A.JOE
 - Software para el Rotor-Gene Q MDx/Rotor-Gene Q, versión 1.7.94 o superior (software para el Rotor-Gene 6000 versión 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94; software para el Rotor-Gene 3000 versión 6.0.23)
 - Tubos de PCR y tapas, 0,1 ml, para usar con el rotor de 72 pozos (n.º cat. 981103 ó 981106)
-  El kit *artus C. trachomatis* Plus RG PCR no está validado para usarse con el rotor de 36 pozos Rotor-Gene (n.º cat. 981005 ó 981008)
- Bloque de refrigeración (Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, n.º cat. 9018901 o Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes, n.º cat. 9018905)

* Asegúrese de que los instrumentos hayan sido revisados y calibrados regularmente acorde con las recomendaciones del fabricante.

Notas importantes

Precauciones generales

El usuario debe siempre en cuenta las siguientes indicaciones:

- Use siempre puntas de pipeta estériles con filtro.
- Se deben purificar, almacenar y añadir a la reacción las muestras positivas (muestras, controles, amplificados) por separado del resto de reactivos, y añadirlos a la mezcla de reacción en un lugar físicamente separado.
- Todos los componentes deben descongelarse completamente a temperatura ambiente (de 15 a 25 °C) antes de iniciar el ensayo.
- Después de descongelados, los componentes deben mezclarse a conciencia (pipeteando arriba y abajo repetidamente o brevemente con el vortex) y por último, centrifugarlos brevemente.
- Trabaje con rapidez y mantenga los componentes en hielo o en el bloque de refrigeración (72/96 well loading block).

Toma, almacenamiento y transporte de las muestras

Nota: Todas las muestras deben tratarse como potencialmente infecciosas.

Sólo se permite la utilización de las muestras indicadas a continuación. Por lo tanto, siga de forma estricta las instrucciones y observaciones acerca de la recogida, transporte y almacenamiento de las mismas.

- Orina
- Hisopo ocular, endocervical y uretral
- Muestra de semen

Para asegurar la alta calidad de la muestra, éstas deben ser transportadas lo más rápido posible. Las muestras deben ser transportadas a las temperaturas indicadas.

Muestras de orina

Nota: El paciente no debe haber miccionado durante las dos horas antes de la toma de la muestra.

Reúna 5-30 ml de orina de la primera micción en un recipiente limpio de polipropileno sin conservantes. Cierre el recipiente con la muestra y rotúlelo.

Note: No utilice muestras de orina recogidas en recipientes con conservantes.

Si el análisis de las muestras de orina puede realizarse en un plazo de 24 horas, las muestras pueden almacenarse a temperatura ambiente (entre 15 °C y 25 °C). Para períodos de almacenamiento más largos, las muestras deben conservarse a una temperatura de 2 °C a 8 °C en un frigorífico si el análisis se va a realizar en un plazo de siete días. Si no es posible procesar las muestras de orina en un plazo de siete días, deben almacenarse a una temperatura de –15 °C a –30 °C, o a una temperatura inferior, durante un máximo de treinta días.

Las muestras de orina deben almacenarse a una temperatura de 2 °C a 8 °C en un frigorífico hasta su envío y deben transportarse conforme a las instrucciones locales y nacionales para el transporte de material patógeno*

Muestras de hisopos

Note: Utilice los siguientes materiales para obtener hisopo ocular, endocervical y uretral.

Note: Use solo hisopos de Dacron®, rayó, o alginate de calico con mangos de plástico. No utilice hisopos de madera o aluminio.

Hisopos de ojo, endocervicales y de uretra pueden ser tomados y transportados en 1-3 ml de los siguientes medios.

- *digene*® Female Swab Specimen Collection Kit (QIAGEN, n.º cat. 5123-1220)
- *digene* Cervical Sampler (QIAGEN, n.º cat. 5122-1220)
- AMPLICOR STM (Specimen transport medium, Roche, Inc.)
- STD Swab Specimen Collection and Transport Kit (Roche, Inc.)
- M4 CTM (MicroTest™, Thermo Fisher Scientific)
- 2SP CTM (Bartels, Inc.)
- Bartels ChlamTrans™ CTM (Bartels, Trinity Biotech)
- Mastazyme™ Chlamydia Swab Set (MAST DIAGNOSTICA)
- Mastazyme Chlamydia Transport Medium (MAST DIAGNOSTICA)
- IDEIA™ Chlamydia Specimen Collection Kit (DakoCytomation)
- MicroTrak® II Chlamydia EIA Specimen Collection Kit (Trinity Biotech)

* International Air Transport Association (IATA). Dangerous Goods Regulations.

Deje el hisopo en el medio para el transporte de cultivos. Cierre el recipiente con la muestra y rotúlelo. Preste atención a las indicaciones para el transporte y almacenamiento.†

Las muestras deben almacenarse a 2-8 °C. (Si los hisopos son enviados a un laboratorio diagnóstico, las muestras deben ser transportadas lo más rápido posible después de la toma y siguiendo las instrucciones del laboratorio respecto al transporte de muestras de *Chlamydia*).

Si los hisopos no son procesados inmediatamente después de su llegada al laboratorio, éstos deben almacenarse a 2-8 °C y deben ser procesados en un periodo de 7 días. En caso de no realizarse el análisis en esos 7 días después de la toma de muestras, éstas deben almacenarse a una temperatura de -15 a -30°C o temperaturas inferiores y procesarlas en un periodo de 30 días después de la toma.

Las muestras de hisopos deben transportarse en frío.

Las muestras de hisopos deben ser transportadas al laboratorio lo más rápido posible después de su toma, siguiendo las instrucciones del laboratorio para transporte refrigerado. Las muestras deben ser transportadas siguiendo las disposiciones locales y estatales para el transporte de sustancias infecciosas.*

Muestras de semen

Nota: Debe haber un periodo de dos a cuatro días de abstinencia sexual previo a la toma de la muestra.

Nota: La muestra de semen debe ser recogida el mismo día en que debe ser transportada al laboratorio.

Usando procedimientos de laboratorio rutinarios la obtención de la muestra de semen humano puede realizarse mediante los métodos siguientes.

- Masturbación directa en un recipiente estéril, limpio y seco. Asegúrese de que toda la muestra se deposite dentro del recipiente. Si alguna porción de muestra se perdiera durante la recogida, debe ser anotado en el protocolo de recogida de la muestra.
- Masturbación con uso de preservativo. Después de la eyaculación, retire el preservativo y anúdelo en el extremo superior para asegurar que el semen queda recogido dentro del preservativo. Coloque el preservativo en una bolsa de transporte de muestras.

* International Air Transport Association (IATA). Dangerous Goods Regulations.

† Biosafety in Microbiological Laboratories. 1999. Richmond, J.Y. and McKinney, R.W. eds. 4th Edition. HHS Publication Number (CDC) 93-8395.

Nota: Use sólo recipientes sin conservantes y preservativos sin espermicida ni agentes artificiales (por ejemplo, colorantes).

Mantenga la muestra de semen de 30 a 45 minutos en la oscuridad (por ejemplo, en un cajón o un armario) hasta que se realice la homogenización.

Congele la muestra de semen directamente después de la homogenización en viales para congelación a una temperatura entre -15 y 30°C o temperaturas inferiores.

Si la muestra de semen no puede ser procesada inmediatamente después de su llegada al laboratorio, ésta debe ser almacenada a una temperatura entre -15 y 30°C o temperaturas inferiores, y procesada en un periodo de 30 días después de su toma.

Si la muestra de semen debe ser transportada a un laboratorio de diagnóstico, el transporte debe ser lo más rápido posible después de la toma y siguiendo las instrucciones del laboratorio respecto al transporte de muestras de *Chlamydia*.

Las muestras de semen deben ser transportadas refrigeradas. Las muestras deben ser transportadas siguiendo las disposiciones locales y estatales para el transporte de sustancias infecciosas.*

Purificación del ADN

Los kits de QIAGEN mostrados en la Tabla 9 están validados para la purificación de ADN partir de las muestras indicadas y para el uso con el kit *artus C. trachomatis* RG PCR. Lleve a cabo la purificación del ADN siguiendo las instrucciones siguientes, que en algunos casos difieren de los manuales de uso de los protocolos.

* International Air Transport Association (IATA). Dangerous Goods Regulations.

Tabla 9. Kits de purificación validados para su uso con el kit *artus C. trachomatis* Plus RG PCR

Muestra	Kit de purificación de ácidos nucleicos	Número catálogo (QIAGEN)	Carrier ARN
Orina	QIAamp Viral RNA Mini Kit (50)	52904	Incluido
Semen, hisopos	QIAamp DNA Mini Kit (50)	51304	No incluido

Nota: El kit *artus C. trachomatis* Plus RG PCR no está indicado para métodos de purificación que utilizan fenol.

Usando el kit QIAamp Viral RNA Mini para muestras de orina

Nota: El uso de carrier de ARN es decisivo en la eficiencia de la purificación, y en consecuencia en la obtención máxima de ADN/ARN. Añada la cantidad apropiada de carrier de ARN a cada purificación siguiendo las instrucciones del *QIAamp Viral RNA Mini Handbook*.

Nota: El control interno del kit *artus C. trachomatis* Plus RG PCR puede añadirse directamente a la purificación (véase "Control interno", página 30).

El tampón AVL, usado en el kit QIAamp Viral RNA Mini, inactiva los numerosos y no identificados inhibidores de la PCR presentes en la orina. Se recomienda el QIAamp Viral RNA Mini Spin Protocol para la purificación de ADN celular, bacterial o vírico a partir de orina.

Equilibre las muestras a temperatura ambiente (de 15 - 25 °C).

La orina contiene a menudo un número muy bajo de bacterias. Por esa razón la concentración de la muestra puede resultar útil. Concentre las muestras (5-30 ml de cada) por centrifugación a un máximo de 18,000 x *g* por 15-20 minutos (de forma alternativa 3000 x *g* por 30 minutos). El sobrenadante debe ser desechado con cuidado. A continuación el precipitado debe ser resuspendido en 1200 µl de PBS (1x) usando el vortex para disolver la muestra. Este paso debe ser realizado utilizando el vortex en periodos de 15-30 segundos.

Use 140 µl de las muestras preparadas para la purificación de ADN.

Siga el protocolo QIAamp Viral RNA Mini Spin Protocol (*QIAamp Viral RNA Mini Handbook*, Third Edition, April 2010, página 23) desde el principio.

Nota: Recomendamos encarecidamente realizar el paso de centrifugación recomendado número 10 del protocolo para eliminar los posibles restos de etanol. Recomendamos también aumentar la duración de este paso de centrifugación a 3 minutos. También recomendamos usar un volumen de elución de 60 µl.

Usando el kit QIAamp DNA Mini para hisopos o muestras de semen

Nota: El uso de carrier de ARN es decisivo en la eficiencia de la purificación, y en consecuencia en la obtención máxima de ADN/ARN. Se recomienda el uso de carrier de ARN (RNA Homopolymer Poly[rA]^{*}, no incluido en el kit QIAamp DNA Mini) para la purificación de ácidos nucleicos a partir de muestras de fluidos corporales libres de células así como a partir de muestras con poca cantidad de ADN y ARN. En estos casos, prepare el carrier RNA siguiendo las instrucciones siguientes.

- Resuspenda el carrier de ARN liofilizado (RNA Homopolymer Poly[rA], no incluido en el kit QIAamp DNA Mini) en el tampón de elución (no use tampón de lisis) suministrado con el kit de purificación (Tampón AE del kit QIAamp DNA Mini), y prepare una dilución con una concentración de 1 µg/µl. Divida esta solución de carrier de ARN en alícuotas, y almacénelas a una temperatura entre -15 y -30°C. Evite congelar y descongelar las alícuotas de carrier de ARN (más de dos veces).
- Use 1 µg de carrier de ARN por 100 µl de tampón de lisis. Por ejemplo, si el protocolo de purificación utiliza 200 µl de tampón de lisis, añada 2 µl de carrier de ARN (1 µg/µl) directamente en el tampón de lisis (Tampón AL del kit QIAamp DNA Mini). Inmediatamente antes de empezar con la purificación, prepare la mezcla de tampón de lisis y carrier de ARN (y control interno, en caso de desearlo, véase "Control interno", página 30) siguiendo el esquema que se muestra en la Tabla 10.

* Cuando trabaje con reactivos químicos, use siempre una bata de laboratorio, guantes desechables y gafas protectoras. Para mayor información consulte las hojas de seguridad de materiales (MSDSs), suministrados por el proveedor del producto.

Tabla 10. Esquema de pipeteo para el uso del kit QIAamp DNA Mini

Número de muestras	1	12
Tampón AL (tampon de lisis)*	p.ej., 200 µl	p.ej., 2400 µl
Carrier ARN (1 µg/µl)	2 µl	24 µl
Volumen total	202 µl	2424 µl
Volumen por purificación	200 µl	200 µl cada

* Contiene hidrocloreuro de guanidina; véase el manual de uso en referencia a información de seguridad.

Nota: Utilice la mezcla del tampón de lisis y carrier de ARN anteriormente preparada inmediatamente. El almacenamiento de la mezcla no es posible.

Nota: El control interno del kit *artus C. trachomatis* Plus RG PCR puede añadirse directamente a la purificación (véase "Control interno", página 30).

Lleve a cabo la purificación con el kit QIAamp DNA Mini acorde con los pasos siguientes, los cuales difieren de los pasos del protocolo presente en los *QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook*.

- Deje que las muestras se estabilicen a temperatura ambiente (entre 15 °C y 25 °C).
- Los hisopos que estén contenidos en medio de transporte deben ser homogenizados a conciencia usando el vortex.
- Deben retirarse con cuidado los tapones de los tubos de recogida de muestra y ponga especial atención en evitar la contaminación de los guantes. Si éstos se contaminan deben cambiarse antes de procesar la muestra siguiente.
- Debe recogerse todo el líquido presente en el hisopo presionándolo contra las paredes del tubo. Cualquier resto de moco de la muestra debe tomarse con el hisopo. Obtenga el resto de líquido del moco del hisopo, presionándolo contra las paredes del tubo. Finalmente debe retirarse el hisopo con los posibles restos de moco.
- Pipetee 180 µl de Tampón ATL y 200 µl del medio de transporte directamente en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y homogenice con el vortex.
- En el caso de un hisopo seco, póngalo en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml con 180 µl de tampón ATL y homogenice con el vortex durante 15-30 segundos. De forma alternativa puede pipetear 200 µl de tampón

ATL en el tubo de transporte y agitar el hisopo con el vortex dentro del tubo durante 15-30 segundos. A continuación pipetee 180 µl en un tubo de centrifuga de 1,5 ml. Por favor tenga en cuenta que debe recogerse todo el líquido presente en el hisopo presionándolo contra las paredes del tubo. Retire el hisopo y deséchelo.

- Para la purificación del ADN de muestras de semen diluya 60 µl de muestra en 140 µl de PBS (1x) en un tubo para microcentrifuga de 1,5 ml. Después de mezclar y homogenizar usando el vortex, pipetee 100 µl de la mezcla en 180 µl de tampón ATL y vortée a conciencia a intervalos de 15-30 segundos.
- Añada 20 µl de Proteinasa K a la muestra. Mezcle bien usando el vortex e incube a 56°C durante 15 minutos (en el caso de hisopos) o 1-12 horas (en el caso de muestras de semen). Use el vortex ocasionalmente durante la incubación para mezclar o utilice un termoagitador.

Nota: Por favor tenga en cuenta que es necesario utilizar Proteinasa K. La Proteasa de QIAGEN tiene una actividad reducida en presencia del tampón ATL.

- Centrifugue brevemente el tubo de microcentrifuga de 1,5 ml para evitar contaminaciones cruzadas a consecuencia de las gotas depositadas en la parte interna del tubo
- Añada 200 µl de tampón AL (con el carrier de ARN, y de forma opcional **el control interno; véase "Control interno", página 30**) a la muestra. Mezcle bien usando el vortex durante 15 segundos e incube a 70 °C durante 10 minutos. Centrifugue brevemente el tubo de microcentrifuga de 1,5 ml para evitar contaminaciones cruzadas a consecuencia de las gotas depositadas en la parte interna del tubo. Es muy importante mezclar bien la muestra y el tampón AL para obtener una solución homogénea.
- Añada 200 µl de etanol (96-100 %) a la muestra y mezcle con el vortex a intervalos durante 15 segundos. Centrifugue brevemente los tubos de microcentrifuga para evitar contaminaciones cruzadas
- Deposite con cuidado 500 µl de la mezcla (incluido precipitado) en la columna QIAamp Mini spin Column (en un collection tube de 2 ml) sin tocar la boca de la columna. Círrrela y centrifugue a 6.000 x g (8.000 rpm) durante un minuto. Disponga la columna QIAamp Mini spin Column en un collection tube limpio de 2 ml y deseche el tubo anterior que contiene el filtrado*. Cierre las columnas para evitar que se formen aerosoles durante la centrifugación.

- Repita el último paso depositando todo el resto de la mezcla en la columna QIAamp Mini spin column.
- Abra con cuidado la QIAamp Column y añada 500 µl de tampón AW1 sin tocar la boca de la columna. Ciérrela y centrifugue a 6.000 x g (8.000 rpm) durante un minuto. Disponga la columna QIAamp Mini spin column en un collection tube limpio de 2 ml y deseche el tubo anterior que contiene el filtrado*.
- Abra con cuidado la QIAamp Mini spin column y añada 500 µl de tampón AW2 sin tocar la boca de la columna. Ciérrela y centrifugue a velocidad máxima (p. ej. 16.000 x g) durante tres minutos. Deseche el tubo que contiene el filtrado y disponga la columna QIAamp Mini spin column en un collection tube limpio de 2 ml. Deseche el tubo anterior que contiene el filtrado. Disponga la columna QIAamp en un collection tube limpio de 2 ml. Centrifugue a velocidad máxima (p. ej. 16.000 x g) durante tres minutos. Disponga la columna QIAamp en un tubo para microcentrífuga de limpio de 1.5 ml y deseche el tubo anterior que contiene el filtrado*.
- Abra con cuidado la QIAamp Mini spin column y añada 50 µl de tampón AE. Incube a temperatura ambiente (entre 15 y 25 °C) durante un minuto y centrifugue a continuación la QIAamp Mini spin column a 6.000 x g (8.000 rpm) durante un minuto.

Usando el kit QIAamp DNA Mini para muestras liofilizadas o sublimadas

Nota: El uso de carrier de ARN es decisivo en la eficiencia de la purificación, y en consecuencia en la obtención máxima de ADN/ARN. Se recomienda el uso de carrier de ARN (RNA Homopolymer Poly[rA], no incluido en el kit QIAamp DNA Mini) para la purificación de ácidos nucleicos a partir de muestras de fluidos corporales libres de células así como a partir de muestras con poca cantidad de ADN y ARN. En estos casos, prepare el carrier RNA siguiendo las instrucciones siguientes.

- Resuspenda el carrier de ARN liofilizado (RNA Homopolymer Poly[rA], no incluido en el kit QIAamp DNA Mini) en el tampón de elución (no use tampón de lisis) suministrado con el kit de purificación (Tampón AE del kit QIAamp DNA Mini), y prepare una dilución con una concentración de 1 µg/µl. Divida esta solución de carrier de ARN en alícuotas, y almacénelas a una temperatura de -15 a -30 °C. Evite congelar y descongelar las alícuotas de carrier de ARN (más de dos veces).

* El filtrado contiene Tampón AL o Tampón AW1 y por lo tanto es incompatible con lejía. Consulte los manuales *QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook* respecto a información de seguridad.

- Use 1 µg de carrier de ARN por 100 µl de tampón de lisis. Por ejemplo, si el protocolo de purificación utiliza 200 µl de tampón de lisis, añada 2 µl de carrier de ARN (1 µg/µl) directamente en el tampón de lisis (Tampón AL del kit QIAamp DNA Mini). Inmediatamente antes de empezar con la purificación, prepare la mezcla de tampón de lisis y carrier de ARN (y control interno, en caso de desearlo, véase “Control interno”, página 30) siguiendo el esquema que se muestra en la Tabla 11.

Tabla 11. Esquema de pipeteo para el uso del kit QIAamp DNA Mini

Número de muestras	1	12
Tampón AL (tampon de lisis)*	p.ej., 200 µl	p.ej., 2.400 µl
Carrier de ARN (1 µg/µl)	2 µl	24 µl
Volumen total	202 µl	2.424 µl
Volumen por purificación	200 µl	200 µl cada

* Contiene hidrocloreuro de guanidina; véase el manual de uso en referencia a información de seguridad.

Nota: Utilice la mezcla del tampón de lisis y carrier de ARN anteriormente preparada inmediatamente. El almacenamiento de la mezcla no es posible.

Nota: El control interno del kit *artus C. trachomatis* Plus RG PCR puede añadirse directamente a la purificación (véase “Control interno”, página 30).

Lleve a cabo la purificación con el kit QIAamp DNA Mini acorde con los pasos siguientes, los cuales difieren de los pasos del protocolo presente en los *QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook*.

- Deje que las muestras se estabilicen a temperatura ambiente (entre 15 °C y 25 °C).
- Reconstituya la muestra liofilizada o sublimada en 500 µl de PBS 1 x lentamente por inversión a mano. Agite las muestras a temperatura ambiente (entre 15 y 25 °C) al menos durante 30 minutos para homogenizarlas (si es posible utilice un termoagitador).
- Pipetee 200 µl de la muestra reconstituida en 360 µl de tampón ATL en un tubo para microcentrífuga de 1,5 ml y mezcle a conciencia usando el vortex
- Añada 20 µl de proteinasa K a la muestra. Mezcle bien usando el vortex, e incube a 56 °C durante 1-12 horas. Use el vortex ocasionalmente durante la incubación para mezclar o utilice un termoagitador.

Nota: Por favor tenga en cuenta que es necesario utilizar Proteinasa K. La Proteasa de QIAGEN tiene una actividad reducida en presencia del tampón ATL.

- Centrifugue brevemente el tubo de microcentrífuga de 1,5 ml para eliminar las gotas depositadas en la parte interna de la tapa del tubo y así evitar contaminaciones.
- Añada 400 µl de tampón AL a la muestra (con el carrier de ARN, y de forma opcional el control interno; véase "Control interno", página 30). Mezcle bien con el vortex durante 15 segundos e incube la muestra a 70°C durante 10 minutos.
- Añada 400 µl de etanol (96-100%) a la muestra y mezcle con el vortex durante 15 segundos.
- Deposite con cuidado 700 µl de la mezcla (incluido precipitado) en la columna QIAamp Mini spin column sin tocar la boca de la columna. Ciérrela y centrifugue a 6.000 x g (8.000 rpm) durante un minuto. Disponga la columna QIAamp Mini spin en un collection tube limpio de 2 ml (incluido en el kit) y deseche el tubo anterior que contiene el filtrado*. Repita el último paso depositando todo el resto de la mezcla en la columna.
- Repita el último paso depositando todo el resto de la mezcla en la columna QIAamp Mini spin column.
- Siga las instrucciones del protocolo para tejidos (*QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook*, Third Edition, June 2012, página 32) a partir del paso 8, con la adición del Tampón AW1.

Nota: Le recomendamos encarecidamente que realice el paso 10 de centrifugación del protocolo, para eliminar posibles restos de etanol. Recomendamos que incremente el tiempo de centrifugación a 3 minutos.

- Le sugerimos un volumen de elución de 50 µl con tampón AE.

Control interno

Se suministra un control interno (C. trachomatis Plus RG IC), con el que podrá analizar tanto la purificación del ADN como una posible inhibición de la PCR. Para ello, añada el control interno en una proporción de 0,1 µl por 1 µl de volumen final de elución durante la purificación. Por ejemplo, usando el kit QIAamp DNA Mini, el ADN se eluye en 200 µl de tampón AE. Por lo tanto, se

* El filtrado contiene Tampón AL o Tampón AW1 y por lo tanto es incompatible con lejía. Consulte los manuales *QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook* respecto a información de seguridad.

debe añadir 20 µl del control interno. La cantidad de control interno depende solo del volumen de elución.

Nota: El control interno y el carrier de ARN (véase “Purificación del ADN”, página 23) deben añadirse sólo a la mezcla de tampón de lisis y muestra o directamente al tampón de lisis.

El control interno no debe añadirse directamente a la muestra. En el caso de añadirlo al tampón de lisis, tenga en cuenta que la mezcla del control interno y tampón de lisis-carrier de ARN debe prepararse y usarse inmediatamente (el almacenamiento de la mezcla a temperatura ambiente o refrigerada puede llevar después de unas horas, al deterioro del control interno y a una reducción de la eficiencia de la purificación).

Note: No añada el control interno y carrier de ARN directamente a la muestra.

Para considerar el proceso de purificación como válido, el valor de C_T del control interno de una muestra de plasma negativa procesada durante la purificación en paralelo (QIAamp DNA Mini Kit o QIAamp Viral RNA Mini Kit) debe alcanzar el $C_T = 24 \pm 3$ (threshold: 0.02) usando los sistemas Rotor-Gene Q. La variación de hasta 3 C_T se debe a la variación del instrumento y purificación. Una desviación mayor indica problemas en la purificación. En este caso el proceso de purificación debe comprobarse y volver a validarlo si fuera necesario. Si tiene dudas o aparecen problemas, por favor contacte con los Servicios Técnicos de QIAGEN.

El control interno también puede utilizarse exclusivamente para el análisis de una posible inhibición de la PCR. Para ello, añada por reacción el control interno directamente a la mezcla de C. trachomatis Plus RG Master y C. trachomatis Plus LC/RG Mg-Sol, tal y como se describe en el paso 2b del protocolo (página 32).

Protocolo: PCR y análisis de datos

Puntos importantes antes de empezar:

- Antes de empezar con el procedimiento, lea “

Notas importantes”, páginas 20-30.

- Tómese tiempo para familiarizarse con el instrumento Rotor-Gene Q antes de empezar con el protocolo. Consulte el manual del usuario.
- Asegúrese de que en cada serie de reacciones de PCR, se incluya al menos un control positivo y un control negativo (Water, PCR grade).

Antes de empezar

- Asegúrese de que el bloque de refrigeración (accesorios del sistema Rotor-Gene Q) haya sido previamente enfriado a una temperatura entre 2 y 8 °C.
- Todos los reactivos deben descongelarse completamente a temperatura ambiente antes de iniciar el ensayo, también deben ser mezclados a conciencia (para ello pipetee la mezcla arriba y abajo varias veces o agite brevemente con el vortex). A continuación centrifugue brevemente.

Procedimiento

1. Coloque el número de tubos de reacción deseados en los adaptadores en el bloque de refrigeración.
2. Si desea utilizar un control interno para analizar la purificación de ADN así como para detectar una posible inhibición de la PCR, continúe con el paso 2a. Si desea utilizar el control interno únicamente para detectar una posible inhibición, continúe con el paso 2b.
- 2a. El control interno ha debido ser añadido durante la purificación del ADN (**véase** “Control interno”, página 30). En este caso prepare la master mix siguiendo las instrucciones de la Tabla 12.

La master mix contiene todos los componentes necesarios para la reacción a excepción de la muestra

Tabla 12. Preparación de la master mix (el control interno se utiliza para analizar la purificación y para detectar una posible inhibición de la PCR)

Número de muestras	1	12
C. trachomatis Plus RG Master	13 µl	156 µl
<i>C. trachomatis Plus LC/RG Mg-Sol</i>	2 µl	24 µl
<i>C. trachomatis Plus RG IC</i>	0 µl	0 µl
Volumen total	15 µl	180 µl

- 2b. El control interno debe ser añadido directamente a la mezcla de *C. trachomatis* Plus RG Master y *C. trachomatis* Plus LC/RG Mg-Sol. En este caso prepare la master mix siguiendo las instrucciones de la Tabla 13.

La master mix contiene todos los componentes necesarios para la reacción a excepción de la muestra.

Tabla 13. Preparación de la master mix (el control interno se utiliza exclusivamente para detectar una posible inhibición de la PCR)

Número de muestras	1	12
<i>C. trachomatis</i> Plus RG Master	13 µl	156 µl
<i>C. trachomatis</i> Plus LC/RG Mg-Sol	2 µl	24 µl
<i>C. trachomatis</i> Plus RG IC	1 µl	12 µl
Volumen total	16 µl*	192 µl*

* El aumento de volumen condicionado por la adición del control interno es irrelevante en la preparación de la reacción del PCR. La sensibilidad del sistema de detección no se ve perjudicada.

3. Introduzca 15 µl de la master mix en el tubo de PCR. A continuación, añada 10 µl de la purificación del ADN (véase Tabla 14). Se debe utilizar como control positivo 10 µl de *C. trachomatis* Plus LC/RG Positive Control y como control negativo 10 µl de agua (Water, PCR grade).

Tabla 14. Preparación de la PCR

Número de muestras	1	12
Master mix	15 µl	15 µl cada
Muestra	10 µl	10 µl cada
Volumen total	25 µl	25 µl cada

4. Cierre los tubos de reacción de PCR. Tenga en cuenta que debe instalarse un anillo de bloqueo (accesorios del Rotor-Gene) en el rotor de 72 pozos, para evitar la apertura accidental de los tubos de reacción durante el ensayo.
5. Para la detección del ADN de *C. trachomatis*, cree un perfil de temperatura siguiendo los siguientes pasos.

Establecimiento de los parámetros generales de la PCR	Figuras 3,4,5
Activación inicial de la enzima Hot Start	Figura 6
Amplificación del ADN	Figura 7
Ajuste de la sensibilidad de los canales de fluorescencia	Figura 8
Inicio del ensayo	Figura 9

Todas las especificaciones se refieren al software del Rotor-Gene Q MDx/Rotor-Gene Q versión 1.7.94, software del Rotor-Gene 6000 versiones 1.7.65, 1.7.87, 1.7.94, y software del Rotor-Gene 3000 versión 6.0.23. Por favor consulte la información adicional contenida en el manual de uso del instrumento acerca de la programación de los instrumentos Rotor-Gene. En las figuras los ajustes se muestran en recuadros marcados en negrita. Las figuras se muestran para los instrumentos Rotor-Gene Q. En caso de necesitar diferentes ajustes para el Rotor-Gene 3000, estos ajustes están descritos en el texto.

- Primero, abra la ventana del asistente “New Run Wizard” (Figura 3. La ventana de menú “New Run Wizard”.3). Compruebe la ventana “Locking Ring Attached” y haga clic en “Next”.

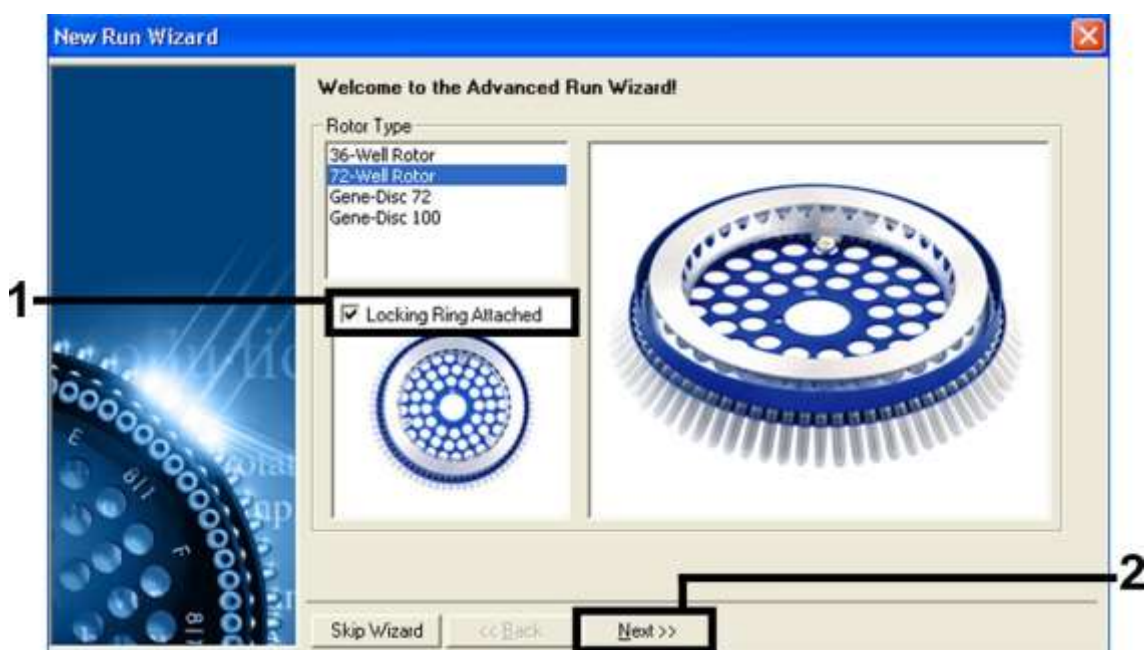


Figura 3. La ventana de menú “New Run Wizard”.

7. Seleccione **25** como volumen de reacción de la PCR y haga clic en **“Next”** (Figura 4).

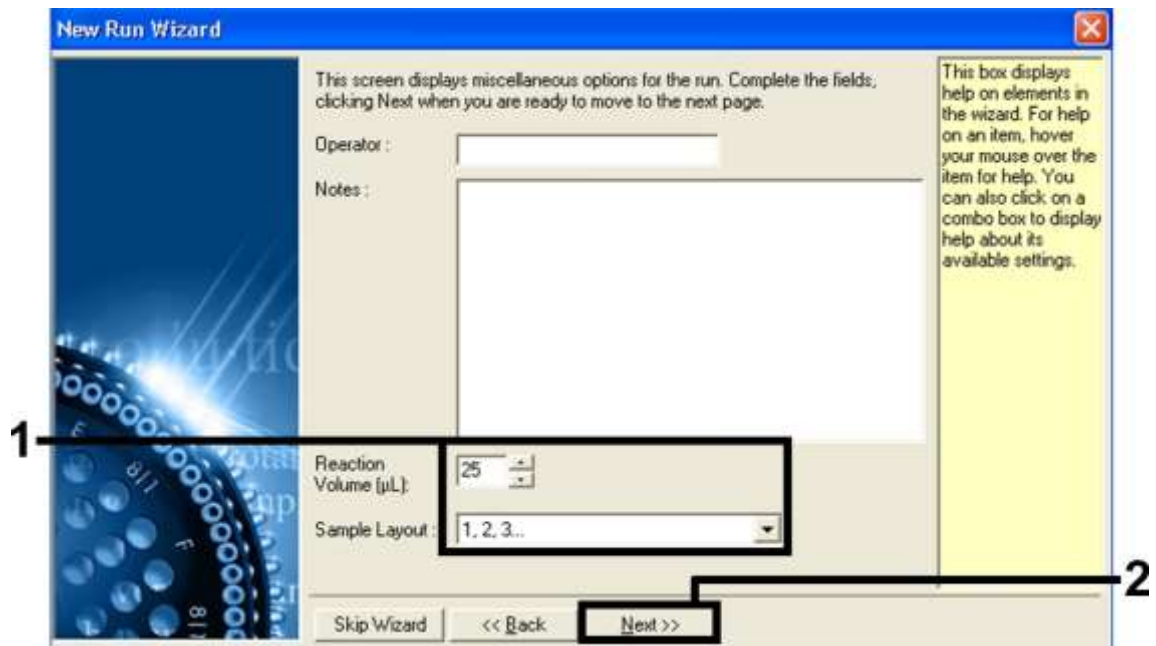


Figura 4. Establecimiento de los parámetros generales de la PCR.

8. Haga clic en **“Edit Profile”** en la siguiente ventana del **“New Run Wizard”** (Figura 5), y programe el perfil de temperatura como se muestra en las Figuras 5–7.

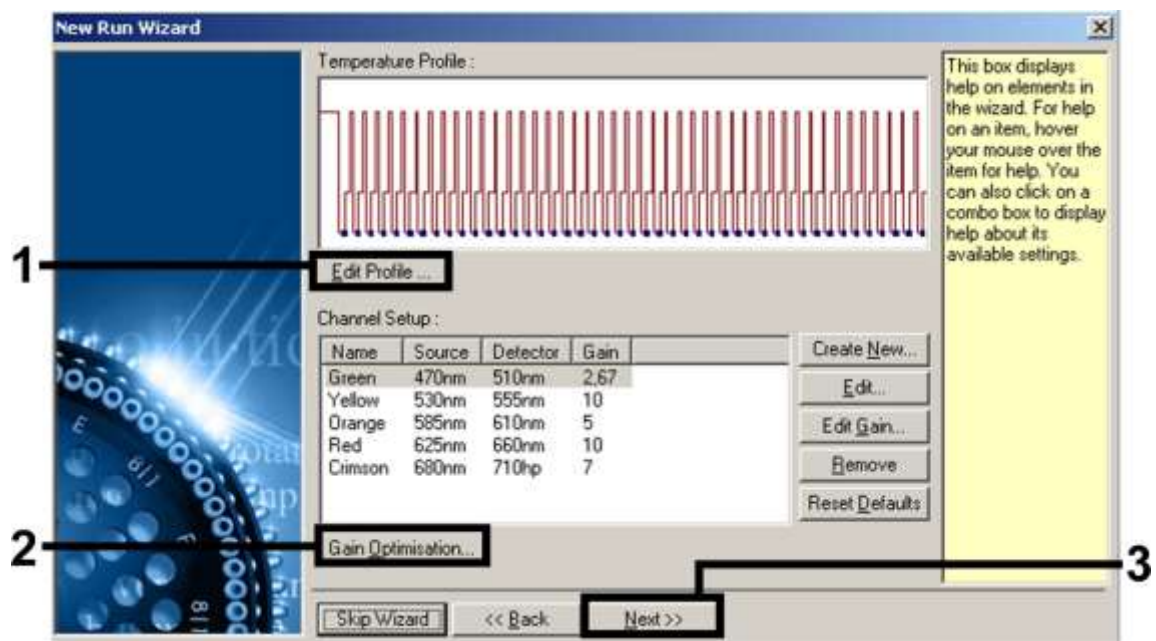


Figura 5. Elección de perfil del ensayo.

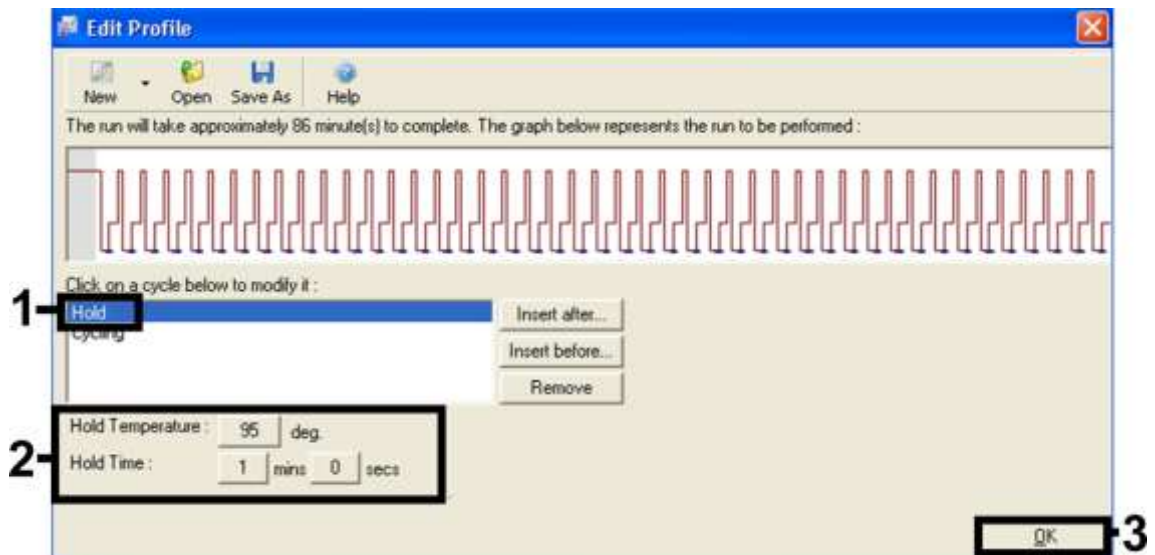


Figura 6. Activación de la enzima Hot Start.

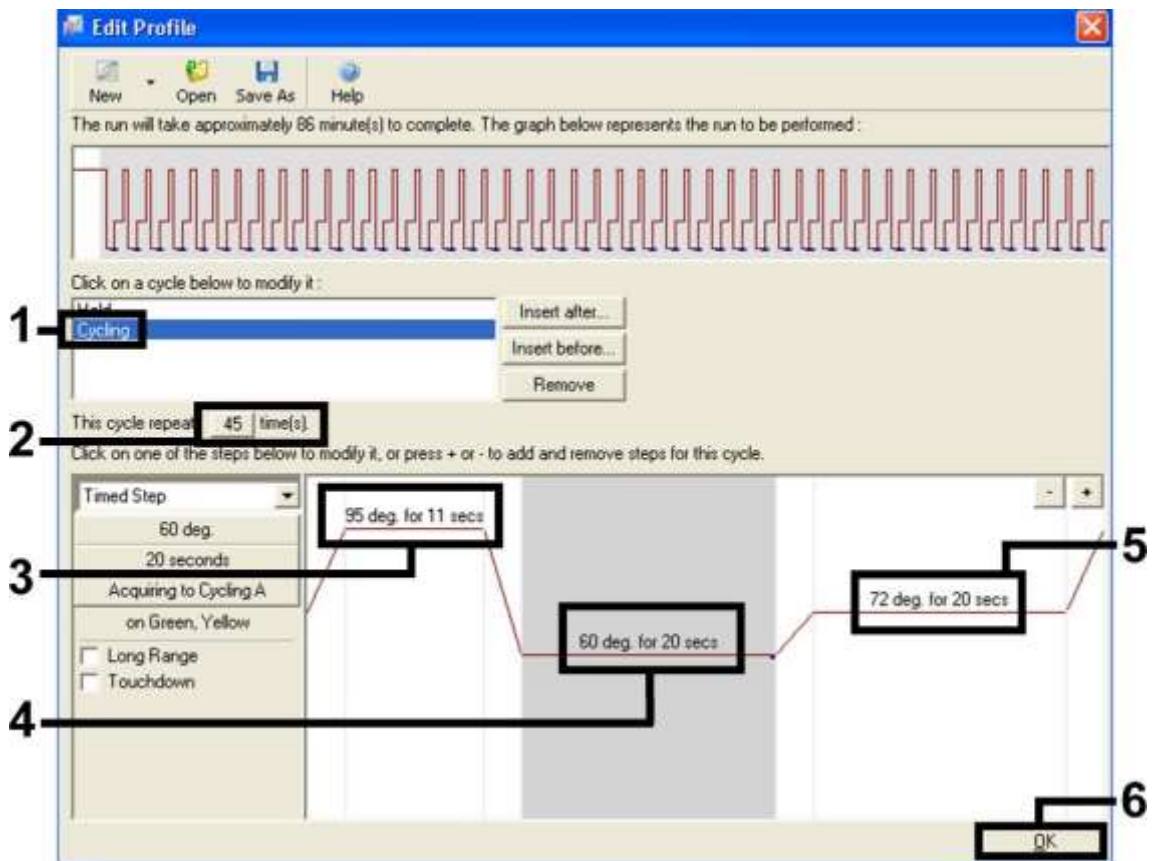


Figura 7. Amplificación del ADN. Por favor tenga en cuenta que en el Rotor-Gene 3000, el software define los fluorocromos como "FAM/Sybr, JOE".

9. El rango de detección de los canales de fluorescencia debe ser determinado dependiendo de las intensidades de fluorescencia en los tubos de PCR. Haga clic en **"Gain Optimisation"** en la ventana **"New Run Wizard"** (véase Figura 5 para abrir la ventana **"Auto-Gain Optimisation Setup"**). Ajuste la temperatura de calibración a 60 para igualar la temperatura de ligación del protocolo de amplificación (Figura 8).

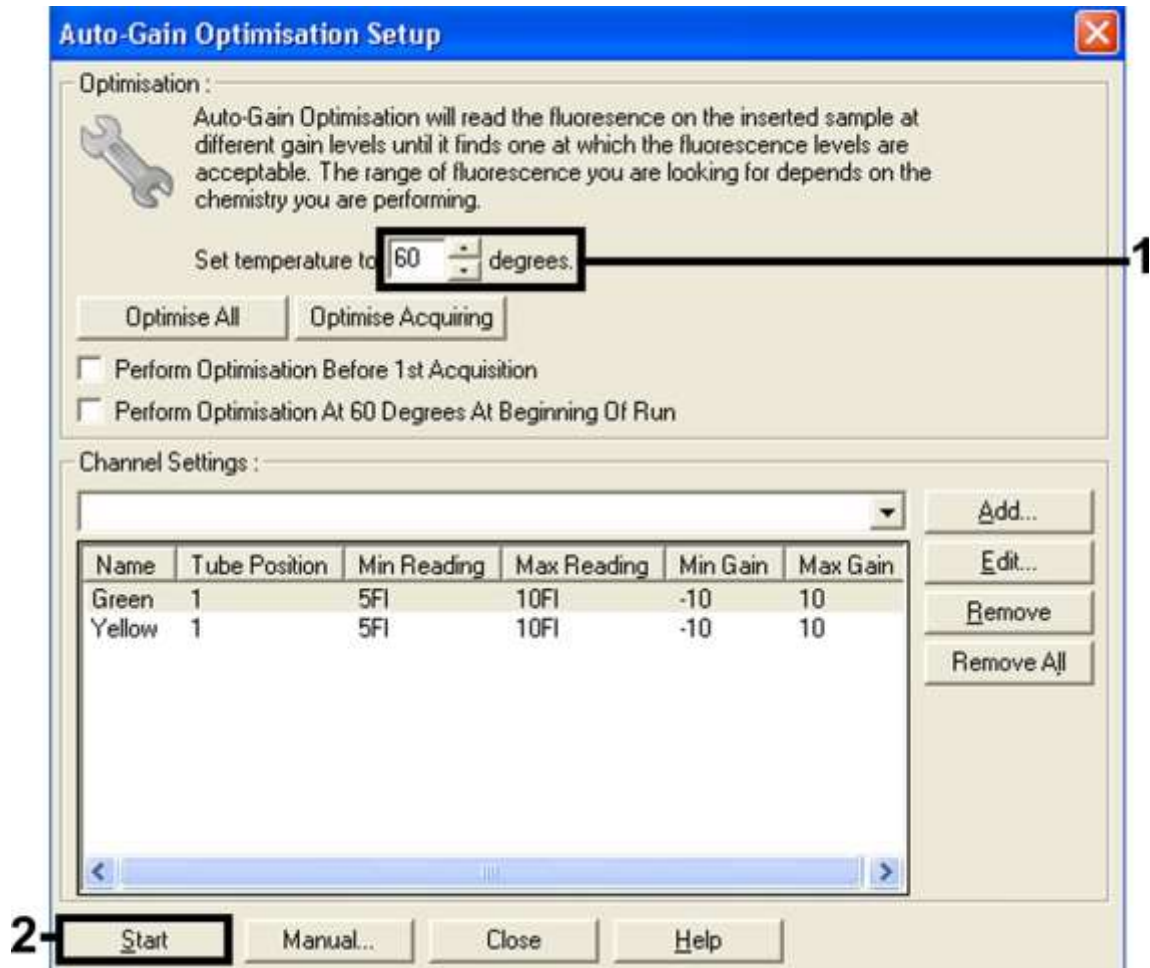


Figura 8. Ajuste de la sensibilidad de los canales de fluorescencia. Por favor tenga en cuenta que en el Rotor-Gene 3000, el software define los fluorocromos como "FAM/Sybr" y "JOE".

10. Los valores "Gain" determinados mediante la calibración del canal se guardan automáticamente y aparecen en la última ventana del menú del proceso de programación (véase Figura 9). **Haga clic en "Start Run".**

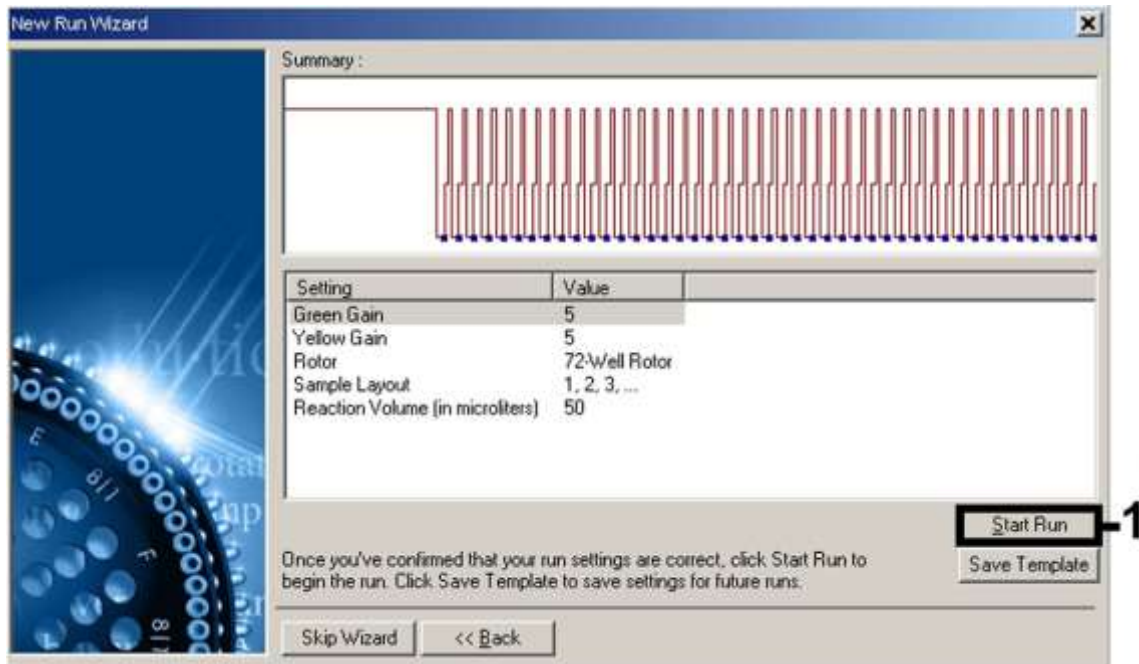


Figura 9. Inicio del ensayo. Por favor tenga en cuenta que en el Rotor-Gene 3000, el software define los fluorocromos como "FAM/Sybr" y "JOE".

11. Después de finalizar el ensayo, analice los datos. Pueden obtenerse los siguientes resultados (11a, 11b, y 11c).

En las ilustraciones Figura 10 y Figura 11 se muestran ejemplos de reacciones positivas y negativas de la PCR.

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

El resultado del análisis es positivo: La muestra contiene ADN de *C. trachomatis*.

En este caso, la detección de la señal en el canal Cycling Yellow es irrelevante, ya que elevadas concentraciones del ADN de *C. trachomatis* (señal positiva en el canal Cycling Green) pueden conducir a la reducción o ausencia de la señal fluorescente del control interno (en el canal Cycling Yellow). Esto se debe a fenómenos de competencia.

Nota: En el Rotor-Gene 3000, los canales de fluorescencia relevantes son Cycling A.FAM para la señal positiva y Cycling A.JOE para el control interno.

- 11b. En el canal de fluorescencia Cycling Green no se detecta ninguna señal, sino sólo en el canal Cycling Yellow (señal del control interno).

En la muestra no se detecta ADN de *C. trachomatis*, por lo que puede considerarse negativa.

En el caso de una PCR negativa para *C. trachomatis*, la señal del control interno detectada excluye la posibilidad de una inhibición de la PCR.

Nota: En el Rotor-Gene 3000, los canales de fluorescencia relevantes son Cycling A.JOE para el control interno y ausencia de señal en el canal Cycling A.FAM.

11c. No se detecta señal ni en el canal Cycling Green, ni en el canal Cycling Yellow.

No es posible realizar el diagnóstico.

Encontrará más información relativa a las causas y soluciones de los problemas en “

Guía de resolución de problemas”, página 41.

Nota: En el Rotor-Gene 3000, los canales de fluorescencia relevantes son Cycling A.FAM y Cycling A.JOE.

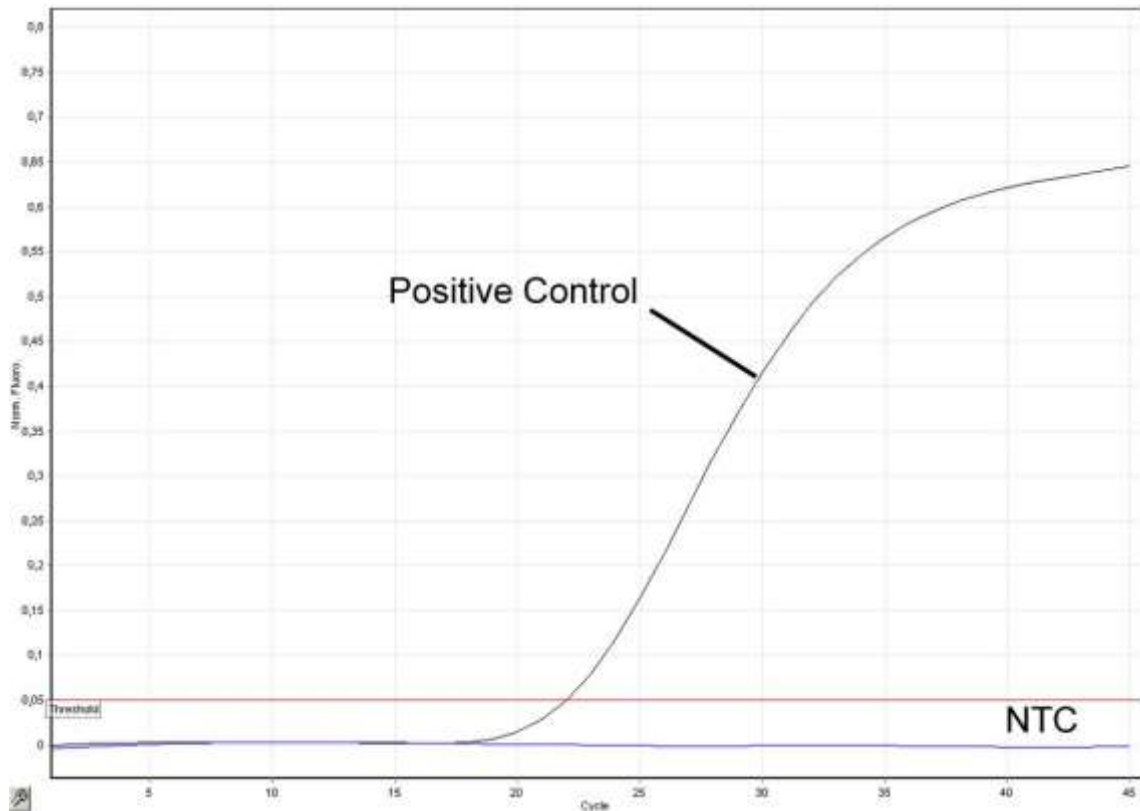


Figura 10. Detección del control positivo (*C. trachomatis* Plus LC/RG Positive Control) en el canal de fluorescencia Cycling Green. NTC : No template control (control negativo).

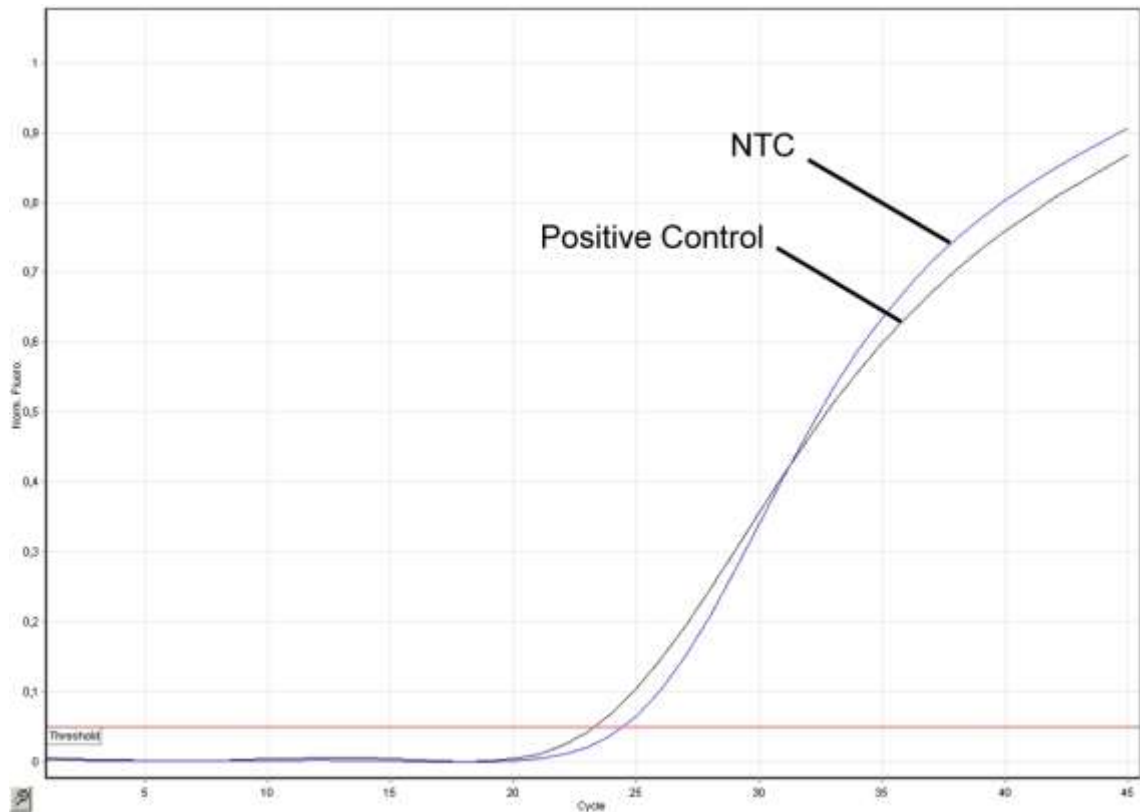






Figura 11. Detección del control interno (IC) en el canal de fluorescencia Cycling Yellow con amplificación simultánea del control positivo (*C. trachomatis* Plus LC/RG Positive Control). NTC: No template control (control negativo).

Guía de resolución de problemas


Esta guía es útil para resolver problemas que puedan surgir. Para mayor información, consulte la página de "Frequently Asked Questions" en nuestro Centro de Apoyo Técnico: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx Los científicos de los Servicios Técnicos de QIAGEN se alegran de contestar cualquier pregunta que pueda tener sobre los protocolos de este manual o sobre cualquier técnica (para contactar con nosotros, consulte la portada posterior o visite www.qiagen.com).

Comentarios y sugerencias





Ausencia de señal en el control positivo (C. trachomatis Plus LC/RG Positive Control) en el canal de fluorescencia Cycling Green o Cycling A.FAM

- a) El canal de fluorescencia seleccionado para el análisis de la PCR no se corresponde con el indicado en el protocolo.  Para el análisis de datos seleccione el canal de fluorescencia Cycling Green o Cycling A.FAM para la PCR analítica de *C. trachomatis* y el canal de fluorescencia Cycling Yellow o Cycling A.JOE para la PCR del control interno.
- b) La programación del perfil de temperatura en el Rotor-Gene no se llevó a cabo correctamente.  Compruebe el perfil de temperatura de acuerdo a las instrucciones del protocolo (véase "Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.PCR y análisis de datos", página 31).
- c) La preparación de la PCR no se llevó a cabo correctamente  Compruebe el esquema de pipeteo de acuerdo a las instrucciones del protocolo (véase "Protocolo: PCR y análisis de datos", página 31) y repita de nuevo la PCR si es necesario.
- d) No se han cumplido las instrucciones de almacenamiento de uno o más componentes del kit indicadas en "Almacenamiento" (página 5)  Compruebe las condiciones de almacenamiento y la fecha de caducidad (véase la etiqueta del kit) de los reactivos y use un nuevo kit si es necesario.

Comentarios y sugerencias

- e) El kit *artus C. trachomatis Plus* RG PCR ha caducado  Compruebe las condiciones de almacenamiento y la fecha de caducidad (véase la etiqueta del kit) de los reactivos y use un nuevo kit si es necesario.

Señal débil o ausencia de señal del control interno de una muestra de plasma negativa ($C_T = 24 \pm 3$; umbral, 0,02) en el canal de fluorescencia Cycling Yellow o Cycling A.JOE con ausencia simultánea de señal en el canal Cycling Green o Cycling A.FAM

- a) Las condiciones de la PCR no cumplen con el protocolo  Compruebe las condiciones de la PCR (véase arriba) y repita la PCR con los ajustes corregidos si es necesario.
- b) Inhibición de la PCR  Asegúrese de haber realizado durante la purificación de ADN el paso de centrifugación adicional antes de la elución para eliminar cualquier residuo de etanol (véase "Purificación del ADN", página 23).
- c) Pérdidas de ARN durante la purificación  Si el control interno ha sido añadido a la purificación, la ausencia de señal del control interno puede indicar la pérdida de ADN durante la purificación. Asegúrese de haber usado el método de purificación recomendado (véase "Purificación del ADN", página 23) y siga detenidamente las instrucciones del fabricante.
-  Asegúrese de haber realizado durante la purificación de ADN el paso de centrifugación adicional antes de la elución para eliminar cualquier residuo de etanol (véase "Purificación del ADN", página 23).

Comentarios y sugerencias

- d) No se han cumplido las instrucciones de almacenamiento de uno o más componentes del kit indicadas en **"Almacenamiento"** (página 5)
- ⓘ Compruebe las condiciones de almacenamiento y la fecha de caducidad (véase la etiqueta del kit) de los reactivos y use un nuevo kit si es necesario.
- e) El *artus C. trachomatis* Plus RG PCR Kit ha caducado
- ⓘ Compruebe las condiciones de almacenamiento y la fecha de caducidad (véase la etiqueta del kit) de los reactivos y use un nuevo kit si es necesario.

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

- a) Se ha producido una contaminación durante la PCR
- ⓘ Repita la PCR con reactivos nuevos y por duplicado.
- ⓘ Si es posible, cierre los tubos de la PCR directamente después de añadir la muestra a analizar.
- ⓘ Asegúrese de pipetear los controles positivos al final.
- ⓘ Asegúrese de descontaminar el lugar de trabajo y los instrumentos con frecuencia.
- b) Se ha producido una contaminación durante la purificación
- ⓘ Repita la purificación y la PCR de la muestra a analizar usando nuevos reactivos.
- ⓘ Asegúrese de descontaminar el lugar de trabajo y los instrumentos con frecuencia.

Información de pedidos

Producto	Contenido	N.º catálogo
<i>artus</i> C. trachomatis Plus RG PCR Kit (24)	Para 24 reacciones: Master, Solución de Mg, control positivo, control interno, agua (de calidad para PCR)	4559263
<i>artus</i> C. trachomatis Plus RG PCR Kit (96)	Para 96 reacciones: Master, Solución de Mg, control positivo, control interno, agua (de calidad para PCR)	4559265
<i>digene</i> Cervical Sampler and <i>digene</i> Female Swab Specimen Collection Kit: para recogida de muestras de cérvix		
<i>digene</i> Cervical Sampler	50 cepillos cervicales y medio de transporte para la recogida de muestras cervicales	5122-1220
<i>digene</i> Female Swab Specimen Collection Kit	50 hisopos de Dacrón y medio de transporte para la recogida de muestras cervicales	5123-1220
QIAamp Viral RNA Mini Kit: para purificación de ARN vírico a partir de fluidos corporales libres de células		
QIAamp Viral RNA Mini Kit (50)	Para 50 preps: QIAamp Mini Spin Columns, Carrier de ARN, Tampones, tubos de recogida (2ml), Tampones libres de ARNasa	52904
QIAamp DNA Mini Kit: para purificación de ADN genómico, mitocondrial, bacteriano, de parásitos o vírico		
QIAamp DNA Mini Kit (50)	Para 50 preps: 50 QIAamp Mini Spin Columns, QIAGEN Proteinasa K, Reactivos, Tampones, tubos de recogida (2 ml)	51304

Producto	Contenido	N.º catálogo
Rotor-Gene Q MDx y accesorios		
Rotor-Gene Q MDx 5plex Platform	Termociclador de PCR en tiempo real con 5 canales (verde, amarillo, naranja, rojo, carmesí), ordenador portátil, software, accesorios: incluye 1 año de garantía en piezas y mano de obra, no se incluyen la instalación ni la formación de personal	9002022
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Termociclador de PCR en tiempo real con 5 canales (verde, amarillo, naranja, rojo, carmesí), ordenador portátil, software, accesorios: incluye 1 año de garantía en piezas y mano de obra, instalación y formación de personal	9002023
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Termociclador de PCR en tiempo real y analizador de alta resolución (High Resolution Melt analyzer) con 5 canales (verde, amarillo, naranja, rojo, carmesí) con canal HRM, ordenador portátil, software, accesorios: incluye 1 año de garantía en piezas y mano de obra, no se incluyen la instalación ni la formación de personal	9002032

Producto	Contenido	N.º catálogo
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Termociclador de PCR en tiempo real y analizador de alta resolución (High Resolution Melt analyzer) con 5 canales (verde, amarillo, naranja, rojo, carmesí), además de canal HRM, ordenador portátil, software, accesorios: incluye 1 año de garantía en piezas y mano de obra, instalación y formación de personal	9002033
Rotor-Gene Q MDx 6plex Platform	Termociclador de PCR en tiempo real con 6 canales (azul, verde, amarillo, naranja, rojo, carmesí), incluyendo ordenador portátil, software, accesorios: incluye 1 año de garantía en piezas y mano de obra, así como la instalación y formación de personal	9002042
Rotor-Gene Q MDx 6plex System	Termociclador de PCR en tiempo real con 6 canales (azul, verde, amarillo, naranja, rojo, carmesí), incluyendo ordenador portátil, software, accesorios: incluye 1 año de garantía en piezas y mano de obra, instalación y formación de personal	9002043
Rotor-Gene Q MDx 2plex Platform	Termociclador de PCR en tiempo real con 2 canales (verde, amarillo), incluyendo ordenador portátil, software, accesorios: incluye 1 año de garantía en piezas y mano de obra, no se incluye la instalación ni la formación de personal	9002002

Producto	Contenido	N.º catálogo
Rotor-Gene Q MDx 2plex System	Termociclador de PCR en tiempo real con 2 canales (verde, amarillo), incluyendo ordenador portátil, software, accesorios: incluye 1 año de garantía en piezas y mano de obra, instalación y formación de personal	9002003
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM Platform	Termociclador de PCR en tiempo real y analizador de alta resolución (High Resolution Melt analyzer) con 2 canales (verde, amarillo), además de canal HRM, ordenador portátil, software, accesorios: incluye 1 año de garantía en piezas y mano de obra, no se incluyen la instalación ni la formación de personal	9002012
Rotor-Gene Q MDx 2plex HRM System	Termociclador de PCR en tiempo real y analizador de alta resolución con 2 canales (verde, amarillo), además de canal HRM, ordenador portátil, software, accesorios: 1 año de garantía en piezas y mano de obra, instalación y formación de personal	9002013
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Bloque de aluminio para la preparación manual de la PCR con pipeta 72 x tubos de 0,1 ml	9018901
Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes	Bloque de aluminio para la preparación manual de la PCR en 8 x 12 array usando 96 x 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

Para obtener información detallada acerca de licencias actuales y límite de uso de productos específicos, consulte el manual de uso del kit de QIAGEN o manual de usuario del instrumento en cuestión. Los manuales de uso de los kits de QIAGEN o los manuales de usuario de los instrumentos se encuentran disponibles en www.qiagen.com o puede solicitarlos al Servicio Técnico de QIAGEN o a su distribuidor local.

Esta página se ha dejado en blanco intencionadamente.

La venta de este producto autoriza al comprador su uso para la realización de diagnóstico "in vitro" en seres humanos. No es una patente general o licencia para cualquier otra finalidad diferente a los derechos de uso especificados por este acuerdo.

Marcas comerciales: QIAGEN®, QIAamp®, *artus*®, *digene*® Rotor-Gene® (Grupo QIAGEN); AMPLICOR®, COBAS® (Roche Group); LightCycler® (Roche Group); Aptima®, Combo 2™ (Gen-Probe, Inc.); ClamTrans™, MicroTrak® (Trinity Biotech); DACRON® (Invista North America S.A.R.L.); FAM™, JOET™, SYBR® (Life Technologies); IDEIA™ (DakoCytomation); LCx® (Abbott Laboratories); Mastazyme™ (MAST DIAGNOSTICA); MicroTest™ (Thermo Fisher Scientific)..

Cláusula de uso del kit *artus C. trachomatis* Plus RG PCR

El uso de este producto implica la aceptación por parte del comprador o usuario del producto de los siguientes términos:

- 1 El producto debe usarse siguiendo las instrucciones de los protocolos suministrados con el producto y de este manual y sólo con los componentes presentes en el kit. QIAGEN no garantiza licencia de uso o de propiedad intelectual en el caso de utilizar los componentes de este kit conjuntamente con componentes no incluidos excepto los mencionados en los protocolos suministrados con el producto, en este manual y en los protocolos adicionales presentes en www.qiagen.com. Algunos de estos protocolos adicionales han sido suministrados por usuarios de QIAGEN para usuarios de QIAGEN. Estos protocolos no han sido rigurosamente comprobados ni optimizados por QIAGEN. QIAGEN no los garantiza ni ofrece garantías de que no infrinjan los derechos de terceros.
- 2 Aparte de las licencias especificadas, QIAGEN no garantiza que este kit o su uso no infrinja los derechos de terceros.
- 3 Este kit y sus componentes tienen licencia de uso único y no deben ser reusados, remezclados o revendidos.
- 4 QIAGEN niega otras licencias, explícitas o implícitas de las especificadas.
- 5 El comprador y usuario del kit se comprometen a no llevar a cabo o a impedir a otros llevar a cabo acciones en contra a las especificadas arriba. QIAGEN se reserva el derecho a presentar acciones legales delante de un tribunal en caso de violación de la cláusula de uso, recuperando todos los gastos derivados de investigación, costes de juicio y honorarios de abogados en un esfuerzo de defender la cláusula de uso y cualquiera de su propiedad intelectual relacionados con el kit y/o sus componentes.

Para mayor información acerca de los términos actuales de uso, visite www.qiagen.com.

© 2009-2016 QIAGEN, todos los derechos reservados.

www.qiagen.com

Australia ■ techservice-au@qiagen.com

Austria ■ techservice-at@qiagen.com

Belgium ■ techservice-bnl@qiagen.com

Brazil ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

Canada ■ techservice-ca@qiagen.com

China ■ techservice-cn@qiagen.com

Denmark ■ techservice-nordic@qiagen.com

Finland ■ techservice-nordic@qiagen.com

France ■ techservice-fr@qiagen.com

Germany ■ techservice-de@qiagen.com

Hong Kong ■ techservice-hk@qiagen.com

India ■ techservice-india@qiagen.com

Ireland ■ techservice-uk@qiagen.com

Italy ■ techservice-it@qiagen.com

Japan ■ techservice-jp@qiagen.com

Korea (South) ■ techservice-kr@qiagen.com

Luxembourg ■ techservice-bnl@qiagen.com

Mexico ■ techservice-mx@qiagen.com

The Netherlands ■ techservice-bnl@qiagen.com

Norway ■ techservice-nordic@qiagen.com

Singapore ■ techservice-sg@qiagen.com

Sweden ■ techservice-nordic@qiagen.com

Switzerland ■ techservice-ch@qiagen.com

UK ■ techservice-uk@qiagen.com

USA ■ techservice-us@qiagen.com

