

Octubre 2015

Manual de uso del *artus*[®] HAdV RG PCR Kit



Versión 1
Para utilizar con los instrumentos
Rotor-Gene[®] Q

IVD

CE

REF

4530265



altona Diagnostics GmbH,
Mörkenstraße 12, 22767 Hamburgo, ALEMANIA

R1 MAT

1096380-ES

Distribuido por QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALEMANIA

Índice

Uso indicado	4
Resumen y explicación	4
Información sobre el patógeno.....	4
Principio del procedimiento	6
Materiales suministrados	7
Contenido del kit.....	7
Materiales necesarios pero no suministrados	7
Advertencias y precauciones.....	8
Advertencias.....	8
Precauciones	9
Conservación y manipulación de los reactivos	10
Componentes del kit	10
Procedimiento	11
Extracción de ADN.....	11
Protocolo: Detección de ADN específico del AdvH	14
Interpretación de los resultados	25
Validez del test	25
Análisis cualitativo.....	26
Análisis cuantitativo.....	27
Limitaciones	29
Control de calidad.....	29

Características de rendimiento	30
Sensibilidad analítica	32
Especificidad analítica	33
Rango lineal	35
Precisión	35
Evaluación diagnóstica	37
Repetibilidad	38
Símbolos	40
Guía de resolución de problemas.....	41
Información para pedidos	42

Uso indicado

El *artus*[®] HAdV RG PCR Kit (96) es un sistema de análisis diagnóstico *in vitro*, basado en la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *polymerase chain reaction*) en tiempo real (*real-time*), para la detección y la cuantificación de ADN específico del adenovirus humano (AdVH).

Resumen y explicación

El *artus* HAdV RG PCR Kit es un sistema listo para usar para la detección de ADN específico del AdVH mediante PCR en tiempo real en los instrumentos Rotor-Gene Q. El producto incluye un sistema de amplificación heterólogo (control interno) para identificar una posible inhibición de la PCR y para confirmar la integridad de los reactivos del kit.

Información sobre el patógeno

Los adenovirus humanos (AdVH), aislados por primera vez en la década de 1950 a partir de tejido adenoideo explantado, son virus ADN bicatenarios sin envoltura de la familia *Adenoviridae* y pertenecen al género *Mastadenovirus*. Tienen una distribución mundial sin un patrón estacional de infección.

Los AdVH se clasifican en 7 especies (A-G). La especie B se subdivide en las subespecies B1 y B2. Hasta ahora se han descrito al menos 56 serotipos diferentes (AdVH-1 a AdVH-56). Los adenovirus causan una amplia variedad de enfermedades tales como resfriados, faringitis, bronquitis, neumonía, diarrea, conjuntivitis (infección del ojo), fiebre, cistitis (inflamación o infección de la vejiga), enfermedad exantemática y enfermedad neurológica.

Los síntomas de la enfermedad causados por una especie de adenovirus dependen del tropismo tisular preferido del virus. Por ejemplo, la enfermedad respiratoria está causada a menudo por las especies B1, C o E, la enfermedad ocular está causada por las especies B, D o E, la gastroenteritis se sabe que suele estar inducida por las especies A, F o G, y las infecciones del riñón y de las vías urinarias a menudo se asocian a la especie B2 del AdVH.

Las características epidemiológicas de los adenovirus varían en función del tipo. Mientras que algunos adenovirus humanos son endémicos en partes del mundo y la infección suele contraerse durante la infancia, otros tipos causan una infección esporádica y brotes ocasionales. Todos los AdVH se transmiten por contacto directo, por transmisión fecal-oral y, en ocasiones, por transmisión a través del agua.

Aunque la mayoría de las infecciones por AdVH son autolimitadas, se han producido neumonías graves esporádicamente en personas por lo demás sanas. Además, algunos tipos pueden establecer infecciones asintomáticas persistentes en las amígdalas, la amígdala faríngea y el intestino de los huéspedes infectados, y la eliminación de virus puede producirse durante meses o años. La reactivación de infecciones latentes en huéspedes inmunodeprimidos, tales como los receptores de trasplantes, puede provocar una enfermedad diseminada potencialmente mortal.

Los AdVH son muy resistentes a diferentes condiciones ambientales y muy contagiosos, por lo que pueden producirse fácilmente brotes hospitalarios de enfermedades asociadas a adenovirus, como la queratoconjuntivitis epidémica, si no se siguen meticulosamente prácticas correctas de control de las infecciones y de higiene. En algunos países es obligatoria la notificación a las autoridades locales para algunos casos de brotes de infección por AdVH.

Principio del procedimiento

Las HAdV RG Master A y HAdV RG Master B contienen reactivos y enzimas para la amplificación específica de regiones diana del genoma del AdVH y para la detección directa del amplicón específico en el canal de fluorescencia Cycling Green de los instrumentos Rotor-Gene Q.

Además, el *artus* HAdV RG PCR Kit contiene un sistema de amplificación heterólogo para identificar posibles fallos durante el proceso. Este se detecta como control interno (IC, *Internal Control*) en el canal de fluorescencia Cycling Yellow de los instrumentos Rotor-Gene Q.

Las sondas específicas para el ADN del AdVH están marcadas con el fluoróforo FAM™. La sonda específica para el control interno (IC) está marcada con el fluoróforo JOE™. El uso de sondas marcadas con fluoróforos distinguibles a nivel espectral permite la detección y la cuantificación simultáneas de ADN del AdVH, así como la detección del control interno en los canales correspondientes del instrumento Rotor-Gene Q.

Materiales suministrados

Contenido del kit

artus HAdV RG PCR Kit		(96)
Número de catálogo		4530265
Número de reacciones		96
Azul	HAdV RG Master A	8 x 60 µl
Morado	HAdV RG Master B	8 x 180 µl
Verde	HAdV RG IC	1 x 1.000 µl
Rojo	HAdV QS*	4 x 250 µl
Blanco	H ₂ O	1 x 500 µl
	Manual de uso	1

*El artus HAdV RG PCR Kit contiene 4 estándares de cuantificación (QS1-QS4).

Materiales necesarios pero no suministrados

Antes de usar el producto, asegúrese de que los instrumentos hayan sido verificados y calibrados siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Reactivos

- QIAamp DNA Mini Kit (n.º de catálogo de QIAGEN 51304 o 51306; consulte «Extracción de ADN», en la página 11)

Consumibles

- 0.1 ml Strip Tubes and Caps (tubos en tira de 0,1 ml y tapas), para uso con un rotor de 72 pocillos (QIAGEN, n.º de catálogo 981103 o 981106)

- Tubos de microcentrifugadora libres de nucleasas y de baja unión al ADN para la preparación de la master mix
- Puntas de pipeta libres de nucleasas con filtros para aerosoles

Equipo

- Instrumento Rotor-Gene Q MDx 5plex, Rotor-Gene Q 5plex o Rotor-Gene Q 6plex
- Software Rotor-Gene Q, versión 2.3.1 o superior
- Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes (bloque para 72 tubos de 0,1 ml), bloque de aluminio para la preparación manual de las reacciones (QIAGEN, n.º de catálogo 9018901)
- Pipetas ajustables adecuadas para la preparación de las muestras
- Pipetas ajustables adecuadas para la preparación de la master mix para la PCR
- Pipetas ajustables adecuadas para la dispensación del ADN
- Agitador vorticial
- Centrifugadora de mesa con rotor para tubos de reacción de 2 ml

Advertencias y precauciones

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Lea atentamente todas las instrucciones antes de utilizar el producto.

Advertencias

Siempre que trabaje con productos químicos, utilice una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y gafas protectoras.

Precauciones

- El uso de este producto está limitado a personal especialmente formado y cualificado en las técnicas de PCR en tiempo real y en procedimientos de diagnóstico *in vitro*.
- Las muestras deben tratarse siempre como infecciosas y/o de riesgo biológico conforme a los procedimientos de seguridad del laboratorio.
- Use guantes protectores desechables sin talco, una bata de laboratorio y protección para los ojos cuando manipule muestras.
- Evite la contaminación microbiana y con nucleasas (ADNasa/ARNasa) de la muestra y de los componentes del kit.
- Use siempre puntas de pipeta desechables libres de ADNasa/ARNasa con filtros para aerosoles.
- Use siempre guantes protectores desechables sin talco cuando manipule los componentes del kit.
- Use áreas de trabajo separadas y apartadas entre sí para la preparación de las muestras, la preparación de las reacciones y las actividades de amplificación/detección. El flujo de trabajo en el laboratorio debe tener lugar de manera unidireccional. Use siempre guantes desechables en cada área y cámbieselos antes de entrar en un área diferente.
- Deposite suministros y equipos en las áreas de trabajo separadas y no los lleve de un área a otra.
- Almacene el material positivo o potencialmente positivo separado de los demás componentes del kit.
- No abra los tubos de reacción/placas después de la amplificación con objeto de evitar la contaminación con amplicones.
- Pueden analizarse controles adicionales conforme a las directrices o requisitos de las normativas locales o nacionales o de los organismos de acreditación.
- No use componentes del kit que hayan superado la fecha de caducidad.
- Elimine los desechos de las muestras y del producto conforme con la normativa local en materia de seguridad.

Conservación y manipulación de los reactivos

Componentes del kit

El *artus* HAdV RG PCR Kit se envía en nieve carbónica. Los componentes del kit deberían llegar congelados. Si uno o más componentes no están congelados en el momento de su recepción, o si los tubos han sido dañados durante el envío, póngase en contacto con el servicio técnico de QIAGEN. Una vez recibidos, conserve todos los componentes del kit a una temperatura de $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Evite descongelar y congelar los reactivos Master (más de dos veces), ya que esto podría reducir el rendimiento del producto. Congele los reactivos en alícuotas si se van a usar de forma intermitente. No conserve los reactivos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante más de 2 horas. Proteja de la luz los reactivos HAdV RG Master A y HAdV RG Master B.

El *artus* HAdV RG PCR Kit incluye:

- Dos reactivos Master (HAdV RG Master A y HAdV RG Master B).
- Control interno (HAdV RG IC).
- Cuatro estándares de cuantificación (HAdV QS1-4).
- Agua (H_2O) apta para PCR.

Los reactivos HAdV RG Master A y HAdV RG Master B contienen todos los componentes (tampón, enzimas, *primers* [cebadores] y sondas) para la amplificación y la detección de ADN específico del AdVH y del control interno en una sola reacción.

Los estándares de cuantificación contienen concentraciones normalizadas de ADN específico del AdVH. Pueden utilizarse individualmente como controles positivos o juntos para generar una curva estándar que puede usarse para determinar la

concentración de ADN específico del AdvH en la muestra. En la tabla 1 se muestran las concentraciones de los estándares de cuantificación.

Tabla 1. Concentración de los estándares de cuantificación.

Estándar de cuantificación	Concentración (copias/ μ l)
QS1	10.000
QS2	1.000
QS3	100
QS4	10

Procedimiento

Extracción de ADN

Se amplifican a partir del ADN secuencias diana específicas del AdvH. Debido a que el rendimiento del producto depende de la calidad del ADN, asegúrese de usar un kit de preparación de muestras que genere ADN apto para su uso en la PCR posterior.

Se recomienda el QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, n.º de catálogo 51304 o 51306) para la purificación del ADN para su utilización con el *artus* HAdV RG PCR Kit. Realice la purificación del ADN conforme a las instrucciones descritas en el manual de uso del QIAamp DNA Mini Kit (*QIAamp DNA Mini Handbook*).

Debido a que los tampones de lavado incluidos en el QIAamp DNA Mini Kit contienen etanol, realice un paso de centrifugación adicional antes de la elución. Coloque la columna de centrifugación QIAamp Mini en un nuevo tubo de recogida de 2 ml y deseche el tubo de recogida antiguo con el filtrado. Centrifugue durante

10 minutos a aproximadamente 17.000 x g (~ 13.000 rpm) en una centrifugadora de mesa.

Importante: La utilización de ARN carrier es esencial para la eficiencia de la extracción y para la estabilidad del ácido nucleico extraído.

Importante: El etanol es un potente inhibidor en la PCR en tiempo real. Si su kit de preparación de muestras utiliza tampones de lavado que contienen alcohol, asegúrese de eliminar todo resto de etanol antes de la elución del ácido nucleico.

Control interno

El *artus* HAdV RG PCR Kit contiene un control interno heterólogo que puede usarse como control de inhibición de la PCR o como control del procedimiento de preparación de las muestras (extracción de ácidos nucleicos) y como control de la inhibición de la PCR.

Si el control interno se utiliza como control de inhibición de la PCR, pero no como control para el procedimiento de preparación de las muestras, añada el control interno directamente a la mezcla de los reactivos HAdV RG Master A y HAdV RG Master B, tal como se describe en el paso 2b del protocolo (página 15).

Con independencia del método/sistema empleado para la extracción de ácidos nucleicos, el control interno no debe añadirse directamente a la muestra. El control interno debe añadirse siempre a la mezcla muestra/tampón de lisis. El volumen del control interno que debe añadirse a la mezcla muestra/tampón de lisis depende únicamente del volumen de elución y representa el 10% del volumen de elución. Por ejemplo, cuando se utiliza el QIAamp DNA Mini Kit, el ADN se eluye en 60 µl de tampón AE. Por consiguiente, añada 6 µl de control interno a la mezcla muestra/tampón de lisis de cada muestra.

Importante: No añada el control interno ni el ARN carrier directamente a la muestra.

Protocolo: Detección de ADN específico del AdVH

Cuestiones importantes antes de comenzar

- Antes de comenzar el procedimiento, lea el apartado «Precauciones», en la página 9.
- Dedique tiempo suficiente a familiarizarse con el instrumento Rotor-Gene Q antes de iniciar el protocolo. Lea el manual del usuario del instrumento.
- Asegúrese de que se incluya al menos un control positivo y un control negativo (agua apta para PCR) para cada test de PCR.

Cosas 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 controlar el procedimiento de purificación del ADN y comprobar una posible inhibición de la PCR, siga el paso 2a. Si va a utilizar el control interno exclusivamente para comprobar una posible inhibición de la PCR, siga el paso 2b.

Utilice el control interno según se describe en el paso 2b para todas las muestras, controles y estándares de cuantificación que vaya a analizar.

2a. El control interno ya se ha añadido al procedimiento de purificación (consulte el apartado «Control interno», en la página 12). En este caso, prepare una master mix según se indica en la tabla 2.

La mezcla de reacción suele contener todos los componentes necesarios para la PCR, excepto la muestra.

Tabla 2. Preparación de la master mix (control interno utilizado para controlar la purificación del ADN y comprobar una posible inhibición de la PCR).

Componente	1 reacción	12 reacciones
HAdV RG Master A	5 µl	60 µl
HAdV RG Master B	15 µl	180 µl
Volumen total	20 µl	240 µl

2b. El control interno debe añadirse directamente a la mezcla de los reactivos HAdV RG Master A y HAdV Master B. En este caso, prepare una master mix tal como se indica en la tabla 3.

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

Tabla 3. Preparación de la master mix (control interno utilizado exclusivamente para comprobar una posible inhibición de la PCR).

Componente	1 reacción	12 reacciones
HAdV RG Master A	5 µl	60 µl
HAdV RG Master B	15 µl	180 µl
HAdV RG IC	1 µl	12 µl
Volumen total	21 µl	252 µl

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

3. Pipetee 20 µl de la master mix en cada tubo de PCR. A continuación, añada 10 µl del ADN eluido de la muestra y mezcle bien mediante pipeteo repetido ascendente y

descendente. Del mismo modo, añada 10 µl de un control positivo o de un estándar de cuantificación o 10 µl de agua (agua apta para PCR) como control negativo.

Asegúrese de tener al menos un control positivo y un control negativo para cada test. Para la cuantificación, utilice los 4 estándares de cuantificación (QS1-QS4).

4. Cierre los tubos de PCR. Asegúrese de que el anillo de bloqueo (acesorio del instrumento Rotor-Gene Q) está colocado en la parte superior del rotor.
5. Para la detección de ADN específico del AdvH, cree un perfil de temperatura siguiendo los pasos que se indican a continuación.

Configuración de los parámetros generales del test	Figuras 1, 2, 3, 4
Activación inicial de la enzima <i>hot-start</i>	Figura 5
Amplificación del ADN	Figura 6
Ajuste de la sensibilidad de los canales de fluorescencia	Figura 7
Inicio del test	Figura 8

Todas las especificaciones hacen referencia a la versión 2.3.1 y versiones superiores del software Rotor-Gene Q. Puede encontrar más información acerca de la programación de los instrumentos Rotor-Gene Q en el manual del usuario del instrumento. En las ilustraciones, estos valores de configuración aparecen recuadrados en negrita.

6. En primer lugar, abra el cuadro de diálogo **New Run Wizard** (Asistente para un nuevo test) con la versión **Advanced** (Avanzada) y seleccione **Two Step** (Dos pasos) (figura 1). Haga clic en **Next** (Siguiente) para continuar.

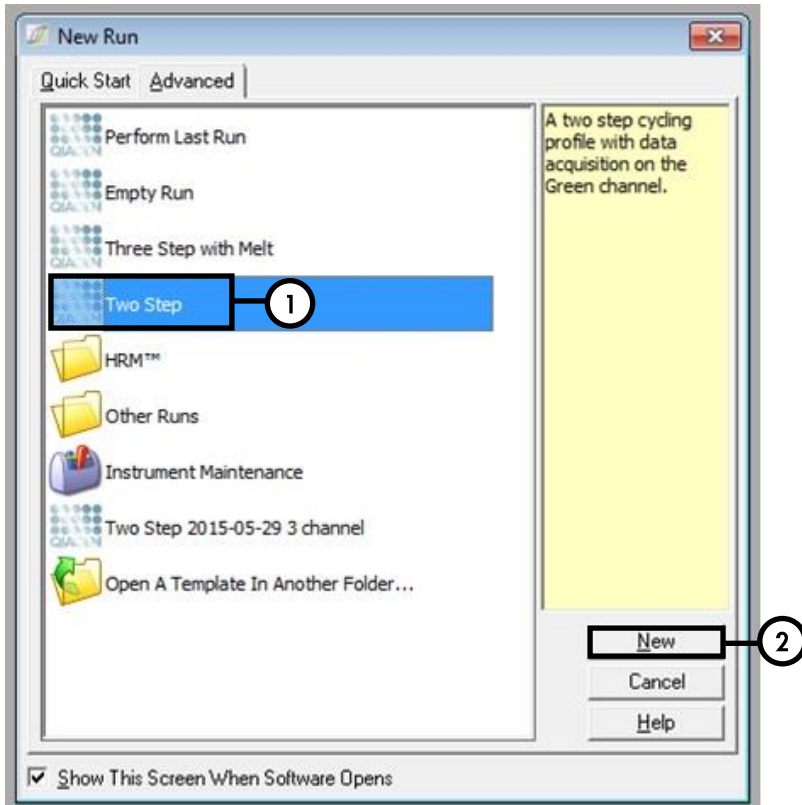


Figura 1. Cuadro de diálogo New Run (Nuevo test).

7. En el siguiente cuadro de diálogo **New Run Wizard** (figura 2), marque la casilla **Locking Ring Attached** (Anillo de bloqueo acoplado) y haga clic en **Next**.

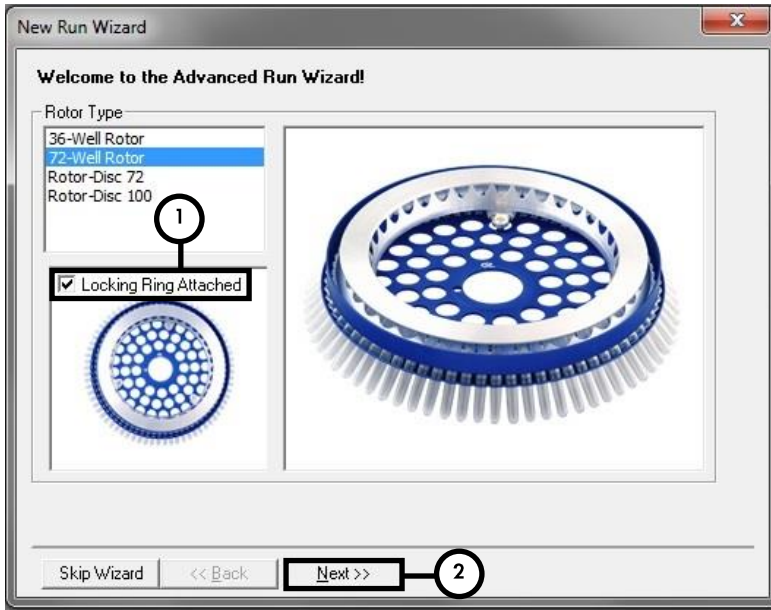


Figura 2. Cuadro de diálogo New Run Wizard.

8. Seleccione **30** para el volumen de reacción de PCR y haga clic en **Next** (figura 3).

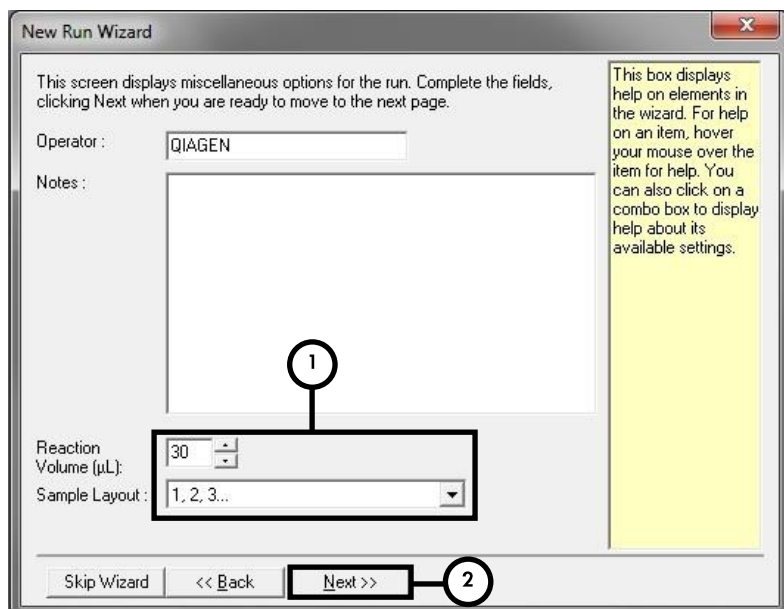


Figura 3. Configuración de los parámetros generales del test.

9. Haga clic en el botón **Edit Profile** (Editar perfil) en el siguiente cuadro de diálogo **New Run Wizard** (figura 4) y programe el perfil de temperatura tal como se muestra en las figuras 5-6.

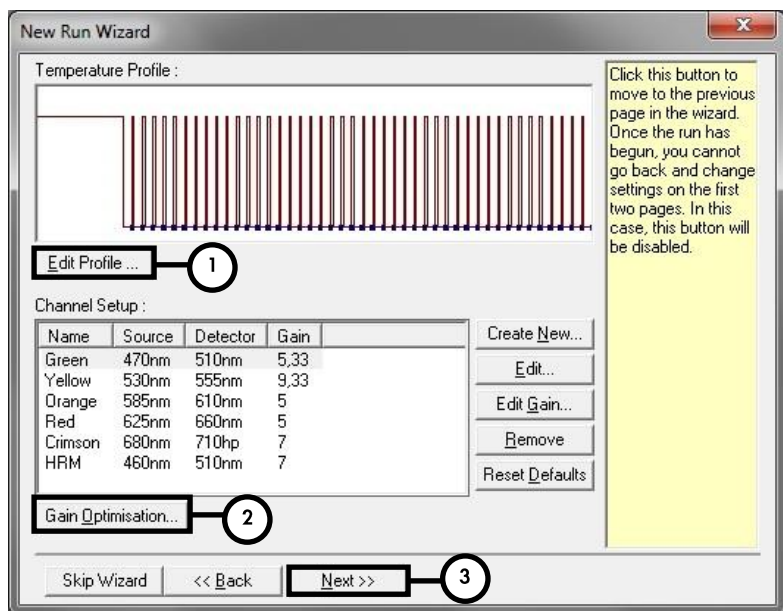


Figura 4. Edición del perfil.

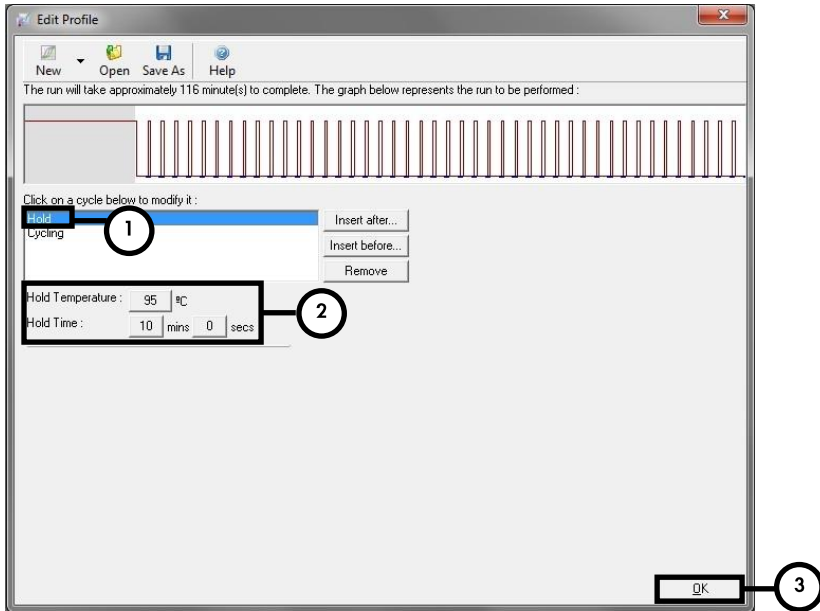


Figura 5. Activación inicial de la enzima *hot-start*.

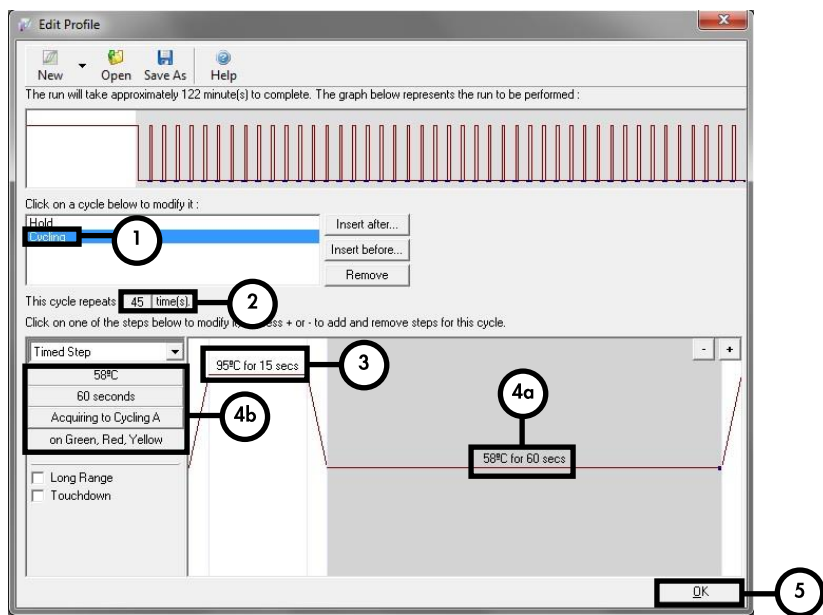


Figura 6. Amplificación del ADN.

10. El rango 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 del aumento de señal) en el cuadro de diálogo **New Run Wizard** (consulte la figura 4, paso 2) para abrir el cuadro de diálogo **Auto-Gain Optimisation Setup** (Configuración automática de la optimización del aumento de señal) (figura 7). Marque la casilla **Perform Optimisation Before 1st Acquisition** (Realizar optimización antes de la primera detección) (figura 7). Asegúrese de que estén seleccionados los dos canales (Green y Yellow) para **Auto-Gain Optimisation** (Optimización automática del aumento de señal) (figura 7). (Busque los canales en el menú desplegable debajo de **Channel Settings** [Configuración de canales] y haga clic en **Add** [Añadir]). Haga clic en **Close** (Cerrar) en el cuadro de diálogo **Auto-Gain Optimisation Setup** una vez finalizada la calibración del aumento de señal.

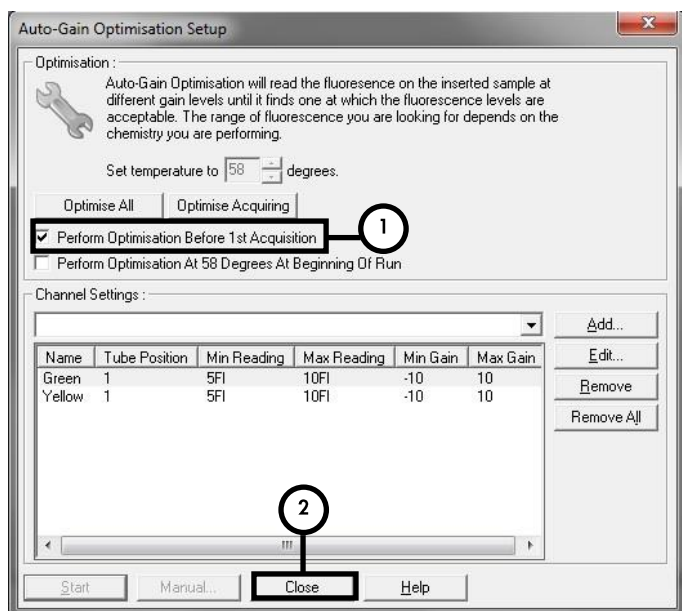


Figura 7. Ajuste de la sensibilidad de los canales de fluorescencia.

11. Los valores de aumento de señal determinados por la calibración de los canales se guardan automáticamente y se muestran en la última ventana de menú del procedimiento de programación (figura 8). Haga clic en **Start Run** (Iniciar test).

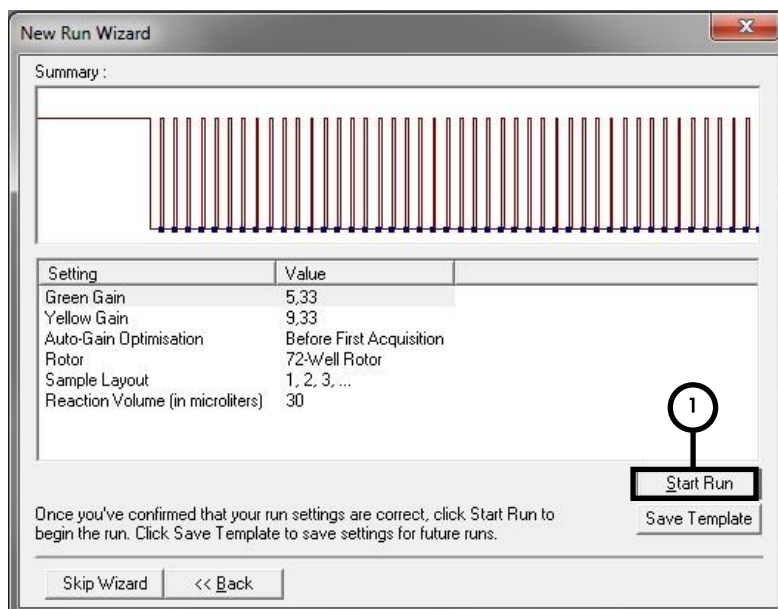


Figura 8. Inicio del test.

12. Una vez finalizado el test, analice los datos (consulte el apartado «Interpretación de los resultados», en la página 25).

Interpretación de los resultados

Validez del test

Test cualitativo válido

Para que un test cualitativo sea considerado válido deben cumplirse las siguientes condiciones (tabla 4).

Tabla 4. Condiciones necesarias para considerar un test cualitativo como válido.

Nombre del control	Canal de detección	
	Cycling Green	Cycling Yellow
Control positivo (QS)	POSITIVO	POSITIVO
Control negativo	NEGATIVO	POSITIVO

Test cualitativo no válido

Un test cualitativo no puede considerarse válido si no se ha completado o si no cumple alguna de las condiciones especificadas.

En caso de obtener un test cualitativo no válido, repita la PCR o extraiga de nuevo el ADN de las muestras originales en caso de no disponer de más ADN.

Test cuantitativo válido

Un test cuantitativo es considerado como válido si se cumplen todas las condiciones especificadas (consulte la tabla 4, arriba). Además, para obtener resultados cuantitativos exactos debe generarse una curva estándar válida. Para considerar un test cuantitativo válido, los parámetros de control de la curva estándar deben cumplir los siguientes valores (tabla 5).

Tabla 5. Parámetros de control para considerar como válida una curva estándar.

Parámetro de control	Valor válido
Pendiente	-3,743/-2,765
Eficiencia de la PCR	85%/130%
R al cuadrado (R ²)	> 0,98

Test cuantitativo no válido

Un test cuantitativo no es considerado como válido si no se ha completado o si no se cumple alguna de las condiciones especificadas.

En caso de obtener un test cuantitativo no válido, repita la PCR o extraiga de nuevo el ADN de las muestras originales en caso de no disponer de más ADN.

Análisis cualitativo

En la tabla 6 se muestra un resumen de la interpretación de los resultados.

Tabla 6. Resumen de la interpretación de los resultados.

Nombre de la muestra	Canal de detección		Interpretación de los resultados
	Cycling Green	Cycling Yellow	
A	POSITIVO	POSITIVO*	Se ha detectado ADN específico del AdvH.
B	NEGATIVO	POSITIVO	No se ha detectado ADN específico del AdvH. La muestra no contiene cantidades detectables de ADN específico del AdvH.
C	NEGATIVO	NEGATIVO	Inhibición de la PCR o fallo de los reactivos. Repita el procedimiento utilizando la muestra original o recoja y analice una nueva muestra.

* La detección del control interno en el canal de detección Cycling Yellow no es necesaria para obtener resultados positivos en el canal de detección Cycling Green. Una carga alta del AdvH en la muestra puede dar lugar a una disminución o a la ausencia de señales del control interno.

Análisis cuantitativo

El *artus* HAdV RG PCR Kit contiene 4 estándares de cuantificación (QS). Para generar una curva estándar para el análisis cuantitativo, estos deben definirse como estándares con las concentraciones adecuadas (consulte la tabla 1, en la página 11). Puede generarse una curva estándar para el análisis cuantitativo utilizando estándares de concentraciones conocidas.

$$C_T = m \log(N_0) + b$$

- C_T = ciclo umbral (*threshold cycle*)
- m = pendiente
- N_0 = concentración inicial

- b = intersección

Las concentraciones de muestras positivas de concentración desconocida pueden derivarse a partir de la curva estándar (figura 9).

$$N_0 = 10^{(C_T - b)/m}$$

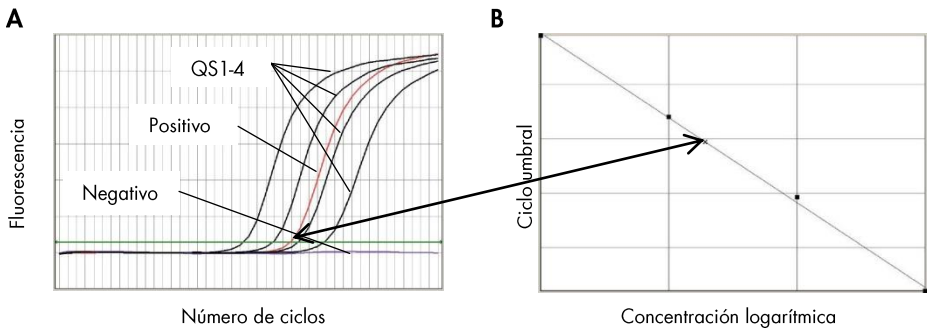


Figura 9. Estándares de cuantificación, una muestra negativa y una muestra positiva mostrados en (A) un gráfico de amplificación y (B) un análisis de una curva estándar.

Nota: La concentración de la muestra se representa en copias/ μ l y hace referencia a la concentración de ADN viral en el eluido.

Utilice la siguiente fórmula para determinar la carga viral de la muestra original.

$$\text{Carga viral (muestra)} \quad [\text{copias/m}] = \frac{\text{Volumen (eluido)} \quad [\mu\text{l}] \times \text{carga viral (eluido)} \quad [\text{copias}/\mu\text{l}]}{\text{Volumen de la muestra} \quad [\text{ml}]}$$

Limitaciones

- El uso de este producto está limitado a personal especialmente formado y cualificado en las técnicas de PCR en tiempo real y en procedimientos de diagnóstico *in vitro*.
- Es esencial usar buenas prácticas de laboratorio para obtener un rendimiento adecuado de este producto.
- Extreme las precauciones para preservar la pureza de los componentes del kit y la preparación de las reacciones. Vigile estrechamente la posible presencia de impurezas y contaminación en todos los reactivos. Deseche los reactivos de los que se sospeche que puedan estar contaminados.
- Para obtener el rendimiento óptimo de este producto se requieren procedimientos adecuados de recogida, transporte, conservación y procesamiento de las muestras.
- No utilice este producto directamente en combinación con la muestra. Realice los procedimientos pertinentes de extracción de ácidos nucleicos antes de usar este producto.
- La presencia de inhibidores de la PCR puede causar resultados negativos falsos o no válidos.
- La presencia de posibles mutaciones en las regiones diana del genoma del AdVH cubiertas por los *primers* o por las sondas empleados en el kit puede resultar en la incapacidad de detección de los mismos.
- Como en el caso de cualquier test diagnóstico, interprete los resultados obtenidos con el *artus* HAdV RG PCR Kit teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

Control de calidad

Cada lote del *artus* HAdV RG PCR Kit se analiza frente a especificaciones predeterminadas para garantizar una calidad homogénea del producto.

Características de rendimiento

Debido a que no se dispone de ningún estándar internacional para el adenovirus, la evaluación cuantitativa del rendimiento del *artus* HAdV RG PCR Kit se realizó utilizando ADN genómico de un aislado de AdVH-3 caracterizado (especie B).

Para la evaluación cualitativa del rendimiento, se analizó ADN genómico de las especies A-F del adenovirus utilizando el *artus* HAdV RG PCR Kit. El ADN genómico se obtuvo de la ATCC® (American Type Culture Collection, Colección estadounidense de cultivos tipo) y a partir de aislados de cultivos celulares caracterizados. Para el análisis de la especie G (serotipo AdVH-52), se utilizó un plásmido que contenía la secuencia diana correspondiente (tabla 7).

Tabla 7. Especies y serotipos de adenovirus analizados con el *artus* HAdV RG PCR Kit.

Especie de AdVH	Serotipo de AdVH	Origen	Resultado con el <i>artus</i> HAdV RG PCR Kit
Especie A	AdVH-12	ATCC-VR-863D	Positivo
	AdVH-31	Aislado caracterizado a partir de un cultivo celular	Positivo
	AdVH-18	Plásmido	Positivo
Especie B1	AdVH-3	ATCC-VR-3, ATCC-VR-857D	Positivo
	AdVH-7	Plásmido	Positivo
Especie B2	AdVH-35	ATCC-VR-718D	Positivo
	AdVH-11	Aislado caracterizado a partir de un cultivo celular	Positivo
	AdVH-55	Plásmido	Positivo
Especie C	AdVH-1	ATCC-VR-1	Positivo
	AdVH-2	Plásmido	Positivo
	AdVH-5	ATCC-VR-5D	Positivo
	AdVH-6	Aislado caracterizado a partir de un cultivo celular	Positivo
Especie D	AdVH-37	ATCC-VR-929D	Positivo
	AdVH-19	Plásmido	Positivo
Especie E	AdVH-4	ATCC-VR-1572D	Positivo
Especie F	AdVH-41	ATCC-VR-930D	Positivo
Especie G	AdVH-52	Plásmido	Positivo

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica del *artus* HAdV RG PCR Kit se define como la concentración (copias por μl del eluido) de ADN específico del AdVH que puede detectarse con una tasa de positividad $\geq 95\%$. La sensibilidad analítica se determinó por medio de un análisis de una serie de diluciones de ADN genómico cuantificado de adenovirus (grupo B, subtipo 3) (tabla 8).

Tabla 8. Resultados de PCR utilizados para calcular la sensibilidad analítica del *artus* HAdV RG PCR Kit.

Concentración (copias/ μl)	Número de replicados	Número de positivos	Tasa de positivos (%)	Control interno
31,6	18	18	100	Válido
10,0	18	18	100	Válido
3,2	18	18	100	Válido
1,0	18	18	100	Válido
0,3	18	12	67	Válido
0,1	18	7	39	Válido
0,03	18	3	17	Válido
0,01	18	1	6	Válido
0,003	18	0	0	Válido

La sensibilidad analítica del *artus* HAdV RG PCR Kit, determinada por medio de un análisis probit, para la detección de ADN específico del AdVH es de 1,07 copias/ μl (intervalo de confianza [IC] del 95%: 0,58-2,99 copias/ μl).

Especificidad analítica

La especificidad analítica del *artus* HAdV RG PCR Kit se garantiza mediante una selección meticulosa de los oligonucleótidos (*primers* y sondas). Los oligonucleótidos se comprueban mediante un análisis comparativo de secuencias frente a secuencias disponibles descritas públicamente para garantizar la detección de todos los genotipos relevantes de adenovirus.

La especificidad analítica del *artus* HAdV RG PCR Kit se evaluó mediante el análisis de un panel de ADN/ARN genómico extraído de otros patógenos que causan síntomas similares a los de las infecciones por adenovirus y mediante el análisis de ADN genómico humano (tabla 9).

Tabla 9. Microorganismos analizados para demostrar la especificidad analítica del *artus* HAdV RG PCR Kit.

Microorganismo	Canal de detección	
	Cycling Green (AdVH)	Cycling Yellow (IC)
ADN genómico humano	Negativo	Válido
Virus de la varicela-zóster	Negativo	Válido
Virus del herpes simple 1	Negativo	Válido
Virus del herpes simple 2	Negativo	Válido
Virus de Epstein-Barr	Negativo	Válido
Virus del herpes humano 6 (A, B)	Negativo	Válido
Virus del herpes humano 7	Negativo	Válido
Citomegalovirus	Negativo	Válido
Virus BK	Negativo	Válido
Virus JC	Negativo	Válido
Virus simio 40	Negativo	Válido

Microorganismo	Canal de detección	
	Cycling Green (AdVH)	Cycling Yellow (IC)
Virus de la hepatitis A	Negativo	Válido
Virus de la hepatitis B	Negativo	Válido
Virus de la hepatitis C	Negativo	Válido
Virus de la inmunodeficiencia humana 1	Negativo	Válido
Parvovirus B19	Negativo	Válido
<i>Escherichia coli</i> (EHEC)	Negativo	Válido
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Negativo	Válido
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Negativo	Válido
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Negativo	Válido
<i>Neisseria meningitidis</i>	Negativo	Válido
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Negativo	Válido

Microorganismo	Canal de detección	
	Cycling Green (AdVH)	Cycling Yellow (IC)
<i>Haemophilus influenzae</i>	Negativo	Válido
Coronavirus	Negativo	Válido
Virus de la gripe A (incl. H1N1-2009), B	Negativo	Válido
Virus respiratorio sincitial A, B	Negativo	Válido
Virus de parainfluenza 1-4	Negativo	Válido
Metaneumovirus humano	Negativo	Válido
Rinovirus	Negativo	Válido

El *artus* HAdV RG PCR Kit no presentó reactividad cruzada con ninguno de los microorganismos especificados.

Rango lineal

El rango lineal del *artus* HAdV RG PCR Kit se evaluó analizando una serie de diluciones logarítmicas de ADN genómico cuantificado del AdVH-2 (especie C) utilizando concentraciones de 1×10^9 copias/ μ l a 0,1 copias/ μ l. Se analizaron 6 replicados por dilución.

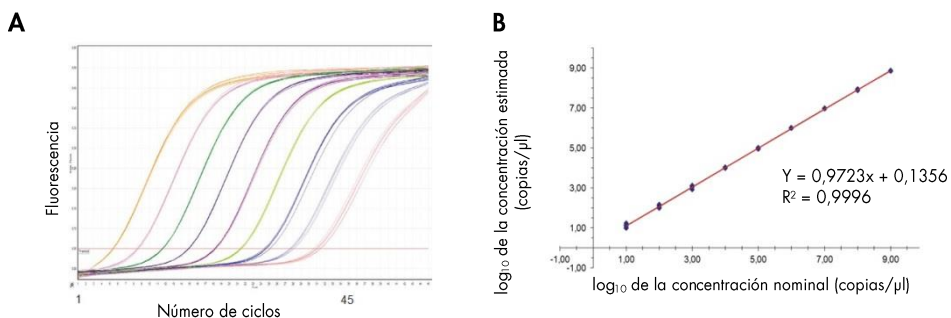


Figura 10. Curva de amplificación (A) y análisis de regresión lineal (B) de una serie de diluciones de ADN genómico del AdVH-2 (especie C).

El rango lineal del *artus* HAdV RG PCR Kit se extiende sobre un rango de al menos 8 órdenes de magnitud para el ADN específico del AdVH.

Precisión

La precisión del *artus* HAdV RG PCR Kit se determinó por medio de la variabilidad intraensayo (variabilidad en un experimento), la variabilidad interensayo (variabilidad entre experimentos diferentes) y la variabilidad interlote (variabilidad entre lotes de producción diferentes).

Los datos de variabilidad se expresan en términos de desviación estándar y coeficiente de variación. Los datos se basan en resultados cuantitativos de concentraciones definidas de ADN genómico del AdvH y en los valores de ciclo umbral (C_T) en el caso del control interno (tablas 10 y 11, respectivamente). Se analizaron al menos 6 replicados por muestra para determinar la variabilidad intraensayo, interensayo e interlote. La varianza total se calculó combinando los tres análisis.

Tabla 10. Datos de precisión para el sistema de detección específico del ADN del AdvH del *artus* HAdV RG PCR Kit.

Sistema específico del AdvH	Concentración media (copias/ μ l)	Desviación estándar	Coficiente de variación (%)
Variabilidad intraensayo	26,88	4,87	18,13
Variabilidad interensayo	35,11	8,65	24,63
Variabilidad interlote	27,39	4,65	16,97
Varianza total	32,37	8,44	26,09

Tabla 11. Datos de precisión para el control interno del *artus* HAdV RG PCR Kit.

Control interno	Ciclo umbral (C _T) medio	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)
Variabilidad intraensayo	21,97	0,15	0,67
Variabilidad interensayo	22,12	0,19	0,87
Variabilidad interlote	22,05	0,25	1,12
Varianza total	22,02	0,22	0,99

Evaluación diagnóstica

La sensibilidad y la especificidad diagnósticas del *artus* HAdV RG PCR Kit se evalúan periódicamente analizando muestras de referencia y diagnósticas previamente analizadas con métodos de referencia (es decir, PCR interna, DFA, cultivo en viales de fondo plano [*shell vial*], microscopia electrónica, tecnología Luminex®). Hasta ahora se han analizado 223 muestras derivadas de frotis, aspirados nasofaríngeos, secreciones bronquiales, muestras de heces, muestras de orina, plasma o frotis de plasma u oculares obtenidos en diferentes laboratorios para determinar la sensibilidad y la especificidad diagnósticas del *artus* HAdV RG PCR Kit. De estas 223 muestras, 50 se clasificaron como positivas para el AdvH y 173 se clasificaron como negativas para el AdvH con los métodos de referencia (tabla 12). Cuatro muestras que habían tenido previamente un resultado negativo para el AdvH con un test de PCR interno tuvieron un resultado positivo para el AdvH (valores de C_T de 35,2, 36,8, 40,0 y 37,9) con el *artus* HAdV RG PCR Kit. Las 50 muestras clasificadas como positivas para el ADN del AdvH se confirmaron como positivas en el análisis con el *artus* HAdV RG PCR Kit.

Tabla 12. Evaluación diagnóstica del *artus* HAdV-6 RG PCR Kit.

		<i>artus</i> HAdV RG PCR Kit	
		NEGATIVO	POSITIVO
Método de referencia	NEGATIVO	169	4*
	POSITIVO	0	50

* Valores de C_T : 35,2, 36,8, 40,0 y 37,9.

Repetibilidad

La especificidad, la sensibilidad y la exactitud de la cuantificación del *artus* HAdV RG PCR Kit se evaluaron analizando muestras de un programa de evaluación externa de la calidad (Proficiency Panel) establecido para adenovirus. Para garantizar la repetibilidad del *artus* HAdV RG PCR Kit, la especificidad y la sensibilidad se evalúan periódicamente mediante la participación en programas de evaluación externa de la calidad establecidos para adenovirus así como muestras diagnósticas caracterizadas.

Tabla 13. Resultados del análisis de un programa de evaluación externa de la calidad (Proficiency Panel) para el AdvH (QCMD) con el *artus* HAdV RG PCR Kit.

Identificación de la muestra	Proficiency Panel		<i>artus</i> HAdV RG PCR Kit	
	Contenido de la muestra	Concentración esperada (copias/ml)	Resultado	Control interno
14-01	AdvH-1	2.793	Positivo	Válido
14-02	AdvH-1	13.213	Positivo	Válido
14-03	AdvH-1	2.793	Positivo	Válido
14-04	AdvH-1	4.093	Positivo	Válido
14-05	AdvH-4	2.032	Positivo	Válido
14-06	AdvH-4	21.281	Positivo	Válido
14-07	Negativo	0	Negativo	Válido
14-08	AdvH-14	426.580	Positivo	Válido
14-09	AdvH-5	241	Positivo	Válido
14-10	AdvH-5	1.820	Positivo	Válido

Símbolos

En estas instrucciones de uso se utilizan los símbolos mostrados en la tabla siguiente.

Símbolo

Definición del símbolo



96

Contenido suficiente para 96 tests



Producto sanitario para diagnóstico *in vitro*








Número de catálogo



Número de lote



Limitación de temperatura

Símbolo	Definición del símbolo
	Fabricante
	Fecha de caducidad
	Número de material
	Número mundial de artículo comercial (<i>Global Trade Item Number</i>)
	Consultar instrucciones de uso

Guía de resolución de problemas

Los científicos del servicio técnico de QIAGEN estarán siempre encantados de responder a cualquier pregunta que pueda usted tener sobre la información y los protocolos de este manual, así como sobre las tecnologías para el tratamiento de muestras y tests de biología molecular (para ver la información de contacto, visite www.qiagen.com).

Información para pedidos

Producto	Contenido	N.º cat.
<i>artus</i> HAdV RG PCR Kit (96)	Para 96 reacciones: Master A, Master B, 4 estándares de cuantificación, control interno, H ₂ O (agua apta para PCR)	4530265
QIAamp DNA Mini Kit (50)	Para 50 preparaciones de ADN: 50 columnas de centrifugación QIAamp Mini, proteinasa K, reactivos, tampones, tubos de recogida (2 ml)	51304
QIAamp DNA Mini Kit (250)	Para 250 preparaciones de ADN: 250 columnas de centrifugación QIAamp Mini, proteinasa K, reactivos, tampones, tubos de recogida (2 ml)	51306
Rotor-Gene Q y accesorios		
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Termociclador para PCR en tiempo real con 5 canales (green, yellow, orange, red, crimson), ordenador portátil, software, accesorios: incluye una 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 (green, yellow, orange, red, crimson), ordenador portátil, software, accesorios: incluye una garantía de 1 año para piezas y mano de obra, no incluye instalación ni formación

9002022

Producto	Contenido	N.º cat.
Rotor-Gene Q 5plex Priority Package Plus	Termociclador para PCR en tiempo real con 5 canales (green, yellow, orange, red, crimson), ordenador portátil, software, accesorios: incluye un Priority Package (paquete prioritario) con software, instalación, formación, una garantía de 3 años para piezas y mano de obra y 3 visitas de mantenimiento preventivo	9001866
Rotor-Gene Q 5plex Priority Package	Termociclador para PCR en tiempo real con 5 canales (green, yellow, orange, red, crimson), ordenador portátil, software, accesorios: incluye un Priority Package (paquete prioritario) con software, instalación, formación, una garantía de 2 años para piezas y mano de obra y 2 visitas de mantenimiento preventivo	9001865
Rotor-Gene Q 5plex System	Termociclador para PCR en tiempo real con 5 canales (green, yellow, orange, red, crimson), ordenador portátil, software, accesorios: incluye una 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 (green, yellow, orange, red, crimson), ordenador portátil, software, accesorios: incluye una garantía de 1 año para piezas y mano de obra, no incluye instalación ni formación	9001570

Producto	Contenido	N.º cat.
Rotor-Gene Q 6plex Priority Package Plus	Instrumento para PCR en tiempo real con 6 canales (blue, green, yellow, orange, red, crimson), ordenador portátil, software, accesorios: incluye un Priority Package con software, instalación, formación, una garantía de 3 años para piezas y mano de obra y 3 visitas de mantenimiento preventivo	9001870
Rotor-Gene Q 6plex Priority Package	Instrumento para PCR en tiempo real con 6 canales (blue, green, yellow, orange, red, crimson), ordenador portátil, software, accesorios: incluye un Priority Package con software, instalación, formación, una garantía de 2 años para piezas y mano de obra y 2 visitas de mantenimiento preventivo	9001869
Rotor-Gene Q 6plex System	Instrumento para PCR en tiempo real con 6 canales (blue, green, yellow, orange, red, crimson), ordenador portátil, software, accesorios: incluye una 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 (blue, green, yellow, orange, red, crimson), ordenador portátil, software, accesorios: incluye una garantía de 1 año para piezas y mano de obra, no incluye instalación ni formación	9001590

Producto	Contenido	N.º cat.
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
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

Acuerdo de licencia limitada para el *artus* HAAdV RG PCR Kit

La utilización de este producto implica por parte de cualquier comprador o usuario del producto la aceptación de los siguientes términos:

1. El producto puede utilizarse únicamente conforme a los protocolos suministrados con el producto y a este manual y para su uso exclusivo con los componentes incluidos en el kit. QIAGEN no ofrece licencia alguna bajo ninguna de sus propiedades intelectuales para incorporar o utilizar los componentes contenidos en este kit con componentes no incluidos en el mismo, excepto según se describe en los protocolos proporcionados con el producto, en este manual y en los protocolos adicionales disponibles 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 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 niega específicamente 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.

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®, Sample to Insight®, QIAamp®, *artus*®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); ATCC® (American Type Culture Collection Corporation); FAM™, JOE™ (Life Technologies Corporation); Luminex® (Luminex Corporation).

HB-2010-001

© 2015 Altona Diagnostics GmbH, todos los derechos reservados.

Pedidos www.qiagen.com/contact | Asistencia técnica support.qiagen.com | Sitio web www.qiagen.com

