

# Manual de uso del *artus*<sup>®</sup> Parvo B19 RG PCR Kit



24 (ref. 4504263)

Diagnóstico *in vitro* cuantitativo

Para utilizar con el *instrumento Rotor-Gene*<sup>®</sup> Q

Junio 2018 – Versión 1



4504263, 4504265



1112933 ES



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALEMANIA

R4

MAT

1112933 ES



## **QIAGEN Sample and Assay Technologies**

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

### **QIAGEN sienta las bases de excelencia en los siguientes campos:**

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

Nuestra misión es ayudarle a superar sus retos y a alcanzar un éxito excepcional. Para más información, visite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

# Índice

<b>1. Contenido.....</b>	<b>5</b>
<b>2. Almacenamiento.....</b>	<b>5</b>
<b>3. Materiales y dispositivos adicionales necesarios .....</b>	<b>6</b>
<b>4. Precauciones generales .....</b>	<b>6</b>
<b>5. Uso previsto.....</b>	<b>7</b>
<b>6. Información sobre el patógeno.....</b>	<b>7</b>
<b>7. Principio de la PCR en tiempo real.....</b>	<b>7</b>
<b>8. Descripción del producto .....</b>	<b>8</b>
<b>9. Protocolo.....</b>	<b>8</b>
9.1 Aislamiento del ADN .....	8
9.2 Control interno.....	11
9.3 Cuantificación.....	12
9.4 Preparación de la PCR.....	13
9.5 Programación del instrumento <i>Rotor-Gene Q</i> .....	18
<b>10. Análisis de los datos.....</b>	<b>23</b>
<b>11. Solución de problemas.....</b>	<b>25</b>
<b>12. Especificaciones .....</b>	<b>27</b>
12.1 Sensibilidad analítica.....	27
12.2 Especificidad .....	28
12.3 Precisión.....	29
12.4 Robustez .....	31
12.5 Reproducibilidad.....	31
<b>13. Limitaciones del uso del producto.....</b>	<b>32</b>
<b>14. Advertencias y precauciones .....</b>	<b>32</b>

<b>15. Control de calidad .....</b>	<b>33</b>
<b>16. Referencias citadas.....</b>	<b>33</b>
<b>17. Explicación de los símbolos .....</b>	<b>34</b>

## artus Parvo B19 RG PCR Kit

Para utilizar con el instrumento RotorGene Q.

### 1. Contenido

	Etiquetado y contenido	Ref. 4504263 24 reacciones
<b>Azul</b>	<i>Parvo B19 RG/TM Master</i>	2 x 12 reacciones
<b>Rojo</b>	<i>Parvo B19 RG/TM QS 1<sup>o</sup> 1 x 10<sup>5</sup> IU/μl</i>	1 x 200 μl
<b>Rojo</b>	<i>Parvo B19 RG/TM QS 2<sup>o</sup> 1 x 10<sup>4</sup> IU/μl</i>	1 x 200 μl
<b>Rojo</b>	<i>Parvo B19 RG/TM QS 3<sup>o</sup> 1 x 10<sup>3</sup> IU/μl</i>	1 x 200 μl
<b>Rojo</b>	<i>Parvo B19 RG/TM QS 4<sup>o</sup> 1 x 10<sup>2</sup> IU/μl</i>	1 x 200 μl
<b>Rojo</b>	<i>Parvo B19 RG/TM QS 5<sup>o</sup> 1 x 10<sup>1</sup> IU/μl</i>	1 x 200 μl
<b>Verde</b>	<i>Parvo B19 RG/TM IC<sup>o</sup></i>	1 x 1000 μl
<b>Blanco</b>	<i>Agua (de calidad para PCR)</i>	1 x 1.000 μl

QS = Quantitation Standard (Estándar de cuantificación)

IC = Internal Control (Control interno)

### 2. Almacenamiento

Los componentes del artus Parvo B19 RG PCR Kit deben almacenarse a una temperatura de  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  y son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Deben evitarse los ciclos repetidos de descongelación y congelación ( $> 2$ ), ya que pueden reducir la sensibilidad. Si se piensa utilizar los reactivos de forma intermitente, deberán congelarse en fracciones alícuotas. La conservación a  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$  no debe superar un período de cinco horas.

### 3. Materiales y dispositivos adicionales necesarios

- Guantes de laboratorio sin talco desechables
- Kit de aislamiento de ADN (consulte el **apartado 9.1 Aislamiento del ADN**)
- Pipetas (ajustables)
- Puntas de pipeta estériles con filtro
- Agitador vorticial
- Centrifugadora de mesa con rotor para tubos de reacción de 2 ml
- *Instrumento Rotor-Gene Q* con versión de software 2.3 o superior
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, para uso con un rotor de 72 pocillos (n.º de referencia 981103 o 981106)
- Bloque de refrigeración (Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, n.º de referencia 9018901)

### 4. Precauciones generales

El usuario debe tener en cuenta siempre las siguientes indicaciones:

- Utilice puntas de pipeta estériles con filtro.
- Almacene y extraiga los materiales positivos (muestras, controles y amplicones) por separado de todos los demás reactivos y añádalos a la mezcla de reacción en un área separada espacialmente.
- Descongele por completo todos los componentes a temperatura ambiente antes de comenzar un ensayo.
- Una vez descongelados los componentes, mézclelos y centrifúgelos brevemente.
- Trabaje con rapidez en hielo o en el bloque de refrigeración (bloque de carga de 72 pocillos).

## 5. Uso previsto

El artus Parvo B19 RG PCR Kit es una prueba de amplificación de ácidos nucleicos *in vitro* para la detección y la cuantificación del ADN del parvovirus B19 en suero humano o plasma con EDTA. El kit emplea la reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction, PCR) en tiempo real y está configurado para su uso con el QIAamp UltraSens Virus Kit, el QIAamp DNA Mini Kit y el instrumento Rotor-Gene Q.

No debe utilizarse el kit como prueba de cribado de sangre/hemoderivados para detectar casos de infección por el parvovirus B19. El artus Parvo B19 RG PCR Kit está diseñado para el uso en diagnóstico *in vitro* por parte de profesionales sanitarios.

## 6. Información sobre el patógeno

La mayoría de las infecciones por el parvovirus B19 son clínicamente asintomáticas. Los síntomas de una infección aguda por el parvovirus B19 son similares a los de la gripe, pero también pueden asemejarse a los de la rubéola y, especialmente en los adultos, a los del reumatismo. El parvovirus B19 es una causa muy importante de crisis aplásica en pacientes con anemia hemolítica. En ocasiones se observan complicaciones fetales graves, especialmente después de infecciones maternas durante el segundo y el tercer trimestres.

## 7. Principio de la PCR en tiempo real

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

acumula sin tener que volver a abrir los tubos de reacción una vez finalizada la serie de PCR (Mackay, 2004).

## 8. Descripción del producto

El *artus* Parvo B19 RG PCR Kit es un sistema listo para usar para la detección del ADN del parvovirus B19 mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en el *instrumento Rotor-Gene Q*. La *Parvo B19 RG/TM Master* contiene los reactivos y las enzimas necesarios para la amplificación específica de una región de 76 pb del genoma del parvovirus B19, así como para la detección directa del amplicón específico en el canal de fluorescencia Cycling A.Green (Ciclado A. Verde) del *instrumento Rotor-Gene Q*. Además, el *artus* Parvo B19 RG PCR Kit contiene un segundo sistema de amplificación heterógeno para identificar una posible inhibición de la PCR. Esto se detecta como *control interno (Internal Control, IC)* en el canal de fluorescencia Cycling A.Yellow (Ciclado A. Amarillo). El límite de detección de la PCR analítica del parvovirus B19 (consulte el **apartado 12.1 Sensibilidad analítica**) no se ve disminuido. Se suministran controles positivos externos (*Parvo B19 RG/TM QS 1-5*) que permiten determinar la carga patógena. Si desea obtener más información, consulte el **apartado 9.3 Cuantificación**.

## 9. Protocolo

### 9.1 Aislamiento del ADN

Diversos fabricantes ofrecen kits de aislamiento de ADN. Las cantidades de muestra para el procedimiento de aislamiento de ADN dependen del protocolo utilizado. Realice el aislamiento de ADN conforme a las instrucciones del fabricante. Se recomiendan los siguientes kits de aislamiento:



Material de muestra	Kit de aislamiento de ácidos nucleicos	Número de referencia	Fabricante	ARN transportador
Suero, plasma	QIAamp® UltraSens® Virus Kit (50)	53 704	QIAGEN	incluido
	QIAamp DNA Mini Kit (50)	51 304	QIAGEN	no incluido

- La utilización de **ARN transportador** es esencial para la eficiencia de la extracción y, por consiguiente, para el rendimiento en la obtención de ADN/ARN. Si el kit de aislamiento seleccionado no contiene ARN transportador, tenga en cuenta que se recomienda enérgicamente la adición del transportador (RNA-Homopolymer Poly(A), Amersham Biosciences, ref. 27-4110-01) para la extracción de ácidos nucleicos a partir de líquidos corporales acelulares y de material con un contenido bajo de ADN/ARN (p. ej., LCR). En estos casos haga lo siguiente:
  - a) Ponga de nuevo en suspensión el ARN transportador liofilizado utilizando el tampón de elución (no utilice tampón de lisis) del kit de extracción (p. ej., tampón AE del kit QIAamp DNA Mini) y prepare una dilución con una concentración de 1 µg/µl. Divida esta solución de ARN transportador en un número de fracciones alícuotas adecuado para sus necesidades y almacénelas a una temperatura de -15 °C a -30 °C. Evite la descongelación repetida (> 2 veces) de una fracción alícuota de ARN transportador.
  - b) Utilice 1 µg de ARN transportador por 100 µl de tampón de lisis. Por ejemplo, si el protocolo de extracción sugiere 200 µl de tampón de lisis, añada 2 µl de ARN transportador (1 µg/µl) directamente al tampón de lisis. Antes de comenzar cada extracción, debe prepararse una mezcla de tampón de lisis y ARN transportador (y de *control interno*, cuando proceda; consulte el **apartado 9.2 Control interno**) en fresco conforme al siguiente esquema de pipeteo:

Número de muestras	1	12
Tampón de lisis	p. ej., 200 µl	p. ej., 2.400 µl
ARN transportador (1 µg/µl)	2 µl	24 µl
<b>Volumen total</b>	<b>202 µl</b>	<b>2424 µl</b>
<b>Volumen por extracción</b>	<b>200 µl</b>	<b>200 µl cada una</b>

- c) Utilice la mezcla preparada en fresco de tampón de lisis y ARN transportador inmediatamente para la extracción. No se puede almacenar la mezcla.
- La utilización de **ARN transportador** es esencial para la eficiencia de la extracción y, por consiguiente, para el rendimiento en la obtención de ADN/ARN. Para aumentar la estabilidad del ARN transportador proporcionado con el QIAamp UltraSens Virus Kit, recomendamos el siguiente procedimiento diferente del manual del usuario del kit de extracción:
    - a. Ponga en suspensión de nuevo el ARN transportador liofilizado antes del primer uso del kit de extracción en 310 µl del tampón de elución proporcionado con el kit (concentración final de 1 µg/µl, no utilice tampón de lisis). Divida esta solución de ARN transportador en un número de fracciones alícuotas adecuado para sus necesidades y almacénelas a una temperatura de  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Evite la descongelación repetida ( $> 2$  veces) de una fracción alícuota de ARN transportador.
    - b. Antes de comenzar cada extracción, debe prepararse una mezcla de tampón de lisis y ARN transportador (y de *control interno*, cuando proceda; consulte el **apartado 9.2 Control interno**) en fresco conforme al siguiente esquema de pipeteo:

Número de muestras	1	12
Tampón de lisis AC	800 µl	9600 µl
ARN transportador (1 µg/µl)	5,6 µl	67,2 µl
<b>Volumen total</b>	<b>805,6 µl</b>	<b>9667,2 µl</b>
<b>Volumen por extracción</b>	<b>800 µl</b>	<b>800 µl cada una</b>

- c. Utilice la mezcla preparada en fresco de tampón de lisis y ARN transportador inmediatamente para la extracción. No se puede almacenar la mezcla.
- Se recomienda eluir el ADN en 50 µl de tampón de elución para obtener la máxima sensibilidad del *artus* Parvo B19 RG PCR Kit.
  - El **QIAamp UltraSens Virus Kit** permite una concentración de la muestra. Si utiliza material de muestra distinto de suero o plasma, añada al menos un 50% (v/v) de plasma humano negativo a la muestra.
  - Si utiliza protocolos de aislamiento con tampones de lavado que contienen **etanol**, realice un paso de centrifugación adicional (tres minutos, 13.000 rpm) antes de la elución para eliminar los restos de etanol que pueda haber. Esto previene la posible inhibición de la PCR.
  - El *artus* Parvo B19 RG PCR Kit no debe utilizarse con métodos de aislamiento basados en el **fenol**.

**Importante:** El *control interno* del *artus* Parvo B19 RG PCR Kit puede utilizarse directamente en el procedimiento de aislamiento (consulte el **apartado 9.2 Control interno**).

## 9.2 Control interno

Se suministra un *control interno* (*Parvo B19 RG/TM IC*). Esto permite al usuario **controlar el procedimiento de aislamiento del ADN y comprobar una posible inhibición de la PCR** (consulte la Fig. 1). Para esta aplicación, añada el *control interno* durante el aislamiento en una proporción de 0,1 µl por 1 µl de volumen de elución. Por ejemplo, usando el QIAamp UltraSens Virus Kit, el ADN se eluye en 50 µl de tampón AVE. Por lo tanto, deben añadirse

inicialmente 5 µl del *control interno*. La cantidad de *control interno* utilizada depende **únicamente** del volumen de elución. El *control interno* y el ARN transportador (consulte el **apartado 9.1 Aislamiento del ADN**) deben añadirse únicamente

- a la mezcla de tampón de lisis y material de muestra o
- directamente al tampón de lisis

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

El *control interno* también puede utilizarse **exclusivamente para comprobar una posible inhibición de la PCR** (consulte la Fig. 2). Para esta aplicación, añada 2 µl del *control interno* por reacción directamente a 30 µl de la *mezcla maestra Parvo B19 RG/TM*. Utilice para cada reacción de PCR 30 µl de la mezcla maestra preparada tal como se ha descrito anteriormente\* y añada 20 µl de la muestra purificada. Si está preparando una serie de PCR para varias muestras, aumente el volumen de la *Parvo B19 RG/TM Master* y del *control interno* según el número de muestras (consulte el **apartado 9.4 Preparación de la PCR**).

### 9.3 Cuantificación

Los *estándares de cuantificación (Parvo B19 RG/TM QS 1-5)* incluidos se tratan como muestras previamente purificadas y se utiliza el mismo volumen (20 µl). Para generar una curva de estándares en el *instrumento Rotor-Gene Q*, utilice los cinco *estándares de cuantificación* y definalos en la ventana de menú *Edit Samples* (Editar muestras) como estándares con las

---

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

concentraciones especificadas (consulte el *manual del usuario de Rotor-Gene Q [Rotor-Gene Q User Manual]*). La curva de estándares generada tal como se ha indicado anteriormente también puede utilizarse para series subsiguientes, siempre que se utilice al menos un estándar de **una** concentración dada en la serie actual. Para ello, es necesario importar la curva de estándares previamente generada (consulte el *manual del usuario de Rotor-Gene Q*). Sin embargo, este método de cuantificación puede dar lugar a desviaciones en los resultados debido a la variabilidad entre diferentes series de PCR.

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

$$\text{Resultado en el material de muestra (UI/ml)} = \frac{\text{Resultado en el eluido (UI/μl) x volumen de elución (μl)}}{\text{Volumen de muestra (ml)}}$$

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

## 9.4 Preparación de la PCR

Asegúrese de que el bloque de refrigeración (accesorio del *instrumento Rotor-Gene Q*) está prerrefrigerado a +4 °C. Ponga el número deseado de tubos de PCR en el bloque de refrigeración. Asegúrese de que se incluya al menos un *estándar de cuantificación* y un control negativo (*agua de calidad para PCR*) para cada serie de PCR. Para generar una curva de estándares, utilice para cada serie de PCR todos los *estándares de cuantificación (Parvo B19 RG/TM QS 1-5)* suministrados. 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.

Si desea utilizar el *control interno* para controlar el procedimiento de aislamiento de ADN y comprobar una posible inhibición de la PCR, ya se ha añadido en el proceso de aislamiento (consulte el apartado 9.2 Control interno). En ese caso, utilice el siguiente esquema de pipeteo (puede ver un resumen esquemático en la Fig. 1):

	Número de muestras	1	12
1. Preparación de la mezcla maestra	<i>Parvo B19 RG/TM Master</i>	30 µl	360 µl
	<i>Parvo B19 RG/TM IC</i>	0 µl	0 µl
	<b>Volumen total</b>	<b>30 µl</b>	<b>360 µl</b>
2. Preparación del ensayo de PCR	Mezcla maestra	30 µl	30 µl (cada una)
	Muestra	20 µl	20 µl (cada una)
	<b>Volumen total</b>	<b>50 µl</b>	<b>50 µl (cada una)</b>

Si desea usar el *control interno exclusivamente* para comprobar una posible inhibición de la PCR, debe añadirlo directamente a la *mezcla maestra Parvo B19 RG/TM*. En ese caso, utilice el siguiente esquema de pipeteo (puede ver un resumen esquemático en la Fig. 2):

	Número de muestras	1	12
1. Preparación de la mezcla maestra	<i>Parvo B19 RG/TM Master</i>	30 µl	360 µl
	<i>Parvo B19 RG/TM IC</i>	2 µl	24 µl
	<b>Volumen total</b>	<b>32 µl*</b>	<b>384 µl</b>
2. Preparación del ensayo de PCR	Mezcla maestra	30 µl	30 µl (cada una)
	Muestra	20 µl	20 µl (cada una)
	<b>Volumen total</b>	<b>50 µl</b>	<b>50 µl (cada una)</b>

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

Pipetee 30 µl de la mezcla maestra en cada tubo de PCR. A continuación, añada 20 µl del ADN eluido de la muestra a cada tubo y mezcle bien mediante pipeteo ascendente y descendente varias veces. En correspondencia, deben usarse 20 µl de al menos uno de los *estándares de cuantificación (Parvo B19 RG/TM QS 1-5)* como control positivo y 20 µl de agua (*agua de calidad para PCR*) como control negativo. Cierre los tubos de PCR. Asegúrese de que el *anillo de bloqueo* (accesorio del *instrumento Rotor-Gene Q*) está colocado en la parte superior del rotor para prevenir la apertura accidental de los tubos durante el procesamiento.

## Adición del *control interno* al procedimiento de purificación

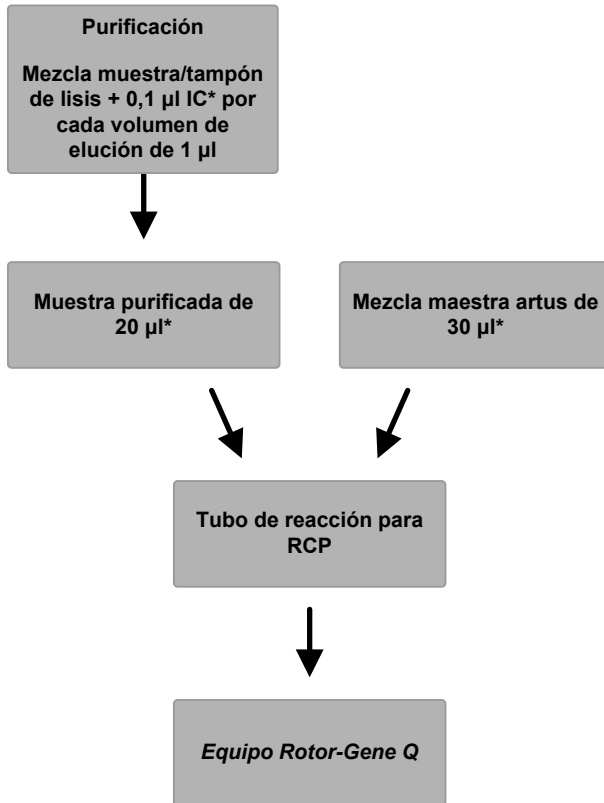


Fig. 1: Esquema del flujo de trabajo para el control del procedimiento de purificación y de la inhibición de la PCR.

\*Asegúrese de que las soluciones estén completamente descongeladas y bien mezcladas y de que hayan sido centrifugadas brevemente.



## Adición del control interno a la mezcla maestra artus

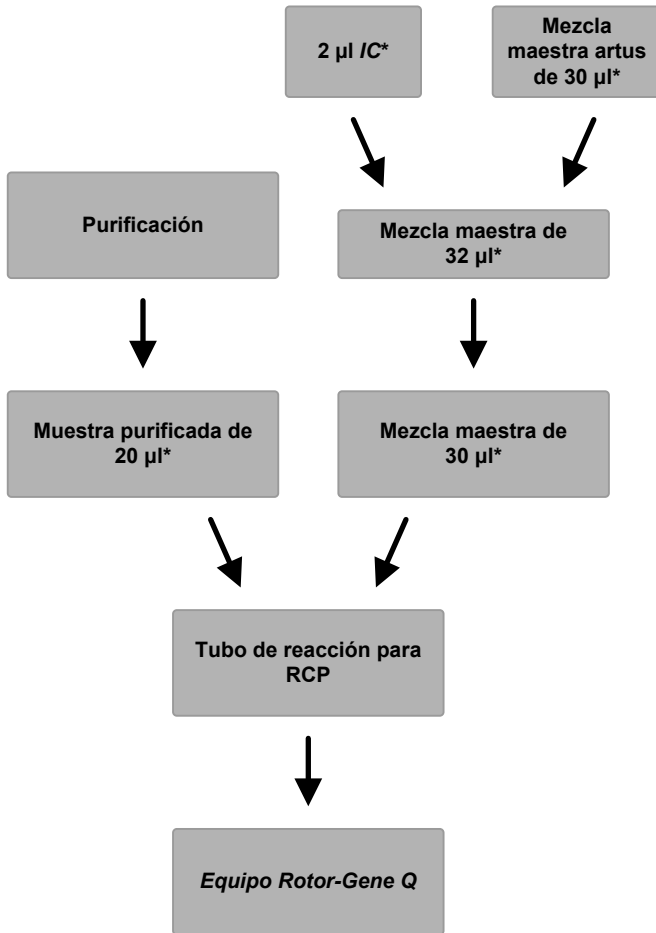


Fig. 2: Esquema del flujo de trabajo para el control de la inhibición de la PCR.

\*Asegúrese de que las soluciones estén completamente descongeladas y bien mezcladas y de que hayan sido centrifugadas brevemente.

## 9.5 Programación del instrumento *Rotor-Gene Q*

Para la detección del ADN del Parvo B19, cree un perfil de temperatura en el *instrumento Rotor-Gene Q* siguiendo los cinco pasos indicados a continuación (consulte la Fig. 4- 7).

- |    |                                                                  |        |
|----|------------------------------------------------------------------|--------|
| A. | Configuración de los parámetros generales del ensayo             | Fig. 4 |
| B. | Activación inicial de la enzima hot-start (arranque en caliente) | Fig. 5 |
| C. | Amplificación del ADN                                            | Fig. 6 |
| D. | Ajuste de la sensibilidad de los canales de fluorescencia        | Fig. 7 |
| E. | Inicio de la serie en el <i>instrumento Rotor-Gene Q</i>         | Fig. 8 |

Todas las especificaciones hacen referencia a la versión 2.3 del software *Rotor-Gene*. Puede encontrar más información sobre la programación del *instrumento Rotor-Gene Q* en el *manual del usuario Rotor-Gene Q*.

En primer lugar, seleccione “Empty Run” (Serie vacía) en la pestaña Advanced (Avanzado) del cuadro de diálogo “New Run” (Serie nueva). En el panel “Rotor Type” (Tipo de rotor), seleccione “72-Well Rotor” (Rotor de 72 pocillos), marque el cuadro “Locking Ring Attached” (Anillo de bloqueo acoplado) y haga clic en “Next” (Siguiente).

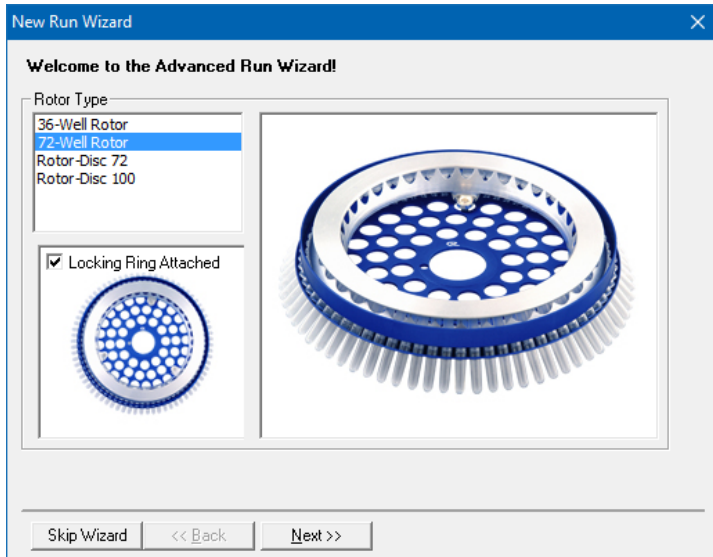


Fig. 3: Pantalla de inicio “New Run Wizard” (Asistente para series nuevas).

A continuación, introduzca el volumen de reacción de PCR en la siguiente ventana de menú *New Run Wizard* (Asistente para series nuevas) (consulte la Fig. 4).

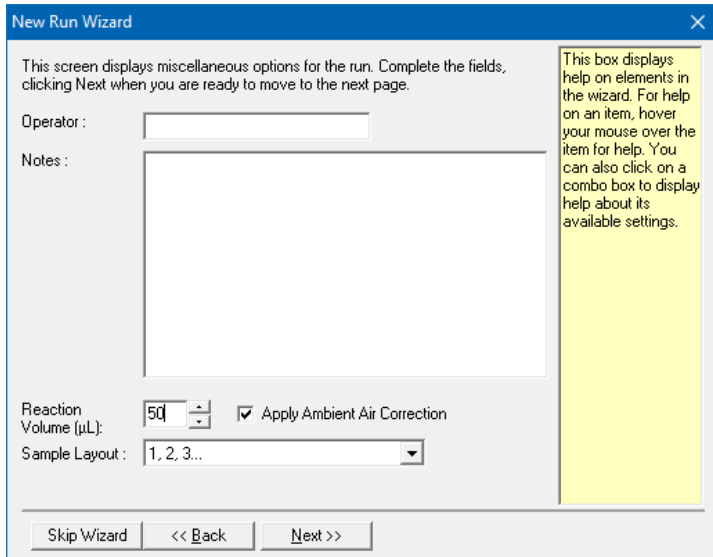


Fig. 4: Configuración de los parámetros generales del ensayo.

Para programar el perfil de temperatura, active el botón *Edit* (Editar) en la siguiente ventana de menú *New Run Wizard* (Asistente para series nuevas) (consulte la Fig. 5 y la Fig. 6).

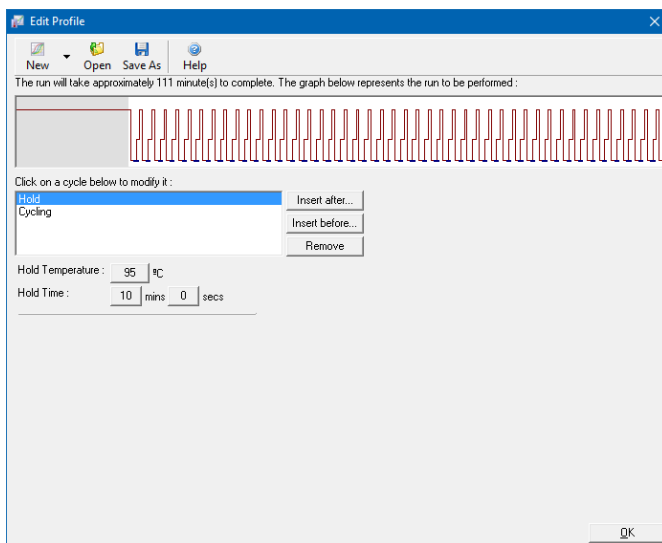


Fig. 5: Activación inicial de la enzima hot-start.

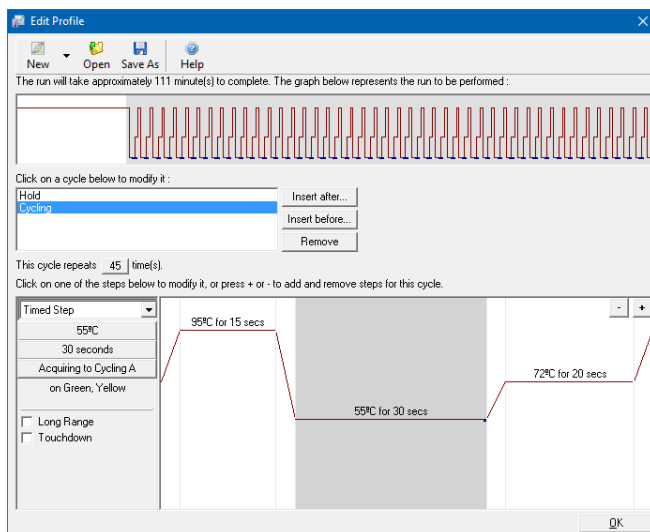


Fig. 6: Amplificación del ADN.

El intervalo de detección de los canales de fluorescencia debe determinarse según las intensidades de fluorescencia de los tubos de PCR. Este ajuste se realiza en la ventana de menú *Auto Gain Optimisation Setup* (Configuración de la optimización de la ganancia automática) (activación en la ventana de menú *New Run Wizard* [Asistente para series nuevas] en *Gain Optimisation* [Optimización de la ganancia]). Configure la temperatura de calibración con la temperatura de apareamiento del programa de amplificación (consulte la Fig. 7), seleccione “Optimise Acquiring” (Optimizar adquisición) e inicie el procedimiento.

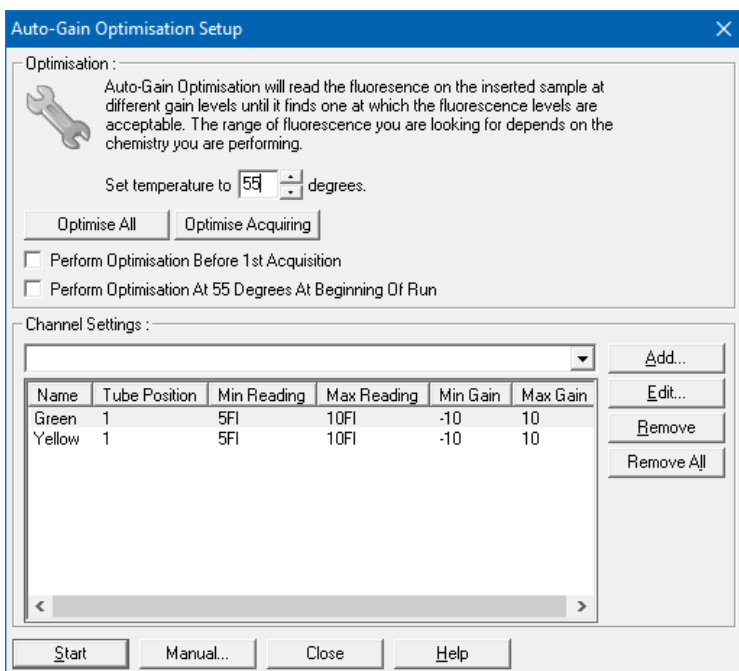


Fig. 7: Ajuste de la sensibilidad de los canales de fluorescencia.

Los valores de ganancia determinados por la optimización de la ganancia automática se guardan automáticamente y se muestran en la última ventana de menú del procedimiento de programación (consulte la Fig. 8).

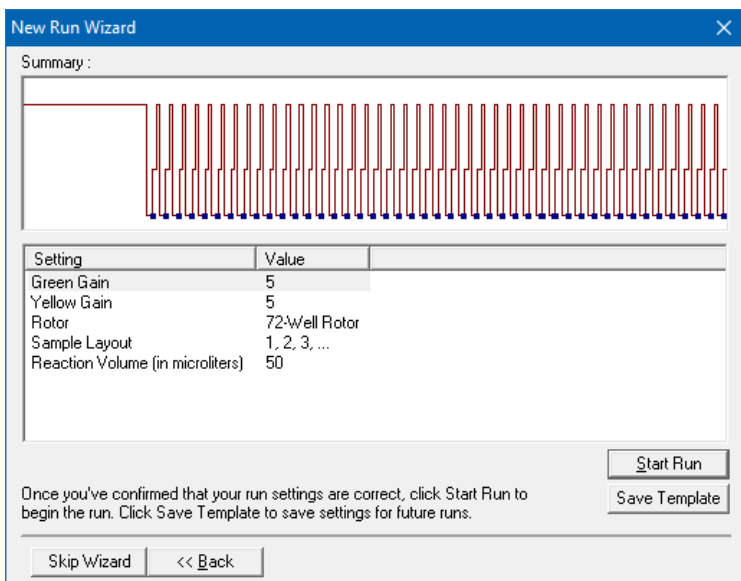


Fig. 8: Inicio de la serie en el instrumento Rotor-Gene Q.

## 10. Análisis de los datos

El análisis de los datos se realiza con el software *Rotor-Gene* conforme a las instrucciones del fabricante (*manual del usuario de Rotor-Gene Q*).

Pueden obtenerse los siguientes resultados:

1. Se detecta una señal en el canal de fluorescencia Cycling A.Green (Ciclado A. Verde).

**El resultado del análisis es positivo: La muestra contiene ADN del parvovirus B19.**

En este caso, la detección de una señal en el canal Cycling A.Yellow (Ciclado A. Amarillo) no es imprescindible, ya que las concentraciones altas iniciales de ADN del parvovirus B19 (señal positiva en el canal Cycling A.Green (Ciclado A. Verde)) pueden dar lugar a una reducción o a la ausencia de señal de fluorescencia del *control interno* en el canal Cycling A.Yellow (Ciclado A. Amarillo) (competición).

2. No se detecta una señal en el canal de fluorescencia Cycling A.Green (Ciclado A. Verde). Al mismo tiempo, aparece una señal procedente del *control interno* en el canal Cycling A.Yellow (Ciclado A. Amarillo).

**En la muestra no hay ADN del parvovirus B19 detectable. Puede considerarse negativa.**

En el caso de una PCR negativa del parvovirus B19, la señal detectada del *control interno* descarta la posibilidad de una inhibición de la PCR.

3. No se detecta una señal en los canales Cycling A.Green (Ciclado A. Verde) o Cycling A.Yellow (Ciclado A. Amarillo).

**Los resultados no son concluyentes.**

Puede encontrar información acerca de las fuentes de error y su solución en el **apartado 11. Solución de problemas.**

En la Fig. 9 y en la Fig. 10 se presentan ejemplos de reacciones de PCR positivas y negativas.

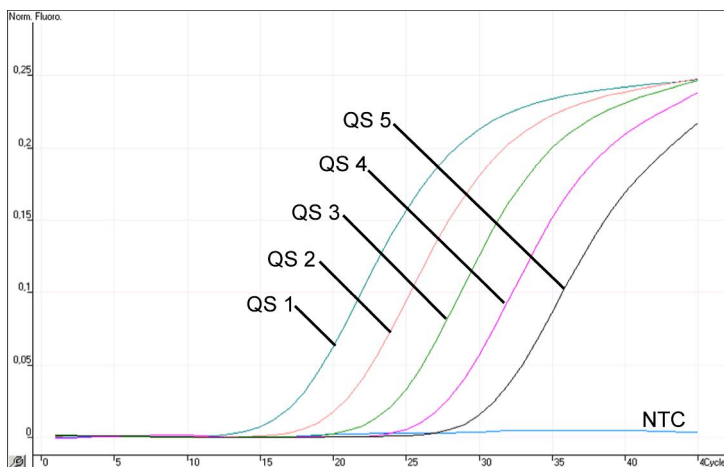


Fig. 9: Detección de los estándares de cuantificación (Parvo B19 RG/TM QS 1-5) en el canal de fluorescencia Cycling A.Green (Ciclado A. Verde). NTC: control sin molde (control negativo).



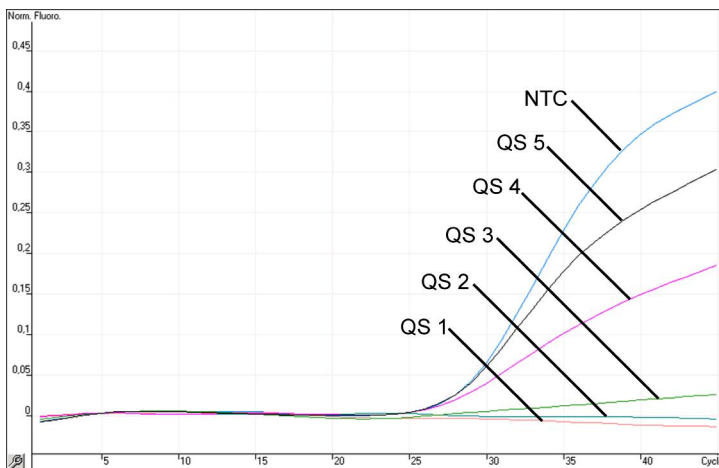


Fig. 10: Detección del *control interno* (IC) en el canal de fluorescencia Cycling A.Yellow (Ciclado A. Amarillo) con amplificación simultánea de los estándares de cuantificación (Parvo B19 RG/TM QS 1-5). NTC: control sin molde (control negativo).

## 11. Solución de problemas

### Ausencia de señal con los controles positivos (Parvo B19 RG/TM QS 1-5) en el canal de fluorescencia Cycling A.Green (Ciclado A. Verde):

- El canal de fluorescencia seleccionado para el análisis de los datos de PCR no cumple el protocolo.
  - Para el análisis de los datos, seleccione el canal de fluorescencia A.Green para la PCR analítica del parvovirus B19 y el canal de fluorescencia A.Yellow para la PCR del *control interno*
- Programación incorrecta del perfil de temperatura del *instrumento RotorGene Q*.
  - Compare el perfil de temperatura con el protocolo (consulte el apartado 9.5 Programación del instrumento *Rotor-Gene Q*).

- Configuración incorrecta de la reacción de PCR.
  - Compruebe los pasos de trabajo por medio del esquema de pipeteo (consulte el **apartado 9.4 Preparación de la PCR**) y repita la PCR en caso necesario.
- Las condiciones de almacenamiento de uno o más componentes del kit no cumplan las instrucciones indicadas en el **apartado 2. Almacenamiento** o el *artus* Parvo B19 RG PCR Kit ha caducado.
  - Compruebe las condiciones de almacenamiento y la fecha de caducidad (consulte la etiqueta del kit) de los reactivos y utilice un kit nuevo en caso necesario.

**Señal débil o ausente del *control interno* en el canal de fluorescencia Cycling A.Yellow (Ciclado A. Amarillo) y ausencia simultánea de una señal en el canal Cycling A.Green (Ciclado A. Verde):**

- Las condiciones de la PCR no cumplen el protocolo.
  - Compruebe las condiciones de la PCR (véase anteriormente) y repita la PCR con los valores de configuración corregidos en caso necesario.
- Se produjo la inhibición de la PCR.
  - Asegúrese de que está utilizando un método de aislamiento recomendado (consulte el **apartado 9.1 Aislamiento del ADN**) y siga exactamente las instrucciones del fabricante.
  - Asegúrese de que durante el aislamiento del ADN se ha realizado el paso adicional de centrifugación recomendado antes de la elución para eliminar los restos de etanol (consulte el **apartado 9.1 Aislamiento del ADN**).
- Se perdió ADN durante la extracción.
  - Si se añadió el *control interno* a la extracción, la ausencia de una señal del *control interno* puede indicar la pérdida de ADN durante la extracción. Asegúrese de que está utilizando un método de aislamiento recomendado (consulte el **apartado 9.1 Aislamiento del ADN**) y siga exactamente las instrucciones del fabricante.
- Las condiciones de almacenamiento de uno o más componentes del kit no cumplan las instrucciones indicadas en el **apartado 2. Almacenamiento** o el *artus* Parvo B19 RG PCR Kit ha caducado.

- Compruebe las condiciones de almacenamiento y la fecha de caducidad (consulte la etiqueta del kit) de los reactivos y utilice un kit nuevo en caso necesario.

### **Señales con los controles negativos en el canal de fluorescencia Cycling A.Green (Ciclado A. Verde) de la PCR analítica.**

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

Si tiene cualquier otra duda o si encuentra problemas, póngase en contacto con nuestro servicio técnico.

## **12. Especificaciones**

### **12.1 Sensibilidad analítica**

Para determinar la sensibilidad analítica del *artus* Parvo B19 RG PCR Kit se realizaron diluciones seriadas de estándares desde 100 hasta un valor nominal de 0,03 UI de parvovirus B19 \*/ $\mu$ l y se analizaron con el *artus* Parvo B19 RG PCR Kit. El ensayo se realizó en tres días diferentes por octuplicado. Los resultados se determinaron mediante un análisis probit. En la Fig. 11 se muestra una representación gráfica del análisis probit. El límite de detección

---

\* El estándar es un producto de PCR clonado, cuya concentración se ha determinado mediante absorción y espectroscopia de fluorescencia.

analítica del *artus* Parvo B19 RG PCR Kit es de 0,2 UI/μl ( $p = 0,05$ ). Esto significa que existe una probabilidad del 95% de que se detecten 0,2 UI/μl.

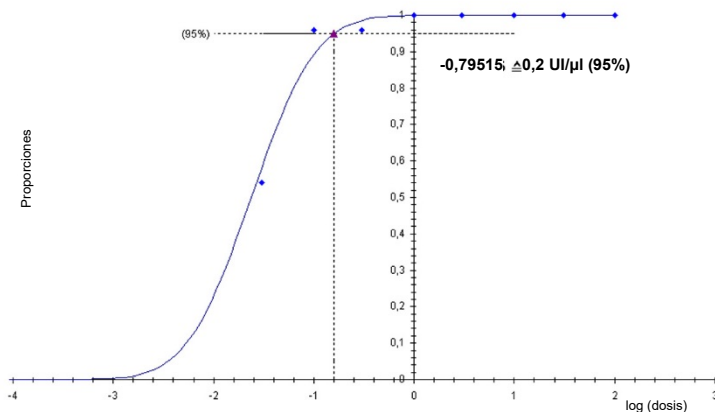


Fig. 11: Sensibilidad analítica del *artus* Parvo B19 RG PCR Kit.

## 12.2 Especificidad

La especificidad del *artus* Parvo B19 RG PCR Kit se asegura ante todo mediante la selección de los *primers* (cebadores) y de las sondas, así como mediante la selección de condiciones estrictas para la reacción. Los *primers* y las sondas se comprobaron con respecto a posibles homologías con todas las secuencias publicadas en los bancos de genes por medio de un análisis de comparación de secuencias. De este modo se ha garantizado la detectabilidad de todos los genotipos relevantes.

Además, la especificidad se validó con seis muestras de suero negativas para el parvovirus B19 diferentes. Estas no generaron ninguna señal con los *primers* y las sondas específicos del parvovirus B19, incluidos en la *mezcla maestra Parvo B19 RG/TM*.

Para determinar la especificidad del *artus* Parvo B19 RG PCR Kit se analizó la reactividad cruzada del grupo de control indicado en la tabla siguiente (consulte la Tabla 1). Ninguno de los patógenos analizados mostró reactividad.

Tabla 1: Análisis de la especificidad del kit con patógenos con posible reactividad cruzada.

Grupo de control	Parvovirus B19 (Cycling A.Green) (Ciclado A. Verde)	Control interno (Cycling A.Yellow) (Ciclado A. Amarillo)
Virus del herpes humano 1 (virus del herpes simple 1)	–	+
Virus del herpes humano 2 (virus del herpes simple 2)	–	+
Virus del herpes humano 3 (virus de la varicela-zóster)	–	+
Virus del herpes humano 5 (citomegalovirus)	–	+
Virus linfotrópico humano de linfocitos T de tipo 1	–	+
Virus linfotrópico humano de linfocitos T de tipo 2	–	+

### 12.3 Precisión

Los datos de precisión del *artus* Parvo B19 RG PCR Kit permiten la determinación de la varianza total del ensayo. La varianza total consta de la **variabilidad intranalítica** (variabilidad de múltiples resultados de muestras de la misma concentración en un único experimento), la **variabilidad interanalítica** (variabilidad de múltiples resultados del ensayo generados en diferentes instrumentos del mismo tipo por diferentes operadores en un mismo laboratorio) y la **variabilidad interlote** (variabilidad de múltiples resultados del ensayo con diferentes lotes). Los datos obtenidos se utilizaron para determinar la desviación estándar, la varianza y el coeficiente de variación para la PCR específica del patógeno y para la PCR del *control interno*.

Se han recogido datos de precisión del *artus* Parvo B19 RG PCR Kit utilizando el *estándar de cuantificación* de menor concentración (QS 5; 10 UI/μl). El análisis se realizó por octuplicado. Los datos de precisión se calcularon en función de los valores de Ct de las curvas de amplificación (Ct: ciclo umbral; consulte la Tabla 2). Además, se determinaron los datos de precisión para los resultados cuantitativos en UI/μl utilizando los valores de Ct correspondientes

(consulte la Tabla 3). En función de estos resultados, la dispersión estadística total de cualquier muestra dada con la concentración mencionada es del 1,66 % (Ct) o del 17,65 % (conc.), mientras que para la detección del *control interno* es del 0,90 % (Ct). Estos valores se basan en la totalidad de los valores individuales de las variabilidades determinadas.

Tabla 2: Datos de precisión basados en los valores de Ct.

	<b>Desviación estándar</b>	<b>Varianza</b>	<b>Coficiente de variación [%]</b>
Variabilidad intranalítica: <i>Parvo B19 RG/TM QS 5</i>	0,22	0,05	0,75
Variabilidad intranalítica: <i>Control interno</i>	0,18	0,03	0,80
Variabilidad interanalítica: <i>Parvo B19 RG/TM QS 5</i>	0,32	0,10	1,11
Variabilidad interanalítica: <i>Control interno</i>	0,19	0,03	0,84
Variabilidad interlote: <i>Parvo B19 RG/TM QS 5</i>	0,38	0,14	1,47
Variabilidad interlote: <i>Control interno</i>	0,21	0,04	0,92
Varianza total: <i>Parvo B19 RG/TM QS 5</i>	0,48	0,23	1,66
Varianza total: <i>Control interno</i>	0,20	0,04	0,90

Tabla 3: Datos de precisión basados en los resultados cuantitativos (en UI/μl).

	Desviación estándar	Varianza	Coefficiente de variación [%]
Variabilidad intranalítica: <i>Parvo B19 RG/TM QS 5</i>	0,96	0,93	9,58
Variabilidad interanalítica: <i>Parvo B19 RG/TM QS 5</i>	1,33	1,78	13,22
Variabilidad interlote: <i>Parvo B19 RG/TM QS 5</i>	2,27	5,17	22,20
Varianza total: <i>Parvo B19 RG/TM QS 5</i>	1,79	3,21	17,65

## 12.4 Robustez

La verificación de la robustez permite determinar la tasa de fracaso total del *artus* Parvo B19 RG PCR Kit. Se añadió 1 UI/μl de volumen de elución de ADN de control del parvovirus B19 (cinco veces la concentración del límite de sensibilidad analítica) a 30 muestras de suero negativas para el parvovirus B19. Tras la extracción con el QIAamp DNA Mini Kit (consulte el **apartado 9.1 Aislamiento del ADN**) estas muestras se analizaron con el *artus* Parvo B19 RG PCR Kit. La tasa de fracaso para todas las muestras de parvovirus B19 fue del 0%. Además, la robustez del *control interno* se evaluó mediante la purificación y el análisis de 30 muestras de suero negativas para el parvovirus B19. La tasa de fracaso total fue del 0%. No se observaron inhibiciones. Por lo tanto, la robustez del *artus* Parvo B19 RG PCR Kit es  $\geq 99\%$ .

## 12.5 Reproducibilidad

Los datos de reproducibilidad permiten evaluar de forma regular el rendimiento del *artus* Parvo B19 RG PCR Kit y comparar su eficiencia con la de otros productos. Estos datos se obtienen por medio de la participación en programas de competencia establecidos.

### 13. Limitaciones del uso del producto

- Todos los reactivos deben utilizarse exclusivamente para el diagnóstico *in vitro*.
- Este producto debe ser utilizado exclusivamente por personal que haya recibido formación y preparación específicas en los procedimientos de diagnóstico *in vitro*.
- Para obtener resultados óptimos con la PCR es necesario un cumplimiento estricto del manual del usuario.
- Debe prestarse atención a las fechas de caducidad impresas en la caja y en las etiquetas de todos los componentes. No utilice componentes caducados.
- El rendimiento declarado no puede garantizarse para algunas secuencias relacionadas con el genotipo 3. Debido a mutaciones en la región de unión *primer*/sonda, podría producirse una disminución importante de la sensibilidad (Baylis and Buchheit, 2009).
- Aunque poco frecuentes, las mutaciones en las regiones altamente conservadas del genoma viral cubiertas por los *primers* y/o por la sonda del kit pueden producir en estos casos una subcuantificación o un fallo de la detección de la presencia del virus. La validez y el rendimiento del diseño del ensayo se revisan a intervalos regulares.

### 14. Advertencias y precauciones

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

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



## **15. Control de calidad**

En cumplimiento del sistema de gestión de calidad con certificación ISO de QIAGEN, cada lote del *artus* Parvo B19 RG PCR Kit se analiza en relación con las especificaciones predeterminadas para garantizar la uniformidad de la calidad de los productos.

## **16. Referencias citadas**

Baylis SA, Buchheit KH. A proficiency testing study to evaluate laboratory performance for the detection of different genotypes of parvovirus B19. *Vox Sang.* 2009; 97 (1): 13 – 20.

Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin. Microbiol. Infect.* 2004; 10 (3): 190 – 212.

## 17. Explicación de los símbolos



Fecha de caducidad



Código de lote



Fabricante



Número de referencia



Número de material



Manual de uso



Producto sanitario para diagnóstico *in vitro*



Componentes



Contiene



Número



Número mundial de artículo comercial



<N>

Contenido suficiente para <n> ensayos



Limitación de temperatura



Consultar instrucciones de uso

**QS**

*Estándar de cuantificación*

**IC**

*Control interno*

## artus Parvo B19 RG PCR Kit

Marcas comerciales y exenciones de responsabilidad  
QIAGEN®, QIAamp®, artus®, Rotor-Gene®, UltraSens® (QIAGEN Group).

Historial de revisiones del documento	
R4 06/2018	Esta es la revisión 4 del manual del artus Parvo RG PCR Kit. Los cambios con respecto a la versión anterior incluyen la adición de una declaración de uso previsto, la eliminación del apartado de evaluación de diagnóstico, la eliminación de la mención del rotor de 36 pocillos y los tubos de 0,2 ml y la actualización de la descripción del instrumento y el software Rotor-Gene Q para las versiones que se encuentran disponibles actualmente.

No debe considerarse que los nombres registrados, marcas comerciales, etc., que se utilizan en este documento no están protegidos por la ley aunque no se hayan identificado específicamente como tales.

El *artus Parvo B19 RG PCR Kit* es un kit de diagnóstico con el marcado CE conforme a la Directiva Europea 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico *in vitro*. No disponible en todos los países.

Para obtener información actualizada sobre la licencia y las exenciones de responsabilidad específicas del producto, consulte el manual o la guía del usuario del kit de QIAGEN correspondiente. Los manuales y las guías del usuario de los kits de QIAGEN están disponibles en [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) o pueden solicitarse a los servicios técnicos de QIAGEN o a su distribuidor local.

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

### Acuerdo de licencia limitada

La utilización de este producto implica por parte de cualquier comprador o usuario del *artus Parvo B19 RG PCR Kit* la aceptación de los siguientes términos:

1. El *artus Parvo B19 RG PCR Kit* puede utilizarse exclusivamente de acuerdo con las especificaciones del *Manual de uso del artus Parvo B19 RG PCR Kit* y empleando únicamente los componentes contenidos en el kit. QIAGEN no ofrece licencia alguna bajo ninguna de sus propiedades intelectuales para utilizar o incorporar los componentes contenidos en este kit con componentes no incluidos en el mismo, excepto según se describe en el *Manual de uso del artus Parvo B19 RG PCR Kit* y en protocolos adicionales disponibles en [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).
2. Aparte de las licencias expresamente especificadas, QIAGEN no garantiza que este kit ni su(s) uso(s) no infrinjan los derechos de terceros.
3. Este kit y sus componentes tienen licencia para un solo uso y no pueden ser reutilizados, reacondicionados ni revendidos.
4. QIAGEN renuncia específicamente a cualquier otra licencia, explícita o implícita, distinta de las licencias expresamente especificadas.
5. El comprador y el usuario del kit aceptan no realizar ni permitir a otros realizar ningún paso que pueda conducir a acciones que hayan sido prohibidas en las especificaciones anteriores o que pueda facilitarlas. QIAGEN se reserva el derecho de emprender acciones legales ante cualquier tribunal para el cumplimiento de las prohibiciones especificadas en este Acuerdo de licencia limitada, y recuperará todos los gastos derivados de la investigación y de los costes del juicio, incluidos los honorarios de abogacía, en cualquier acción emprendida para hacer cumplir este Acuerdo de licencia limitada o cualquier otro derecho de propiedad intelectual en relación con este kit y/o con sus componentes.

Para obtener los términos actualizados de la licencia, visite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1112933 ES

