

Marzo 2017

Manual de AdnaTest ColonCancerSelect y ColonCancerDetect



12 (n.º de referencia 395422)



12 (n.º de referencia 396422)

Para el enriquecimiento de células tumorales de la sangre total de pacientes con cáncer de colon y para la detección de la expresión génica asociada al cáncer de colon en células tumorales enriquecidas.

Para uso diagnóstico in vitro

Versión 1

IVD

CE

REF

395422 (AdnaTest ColonCancerSelect)

396422 (AdnaTest ColonCancerDetect)



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
GERMANY

R1 MAT

1106497ES

Sample to Insight



Contenido

Uso previsto	4
Resumen y explicación	4
Principios del procedimiento	5
AdnaTest ColonCancerSelect	5
AdnaTest ColonCancerDetect	6
Materiales suministrados	7
Contenido del kit	7
Materiales necesarios pero no suministrados	9
AdnaTest ColonCancerSelect	9
AdnaTest ColonCancerDetect	10
Advertencias y precauciones	11
Información de seguridad	11
Información para la aplicación	11
Patentes	11
Almacenamiento y manipulación de reactivos	12
Almacenamiento	12
Manipulación	12
Manipulación y almacenamiento de muestras	13
Preparación de las muestras	13
Protocolo: Enriquecimiento de células tumorales con AdnaTest ColonCancerSelect	14
Protocolo: Detección de expresión génica asociada al cáncer de colon en células tumorales enriquecidas con la prueba AdnaTest ColonCancerDetect	18

Protocolo: Multiplex PCR	23
Interpretación de los resultados	25
Análisis de fragmentos en el dispositivo Agilent 2100 Bioanalyzer	25
Guía para la resolución de problemas	28
Control de calidad	28
Limitaciones	28
Características de rendimiento	29
Recuperación	29
Especificidad	30
Reproducibilidad	30
Precisión	31
Sustancias interferentes	31
Condiciones interferentes	33
Estudios clínicos	33
Referencia	34
Abreviaturas	34
Símbolos	35
Información para pedidos.....	36

Uso previsto

La prueba AdnaTest ColonCancerSelect es un método de diagnóstico in vitro destinado al enriquecimiento inmunoquímico de células tumorales circulantes de muestras de sangre completa anticoagulada obtenidas de pacientes con cáncer de colon a través de una combinación de antígenos epiteliales y asociados a tumores.

La prueba AdnaTest ColonCancerDetect es un ensayo de diagnóstico in vitro destinado al análisis de perfiles de expresión de células tumorales mediante transcripción inversa y PCR multiplexada y al análisis densitométrico posterior de los productos de la PCR mediante electroforesis capilar automatizada que utiliza el dispositivo Agilent® 2100 Bioanalyzer.

La prueba AdnaTest ColonCancerSelect/Detect no está diseñada para la detección sistemática y no se utilizará como prueba diagnóstica para confirmar la presencia de cáncer de colon.

Este producto está destinado a ser utilizado por usuarios profesionales, como técnicos y médicos que hayan recibido formación en técnicas de biología molecular.

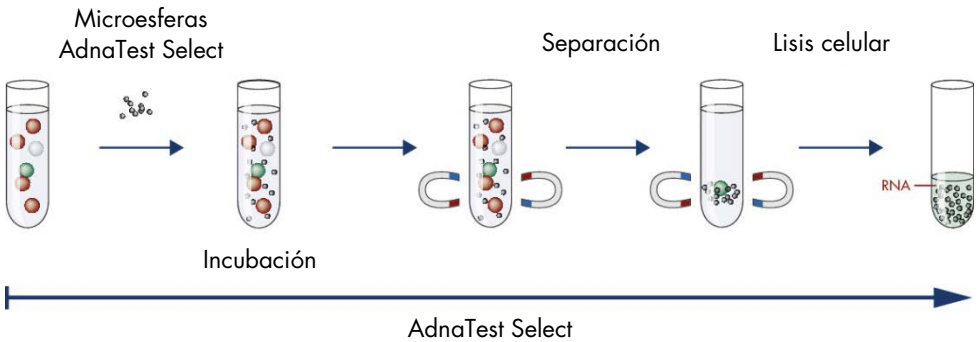
Resumen y explicación

La prueba AdnaTest ColonCancerSelect se utiliza para el enriquecimiento inmunomagnético de células tumorales a través de los antígenos epiteliales y asociados a tumores. La prueba AdnaTest ColonCancerDetect se utiliza para el análisis de la expresión génica asociada al cáncer de colon en células tumorales enriquecidas inmunomagnéticamente mediante transcripción inversa y PCR.

Principios del procedimiento

AdnaTest ColonCancerSelect

Los anticuerpos contra antígenos epiteliales y asociados a tumores se conjugan con las microesferas magnéticas para la marcación de las células tumorales en sangre completa. Las células marcadas se extraen mediante un concentrador de partículas magnéticas (AdnaMag-L y AdnaMag-S) para su posterior lisado (Figuras 1 y 2).



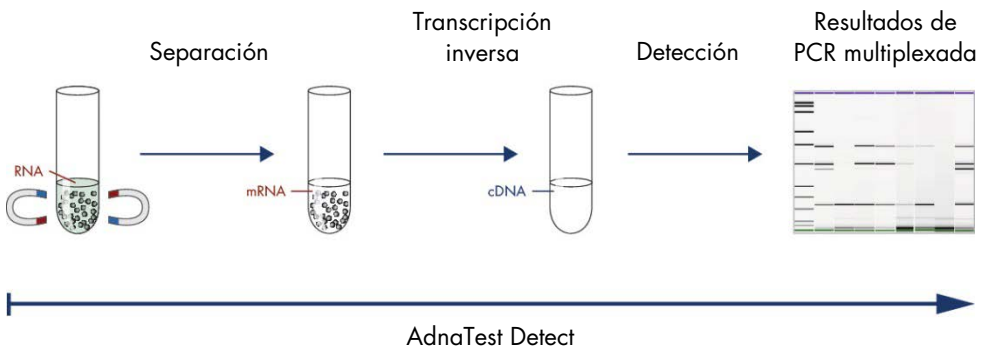
- Células sanguíneas ● Células tumorales
- ⊛ Microesferas magnéticas recubiertas con anticuerpos u Oligo(dT)25

Figura 1. AdnaTest ColonCancerSelect: Selección de células inmunomagnéticas con varios anticuerpos asociados a tumores.

El lisado celular sirve para la realización de otros análisis con la prueba AdnaTest ColonCancerDetect.

AdnaTest ColonCancerDetect

La prueba AdnaTest ColonCancerDetect contiene microesferas de Oligo (dT)₂₅ para aislar el ARNm del lisado de las células tumorales preenriquecidas. La transcripción inversa genera ADNc que posteriormente se utiliza como molde para la detección y caracterización de células tumorales mediante PCR multiplexada. La mezcla AdnaTest PrimerMix ColonDetect permite la amplificación de tres antígenos asociados a tumores y un gen de control.



- Células sanguíneas ● Células tumorales
- ⊛ Microesferas magnéticas recubiertas con anticuerpos u Oligo(dT)₂₅

Figura 2. AdnaTest ColonCancerDetect: PCR multiplexada de diversos marcadores tumorales asociados al cáncer.

En un segundo paso, las células enriquecidas se examinan con RT-PCR para detectar patrones de expresión asociados al tumor. Las cadenas de ARNm se transcriben de forma inversa en ADNc. Posteriormente, se pueden amplificar varios marcadores tumorales asociados mediante el uso de PCR multiplexada y se pueden visualizar.

Los primers generan fragmentos de los tamaños siguientes:

- GA733-2: 395 pb
- ACE: 231 pb
- EGFR: 163 pb
- Actina: 120 pb (control interno para PCR)

Nota: los tamaños de fragmento pueden variar ligeramente. Asegúrese de usar los controles positivos AdnaTest Positive Control Colon para la asignación de las señales detectadas.

Materiales suministrados

Contenido del kit

AdnaTest ColonCancerSelect			
Número de referencia		395422	
Número de pruebas		12	
Tubos de recogida	Collection Tubes (tubos de recogida) (1,5 ml)	<input type="checkbox"/> COL <input type="checkbox"/> TUBE	3 × 5
Tubos de recogida	Collection Tubes (tubos de recogida) (15 ml)	<input type="checkbox"/> COL <input type="checkbox"/> TUBE	24
Rojo	ColonSelect Beads (Microesferas ColonSelect)	CSB	1,2 ml
Rojo	AdnaTest Lysis/Binding Buffer (tampón de lisis/unión AdnaTest)	LBB	2 × 1,2 ml
	Handbook (manual)		1

AdnaTest ColonCancerDetect			
Número de referencia	396422		
Número de pruebas	12		
Reactivos de ARN AdnaTest			Caja 1
Rojo	AdnaTest Lysis/Binding Buffer (tampón de lisis/unión AdnaTest)	LBB	2 ml
Naranja	Oligo(dT) ₂₅ Beads (microesferas Oligo(dT) ₂₅)	OdT	280 µl
Blanco	RNA Purification Buffer A (tampón de purificación de ARN A)	BA	4ml
Blanco	RNA Purification Buffer B (tampón de purificación de ARN B)	BB	4ml
Púrpura	Tris-HCL Buffer (tampón Tris-HCL)	TB	2 ml
AdnaTest ColonCancerDetect			Caja 2
Azul	AdnaTest PrimerMix ColonDetect (mezcla AdnaTest PrimerMix ColonDetect)	PMC	144 µl
Naranja	AdnaTest Positive Control Colon (C+) (control positivo para colon [C+] AdnaTest)	CONTROL +	56 µl
	Handbook (manual)		1

Se incluyen reactivos AdnaTest ColonCancerDetect suficientes para analizar 6 controles para PCR y 12 muestras de sangre.

Materiales necesarios pero no suministrados

Siempre que trabaje con productos químicos, utilice una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y gafas protectoras. Para obtener más información, consulte las hojas de datos sobre seguridad (safety data sheets, SDS) correspondientes, que puede solicitar al proveedor del producto.

AdnaTest ColonCancerSelect

Equipo

- Tube rotator for 15 ml and 1.5 ml tubes (rotador de tubos para tubos de 15 ml y 1,5 ml) (p. ej., ELMi Ltd., n.º de ref. IMIX-03)
- Concentradores de partículas magnéticas
 - AdnaMag-L (n.º de ref. 399921)
 - AdnaMag-S (n.º de ref. 399911)

Material

- AdnaTube Tubes (n.º de ref. 399932), al trabajar con tubos con ACD-A BD Vacutainer®
- Pipeteador y pipetas de vidrio o de plástico de 10 ml estériles y exentas de RNasa
- Sterile, RNase-free 1.5 ml reaction tubes (tubos de reacción de 1,5 ml estériles y exentos de RNasa) (p. ej., Sarstedt, n.º de ref. 72.690)
- Pipetas y puntas de pipeta exentas de RNasa con barrera para aerosoles, aptas para pipetear volúmenes de 100 µl a 1000 µl

Reactivos

- Phosphate buffered saline (PBS), pH 7.0–7.3 (tampón fosfato salino [TFS], pH 7,0-7,3) (p. ej., Fisher, n.º de ref. VX14190169, D-PBS)

AdnaTest ColonCancerDetect

Equipo

- Tube rotator for 1.5 ml tubes (rotador de tubos para tubos de 1,5 ml) (p. ej., ELMi Ltd., n.º de ref. IMIX-03)
- Magnetic particle concentrator AdnaMag-S (concentrador de partículas magnéticas AdnaMag-S) (n.º de ref. 399911)
- Bloque térmico o baño de agua (50°C)
- Termociclador con tapa térmica y tasa de calentamiento de 2 °C/s
- Dispositivo Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies)

Material

- Tubos para PCR de 0,2 ml de paredes finas estériles y exentos de RNasa
- Sterile, RNase-free 1.5 ml reaction tubes (tubos de reacción de 1,5 ml estériles y exentos de RNasa) (p. ej., Sarstedt, n.º de ref. 72.690)
- Pipetas y puntas de pipeta exentas de RNasa con barrera para aerosoles, aptas para pipetear volúmenes de 1 µl a 200 µl

Reactivos

- Sensiscript® RT Kit (kit de RT Sensiscript®) (QIAGEN, n.º de ref. 205211, 50 reacciones)
 - **Nota:** El Sensiscript RT Kit (kit de RT Sensiscript) (n.º de ref. 205211) incluye volumen para 25 muestras porque se necesita el doble de volumen para cada reacción.
- Recombinant RNasin, RNase-inhibitor, 2.500 U (inhibidor de RNasa recombinante RNasin, 2,500 U) (Promega, n.º de ref. N2511)
- HotStarTaq® Master Mix Kit (kit de mezcla maestra para HotStarTaq®) (QIAGEN, n.º de ref 203443, 250 U)
- Hielo picado

Advertencias y precauciones

Para uso diagnóstico in vitro

Información de seguridad

Siempre que trabaje con productos químicos, utilice una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y gafas protectoras. Para obtener más información, consulte las hojas de datos sobre seguridad (SDS) correspondientes. Puede obtenerlas en línea en el práctico y compacto formato PDF en www.qiagen.com/safety, desde donde también podrá buscar, ver e imprimir las hojas de datos SDS de todos los kits y componentes de los kits QIAGEN.

Deseche los residuos de muestras y ensayos conforme a los requisitos de seguridad local.

Información para la aplicación

Estas pruebas debe realizarlas personal especializado en técnicas de biología molecular.

Patentes

AdnaTest ColonCancerDetect requiere licencias de Hoffmann-La Roche AG, Basilea. La adquisición de la prueba AdnaTest ColonCancerDetect no implica autorización para que el usuario pueda llevar a cabo el proceso de PCR sin licencia.

Almacenamiento y manipulación de reactivos

Almacenamiento

El sistema AdnaTest ColonCancer se entrega en tres cajas. La prueba AdnaTest ColonCancerSelect (n.º de ref. 395422) y la caja 1 con los reactivos de ARN AdnaTest (caja 1 con n.º de ref. 396422) deben almacenarse a una temperatura de entre 2 y 8 °C. No debe utilizarse ningún componente después de su fecha de caducidad.

La caja 2 de la prueba AdnaTest ColonCancerDetect (caja 2 con n.º de ref. 396422) que contiene las mezclas AdnaTest PrimerMix ColonDetect y los controles positivos AdnaTest Positive Control Colon deben almacenarse por separado a una temperatura entre -30 °C y -15 °C. Para evitar la posible contaminación y los constantes cambios de temperatura, realice alícuotas de la mezcla de primer. Los componentes no deben utilizarse después de su fecha de caducidad.

Manipulación

- Las microesferas ColonSelect contienen azida sódica como conservante. La azida sódica es citotóxica y, por lo tanto, debe eliminarse antes de utilizar las microesferas. (Consulte el apartado "Protocolo: Enriquecimiento de células tumorales con AdnaTest ColonCancerSelect" en la página 14).
- Todos los componentes y reactivos adicionales suministrados por otros proveedores deben almacenarse conforme a sus instrucciones. Deben cumplirse los consejos de seguridad de los respectivos fabricantes.
- Utilice guantes de protección para evitar la contaminación por ADN, ARN y RNasa.
- Realice alícuotas de las microesferas ColonSelect para evitar la contaminación.
- La prueba debe realizarse en la secuencia indicada y deben cumplirse todas las especificaciones relativas a los tiempos y las temperaturas de incubación.
- Deseche las muestras en las que las microesferas de selección se hayan aglutinado durante el enriquecimiento.

- Para evitar la contaminación cruzada, lleve a cabo el procesamiento de la muestra, incluida la transcripción inversa y el posterior análisis de los productos de PCR amplificados, en salas diferentes, si es posible.
- El uso de productos de proveedores distintos a los recomendados puede afectar negativamente a los resultados.
- Debe respetar las normativas de seguridad e higiene del laboratorio (p. ej., utilizar una bata de laboratorio, gafas protectoras y guantes).

Manipulación y almacenamiento de muestras

Preparación de las muestras

- Las muestras de sangre se deben obtener antes de la aplicación de sustancias terapéuticas. No utilice la prueba AdnaTest ColonCancerSelect antes de 7 días después de la última intervención terapéutica.
- Recogida de sangre: Si el transporte de la muestra tarda en efectuarse menos de cuatro horas, use tubos que contengan EDTA como anticoagulante (p. ej., S Monovette® K3 EDTA, Sarstedt [n.º de ref. 01.1605.001]) para extraer como mínimo 7,5 ml de sangre completa.
- Si el transporte de la muestra tarda en efectuarse más de cuatro horas, use tubos con ACD-A BD Vacutainer (Becton Dickinson GmbH, n.º de ref. 366645 [UE]; 364606 [EE. UU.]) para extraer al menos 8,5 ml de sangre completa. Antes de continuar con el procesamiento con la prueba AdnaTest, se deben transferir 5 ml de sangre con ACD-A a un tubo para muestras AdnaTube, n.º de ref. 399932.
- La sangre debe almacenarse a una temperatura de 4 °C de forma inmediata.
- Las muestras deben procesarse lo antes posible, pero nunca después de las 4 horas posteriores a la extracción de sangre cuando se utilicen tubos con EDTA estándar o en un periodo de 30 horas cuando se utilicen tubos de recogida de sangre BD Vacutainer junto con tubos AdnaTube.
- La muestra de sangre no se debe hemolizar.

Protocolo: Enriquecimiento de células tumorales con AdnaTest ColonCancerSelect

Cuestiones importantes antes de comenzar

- Antes de iniciar el procedimiento, lea “Advertencias y precauciones” (página 11), “Almacenamiento y manipulación de reactivos” (página 12) y “Manipulación y almacenamiento de muestras” (página 13).
- Es necesario eliminar la azida sódica lavando las microesferas ColonSelect antes de utilizarlas, como se describe a continuación en “Procedimiento A: Preparación de las microesferas ColonSelect”.
- Para el paso indicado del protocolo, use solamente los tubos de recogida de 1,5 ml suministrados.

Antes de comenzar

- Asegúrese de que el tampón de lisis/unión AdnaTest esté equilibrado a temperatura ambiente. Si observa algún precipitado, deje que los reactivos alcancen la temperatura ambiente y mezcle hasta que el precipitado se disuelva por completo.

Procedimiento A: Preparación de las microesferas ColonSelect

1. Resuspenda por completo las microesferas ColonSelect mediante pipeteo (no mezcle en vórtex).
2. Calcule el volumen de microesferas ColonSelect necesario para procesar todas las muestras (100 µl por muestra) y transfiera el volumen calculado a un tubo de reacción de 1,5 ml (no suministrado).

Si se procesan más de 10 muestras, utilice tubos de reacción de 1,5 ml adicionales.

3. Coloque el tubo en el concentrador AdnaMag-S.

4. Transcurrido 1 minuto, retire el sobrenadante con una pipeta.

Nota: No toque las microesferas cuando retire el sobrenadante.

5. Pasos de lavado:

5a. Retire el deslizador magnético del concentrador AdnaMag-S.

5b. Añada 1 ml de PBS y resuspenda las microesferas realizando varios pipeteos.

5c. Coloque el deslizador magnético en el concentrador AdnaMag-S.

5d. Transcurrido 1 minuto, retire todo el sobrenadante con una pipeta.

5e. Repita los pasos del 5a al 5d dos veces (tres lavados en total).

6. Retire el tubo del concentrador AdnaMag-S y resuspenda las microesferas en PBS hasta alcanzar el volumen original (100 µl por muestra). Continúe con "Procedimiento B: Selección de células tumorales". más adelante

Procedimiento B: Selección de células tumorales

1. Al utilizar tubos con EDTA estándar, pipetee 5 ml de la muestra de sangre en un tubo de recogida de 15 ml (suministrado).

Al utilizar sangre con ACD-A en un tubo con ACD-A BD Vacutainer, transfiera 5 ml de sangre a un tubo AdnaTube.

Nota: Los tubos AdnaTube son obligatorios al utilizar tubos con ACD-A BD Vacutainer.

2. Resuspenda por completo las microesferas ColonSelect (preparadas en el paso 6 del procedimiento A) mediante pipeteo y añada 100 µl de las microesferas a cada muestra de sangre.

3. Introduzca los tubos en un dispositivo que permita tanto inclinación como rotación para hacerlos girar lentamente (aproximadamente 5 rpm) durante 30 minutos a temperatura ambiente.

4. Coloque los tubos en el concentrador AdnaMag-L sin el deslizador magnético. Incline hacia abajo el concentrador AdnaMag-L para liberar las gotas de sangre que hayan podido quedar en el tapón.

5. Inserte el deslizador magnético e incube los tubos en el concentrador AdnaMag-L durante 3 minutos a temperatura ambiente.

6. Retire todo el sobrenadante con una pipeta de 10 ml sin tocar las microesferas.

Nota: No toque las microesferas cuando retire el sobrenadante.

7. Pasos de lavado:

7a. Retire el deslizador magnético del concentrador AdnaMag-L.

7b. Añada 5 ml de PBS. Cierre los tubos y agite suavemente el concentrador *AdnaMag-L* hacia atrás y hacia delante 5 veces para resuspender los complejos de células/microesferas magnéticas.

7c. Inclíne dos veces el concentrador *AdnaMag-L* con los tubos orientados hacia abajo para liberar las gotas de sangre que hayan podido quedar en el tapón.

7d. Coloque el deslizador magnético en el concentrador *AdnaMag-L* e incube durante 1 minuto a temperatura ambiente.

7e. Retire todo el sobrenadante con una pipeta.

7f. Repita los pasos del 7a al 7e dos veces (tres lavados en total).

8. Retire el deslizador magnético del concentrador *AdnaMag-L*.

9. Resuspenda los complejos de células/microesferas magnéticas en 1 ml de PBS y transfiera cada muestra a un tubo de reacción de 1,5 ml (no suministrado).

10. Coloque los tubos de reacción en un concentrador *AdnaMag-S* en el que se haya introducido un deslizador magnético.

Nota: El deslizador magnético del concentrador *AdnaMag-S* se puede insertar en dos posiciones. Asegúrese de insertarlo siempre con la película de plástico blanco orientada hacia delante para que los imanes estén junto a los tubos de reacción.

11. Transcurrido 1 minuto, retire todo el sobrenadante con una pipeta para optimizar la siguiente lisis celular.

12. Retire el deslizador magnético del concentrador *AdnaMag-S*.

13. Añada 200 µl de tampón de lisis/unión *AdnaTest* (que haya alcanzado la temperatura ambiente) a cada tubo de reacción. Resuspenda la solución pipeteando al menos cinco veces.

14. Introduzca el deslizador magnético en el concentrador *AdnaMag-S* e incube durante 1 minuto.

-
15. Transfiera los sobrenadantes (lisados celulares) a tubos de reacción de 1,5 ml nuevos.
 16. Deseche los tubos con microesferas.
 17. Continúe con el aislamiento de ARNm (consulte “Protocolo: Detección de expresión génica asociada al cáncer de colon en células tumorales enriquecidas con la prueba AdnaTest ColonCancerDetect”, página 18) de inmediato o almacene los lisados celulares a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 2 semanas como máximo.

Protocolo: Detección de expresión génica asociada al cáncer de colon en células tumorales enriquecidas con la prueba AdnaTest ColonCancerDetect

Cuestiones importantes antes de comenzar

- Antes de iniciar el procedimiento, lea los apartados “Advertencias y precauciones” (página 11) y “Almacenamiento y manipulación de reactivos” (página 12).
- Los procedimientos A a C describen el aislamiento de ARNm y la transcripción inversa.
- Para el paso indicado del protocolo, use solamente los tubos de recogida de 1,5 ml suministrados.

Antes de comenzar

- Asegúrese de que el tampón de lisis/unión AdnaTest esté equilibrado a temperatura ambiente. Si observa algún precipitado, deje que los reactivos alcancen la temperatura ambiente y mezcle hasta que el precipitado se disuelva por completo.
- Deje que el tampón de purificación de ARN A y el tampón de purificación de ARN B alcancen la temperatura ambiente. Coloque el tampón Tris-HCL en hielo.
- Descongele tampón RT 10x y dNTP del kit de RT Sensiscript a temperatura ambiente. Mezcle mediante agitación vorticial. Centrifugue brevemente y almacene en hielo. Descongele agua exenta de RNasa (parte del kit de RT Sensiscript).
- Ajuste un bloque térmico o baño de agua a 50°C.

Procedimiento A: Preparación de microesferas Oligo(dT)₂₅

1. Resuspenda por completo las microesferas Oligo(dT)₂₅ mediante pipeteo. ¡No lo agite mediante vórtice!
2. Calcule el volumen de microesferas necesario para procesar todas las muestras (20 µl por muestra más un 10%) y transfiera el volumen calculado a un tubo de reacción de 1,5 ml exento de RNasa (no suministrado).
3. Coloque el tubo en el concentrador AdnaMag-S.

Nota: El deslizador magnético del concentrador AdnaMag-S se puede insertar en dos posiciones. Asegúrese de insertarlo siempre con la película de plástico blanco orientada hacia delante para que los imanes estén junto a los tubos de reacción.

4. Transcurrido 1 minuto, retire el sobrenadante con una pipeta.
5. Pasos de lavado:
 - 5a. Retire el deslizador magnético del concentrador AdnaMag-S.
 - 5b. Añada el volumen original (paso 2, página 19) del tampón de lisis/unión AdnaTest y repita el pipeteo para resuspender las microesferas. Resuspenda con suavidad para evitar la formación de espuma.
 - 5c. Introduzca el deslizador magnético en el concentrador AdnaMag-S.
 - 5d. Transcurrido 1 minuto, retire todo el sobrenadante.
 - 5e. Repita los pasos del 5a al 5d una vez (dos lavados en total).
6. Retire el tubo del concentrador AdnaMag-S y resuspenda las microesferas en tampón de lisis/unión AdnaTest hasta conseguir el volumen original (paso 2, página 19). Continúe con "Procedimiento B: Aislamiento de ARNm".

Procedimiento B: Aislamiento de ARNm

1. Añada 20 µl de microesferas Oligo(dT)₂₅ (paso 6, más atrás) a cada tubo que contiene lisado celular (paso 15, página 17).
2. Introduzca los tubos en un dispositivo que permita tanto inclinación como rotación para hacerlos girar lentamente (aproximadamente 5 rpm) durante 10 minutos a temperatura ambiente.

3. Coloque los tubos en el concentrador AdnaMag-S sin el deslizador magnético. Inclínelo hacia abajo el concentrador AdnaMag-S para liberar las microesferas y el líquido que haya podido quedar en el tapón.
4. Transcurrido 1 minuto, introduzca el deslizador magnético y retire el sobrenadante.
5. Pasos de lavado 1:
 - 5a. Retire el deslizador magnético del concentrador AdnaMag-S.
 - 5b. Añada 100 µl de tampón de purificación de ARN A a cada tubo y pipetee varias veces para resuspender las microesferas. Para evitar la pérdida de microesferas, aclare bien la tapa y la pared del tubo.
 - 5c. Introduzca el deslizador magnético en el concentrador AdnaMag-S.
 - 5d. Transcurrido 1 minuto, retire todo el sobrenadante.
 - 5e. Repita los pasos del 5a al 5d una vez (dos lavados en total).
6. Pasos de lavado 2
 - 6a. Retire el deslizador magnético del concentrador AdnaMag-S.
 - 6b. Añada 100 µl de tampón de purificación de ARN B a cada tubo. Pipetee para resuspender las microesferas y transfíralas a tubos de reacción de 1,5 ml nuevos (suministrados).
 - 6c. Introduzca el deslizador magnético en el concentrador AdnaMag-S.
 - 6d. Transcurrido 1 minuto, retire todo el sobrenadante. Este paso debe realizarse con sumo cuidado (debe vigilarse el sedimento) porque las microesferas pueden resbalar y podrían eliminarse por error.
 - 6e. Repita los pasos del 6a al 6d una vez en los mismos tubos de reacción (dos lavados en total).
7. Retire el deslizador magnético del concentrador AdnaMag-S.
8. Añada 100 µl de tampón Tris-HCL refrigerado en hielo a cada tubo y pipetee para resuspender las microesferas.
9. Introduzca el deslizador magnético en el concentrador AdnaMag-S.
10. Transcurrido 1 minuto, retire todo el sobrenadante.
11. Retire el deslizador magnético del concentrador AdnaMag-S.

12. Resuspenda el complejo de ARNm/microesferas en 29,5 µl de agua exenta de RNasa.
13. Transfiera los tubos a un bloque térmico o baño de agua y déjelos incubar durante 5 minutos a una temperatura de 50°C.
14. Coloque los tubos en hielo inmediatamente durante al menos 2 minutos.
15. Continúe de inmediato (en un plazo de 5 minutos) con la transcripción inversa (Procedimiento C: Transcripción inversa con el kit de RT Sensiscript)
No conserve el complejo de ARNm/microesferas.

Procedimiento C: Transcripción inversa con el kit de RT Sensiscript

1. Prepare la mezcla maestra para RT en hielo. La mezcla maestra para RT se prepara tal como se muestra en la tabla 1 en función del número de muestras.
El volumen de la mezcla maestra para RT debería ser un 10% superior al calculado para el número total de reacciones de transcripción inversa. Siempre debe prepararse una reacción con control negativo sin añadir ARNm (control para RT).
2. Mezcle en vórtex la mezcla maestra para RT. Centrifugue brevemente y, luego, pipetee 10,5 µl para cada reacción en tubos para PCR de 0,2 ml.

- Resuspenda el complejo de ARNm/microesferas (paso 10, página 20) cuidadosamente con una pipeta. Transfiera el volumen total al tubo de reacción para PCR de 0,2 ml que contenga la mezcla maestra para RT. Pipetee varias veces para mezclar bien.

Tabla 1. Configuración de reacción de transcripción inversa

Componente	Volumen
Mezcla maestra para RT	
10x Buffer RT (tampón RT 10x)	4,0 µl
dNTP Mix (mezcla de dNTP) (5 mM por cada dNTP)	4,0 µl
RNase inhibitor (inhibidor de RNasa), 40 U/µl (Promega)	0,5 µl
Sensiscript Reverse Transcriptase (transcriptasa inversa Sensiscript)	2,0 µl
ARN de molde*	29,5 µl
Complejo de ARNm/microesferas o agua exenta de RNasa	
Volumen total	40,0 µl

* como control para RT, añada 29,5 µl de agua exenta de RNasa en lugar del complejo de ARNm/microesferas. El volumen del complejo de ARNm/microesferas puede variar ligeramente. Use siempre su volumen total en la reacción de transcripción inversa.

- El ADNc se sintetiza en un termociclador con las siguientes condiciones (tabla 2).

Tabla 2. Programa de transcripción inversa

Paso	Tiempo	Temperatura
Transcripción inversa	60 minutos	37°C
Desnaturalización	5 minutos	93°C
Enfriamiento	∞	4°C

- Coloque los tubos de reacción con el ADNc en hielo o almacénelos a -20 °C durante un máximo de 4 semanas.
- Continúe con el apartado "Protocolo: Multiplex PCR", página 23.

Protocolo: Multiplex PCR

Cuestión importante antes de comenzar

- Antes de iniciar el procedimiento, lea los apartados “Advertencias y precauciones” (página 11) y “Almacenamiento y manipulación de reactivos” (página 12).

Antes de comenzar

- Descongele la mezcla maestra HotStarTaq (QIAGEN), el control positivo AdnaTest Positive Control Colon, la mezcla AdnaTest PrimerMix ColonDetect y agua exenta de RNasa. Mezcle en vórtex, centrifugue rápidamente y almacene en hielo.

Procedimiento

1. La mezcla maestra para PCR se prepara tal como se muestra en la tabla 3 en función del número de muestras.

El volumen de mezcla maestra para PCR deberá ser como mínimo un 10% superior a los requisitos calculados a partir del número de muestras. Tenga en cuenta que siempre debe incluirse un control positivo AdnaTest Positive Control Colon, agua exenta de RNasa como control negativo y el control para RT.

2. Para cada preparación, dispense 42,0 µl de la mezcla maestra para PCR en tubos de reacción para PCR de 0,2 ml. Resuspanda la mezcla de ADNc/microesferas mediante pipeteo y añada 8,0 µl de esta mezcla a cada tubo de reacción.

Nota: Añada 8,0 µl de agua exenta de RNasa como control negativo en lugar de ADNc.

Tabla 3. Preparación de la PCR multiplexada

Componente	Volumen
Mezcla maestra para PCR multiplexada	
HotStarTaq Master Mix (Mezcla maestra para HotStarTaq)	25,0 µl
Agua exenta de RNasa	13,0 µl
AdnaTest PrimerMix ColonDetect (mezcla AdnaTest PrimerMix ColonDetect)	4,0 µl
ADNc o control para RT o control negativo (agua exenta de RNasa) o control positivo AdnaTest Positive Control Colon, cada:	8,0 µl
Volumen total	50,0 µl

3. Se utiliza un termociclador para la PCR según el programa descrito en la tabla 4. Ejecute el termociclador con una rampa de 2 °C/segundo. La PCR se lleva a cabo con un total de 38 ciclos.

Tabla 4. Programa de ciclado de PCR

Paso	Tiempo	Temperatura
Paso de activación inicial	15 minutos	95°C
Ciclado en 3 pasos		
Desnaturalización	45 segundos	94°C
Hibridación	45 segundos	58°C
Extensión	45 segundos	72°C
Extensión final	10 minutos	72°C
Enfriamiento	∞	4°C

Interpretación de los resultados

Análisis de fragmentos en el dispositivo Agilent 2100 Bioanalyzer

Se recomienda realizar el análisis con el dispositivo Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) en un kit DNA 1000 LabChip®. Siga las instrucciones del manual del kit DNA 1000 LabChip y asegúrese de que no se transfiera ninguna microesfera al LabChip. Las microesferas magnéticas del gel pueden generar resultados falsos.

1. Inicie el software del Bioanalyzer "2100 expert". Seleccione "**Instrument**" (Instrumento) en "**Contexts**" (Contextos) y, luego, haga clic en el botón "**Assay**" (Ensayo), que se encuentra junto a "**Assay Selection**" (Selección de ensayo).
2. Seleccione "**Electrophoresis > DNA 1000 Series II.xsy**" (Electroforesis > DNA 1000 Series II.xsy). Prepare el chip e inicie la serie.
3. Defina un umbral de detección para la evaluación de los resultados:
 - 3a. Seleccione "**Data**" (Datos) en "**Contexts**" y luego haga clic en la pestaña "**Assay Properties**" (Propiedades del ensayo). Seleccione **Global** y **Normal** en el menú desplegable de la derecha.
 - 3b. Seleccione "**Sample Setpoints > Integrator > height threshold (FU)**" (Puntos definidos de muestra > Integrador > umbral de altura [FU]) y establezca el valor en "**0**" (el valor predeterminado es "**20**") para detectar todas las señales.

Análisis de los resultados

La prueba se considera positiva cuando se detecta claramente un fragmento de PCR de como mínimo un transcrito asociado al tumor.

Al utilizar el dispositivo Agilent 2100 Bioanalyzer, los picos con una concentración $\geq 0,10$ ng/ μ l son positivos (figura 3).

El fragmento de la actina del gen de control debe mostrarse en todas las muestras de la prueba (control de PCR interno). Una señal de actina constituye un control positivo para una separación celular, transcripción inversa y PCR multiplexada efectivas. Las muestras de control negativo y control para RT no deben presentar bandas superiores a 80 pares de bases (dímeros de primers).

Un fragmento superior a 900 bp es indicativo de contaminación con ADN genómico, lo cual sugiere que ha ocurrido un problema durante la separación celular. En este caso los resultados no son válidos.

IMPORTANTE: Si el protocolo no se sigue con exactitud, se pueden generar resultados negativos falsos o positivos falsos.

Por favor, no dude en ponerse en contacto con nuestro equipo de asistencia si necesita ayuda para interpretar los resultados.

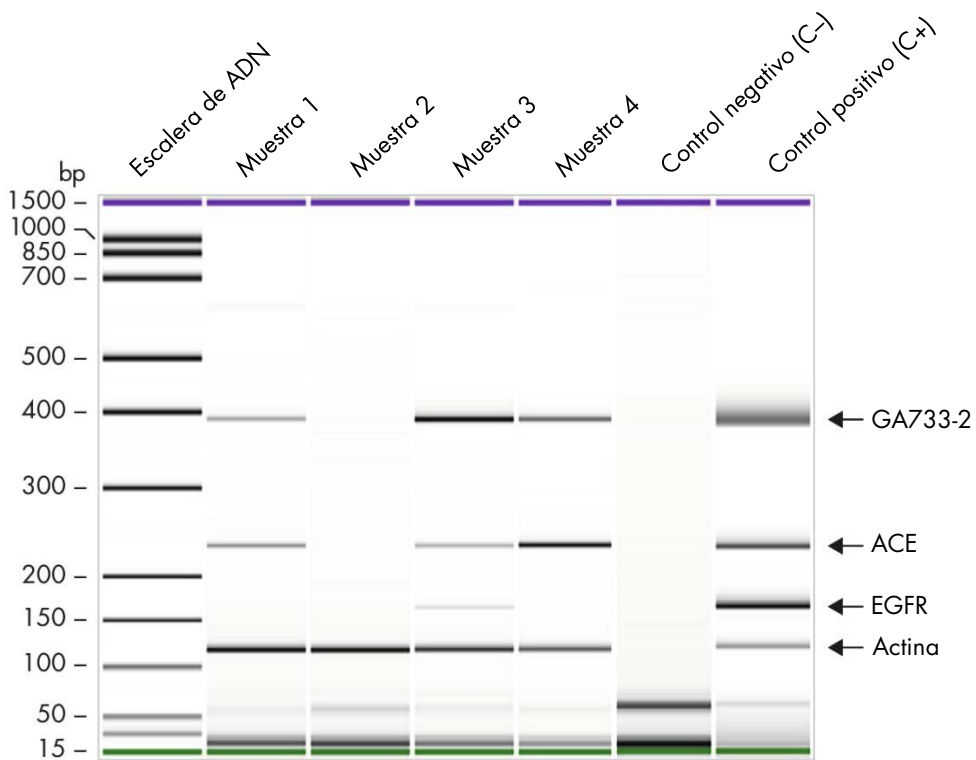


Figura 3. Resultados de la prueba AdnaTest ColonCancerDetect con muestras analizadas con Agilent 2100 Bioanalyzer. El primer carril muestra el tamaño estándar del ADN (escalera de ADN). Las muestras 1 y 4 son positivas para GA733-2 y ACE; la muestra 2 es negativa y la muestra 3 es positiva para GA733-2, ACE y EGFR. La actina se detecta en las muestras de la 1 a la 4. Los controles negativo (C-) y positivo (C+) para PCR aparecen en los dos últimos carriles.

Guía para la resolución de problemas

Para obtener más información, consulte la página de preguntas frecuentes (Frequently Asked Questions) de nuestro Centro de asistencia técnica: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Los científicos del servicio técnico de QIAGEN se encargarán de responder cualquier pregunta que tenga sobre la información y/o los protocolos de este manual, así como sobre las tecnologías para la preparación de muestras y ensayos de biología molecular (encontrará la información de contacto en www.qiagen.com).

Control de calidad

En cumplimiento del sistema de gestión de calidad con certificación ISO de QIAGEN, cada lote de pruebas AdnaTest ColonCancerSelect y AdnaTest ColonCancerDetect se analiza en relación con especificaciones predeterminadas para garantizar la uniformidad de la calidad del producto.

Limitaciones

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

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

Es importante que el usuario lea atentamente las instrucciones de uso antes de utilizar el sistema.

Para obtener resultados óptimos con la PCR es necesario un cumplimiento estricto de las instrucciones de uso.

Preste atención a las fechas de caducidad impresas en la caja y en las etiquetas de todos los componentes. No use componentes después de su fecha de caducidad.

La interpretación de los resultados de diagnóstico obtenidos debe realizarse en combinación con otros resultados clínicos o de laboratorio.

Características de rendimiento

Recuperación

Se añadieron 2 y 10 células T84 de cáncer de colon cultivadas a muestras de sangre de donantes sanos para determinar las tasas de recuperación obtenidas con la prueba AdnaTest ColonCancerSelect/Detect (tabla 5).

Tabla 5. Tasa de recuperación de la prueba AdnaTest ColonCancer para células tumorales añadidas a muestras de sangre de donantes sanos

	Número total de muestras	Número de positivos	Recuperación
Dos células tumorales añadidas a 5 ml de sangre	63	48	76%
Diez células tumorales añadidas a 5 ml de sangre	41	41	100%

La tasa de recuperación es del 76% para la detección de 2 células tumorales añadidas a 5 ml de sangre proveniente de donantes sanos. La detección de 10 células añadidas a 5 ml de sangre de donantes sanos es del 100%.

Especificidad

Se utilizó la prueba AdnaTest ColonCancerSelect/Detect para analizar muestras de 106 donantes sanos con el objetivo de determinar la tasa de falsos positivos en el valor de corte indicado (concentración del fragmento de 0,15 ng/μl para cada perfil génico incluido, excepto la actina).

Tabla 6. Determinación de la especificación

Controles	Número total de muestras	Número de positivos falsos	Especificidad (%)
Donantes sanos	106	2 (2%)	98

La prueba AdnaTest ColonCancerSelect/Detect mostró una especificidad del 98% (tabla 6).

Reproducibilidad

Se añadieron 10 células T84 de cáncer de colon a veinte muestras de sangre provenientes de donantes sanos por muestra. Se procedió al análisis de las muestras de sangre mediante la prueba AdnaTest ColonCancerSelect/Detect a cargo de dos operarios para determinar la reproducibilidad. La reproducibilidad intraensayo e interensayo fue del 100% (tabla 7).

Tabla 7. Reproducibilidad de la prueba AdnaTest ColonCancer Select/Detect

Usuario	Resultados positivos para AdnaTest/muestras	Reproducibilidad intraensayo (%)	Reproducibilidad interensayo (%)
A	10/10	100	100
B	10/10	100	100

Precisión

Para determinar la precisión, se agruparon alícuotas de ADNc y se analizaron mediante la prueba AdnaTest ColonCancerDetect. Dos operarios analizaron 30 muestras de ADNc formadas por 3 mediciones independientes de 10 muestras. La precisión intraensayo e interensayo fue del 100% (tabla 8).

Tabla 8. Precisión de la prueba AdnaTest ColonCancerDetect

Usuario	Resultados positivos para AdnaTest/muestras	Precisión intraensayo (%)	Precisión interensayo (%)
A	30/30	100	100
B	30/30	100	100

Sustancias interferentes

Anticoagulantes

Es obligatorio el uso de anticoagulantes para extraer y transportar sangre. No obstante, la heparina y el citrato facilitan la formación de agregados tras la adición de las microesferas inmunomagnéticas de la prueba AdnaTest, lo que puede provocar la ausencia de resultados o resultados falsos. En cambio, los anticoagulantes EDTA y ACDA (solución A de citrato/dextrosa/adenina) son compatibles con las microesferas inmunomagnéticas de la prueba AdnaTest.

Hemólisis

La hemólisis de las muestras de sangre (la fracción del plasma se muestra en rojo) se debe, en la mayoría de los casos, a condiciones de transporte o almacenamiento incorrectas. Este tipo de muestras pueden generar resultados negativos falsos y deberían eliminarse.

Medicamentos para quimioterapia y terapias dirigidas y terapias antihormonales

Los medicamentos empleados para la quimioterapia (taxanos, cisplatino, oxaliplatino, 5-FU, antraciclina, irinotecán, etc.) son potentes citotoxinas que provocan daños o muerte celular rápida en las muestras de sangre. Como consecuencia, es muy probable que se obtengan resultados negativos falsos cuando se utilizan las microesferas inmunomagnéticas de la prueba AdnaTest. Tras la administración de estas sustancias, el cuerpo humano necesita entre 5 y 7 días aproximadamente para desintoxicarse (tabla 9). Por lo tanto, no deben utilizarse las muestras de sangre extraídas durante este periodo con las microesferas inmunomagnéticas de la prueba AdnaTest.

Tabla 9. Semivida de los fármacos para quimioterapia

Fármaco	Semivida	Referencia
5-Fluorouracilo	Hasta 20 minutos	www.drugs.com/pro/fluorouracil-injection.html
Docetaxel	Hasta 11,1 horas	www.drugs.com/pro/docetaxel.html
Cisplatino	Hasta 30 minutos	www.drugs.com/pro/cisplatin.html
Carboplatino	Hasta 5,9 horas	www.drugs.com/pro/carboplatin.html
Paclitaxel	Aproximadamente 25,4 horas	www.drugs.com/pro/paclitaxel.html

Se recomienda tomar la misma precaución con las terapias dirigidas que utilizan anticuerpos (Herceptin®, bevacizumab, cetuximab, etc.), bloqueadores de tirosina cinasa (olaparib, Iressa®, Erbitux®, lapatinib, etc.) y fármacos antihormonales (tamoxifeno, abiraterona, enzalutamida, etc.) administrados de forma individual o en combinación con fármacos para quimioterapia.

En los ensayos clínicos que demuestran el valor pronóstico de las células tumorales circulantes (CTC) identificadas y caracterizadas mediante las microesferas inmunomagnéticas de la prueba AdnaTest, no se observaron interferencias negativas provocadas por los fármacos para quimioterapia, las terapias dirigidas o las terapias antihormonales en los casos en los que se respetó el periodo de espera mínimo de 7 días tras la administración del fármaco. Asimismo, aunque es poco probable un efecto negativo de las comedificaciones habituales (aspirina, ibuprofeno, aprepitant, esteroides, etc.), siempre se realiza un seguimiento.

Condiciones interferentes

Coagulación de la sangre

Durante la realización de los ensayos clínicos, se observó coagulación sanguínea tras la incubación con microesferas inmunomagnéticas de la prueba AdnaTest, principalmente en muestras de pacientes cuya enfermedad estaba en un estado avanzado. Las muestras que presentan coagulación son difíciles de procesar durante el flujo de trabajo de la prueba AdnaTest debido al aumento de la viscosidad, y también son difíciles de pipetear. Este tipo de muestras también contiene un número elevado inaceptable de leucocitos contaminantes, lo que conlleva la aparición de resultados positivos falsos. Es necesario eliminar dichas muestras.

Enfermedades orgánicas benignas y afecciones inflamatorias crónicas

Las enfermedades orgánicas benignas y las inflamaciones crónicas, como la artritis, la hiperplasia prostática benigna (HPB), la enfermedad de Crohn, etc., no generan resultados positivos falsos en la prueba AdnaTest.

Alergia aguda

Las afecciones alérgicas agudas incrementan el número de leucocitos contaminantes tras el enriquecimiento de las CTC mediante las microesferas inmunomagnéticas de la prueba AdnaTest. Por lo tanto, no se pueden descartar por completo los resultados positivos falsos.

Estudios clínicos

Se analizaron muestras de sangre de 18 pacientes con cáncer de colon metastásico antes de recibir tratamiento y durante la primera fase del mismo a fin de comparar los datos clínicos de TC (obtenidos 3 meses después de comenzar el tratamiento) con los resultados de la prueba AdnaTest. La positividad global de las CTC antes del tratamiento fue del 67% (12/18). De los 12 pacientes, 4 no respondieron al tratamiento, 2 mantuvieron estable la enfermedad y 6 respondieron positivamente (remisión parcial). Las CTC persistieron en un 75% de los pacientes que no respondieron al tratamiento, pero desaparecieron durante la

fase inicial del tratamiento en un 100% del grupo que respondió positivamente. Estos hallazgos indican que el análisis de las CTC en pacientes con cáncer de colon metastásico constituye un indicador temprano de la respuesta al tratamiento. Lankiewicz et al. 2008).

Referencia

Lankiewicz, S., Zimmermann, S., Hollmann, C., Hillemann, T. y Greten, T.F. (2008) Circulating tumour cells as a predictive factor for response to systemic chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Mol. Oncol.* **2**, 349–55.

Abreviaturas

AdnaMag-L	Concentrador de partículas magnéticas (grande)
AdnaMag-S	Concentrador de partículas magnéticas (pequeño)
pb	Pares de bases
C+	Control positivo
C-	Control negativo
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ACE	Antígeno carcinoembrionario
ADN	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfato
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
GA733-2	Antígeno 733-2 asociado a tumor gastrointestinal
kb	kilobases
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RNasa	Ribonucleasa
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcripción inversa

Símbolos



Contiene suficientes reactivos para <N> pruebas



Fecha de caducidad



Limitación de temperatura



Número de referencia



Consultar las instrucciones de uso



Fabricante



Dispositivo médico para diagnóstico *in vitro*



Número de material



Número mundial de artículo comercial

Información para pedidos

Producto	Contenido	N.º de referencia
AdnaTest ColonCancerSelect	Para el aislamiento de las CTC y la posterior extracción de ARNm de sangre completa humana para 12 preparaciones	395422
AdnaTest ColonCancerDetect	Kit RT-PCR para la detección de la expresión génica asociada al cáncer de colon en células tumorales enriquecidas	396422
Productos relacionados		
AdnaTube	12 tubos para muestras que contienen EDTA. Usar solamente con sangre anticoagulada recogida en tubos de recogida de sangre con A-CDA de BD	399932
AdnaMag-L	Para 8 tubos, 15 ml	399921
AdnaMag-S	Para 8 tubos, 1,5 ml	399911
Sensiscript RT Kit (50)	Para 50 reacciones de transcripción inversa:* Sensiscript Reverse Transcriptase (transcriptasa inversa Sensiscript), 150 µl de 10x Buffer RT (tampón RT 10x), 100 µl de dNTP Mix (mezcla de dNTP) (contiene 5 mM por cada dNTP), 1,1 ml de agua exenta de RNasa	205211
HotStarTaq Master Mix Kit (250 U)	HotStarTaq Master Mix (mezcla maestra para HotStarTaq) 3 × 0,85 ml (contiene 250 unidades de polimerasa de ADN HotStarTaq, tampón para PCR con 3 mM de MgCl ₂ y 400 µM de cada dNTP) y agua exenta de RNasa 2 × 1,7 ml	203443

* El kit para RT Sensiscript (50) solo tiene capacidad para 25 muestras con la prueba AdnaTest ColonCancerDetect, ya que se necesita el doble de volumen para cada reacción.

Si desea obtener información actualizada sobre la licencia y las exenciones de responsabilidad específicas del producto, consulte el manual del usuario o el manual del kit de QIAGEN correspondiente. Los manuales del usuario y los manuales del kit de QIAGEN están disponibles en **www.qiagen.com** o pueden solicitarse a los servicios técnicos de QIAGEN o a su distribuidor local.

Acuerdo de licencia limitada para AdnaTest ColonCancerSelect y AdnaTest ColonCancerDetect

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

1. El producto debe utilizarse exclusivamente de acuerdo con los protocolos proporcionados con el producto y este manual de uso, así como con los componentes contenidos en el kit. QIAGEN no ofrece licencia alguna bajo ninguna de sus propiedades intelectuales para utilizar o incorporar los componentes suministrados en este kit con componentes no incluidos en el mismo, excepto según se describe en los protocolos proporcionados con el producto, este manual y otros protocolos disponibles en **www.qiagen.com**. Algunos de estos protocolos adicionales han sido proporcionados por usuarios de QIAGEN para otros usuarios. QIAGEN no ha probado ni optimizado estos protocolos en profundidad. Por ello, QIAGEN no los garantiza ni asegura que no infrinjan los derechos de terceros.
2. Aparte de las licencias expresamente especificadas, QIAGEN no garantiza que estos kits ni su uso no infrinjan los derechos de terceros.
3. Este kit y sus componentes tienen licencia para un solo uso y no se pueden reutilizar, reacondicionar ni revender.
4. QIAGEN renuncia específicamente a cualquier otra licencia, explícita o implícita, distinta de las licencias expresamente especificadas.
5. El comprador y el usuario de los kits aceptan no realizar ni permitir a otros realizar ningún paso que pueda conducir a acciones 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**.

Marcas comerciales: QIAGEN®, Sample to Insight®, HoStarTaq®, Sensiscript® (QIAGEN Group); Agilent® (Agilent Technologies, Inc.); ERBITUX® (ImClone LLC., una filial propiedad exclusiva de Eli Lilly and Company); Herceptin® (Genentech, Inc.); IRESSA® (AstraZeneca Group) LabChip® (Caliper Life Sciences, Inc.); Sarstedt®, S-Monovette® (Sarstedt AG y Co.); Vacutainer® (Becton Dickinson and Company).

HB-2343-001 © 2017 QIAGEN. Reservados todos los derechos.

Esta página se ha dejado intencionadamente en blanco.

Pedidos www.qiagen.com/shop | Servicio técnico support.qiagen.com | Sitio web www.qiagen.com