



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
1983/2023 - 40 AÑOS DE DEMOCRACIA

Disposición

Número:

Referencia: 1-0047-3110-000956-23-3

VISTO el Expediente N° 1-0047-3110-000956-23-3 del Registro de esta Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT), y:

CONSIDERANDO:

Que por las presentes actuaciones INVITROGEN ARGENTINA S.A solicita se autorice la inscripción en el Registro Productores y Productos de Tecnología Médica (RPPTM) de esta Administración Nacional, de un nuevo/s Producto/s Médico/s para diagnóstico in vitro, Nombre descriptivo: A54401 – Applied Biosystems™ TaqPath™ Seq HIV-1 Genotyping Kit.

Que en el expediente de referencia consta el informe técnico producido por el Servicio de Productos para Diagnóstico in vitro que establece que los productos reúnen las condiciones de aptitud requeridas para su autorización .

Que se ha dado cumplimiento a los términos que establecen la Ley N° 16.463, Resolución Ministerial N° 145/98 y Disposición ANMAT N° 2674/99 y normas complementarias.

Que el Instituto Nacional de Productos Médicos ha tomado la intervención de su competencia.

Que corresponde autorizar la inscripción en el RPPTM del producto médico objeto de la solicitud.

Que la presente se dicta en virtud de las facultades conferidas por los Decretos N° 1490/92 y sus modificatorias.

Por ello;

EL ADMINISTRADOR NACIONAL DE LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE MEDICAMENTOS,
ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA MÉDICA

DISPONE:

ARTÍCULO 1º.- Autorízase la inscripción en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica (RPPTM) de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) del producto médico para diagnóstico de uso in vitro, Nombre descriptivo: A54401 – Applied Biosystems™ TaqPath™ Seq HIV-1 Genotyping Kit de acuerdo con lo solicitado por INVITROGEN ARGENTINA S.A con los Datos Característicos que figuran al pie de la presente.

ARTÍCULO 2º.- Autorízase los textos de los proyectos de rótulo/s y de instrucciones de uso que obran en documento GEDO N° IF-2023-148717480-APN-INPM#ANMAT .

ARTÍCULO 3º.- En los rótulos e instrucciones de uso autorizados deberá figurar la leyenda "Autorizado por la ANMAT PM 1569-32 ", con exclusión de toda otra leyenda no contemplada en la normativa vigente.

ARTICULO 4º.- Extiéndase el Certificado de Autorización e Inscripción en el RPPTM con los datos característicos mencionados en esta disposición.

ARTÍCULO 5º.- La vigencia del Certificado de Autorización será de cinco (5) años, a partir de la fecha de la presente disposición.

ARTÍCULO 6º.- Regístrese. Inscríbese en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica al nuevo producto. Por el Departamento de Mesa de Entrada, notifíquese al interesado, haciéndole entrega de la presente Disposición, conjuntamente con rótulos e instrucciones de uso autorizados y el Certificado mencionado en el artículo 4º. Gírese a la Dirección de Gestión de Información Técnica a los fines de confeccionar el legajo correspondiente. Cumplido, archívese.

DATOS IDENTIFICATORIOS CARACTERÍSTICOS

Nombre descriptivo: A54401 – Applied Biosystems™ TaqPath™ Seq HIV-1 Genotyping Kit

Marca comercial: TaqPath™

Modelos:

Conteniendo:

- 2) 100110989 - RNA Positive Control
- 3) 100110995 - HIV RNA Negative Control
- 4) 100111072 - RT-PCR Master Mix, PR/RT
- 5) 100110985 - RT-PCR Master Mix, IN
- 6) 100110997 - Nested-PCR Master Mix, PR/RT
- 7) 100110987 - Nested-PCR Master Mix, IN
- 8) 100110998 - SuperScript™ III One-Step RT-PCR with Platinum™ Taq High Fidelity Enzyme
- 9) 100110994 - AmpliTaq Gold™ LD DNA Polymerase

- 10) 100110993 - HIV Sequencing Mix R12
- 11) 100110992 - HIV Sequencing Mix R11
- 12) 100110991 - HIV Sequencing Mix F12
- 13) 100110990 - HIV Sequencing Mix F11
- 14) 100111009 - HIV Sequencing Mix R3
- 15) 100111008 - HIV Sequencing Mix R2
- 16) 100111002 - HIV Sequencing Mix R1
- 17) 100111001 - HIV Sequencing Mix F3
- 18) 100111000 - HIV Sequencing Mix F2
- 19) 100110999 - HIV Sequencing Mix F1

Indicación/es de uso:

El Applied Biosystems™ TaqPath™ Seq HIV-1 Genotyping Kit (A54401) es un ensayo de diagnóstico in vitro (IVD) basado en la carrera de secuenciación de Sanger para ayudar en la detección de mutaciones genómicas (en las regiones de proteasa, transcriptasa inversa e integrasa del gen pol) en el ácido ribonucleico vírico del VIH-1 extraído de plasma EDTA y manchas de sangre secas, como ayuda en la monitorización y el tratamiento de personas infectadas con VIH-1.

El Applied Biosystems™ TaqPath™ Seq HIV-1 Genotyping Kit se usa junto con los 3500 Series Genetic Analyzers. El ensayo genera resultados para su uso en el genotipado de los subtipos A, B, C, D, F, G, CRF01_AE, CRF02_AG, CRF 06_cpx del VIH-1.

Los resultados se deben evaluar con más información disponible clínica y de laboratorio. Los resultados no están previstos para su uso como ayuda en el diagnóstico de infección por VIH ni para confirmar la presencia de infección por VIH. Los resultados no están previstos para el cribado de donantes de sangre, plasma o células humanas, tejidos, productos basados en tejidos y células.

Solo para uso profesional.

- 2) 100110989 - RNA Positive Control: Control positivo.
- 3) 100110995 - HIV RNA Negative Control: Control negativo.
- 8) 100110998 - SuperScript™ III One-Step RT-PCR with Platinum™ Taq High Fidelity Enzyme: Transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina recombinante.

Forma de presentación: 1) A54401 – Applied Biosystems™ TaqPath™ Seq HIV-1 Genotyping Kit para 48 muestras

Conteniendo:

- 2) 100110989 - RNA Positive Control: 2 × 100 µL
- 3) 100110995 - HIV RNA Negative Control: 2 × 100 µL
- 4) 100111072 - RT-PCR Master Mix, PR/RT: 2 × 1,055 µL
- 5) 100110985 - RT-PCR Master Mix, IN: 2 × 1,055 µL
- 6) 100110997 - Nested-PCR Master Mix, PR/RT: 2 × 1,285 µL
- 7) 100110987 - Nested-PCR Master Mix, IN: 2 × 1,285 µL
- 8) 100110998 - SuperScript™ III One-Step RT-PCR with Platinum™ Taq High Fidelity Enzyme: 2 × 54 µL
- 9) 100110994 - AmpliTaq Gold™ LD DNA Polymerase: 1 × 54 µL
- 10) 100110993 - HIV Sequencing Mix R12: 2 × 435 µL
- 11) 100110992 - HIV Sequencing Mix R11: 2 × 435 µL
- 12) 100110991 - HIV Sequencing Mix F12: 2 × 435 µL
- 13) 100110990 - HIV Sequencing Mix F11: 2 × 435 µL

- 14) 100111009 - HIV Sequencing Mix R3: 2 × 435 µL
- 15) 100111008 - HIV Sequencing Mix R2: 2 × 435 µL
- 16) 100111002 - HIV Sequencing Mix R1: 2 × 435 µL
- 17) 100111001 - HIV Sequencing Mix F3: 2 × 435 µL
- 18) 100111000 - HIV Sequencing Mix F2: 2 × 435 µL
- 19) 100110999 - HIV Sequencing Mix F1: 2 × 435 µL

Período de vida útil y condición de conservación: 1) A54401 – Applied Biosystems™ TaqPath™ Seq HIV-1 Genotyping Kit: 12 meses de -25°C a -15°C

Conteniendo:

- 2) 100110989 - RNA Positive Control: 12 meses de -25°C a -15°C
- 3) 100110995 - HIV RNA Negative Control: 12 meses de -25°C a -15°C
- 4) 100111072 - RT-PCR Master Mix, PR/RT: 12 meses de -25°C a -15°C
- 5) 100110985 - RT-PCR Master Mix, IN: 12 meses de -25°C a -15°C
- 6) 100110997 - Nested-PCR Master Mix, PR/RT: 12 meses de -25°C a -15°C
- 7) 100110987 - Nested-PCR Master Mix, IN: 12 meses de -25°C a -15°C
- 8) 100110998 - SuperScript™ III One-Step RT-PCR with Platinum™ Taq High Fidelity Enzyme: 12 meses de -25°C a -15°C
- 9) 100110994 - AmpliTaq Gold™ LD DNA Polymerase: 12 meses de -25°C a -15°C
- 10) 100110993 - HIV Sequencing Mix R12: 12 meses de -25°C a -15°C, protegido de la luz
- 11) 100110992 - HIV Sequencing Mix R11: 12 meses de -25°C a -15°C, protegido de la luz
- 12) 100110991 - HIV Sequencing Mix F12: 12 meses de -25°C a -15°C, protegido de la luz
- 13) 100110990 - HIV Sequencing Mix F11: 12 meses de -25°C a -15°C, protegido de la luz
- 14) 100111009 - HIV Sequencing Mix R3: 12 meses de -25°C a -15°C, protegido de la luz
- 15) 100111008 - HIV Sequencing Mix R2: 12 meses de -25°C a -15°C, protegido de la luz
- 16) 100111002 - HIV Sequencing Mix R1: 12 meses de -25°C a -15°C, protegido de la luz
- 17) 100111001 - HIV Sequencing Mix F3: 12 meses de -25°C a -15°C, protegido de la luz
- 18) 100111000 - HIV Sequencing Mix F2: 12 meses de -25°C a -15°C, protegido de la luz
- 19) 100110999 - HIV Sequencing Mix F1: 12 meses de -25°C a -15°C, protegido de la luz

No utilice los componentes del kit si se han superado las fechas de caducidad indicadas en las cajas del componente.

No supere los 6 ciclos de congelación/descongelación de las RT-PCR Master Mixes, Nested-PCR Master Mixes, RNA Positive Control y HIV Sequencing Mixes.

Mantenga los reactivos en hielo durante la preparación de la reacción.

Restablezca los tubos con enzimas a una temperatura comprendida entre -25 °C y -15 °C de inmediato después del uso.

Nombre del fabricante:

Life Technologies Corporation

Lugar de elaboración:

6055 Sunol Boulevard

Pleasanton CA 94566

ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

Condición de uso: Uso profesional exclusivo

Expediente N° 1-0047-3110-000956-23-3

N° Identificador Trámite: 46164

AM

Digitally signed by GARAY Valéria Teresa
Date: 2023.12.19 17:18:00 ART
Location: Ciudad Autónoma de Buenos Aires

Digitally signed by GESTION DOCUMENTAL
ELECTRONICA - GDE
Date: 2023.12.19 17:18:03 -03:00

TaqPath™ Seq HIV-1 Genotyping Kit

INSTRUCCIONES DE USO

Número de catálogo A54401

Número de publicación MAN0026523

Revisión B.0



Para utilización en diagnóstico in vitro.

ThermoFisher
S C I E N T I F I C

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Jeny', is written over the ThermoFisher Scientific logo.

Directora Técnica y Apoderada Legal
MNI 15234



El cliente es responsable de la validación de los ensayos y del cumplimiento de todos los requisitos legales relacionados con los procedimientos y usos del instrumento.

La información incluida en esta guía está sujeta a cambios sin previo aviso.

EXENCIÓN DE RESPONSABILIDAD: EN LA MEDIDA DE LO ESTIPULADO POR LA LEY, THERMO FISHER SCIENTIFIC INC. Y/O SUS AFILIADOS NO SE HACEN RESPONSABLES POR DAÑOS ESPECIALES, INCIDENTALES, INDIRECTOS, PUNITIVOS, MÚLTIPLES O CONSIGUIENTES EN RELACIÓN CON O DERIVADOS DE ESTE DOCUMENTO, INCLUYENDO EL USO DEL MISMO.

Traducido del inglés, del número de publicación MAN0026326 Revisión B.0.

Historial de revisiones: N.º de Pub. MAN0026326

Revisión	Fecha	Descripción
B.0	19 de julio de 2022	<ul style="list-style-type: none"> Se han hecho actualizaciones para cambiar el nombre de pGEM Sequencing Control a Sequencing Vector. Se ha añadido la declaración de validación del cliente a la página de derechos de autor (copyright). Se ha añadido la información sobre el producto a "Descripción del producto" en la página 6. Se han revisado las tablas de contenido en "Contenido y almacenamiento" en la página 6. Se han revisado los materiales en "Materiales necesarios no suministrados" en la página 10. Se han añadido referencias a MagMAX™ Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit y MagMAX™ Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit for HIV-1 Dried Blood Spots "Limitaciones del ensayo" en la página 14. Se han revisado los pasos del flujo de trabajo en "Tareas de flujo de trabajo por zona de laboratorio" en la página 16. Se ha eliminado la referencia al procesamiento de muestras unidireccional de "Directrices" en la página 18. Se ha añadido la referencia a las muestras en "Preparación de las reacciones de RT-PCR de proteasa/transcriptasa inversa (PR/RT)" en la página 19. Se han actualizado las unidades en la tabla de reacción de PCR posicionada de PR/RT a µl en "Preparación de las reacciones de la PCR posicionada de PR/RT" en la página 23. Se ha añadido texto a la descripción de la banda de muestras en las tablas de calidad del producto en "Evaluación de la calidad del producto de PCR posicionada de PR/RT" en la página 24 y "Evaluación de la calidad del producto de PCR posicionada de IN" en la página 27. La referencia a realizar 3 o más ciclos de PCR se ha eliminado en "Evaluación de la calidad del producto de PCR posicionada de PR/RT" en la página 24 y "Evaluación de la calidad del producto de PCR posicionada de IN" en la página 27. Se ha añadido una referencia a Apéndice A, "Solución de problemas" en "Evaluación de la calidad del producto de PCR posicionada de PR/RT" en la página 24 y "Evaluación de la calidad del producto de PCR posicionada de IN" en la página 27. Se ha actualizado el texto de los pasos de EC en "Realice la electroforesis capilar (EC)" en la página 35. Se han actualizado los datos en "Reproducibilidad y precisión" en la página 38. Se ha añadido texto a la observación sobre tamaños de banda incorrectos como posible causa en Apéndice A, "Solución de problemas".
A.0	13 mayo de 2022	Nuevo documento para el TaqPath™ Seq HIV-1 Genotyping Kit.

Información importante sobre licencias: Estos productos pueden estar cubiertos por una o más licencias de etiquetado de uso limitado. Mediante el uso de estos productos, acepta los términos y condiciones de todas las licencias de etiquetado de uso limitado aplicables.

MARCAS COMERCIALES: Exatype es una marca comercial de Hyrax Biosciences. Todas las marcas comerciales son propiedad de Thermo Fisher Scientific y sus subsidiarias a menos que se especifique lo contrario.

©2022 Thermo Fisher Scientific Inc. Todos los derechos reservados.

Índice

■ CAPÍTULO 1 Información sobre el producto	5
Uso previsto	5
Descripción del producto	6
Contenido y almacenamiento	6
Materiales necesarios no suministrados	10
Estabilidad del kit	13
Advertencias y precauciones	13
Limitaciones del ensayo	14
Estabilidad del reactivo en uso	15
Descripción general del flujo de trabajo	16
Tareas de flujo de trabajo por zona de laboratorio	16
■ CAPÍTULO 2 Realización de la amplificación	18
Directrices	18
Antes de empezar	19
Realización de la RT-PCR	19
Preparación de las reacciones de RT-PCR de proteasa/transcriptasa inversa (PR/RT)	19
Procesamiento de las reacciones de RT-PCR de PR/RT	20
Preparación de las reacciones de RT-PCR de integrasa (IN)	21
Procesamiento de las reacciones de RT-PCR de IN	22
Realización de la PCR posicionada de PR/RT	23
Preparación de las reacciones de la PCR posicionada de PR/RT	23
Procesamiento de las reacciones de la PCR posicionada de PR/RT	24
Evaluación de la calidad del producto de PCR posicionada de PR/RT	24
Realización de la PCR posicionada de IN	26
Preparación de las reacciones de la PCR posicionada de IN	26
Procesamiento de las reacciones de la PCR posicionada de IN	27
Evaluación de la calidad del producto de PCR posicionada de IN	27

■	CAPÍTULO 3	Realización de la carrera de secuenciación	29
		Realización de la carrera de secuenciación para PR/RT	29
		Tratamiento de los productos de PCR posicionada de PR/RT con el ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent	29
		Preparación de las reacciones de la carrera de secuenciación del ciclo para PR/RT	30
		Procesamiento de las reacciones de la carrera de secuenciación del ciclo para PR/RT	31
		Realización de la carrera de secuenciación para IN	31
		Tratamiento de los productos de PCR posicionada de IN con el ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent	31
		Preparación de las reacciones de la carrera de secuenciación del ciclo para IN	32
		Procesamiento de las reacciones de la carrera de secuenciación del ciclo para IN	33
		Purifique las reacciones de la carrera de secuenciación con el BigDye X Terminator™ Purification Kit	34
		Realice la electroforesis capilar (EC)	35
		Determinación de la calidad de la secuencia	36
■	CAPÍTULO 4	Características de rendimiento	37
		Límite de detección (sensibilidad analítica)	37
		Reproducibilidad y precisión	38
		Sustancias interferentes	40
		Reactividad cruzada (especificidad analítica)	41
		Evaluación del rendimiento	42
■	APÉNDICE A	Solución de problemas	44
■	APÉNDICE B	Secuencias de controles	47
		Secuencia parcial de RNA Positive Control, PR/RT/IN	47
		Perfil de mutación del control positivo de ARN	48
■	APÉNDICE C	Seguridad	49
		Seguridad química	50
		Seguridad biológica	51
■	APÉNDICE D	Documentación y soporte	52
		Documentación relacionada	52
		Asistencia al cliente y soporte técnico	52
		Garantía limitada del producto	53



Información sobre el producto

■ Uso previsto	5
■ Descripción del producto	6
■ Contenido y almacenamiento	6
■ Materiales necesarios no suministrados	10
■ Estabilidad del kit	13
■ Advertencias y precauciones	13
■ Limitaciones del ensayo	14
■ Estabilidad del reactivo en uso	15
■ Descripción general del flujo de trabajo	16
■ Tareas de flujo de trabajo por zona de laboratorio	16

¡IMPORTANTE! Antes de usar este producto, lea y entienda la información presentada en el apéndice “Seguridad” de este documento.

Uso previsto

El Applied Biosystems™ TaqPath™ Seq HIV-1 Genotyping Kit es un ensayo de diagnóstico *in vitro* (IVD) basado en la carrera de secuenciación de Sanger para ayudar en la detección de mutaciones genómicas (en las regiones de proteasa, transcriptasa inversa e integrasa del gen *pol*) en el ácido ribonucleico vírico del VIH-1 extraído de plasma EDTA y manchas de sangre secas, como ayuda en la monitorización y el tratamiento de personas infectadas con VIH-1.

El Applied Biosystems™ TaqPath™ Seq HIV-1 Genotyping Kit se usa junto con los 3500 Series Genetic Analyzers. El ensayo genera resultados para su uso en el genotipado de los subtipos A, B, C, D, F, G, CRF01_AE, CRF02_AG, CRF 06_cpx del VIH-1.

Los resultados se deben evaluar con más información disponible clínica y de laboratorio. Los resultados no están previstos para su uso como ayuda en el diagnóstico de infección por VIH ni para confirmar la presencia de infección por VIH. Los resultados no están previstos para el cribado de donantes de sangre, plasma o células humanas, tejidos, productos basados en tejidos y células.

Solo para uso profesional.

Descripción del producto

El Applied Biosystems™ HIV-1 Genotyping Kit with Integrase está diseñado para detectar mutaciones genómicas de VIH en las regiones de los codones 6-99 de la proteasa (PR), los codones 1-251 de la transcriptasa inversa (RT) y los codones 1-288 de la integrasa (IN) del gen pol en ARN aislado del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1).

Las muestras de ARN del VIH-1 preextraído se procesan mediante el kit de genotipado, que se basa en tres procesos principales:

- Transcripción inversa (RT), reacción de la cadena de la polimerasa (PCR) y PCR posicionada
- Carrera de secuenciación de ciclos
- Detección de secuencia automatizada para ofrecer un archivo de salida AB1

El archivo de salida puede analizarse para interpretar más los datos con el software público o privado disponible de su elección.

Contenido y almacenamiento

Nota: Para conocer la composición del contenido, consulte Tabla 4.

Nota: Para consultar una imagen de los contenidos del kit, consulte Figura 1.

Tabla 1 TaqPath™ Seq HIV-1 Genotyping Kit (n.º de cat. [A54401](#)): Contenido de amplificación

Contenido	Número de referencia	Cantidad	N.º de reacciones	Color del tapón	Conservación
RNA Positive Control	100110989	2 × 100 µl	2 × 8	Morado	Entre -25 °C y -15 °C
HIV RNA Negative Control	100110995	2 × 100 µl	2 × 8	Blanco	
RT-PCR Master Mix, PR/RT	100111072	2 × 1.055 µl	2 × 24	Verde azulado	
RT-PCR Master Mix, IN	100110985	2 × 1.055 µl	2 × 24	Verde azulado	
Nested-PCR Master Mix, PR/RT	100110997	2 × 1.285 µl	2 × 24	Amarillo	
Nested-PCR Master Mix, IN	100110987	2 × 1.285 µl	2 × 24	Verde claro	
SuperScript™ III One-Step RT-PCR with Platinum™ Taq High Fidelity Enzyme	100110998	2 × 54 µl	2 × 48	Verde	
AmpliTaq Gold™ LD DNA Polymerase	100110994	1 × 54 µl	1 × 48	Dorado	

Tabla 2 TaqPath™ Seq HIV-1 Genotyping Kit (n.º de cat. A54401): Contenido para la carrera de secuenciación (IN)

Contenido	Contenido abreviado	Número de referencia	Cantidad	N.º de reacciones	Color del tapón	Conservación
HIV Sequencing Mix R12	R12	100110993	2 × 435 µl	2 × 24	Verde azulado	Entre -25 °C y -15 °C, protegido de la luz
HIV Sequencing Mix R11	R11	100110992	2 × 435 µl	2 × 24	Verde claro	
HIV Sequencing Mix F12	F12	100110991	2 × 435 µl	2 × 24	Dorado	
HIV Sequencing Mix F11	F11	100110990	2 × 435 µl	2 × 24	Gris	

Tabla 3 TaqPath™ Seq HIV-1 Genotyping Kit (n.º de cat. A54401): Contenido para la carrera de secuenciación (PR/RT)

Contenido	Contenido abreviado	Número de referencia	Cantidad	N.º de reacciones	Color del tapón	Conservación
HIV Sequencing Mix R3	R3	100111009	2 × 435 µl	2 × 24	Naranja	Entre -25 °C y -15 °C, protegido de la luz
HIV Sequencing Mix R2	R2	100111008	2 × 435 µl	2 × 24	Amarillo	
HIV Sequencing Mix R1	R1	100111002	2 × 435 µl	2 × 24	Verde	
HIV Sequencing Mix F3	F3	100111001	2 × 435 µl	2 × 24	Blanco	
HIV Sequencing Mix F2	F2	100111000	2 × 435 µl	2 × 24	Morado	
HIV Sequencing Mix F1	F1	100110999	2 × 435 µl	2 × 24	Azul	

Tabla 4 Composición de los componentes del TaqPath™ Seq HIV-1 Genotyping Kit

Contenido	Composición en solución acuosa
RNA Positive Control	Componentes de ARN blindado transcrito in vitro no infeccioso que contienen secuencias de PR/RT e IN del genoma del VIH-1 < 0,1 % de tris-HCl < 0,1 % de cloruro de magnesio < 0,1 % de cloruro de sodio < 0,1 % de gelatina, piel bovina, tipo B
HIV RNA Negative Control	Tampón tris-EDTA (T10E0,1 pH 8,0)
RT-PCR Master Mix, PR/RT	< 0,1 % de base tris < 0,1 % de sulfato de magnesio
RT-PCR Master Mix, IN	< 0,1 % de BSA y proteínas recombinantes < 0,1 % de mezcla dNTP < 0,1 % de mezcla de iniciador de oligonucleótidos específicos de VIH-1 sintético no infeccioso
Nested-PCR Master Mix, PR/RT	< 0,1 % de base tris < 0,1 % de detergente no iónico
Nested-PCR Master Mix, IN	< 0,1 % de cloruro de potasio < 0,1 % de BSA < 0,01 % de azida de sodio < 0,1 % de sulfato amónico < 0,1 % de mezcla dNTP < 0,1 % de mezcla de iniciador de oligonucleótidos específicos de VIH-1 sintético no infeccioso
SuperScript™ III One-Step RT-PCR with Platinum™ Taq High Fidelity Enzyme	Transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina recombinante Platinum™ Taq High Fidelity Enzyme
AmpliTaq Gold™ LD DNA Polymerase	AmpliTaq Gold™ LD DNA Polymerase (Low DNA) "hot-start" habilitada recombinante, 5 µ/µl
HIV Sequencing Mix R12	< 0,1 % de base tris < 0,1 % de EDTA
HIV Sequencing Mix R11	< 0,1 % de cloruro de magnesio < 0,1 % de detergente no iónico < 5 % de glicerol

Tabla 4 Composición de los componentes del TaqPath Seq HIV-1 Genotyping Kit (cont.)

Contenido	Composición en solución acuosa
HIV Sequencing Mix F12	< 0,1 % de DTT
	< 0,1 % de mezcla dNTP
HIV Sequencing Mix F11	< 0,1 % de mezcla BigDye™ Terminator
	< 0,1 % de composición de enzimas de carrera de secuenciación recombinantes
	< 0,1 % de iniciador específico de VIH-1 de oligonucleótidos sintéticos no infecciosos
HIV Sequencing Mix R3	< 0,1 % de base tris
HIV Sequencing Mix R2	< 0,1 % de EDTA
HIV Sequencing Mix R1	< 0,1 % de cloruro de magnesio
	< 0,1 % de detergente no iónico
	< 5 % de glicerol
HIV Sequencing Mix F3	< 0,1 % de DTT
	< 0,1 % de mezcla dNTP
HIV Sequencing Mix F2	< 0,1 % de mezcla BigDye™ Terminator
	< 0,1 % de composición de enzimas de carrera de secuenciación recombinantes
HIV Sequencing Mix F1	< 0,1 % de iniciador específico de VIH-1 de oligonucleótidos sintéticos no infecciosos

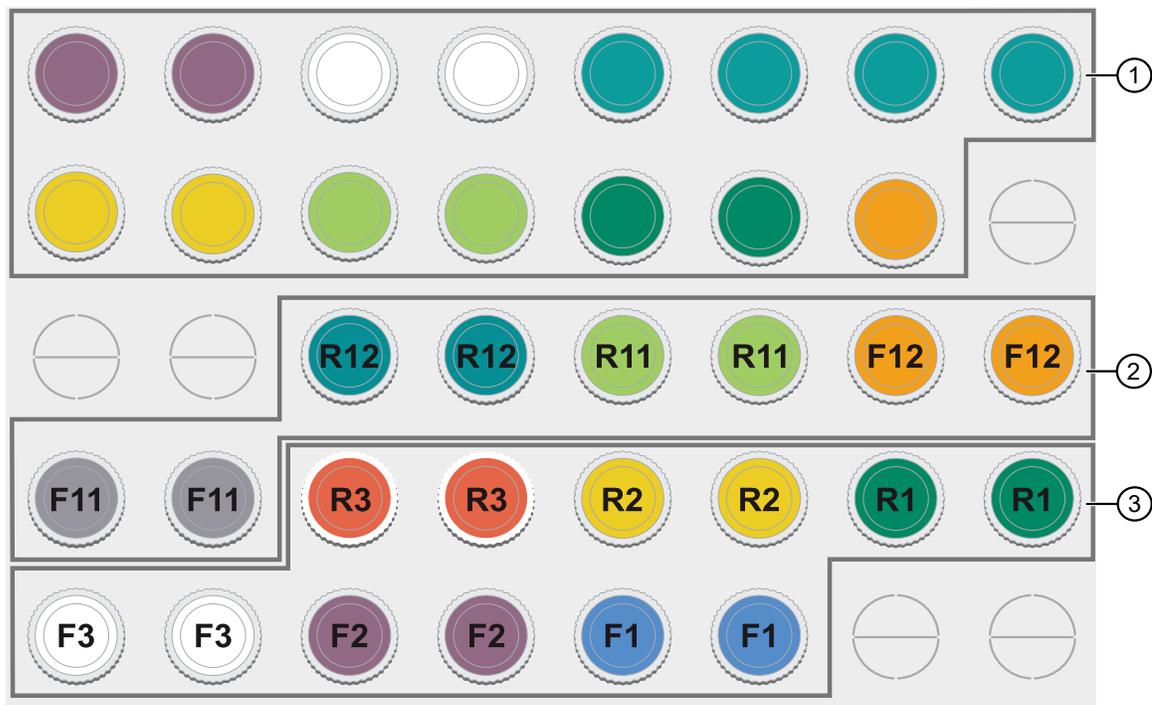


Figura 1 TaqPath™ Seq HIV-1 Genotyping Kit (n.º de cat. [A54401](#)) imagen de los contenidos

- ① Contenido de amplificación
- ② Contenido para la carrera de secuenciación (IN)
- ③ Contenido para la carrera de secuenciación (PR/RT)

Materiales necesarios no suministrados

A menos que se indique lo contrario, todos los materiales están disponibles en thermofisher.com. «MLS» indica que el material está disponible en fisherscientific.com u otro proveedor general de productos de laboratorio. Los números de catálogo que aparecen como vínculos abren las páginas web de esos productos.

Tabla 5 Materiales para generar productos de PCR posicionada

Artículo	Origen
Instrumentos y equipo	
Uno de los siguientes termocicladores: ^[1] <ul style="list-style-type: none"> • Veriti™ Dx 96-well Thermal Cycler, 0,2 mL • Veriti™ 96-Well Thermal Cycler, 0,2 ml • Termociclador GeneAmp™ PCR System 9700 	Póngase en contacto con su oficina de ventas local.
Dos estaciones de trabajo de PCR con luz UV	MLS
Microcentrífuga de sobremesa	MLS

Tabla 5 Materiales para generar productos de PCR posicionada (cont.)

Artículo	Origen
Centrífuga de placas	MLS
Agitador	MLS
E-Gel™ Power Snap Plus Electrophoresis System o equivalente (por ejemplo, consumibles y equipo de electroforesis en gel, caja UV y sistema de documentación de imágenes)	Póngase en contacto con su oficina de ventas local
Micropipetas ajustables	MLS
Pipeta multicanal (1-20 µl de volumen)	MLS
Pipeta multicanal (20-200 µl de volumen)	MLS
Bloque de frío para placa de PCR o equivalente	MLS
Congeladores y refrigeradores de almacenamiento	MLS
Placas y otros consumibles	
MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode	4306737
Uno de los siguientes, o equivalente: <ul style="list-style-type: none"> • MicroAmp™ Clear Adhesive Film • Sellos para microplaca de aluminio PolarSeal 	4306311 1152A34 (Thomas Scientific)
Puntas de pipeta, resistentes a aerosoles	MLS
Uno de los siguientes: <ul style="list-style-type: none"> • FastRuler Middle Range DNA Ladder, ready-to-use • Escalera de ADN que cubre rangos de tamaños de fragmentos de 100 bp a 2000 bp 	SM1113 MLS

[1] Puede utilizar un termociclador equivalente. Optimice los protocolos para otros termocicladores.

Tabla 6 Materiales para la carrera de secuenciación de ciclos

Artículo	Origen
Instrumentos y equipo	
Uno de los siguientes termocicladores: [1] <ul style="list-style-type: none"> • Veriti™ Dx 96-well Thermal Cycler, 0,2 mL • Veriti™ 96-Well Thermal Cycler, 0,2 ml • Termociclador GeneAmp™ PCR System 9700 	Póngase en contacto con su oficina de ventas local.
Uno de los siguientes instrumentos: [2] <ul style="list-style-type: none"> • 3500 Dx/3500xL Dx Genetic Analyzer • 3500/3500xL Genetic Analyzer 	Póngase en contacto con su oficina de ventas local.

Tabla 6 Materiales para la carrera de secuenciación de ciclos (cont.)

Artículo	Origen
Dos estaciones de trabajo de PCR con luz UV	MLS
Microcentrífuga de sobremesa	MLS
Centrífuga de placas	MLS
Agitador para el BigDye XTerminator™ Purification Kit; uno de los siguientes, o equivalente: <ul style="list-style-type: none"> Scientific Industries ABI Digital Vortex-Genie™ 2 para protocolos de micro-placa Agitador Fisherbrand™ Microplate Advanced (02-216-101) 	MLS
Micropipetas ajustables	MLS
Reactivos	
ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent	A55242
BigDye XTerminator™ Purification Kit	A55219
Placas y otros consumibles	
MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode	4306737
MicroAmp™ Clear Adhesive Film o equivalente	4306311
Puntas de pipeta, resistentes a aerosoles	MLS
Puntas de pipeta anchas (>1,0 mm)	MLS
Otros consumibles de plástico	MLS

[1] Puede utilizar un termociclador equivalente. Optimice los protocolos para otros termocicladores.

[2] Puede utilizar un instrumento de electroforesis capilar (EC) equivalente con calibración espectral de Dye Set Z. Optimice los protocolos para otros instrumentos.

Nota: Para analizar las trazas de secuenciación, puede exportar los archivos AB1 del 3500 Series Genetic Analyzer o el 3500 Dx Series Genetic Analyzer para usarlo en el análisis posterior y el software de elaboración de informes. Para obtener más información sobre el software comercial disponible, consulte los documentos de la OMS incluidos en “Documentación relacionada” en la página 52.

Nota: Los instrumentos 3500/3500xL Genetic Analyzer y 3500 Dx/3500xL Dx Genetic Analyzer se deben calibrar para que sean compatibles con el BigDye™ Terminator v3.1. Para obtener una lista completa de los consumibles requeridos del instrumento de electroforesis capilar (EC), consulte la guía de usuario de su instrumento.

Nota: Para obtener información e instrucciones sobre el instrumento, consulte los documentos enumerados en “Documentación relacionada” en la página 52.

Estabilidad del kit

- No utilice los componentes del kit si se han superado las fechas de caducidad indicadas en las cajas del componente.
- No supere los 6 ciclos de congelación/descongelación de las RT-PCR Master Mixes, Nested-PCR Master Mixes, RNA Positive Control y HIV Sequencing Mixes.
- Mantenga los reactivos en hielo durante la preparación de la reacción.
- Restablezca los tubos con enzimas a una temperatura comprendida entre $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ de inmediato después del uso.

Advertencias y precauciones

El flujo de trabajo del TaqPath™ Seq HIV-1 Genotyping Kit debe correr a cargo de personal formado y cualificado para evitar el riesgo de resultados erróneos. Utilice zonas separadas para la preparación de las muestras de los pacientes y de los controles para evitar resultados falsos positivos.

- Precaución: La ley federal limita la venta de este dispositivo únicamente a facultativos autorizados o por una orden facultativa.
- Para uso diagnóstico *in vitro*.
- Las muestras y los controles se deben tratar siempre como infecciosos y/o de riesgo biológico de acuerdo con los procedimientos de seguridad del laboratorio.
- Al manipular las muestras tome todas las precauciones necesarias. Utilice equipo de protección individual (EPI) que cumpla las directrices actuales sobre la manipulación de muestras potencialmente infecciosas.
- Utilice siempre puntas de pipeta con barrera para aerosoles. Las puntas que se usan deben ser estériles y sin desoxirribonucleasas ni ribonucleasas.
- No coma, beba, fume ni se aplique productos cosméticos en las áreas de trabajo.
- Los reactivos deben almacenarse y manipularse como se indica en “Contenido y almacenamiento” en la página 6.
- No use los kits después de la fecha de caducidad indicada.
- Deseche los residuos de conformidad con las normativas locales, estatales y federales.
- Puede solicitar las hojas de datos de seguridad.
- Los datos personales se deberán encriptar, dissociar o anonimizar cuando sea posible según los requisitos del RGPD (Reglamento General de Protección de Datos).
- En el momento de poner en marcha los instrumentos, no modifique los parámetros de la plantilla del ensayo.
- No deshabilite las características de seguridad, auditoría y firma electrónica en los instrumentos 3500 Series Genetic Analyzer.
- Ponga en marcha los instrumentos 3500 Series Genetic Analyzer solo con una placa a la vez.
- Utilice el método de carrera del termociclador que se ha definido en el protocolo y no modifique el método.
- No utilice productos de carreras que incluyan interrupciones, cancelaciones o modificaciones.

Limitaciones del ensayo

- Únicamente para uso profesional.
- El ensayo se ha diseñado para detectar los subtipos del grupo M del VIH-1 indicados en “Uso previsto” en la página 5. Sin embargo, debido a que el genoma del VIH-1 es altamente mutable, siempre existirá una pequeña probabilidad de que algunos subtipos inusuales, las formas recombinantes en circulación y las formas recombinantes nuevas y particulares de VIH-1 reaccionen de manera deficiente con el ensayo, especialmente si se producen mutaciones aleatorias en los sitios de unión del cebador.
- Es posible que la detección de mutaciones genómicas de resistencia a los medicamentos no se correlacione con la expresión fenotípica de genes.
- Esta prueba no detecta mutaciones en el grupo O del VIH-1 o el VIH-2 debido a que no se ha establecido el rendimiento en las mismas.
- Esta prueba no detectará las mutaciones genéticas fuera del alcance de este ensayo.
- La ausencia de detección de las mutaciones de resistencia a los fármacos no excluye la posibilidad de mutaciones genéticas. El médico tratante debe utilizar otras pruebas de laboratorio e información clínica para atender a los pacientes.
- Las muestras deben recogerse, transportarse y almacenarse usando los procedimientos y condiciones adecuados. La recogida, transporte o almacenamiento incorrectos de las muestras pueden reducir la capacidad del ensayo para detectar las secuencias diana.
- El rendimiento de esta prueba se estableció mediante ácidos nucleicos extraídos mediante MagMAX™ Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit y MagMAX™ Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit for HIV-1 Dried Blood Spots.
- El rendimiento del TaqPath™ Seq HIV-1 Genotyping Kit se ha establecido con el uso de especímenes de plasma recogidos a partir de muestras de sangre entera conservadas en tubos con tapones de color lavanda (tratados con EDTA). Los tipos de especímenes distintos de los especímenes de plasma recogidos a partir de muestras de sangre entera conservadas en tubos con tapón de color lavanda (tratados con EDTA) no deben someterse a pruebas con este ensayo.

Estabilidad del reactivo en uso

Tabla 7 TaqPath™ Seq HIV-1 Genotyping Kit: Información sobre la estabilidad

Reactivo	Información sobre la estabilidad
<ul style="list-style-type: none"> • RNA Positive Control • RT-PCR Master Mix, PR/RT • RT-PCR Master Mix, IN • Nested-PCR Master Mix, PR/RT • Nested-PCR Master Mix, IN • HIV Sequencing Mix R12 • HIV Sequencing Mix R11 • HIV Sequencing Mix F12 • HIV Sequencing Mix F11 • HIV Sequencing Mix R3 • HIV Sequencing Mix R2 • HIV Sequencing Mix R1 • HIV Sequencing Mix F3 • HIV Sequencing Mix F2 • HIV Sequencing Mix F1 	<p>Al descongelarse, los reactivos indicados son estables durante un período máximo de 1 año a una temperatura comprendida entre $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$.</p> <p>No supere los 6 ciclos de congelación/descongelación.</p>

Descripción general del flujo de trabajo

1. Realice dos reacciones de RT-PCR por cada muestra, una para PR/RT y una para IN, a fin de generar dos productos de RT-PCR.
2. Realice una reacción de PCR posicionada para PR/RT y una reacción de PCR posicionada para IN. Esto generará dos productos de PCR posicionada por cada muestra.
3. *(Recomendado)* Procese una alícuota (5 µl de amplicón mezclado con 5 µl de agua y el marcador del tamaño adecuado en un e-gel al 2 % o un gel de agarosa tradicional) para el control de calidad del material de entrada para la carrera de secuenciación del ciclo.
4. Trate todos los productos de PCR posicionada con el ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent.
5. Realice la carrera de secuenciación de ciclos del producto de PCR posicionada de PR/RT tratada con ExoSAP-IT™ con las mezclas de la carrera de secuenciación R3, R2, R1, F3, F2 y F1.
6. Realice la carrera de secuenciación de ciclos del producto de PCR posicionada de IN tratada con ExoSAP-IT™ con las mezclas de la carrera de secuenciación R12, R11, F12 y F11.
7. Limpie las reacciones de la carrera de secuenciación de ciclos con el BigDye XTerminator™ Purification Kit.
8. Realice la electroforesis capilar (EC) y utilice los archivos AB1 para determinar la calidad de la secuencia.

Tareas de flujo de trabajo por zona de laboratorio

Zona de preamplificación: dispensación de reactivos (sin plantillas; estación de trabajo de PCR)

Prepare la mezcla de RT-PCR

Prepare y divida las mezclas de PCR posicionada en partes alícuotas en la placa

Divida las mezclas de carrera de secuenciación de ciclos en partes alícuotas en la placa

Zona de amplificación (zona de instrumentos, área con bajos niveles de amplicones)

Divida el ARN extraído en partes alícuotas en la placa (estación de trabajo de PCR)

Desnaturalice el ARN antes del paso de RT-PCR

Agregue la mezcla de RT-PCR a las muestras desnaturalizadas de ARN (estación de trabajo de PCR)

Agregue el producto de RT-PCR a la placa de reacción de PCR posicionada

Procese los protocolos del termociclador

Realice la electroforesis capilar (EC)

Zona de posamplificación (área con altos niveles de amplicones)

Prepare las muestras de PCR posicionada para el análisis de gel

Realice el análisis de gel

Agregue las muestras de PCR posicionada al ExoSAP-IT™ Reagent

Agregue el producto purificado de PCR posicionada a las mezclas de carrera de secuenciación

Realice la limpieza de la carrera de secuenciación con el BigDye XTerminator™ Purification Kit

2

Realización de la amplificación

■ Directrices	18
■ Antes de empezar	19
■ Realización de la RT-PCR	19
■ Realización de la PCR posicionada de PR/RT	23
■ Realización de la PCR posicionada de IN	26

Directrices

- Prepare zonas de laboratorio independientes para reducir al mínimo el riesgo de contaminación.

Nota: Consulte “Tareas de flujo de trabajo por zona de laboratorio” en la página 16.

- **Preamplificación:** Para preparar las mezclas de reacción
Evite la contaminación de los reactivos empleando una campana que tenga incluida luz UV.
- **Amplificación:** Para agregar el producto de RT-PCR a la mezcla de PCR posicionada
Evite la contaminación cruzada de ADN empleando una campana que tenga incluida luz UV.
- **Posamplificación:** Para el análisis con gel de productos amplificados
Zona general de laboratorio designada para el uso con productos de PCR.
- Prepare todas las reacciones en un bloque de frío o en hielo.
- Incluya los controles suministrados en cada conjunto de reacciones de PCR.
 - Control positivo: ARN con mutaciones en las regiones de PR/RT e IN del VIH-1
 - Control negativo: Tampón TE
- Encienda el termociclador y seleccione el programa del termociclador entre 15 y 20 minutos antes de su uso.
- Procese la RT-PCR y la PCR posicionada en lotes de ≥ 6 muestras, incluidos los controles. Esto puede permitir que se evite la repetición del descongelamiento de reactivos y reducir los costes mediante la reducción de la proporción de los controles en las muestras.

Antes de empezar

- Realice la esterilización UV de las estaciones de trabajo de PCR en las zonas de laboratorio de preamplificación y amplificación durante un período mínimo de 30 minutos antes de usarlas.

¡IMPORTANTE! Siga las directrices del instrumento para brindar protección contra la exposición a la luz UV.

¡IMPORTANTE! No exponga los reactivos a la luz UV durante el proceso de esterilización.

- Deje reposar las RT-PCR Master Mixes para equilibrarlas a la temperatura ambiente, agítelas ligeramente en vórtex y centrifúguelas brevemente. Colóquelas en un bloque de frío o en hielo hasta su uso.

Realización de la RT-PCR

Nota: Según la preferencia del usuario, las reacciones de RT-PCR de PR/RT y de RT-PCR de IN se pueden producir de forma paralela en la misma placa con el mismo termociclador.

Preparación de las reacciones de RT-PCR de proteasa/transcriptasa inversa (PR/RT)

¡IMPORTANTE! Siga todos los pasos en un bloque de frío o en hielo.

- En la zona de laboratorio de preamplificación, combine los siguientes componentes en un tubo. Prepare suficiente mezcla de reacción de RT-PCR de PR/RT para el número requerido de reacciones, más ~5 % de excedente.

Componente	Volumen (número de reacciones)		
	1	12	24
RT-PCR Master Mix, PR/RT	39 µl	468 µl	936 µl
SuperScript™ III One-Step RT-PCR with Platinum™ Taq High Fidelity Enzyme	1 µl	12 µl	24 µl
Volumen total	40 µl	480 µl	960 µl

- Mezcle bien los componentes y centrifúguelos brevemente para recoger el contenido que está al fondo del tubo.
- Transfiera el tubo a la zona de laboratorio de amplificación.
- Agregue 10 µl de muestra de ARN o controles a una placa de reacción etiquetada y, a continuación, selle la placa con película de sellado.

Nota: La calidad y la cantidad del ARN de partida afectan los resultados de la carrera de secuenciación.

5. Centrifugue brevemente para recoger el contenido que está al fondo de los pocillos.
6. Desnaturalice el ARN y los controles en un termociclador durante 10 minutos a 65 °C y coloque *inmediatamente* la placa en un bloque de frío o en hielo durante ≥ 3 minutos.
7. Centrifugue brevemente para recoger el contenido que está al fondo de los pocillos.
8. Agregue 40 μ l de mezcla de reacción de RT-PCR de PR/RT a cada pocillo de la placa y, a continuación, selle la placa con película de sellado.

¡IMPORTANTE! Cambie las puntas de pipeta entre pocillos.

9. Agite en un vórtex suavemente todas las esquinas y el centro de la placa, asegúrese de completar la mezcla del contenido del pocillo y, a continuación, centrifúguela brevemente para recoger el contenido que está al fondo de los pocillos.
10. Continúe inmediatamente con “Procesamiento de las reacciones de RT-PCR de PR/RT” en la página 20.

Procesamiento de las reacciones de RT-PCR de PR/RT

1. En la zona de laboratorio de amplificación, cargue la placa de reacción etiquetada en el termociclador.
2. Ajuste las condiciones de termociclado de la RT-PCR de PR/RT de acuerdo con la tabla siguiente.

¡IMPORTANTE! Consulte cuáles son los termocicladores recomendados en Tabla 6.

¡IMPORTANTE! Utilice el modo de emulación/simulación 9600. Consulte las velocidades de rampa a continuación cuando el modo de emulación/simulación 9600 no esté disponible.

Paso	Velocidad de rampa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Transcripción inversa	0,8 °C	50 °C	45 minutos	1
Inactivación enzimática	0,8 °C	94 °C	2 minutos	1
Desnaturalización	—	94 °C	15 segundos	40
Hibridación	1,6 °C	50 °C	20 segundos	
Extensión	0,8 °C	72 °C	2 minutos	
Extensión final	—	72 °C	10 minutos	1
Mantener	1,6 °C	4 °C	18 horas como máximo	

¡IMPORTANTE! No modifique las condiciones del termociclador.

3. Ajuste el volumen de reacción a 50 μ l e inicie la carrera.
4. Cuando la carrera haya finalizado, proceda a: “Realización de la PCR posicionada de PR/RT” en la página 23.

Preparación de las reacciones de RT-PCR de integrasa (IN)

¡IMPORTANTE! Siga todos los pasos en un bloque de frío o en hielo.

1. En la zona de laboratorio de preamplificación, combine los siguientes componentes en un tubo. Prepare suficiente mezcla de reacción de RT-PCR multiplexada de IN para el número requerido de reacciones, más ~5 % de excedente.

Componente	Volumen (número de reacciones)		
	1	12	24
RT-PCR Master Mix, IN	39 µl	468 µl	936 µl
SuperScript™ III One-Step RT-PCR with Platinum™ Taq High Fidelity Enzyme	1 µl	12 µl	24 µl
Volumen total	40 µl	480 µl	960 µl

2. Mezcle bien los componentes y centrifúgelos brevemente para recoger el contenido que está al fondo del tubo.
3. Transfiera el tubo a la zona de laboratorio de amplificación.
4. Agregue 10 µl de ARN o controles a una placa de reacción etiquetada y, a continuación, selle la placa con película de sellado.

Nota: La calidad y la cantidad del ARN de partida afectan los resultados de la carrera de secuenciación.

5. Centrifugue brevemente para recoger el contenido que está al fondo de los pocillos.
6. Desnaturalice el ARN y los controles en un termociclador durante 10 minutos a 65 °C y coloque *inmediatamente* la placa en un bloque de frío o en hielo durante ≥3 minutos.
7. Centrifugue brevemente para recoger el contenido que está al fondo de los pocillos.
8. Agregue 40 µl de mezcla de reacción de RT-PCR de IN a cada pocillo de la placa y, a continuación, selle la placa con película de sellado.

¡IMPORTANTE! Cambie las puntas de pipeta entre pocillos.

9. Agite en un vórtex suavemente todos los laterales de la placa, asegúrese de completar la mezcla del contenido del pocillo y, a continuación, centrifúguela brevemente para recoger el contenido que está al fondo de los pocillos.
10. Continúe inmediatamente con “Procesamiento de las reacciones de RT-PCR de IN” en la página 22.

Procesamiento de las reacciones de RT-PCR de IN

1. En la zona de laboratorio de amplificación, cargue la placa de reacción etiquetada en el termociclador.
2. Ajuste las condiciones de termociclado de la RT-PCR de IN de acuerdo con la tabla siguiente.

¡IMPORTANTE! Consulte cuáles son los termocicladores recomendados en Tabla 6.

¡IMPORTANTE! Utilice el modo de emulación/simulación 9600.

Paso	Velocidad de rampa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Transcripción inversa	0,8 °C	50 °C	45 minutos	1
Inactivación enzimática	0,8 °C	94 °C	2 minutos	1
Desnaturalización	—	94 °C	15 segundos	40
Hibridación	1,6 °C	50 °C	20 segundos	
Extensión	0,8 °C	72 °C	2 minutos	
Extensión final	—	72 °C	10 minutos	1
Hold	1,6 °C	4 °C	18 horas como máximo	

¡IMPORTANTE! No modifique las condiciones del termociclador.

3. Ajuste el volumen de reacción a 50 µl e inicie la carrera.
4. Cuando la carrera haya finalizado, proceda a: “Realización de la PCR posicionada de IN” en la página 26.

Realización de la PCR posicionada de PR/RT

Nota: Según la preferencia del usuario, las reacciones de PCR posicionada de PR/RT y de PCR posicionada de IN se pueden producir de forma paralela en la misma placa con el mismo termociclador.

Preparación de las reacciones de la PCR posicionada de PR/RT

¡IMPORTANTE! Siga todos los pasos en un bloque de frío o en hielo.

1. Etiquete las placas de reacción de PCR posicionada de PR/RT y, a continuación, colóquelas en un bloque de frío o en hielo para enfriarlas.
2. En la zona de laboratorio de preamplificación, combine los siguientes componentes en un tubo enfriado. Prepare suficiente mezcla de reacción de PCR posicionada de PR/RT para el número requerido de reacciones, más ~5 % de excedente (no se incluye en los cálculos).

Componente	Volumen (número de reacciones)		
	1	12	24
Nested PCR Master Mix, PR/RT	47,5 µl	570 µl	1.140 µl
AmpliTaq Gold™ LD DNA Polymerase	0,5 µl	6 µl	12 µl
Volumen total de mezcla de reacción	48 µl	576 µl	1.152 µl

3. Mezcle bien los componentes y centrifúgelos brevemente para recoger el contenido que está en el fondo del tubo y eliminar las burbujas de aire.
4. Agregue 48 µl de la mezcla de reacción de PCR posicionada de PR/RT a cada pocillo de la placa de reacción etiquetada.
5. Transfiera la placa a la zona de laboratorio de amplificación.
6. En una campana para PCR en la zona de laboratorio de amplificación, agregue 2 µl de productos de RT-PCR (incluyendo los controles) a la placa y, a continuación, selle la placa con película de sellado.
7. Agite en un vórtex suavemente todos los laterales de la placa, asegúrese de completar la mezcla del contenido del pocillo y, a continuación, centrifúguela brevemente para recoger el contenido que está al fondo de los pocillos.
8. Continúe inmediatamente con “Procesamiento de las reacciones de la PCR posicionada de PR/RT” en la página 24.

Procesamiento de las reacciones de la PCR posicionada de PR/RT

1. En la zona de laboratorio de amplificación, cargue la placa de reacción etiquetada en el termociclador.
2. Ajuste las condiciones de termociclado de la PCR posicionada de PR/RT de acuerdo con la tabla siguiente.

¡IMPORTANTE! Consulte cuáles son los termocicladores recomendados en Tabla 6.

¡IMPORTANTE! Utilice el modo de emulación/simulación 9600.

Paso	Velocidad de rampa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	0,8 °C	94 °C	4 minutos	1
Desnaturalización	—	94 °C	15 segundos	40
Hibridación	1,6 °C	53 °C	20 segundos	
Extensión	0,8 °C	72 °C	2 minutos	
Extensión final	—	72 °C	10 minutos	1
Hold	1,6 °C	4 °C	18 horas como máximo	

¡IMPORTANTE! No modifique las condiciones del termociclador.

3. Ajuste el volumen de reacción a 50 µl e inicie la carrera.
4. Cuando la carrera haya finalizado, proceda a “Evaluación de la calidad del producto de PCR posicionada de PR/RT” en la página 24.

(Opcional) Almacene los productos de PCR posicionada de PR/RT durante ≤2 semanas a una temperatura comprendida entre -15 °C y -25 °C.

Evaluación de la calidad del producto de PCR posicionada de PR/RT

Para ahorrar reactivos y tiempo, le recomendamos confirmar los productos de PCR.

1. En la zona de laboratorio de posamplificación, visualice los productos de PCR posicionada de PR/RT según sus procedimientos estándares de laboratorio.
(Recomendado) Utilice una alícuota del producto de PCR (5 µl) posicionada de PR/RT mezclado con agua (5 µl) y el marcador de tamaño adecuado en un e-gel al 2 % o un gel de agarosa tradicional para confirmar los productos de PCR.

Nota: Utilice una escalera de ADN que incluya bandas con un tamaño aproximado de 1 kb. Recomendamos la FastRuler Middle Range DNA Ladder, que cuenta con 5 bandas y carga 10 µl.

2. Determine si los productos de PCR posicionada cumplen los siguientes criterios:

Muestra	Criterios
Control positivo	El producto principal es ~0,9 kb
Control negativo	Sin amplificación; sin bandas visibles de ADN
Muestras de la prueba	El producto principal es ~1,1 kb Nota: Las bandas adicionales de longitud más corta en la muestra de la prueba pueden reducir la calidad de la carrera de secuenciación y dificultan el genotipado. Para obtener más información, consulte el Apéndice A, “Solución de problemas”.
	Sin extensión de ADN

¡IMPORTANTE! Si algún control no cumple con los criterios, repita el proceso de amplificación.

3. Proceda de acuerdo con los resultados de muestra de la prueba:

Si la muestra de la prueba	Realice esta acción
No muestra amplificación	Repita la RT-PCR de PR/RT y la PCR posicionada para la muestra.
Muestra baja intensidad de banda	Repita la PCR posicionada de PR/RT o repita los pasos de RT-PCR de PR/RT y de PCR posicionada.
Muestra bandas adicionales menores que 1 kb o mayores que 100 bp que tienen una intensidad igual o más brillante que la banda diana	Repita la RT-PCR de PR/RT y la PCR posicionada para la muestra.
Cumple con los criterios en el paso 2	Proceda a “Realización de la carrera de secuenciación para PR/RT” en la página 29.

Realización de la PCR posicionada de IN

Nota: Según la preferencia del usuario, las reacciones de PCR posicionada de PR/RT y de PCR posicionada de IN se pueden producir de forma paralela en la misma placa con el mismo termociclador.

Preparación de las reacciones de la PCR posicionada de IN

¡IMPORTANTE! Siga todos los pasos en un bloque de frío o en hielo.

1. Etiquete las placas de reacción de PCR posicionada de IN y, a continuación, colóquelas en un bloque de frío o en hielo para enfriarlas.
2. En la zona de laboratorio de preamplificación, combine los siguientes componentes en un tubo. Prepare suficiente mezcla de reacción de PCR de IN para el número requerido de reacciones, más ~5 % de excedente.

Componente	Volumen (número de reacciones)		
	1	12	24
Nested PCR Master Mix, IN	47,5 µl	570 µl	1,14 ml
AmpliTaq Gold™ LD DNA Polymerase	0,5 µl	6 µl	12 µl
Volumen total de mezcla de reacción	48 µl	576 µl	1,15 ml

3. Agite en un vórtex los componentes para mezclarlos completamente y centrifúgelos brevemente para recoger el contenido que está al fondo del tubo y eliminar las burbujas de aire.
4. Agregue 48 µl de la mezcla de reacción de PCR posicionada de IN a cada pocillo de la placa de reacción etiquetada.
5. Transfiera la placa a la zona de laboratorio de amplificación.
6. En una campana para PCR en la zona de laboratorio de amplificación, agregue 2 µl de productos de RT-PCR (incluyendo los controles) a la placa y, a continuación, selle la placa con película de sellado.
7. Agite en un vórtex suavemente todas las esquinas y el centro de la placa, asegúrese de completar la mezcla del contenido del pocillo y, a continuación, centrifúguela brevemente para recoger el contenido que está al fondo de los pocillos.
8. Continúe inmediatamente con “Procesamiento de las reacciones de la PCR posicionada de IN” en la página 27.

Procesamiento de las reacciones de la PCR posicionada de IN

1. En la zona de laboratorio de amplificación, cargue la placa de reacción etiquetada en el termociclador.
2. Ajuste las condiciones de termociclado de la PCR posicionada de IN de acuerdo con la tabla siguiente.

¡IMPORTANTE! Consulte cuáles son los termocicladores recomendados en Tabla 6.

¡IMPORTANTE! Utilice el modo de emulación/simulación 9600.

Paso	Velocidad de rampa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	0,8 °C	94 °C	4 minutos	1
Desnaturalización	—	94 °C	15 segundos	40
Hibridación	1,6 °C	53 °C	20 segundos	
Extensión	0,8 °C	72 °C	2 minutos	
Extensión final	—	72 °C	10 minutos	1
Hold	1,6 °C	4 °C	18 horas como máximo	

¡IMPORTANTE! No modifique las condiciones del termociclador.

3. Ajuste el volumen de reacción a 50 µl e inicie la carrera.
4. Cuando la carrera haya finalizado, proceda a “Evaluación de la calidad del producto de PCR posicionada de IN” en la página 27.

Evaluación de la calidad del producto de PCR posicionada de IN

Para ahorrar reactivos y tiempo, le recomendamos confirmar los productos de PCR.

1. En la zona de laboratorio de posamplificación, visualice los productos de PCR posicionada de IN según sus procedimientos estándares de laboratorio.

(Recomendado) Utilice una alícuota del producto de PCR (5 µl) posicionada de PR/RT mezclado con agua (5 µl) y el marcador de tamaño adecuado en un e-gel al 2 % o un gel de agarosa tradicional para confirmar los productos de PCR.

Nota: Utilice una escalera de ADN que incluya bandas con un tamaño aproximado de 1 kb. Recomendamos la FastRuler Middle Range DNA Ladder, que cuenta con 5 bandas y carga 10 µl.

2. Determine si los productos de PCR posicionada cumplen los siguientes criterios:

Muestra	Criterios
Control positivo	El producto principal es ~1 kb
Control negativo	Sin amplificación; sin bandas visibles de ADN
Muestras de la prueba	El producto principal es ~1 kb Nota: Las bandas adicionales de longitud más corta en la muestra de la prueba pueden reducir la calidad de la carrera de secuenciación y dificultan el genotipado. Para obtener más información, consulte el Apéndice A, "Solución de problemas".
	Sin extensión de ADN

¡IMPORTANTE! Si algún control no cumple con los criterios, repita el proceso de amplificación.

3. Proceda de acuerdo con los resultados de muestra de la prueba:

Si la muestra de la prueba	Realice esta acción
No muestra amplificación	Repita la RT-PCR de IN y la PCR posicionada para la muestra.
Muestra baja intensidad de banda del amplicón de 1 kb	Repita la PCR posicionada de IN o repita los pasos de RT-PCR de IN y de PCR posicionada.
Muestra bandas adicionales menores que 1 kb o mayores que 100 bp que tienen una intensidad igual o más brillante que la banda diana	Repita la RT-PCR de IN y la PCR posicionada para la muestra.
Cumple con los criterios en el paso 2.	Proceda a "Realización de la carrera de secuenciación para IN" en la página 31.

3

Realización de la carrera de secuenciación

■ Realización de la carrera de secuenciación para PR/RT	29
■ Realización de la carrera de secuenciación para IN	31
■ Purifique las reacciones de la carrera de secuenciación con el BigDye X Terminator™ Purification Kit	34
■ Realice la electroforesis capilar (EC)	35
■ Determinación de la calidad de la secuencia	36

Realización de la carrera de secuenciación para PR/RT

Salvo otra indicación, realice los pasos de la carrera de secuenciación del ciclo en la zona de laboratorio de posamplificación.

Tratamiento de los productos de PCR posicionada de PR/RT con el ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent

1. Transfiera 10 µl de productos de PCR posicionada de PR/RT a una nueva placa de reacción de 96 pocillos.
2. Coloque la placa y el tubo del ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent en un bloque de frío o en hielo.
3. Agregue 4 µl de ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent a cada pocillo que contenga 10 µl de productos de PCR posicionada de PR/RT.

¡IMPORTANTE! Cambie las puntas de pipeta entre pocillos.

4. Etiquete la placa con “PR/RT +ExoSAP-IT™”; a continuación, séllela con la MicroAmp™ Clear Adhesive Film.
5. Agite en un vórtex la placa durante 2 o 3 segundos y, a continuación, centrifúguela a 1000 × g durante 5-10 segundos.

6. Coloque la placa en el termociclador y realice la carrera con los siguientes ajustes.

Paso	Temperatura	Tiempo
Digerir	37 °C	15 minutos
Desactivación de calor	80 °C	15 minutos
Mantener	4 °C	Mantener

7. Para su uso inmediato, almacene la placa en un bloque de frío o en hielo y, a continuación, proceda a “Preparación de las reacciones de la carrera de secuenciación del ciclo para PR/RT” en la página 30.

Nota: Agite en un vórtex y centrifugue la placa después del ciclado.

Preparación de las reacciones de la carrera de secuenciación del ciclo para PR/RT

Nota: Según la preferencia del usuario, las reacciones de la carrera de secuenciación de ciclo de PR/RT y de IN se pueden producir de forma paralela en la misma placa con el mismo termociclador.

Consulte “Documentación relacionada” en la página 52 para obtener más información.

¡IMPORTANTE! Proteja las mezclas de la carrera de secuenciación de la luz.

¡IMPORTANTE! Siga todos los pasos en un bloque de frío o en hielo.

Antes de empezar:

- En la zona de laboratorio de preamplificación, descongele por completo las seis mezclas siguientes de carrera de secuenciación que se suministran con el TaqPath™ Seq HIV-1 Genotyping Kit en un bloque de frío o en hielo: R3, R2, R1, F3, F2, F1. Agite en un vórtex brevemente; a continuación, centrifugue durante 2 o 3 segundos para recoger el contenido que está al fondo de los tubos.
1. En la zona de laboratorio de preamplificación, agregue 18 µl de cada una de las seis mezclas de la carrera de secuenciación a los pocillos correspondientes de una placa de reacción de 96 pocillos.
 2. Transfiera la placa a la zona de laboratorio de posamplificación y, a continuación, agregue los siguientes elementos:
 - 2 µl de productos de PCR posicionada de PR/RT tratados con ExoSAP-IT™ a cada mezcla de carrera de secuenciación.
 3. Selle la placa y continúe inmediatamente con “Procesamiento de las reacciones de la carrera de secuenciación del ciclo para PR/RT” en la página 31.

Procesamiento de las reacciones de la carrera de secuenciación del ciclo para PR/RT

1. Cargue la placa de reacción de 96 pocillos en el instrumento.
2. Ajuste las condiciones de la carrera de secuenciación del ciclo.

¡IMPORTANTE! Consulte cuáles son los termocicladores recomendados en Tabla 6.

¡IMPORTANTE! Utilice el modo de emulación/simulación 9600.

Paso	Velocidad de rampa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	0,8 °C	96 °C	10 segundos	25
Hibridación	1,6 °C	50 °C	5 segundos	
Extensión	0,8 °C	60 °C	4 minutos	
Hold	1,6 °C	4 °C	18 horas como máximo	

¡IMPORTANTE! No modifique las condiciones del termociclador.

3. Ajuste el volumen de reacción a 20 µl e inicie la carrera.
4. Cuando la carrera haya finalizado, proceda a “Purifique las reacciones de la carrera de secuenciación con el BigDye X Terminator™ Purification Kit” en la página 34.

(En caso necesario) Puede almacenar los productos de secuenciación durante ≤3 días a una temperatura comprendida entre -15 °C y -25 °C.

Nota: Proteja los productos de secuenciación de la luz.

Realización de la carrera de secuenciación para IN

Salvo otra indicación, realice los pasos de la carrera de secuenciación del ciclo en la zona de laboratorio de posamplificación.

Tratamiento de los productos de PCR posicionada de IN con el ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent

1. Transfiera 10 µl de productos de PCR posicionada de IN a una nueva placa de reacción de 96 pocillos.
2. Coloque la placa y el tubo del ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent en un bloque de frío o en hielo.
3. Agregue 4 µl de ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent a cada pocillo que contenga 10 µl de productos de PCR posicionada de IN.

¡IMPORTANTE! Cambie las puntas de pipeta entre pocillos.

4. Etiquete la placa con “IN +ExoSAP-IT™”; a continuación, séllela con la MicroAmp™ Clear Adhesive Film.
5. Agite en un vórtex la placa durante 2 o 3 segundos y, a continuación, centrifúguela a 1000 × g durante 5-10 segundos.
6. Coloque la placa en el termociclador y realice la carrera con los siguientes ajustes.

Paso	Temperatura	Tiempo
Digerir	37 °C	15 minutos
Desactivación de calor	80 °C	15 minutos
Mantener	4 °C	Mantener

7. Para su uso inmediato, almacene la placa en un bloque de frío o en hielo y, a continuación, proceda a “Preparación de las reacciones de la carrera de secuenciación del ciclo para IN” en la página 32.

Nota: Agite en un vórtex y centrifugue la placa después del ciclado.

Preparación de las reacciones de la carrera de secuenciación del ciclo para IN

Consulte “Documentación relacionada” en la página 52 para obtener más información.

¡IMPORTANTE! Proteja las mezclas de la carrera de secuenciación de la luz.

¡IMPORTANTE! Siga todos los pasos en un bloque de frío o en hielo.

Antes de empezar:

- En la zona de laboratorio de preamplificación, descongele por completo las cuatro mezclas siguientes de carrera de secuenciación que se suministran con el TaqPath™ Seq HIV-1 Genotyping Kit en un bloque de frío o en hielo: R12, R11, F12, F11. Agite en un vórtex brevemente; a continuación, centrifugue durante 2 o 3 segundos para recoger el contenido que está al fondo de los tubos.
1. En la zona de laboratorio de preamplificación, agregue 18 µl de cada una de las cuatro mezclas de carrera de secuenciación a los pocillos correspondientes de una placa de reacción enfriada de 96 pocillos.
 2. Transfiera la placa a la zona de laboratorio de posamplificación y, a continuación, agregue:
 - 2 µl de productos de PCR posicionada de IN tratados con ExoSAP-IT™ a cada mezcla de carrera de secuenciación.
 3. Selle la placa y continúe inmediatamente con “Procesamiento de las reacciones de la carrera de secuenciación del ciclo para IN” en la página 33.

Procesamiento de las reacciones de la carrera de secuenciación del ciclo para IN

1. Cargue la placa de reacción de 96 pocillos en el instrumento.
2. Ajuste las condiciones de la carrera de secuenciación del ciclo.

¡IMPORTANTE! Consulte cuáles son los termocicladores recomendados en Tabla 6.

¡IMPORTANTE! Utilice el modo de emulación/simulación 9600.

Paso	Velocidad de rampa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	0,8 °C	96 °C	10 segundos	25
Hibridación	1,6 °C	50 °C	5 segundos	
Extensión	0,8 °C	60 °C	4 minutos	
Hold	1,6 °C	4 °C	18 horas como máximo	

¡IMPORTANTE! No modifique las condiciones del termociclador.

3. Ajuste el volumen de reacción a 20 µl e inicie la carrera.
4. Cuando la carrera haya finalizado, proceda a “Purifique las reacciones de la carrera de secuenciación con el BigDye X Terminator™ Purification Kit” en la página 34.

(En caso necesario) Puede almacenar los productos de secuenciación durante ≤3 días a una temperatura comprendida entre -15 °C y -25 °C.

Nota: Proteja los productos de secuenciación de la luz.

Purifique las reacciones de la carrera de secuenciación con el BigDye XTerminator™ Purification Kit

Nota: Se recomienda este protocolo para la purificación de reacciones de la carrera de secuenciación.

Nota: Utilice los depósitos para reactivos desechables y una pipeta P200 de 8 o 12 canales, si está disponible, para ayudarle en el proceso de limpieza.

Nota: Para conocer las directrices de pipeteado, consulte el *BigDye XTerminator™ Purification Kit User Guide* (n.º de pub. 4374408).

Antes de comenzar, retire la solución XTerminator™ del almacenamiento a 4 °C y déjela reposar para que se equilibre a la temperatura ambiente.

1. Agite en un vórtex la solución XTerminator™ durante un período mínimo de 10 segundos antes de mezclarla con la solución SAM™.

¡IMPORTANTE! Para lograr la limpieza eficaz de BigDye XTerminator™, asegúrese de que los materiales están bien mezclados.

Nota: Utilice puntas de pipeta ancha para XTerminator™ Solution.

2. Prepare la solución de trabajo de microesferas magnéticas:

Componente	Volumen por cada reacción de 20 µl	Volumen por cada placa de reacción de 96 pocillos
Solución SAM™	90 µl	9,9 ml
Solución XTerminator™	20 µl	2,2 ml
Volumen total	110 µl	12,1 ml

¡IMPORTANTE! Compruebe que la placa se haya agitado en vórtex y se haya centrifugado antes de retirar la MicroAmp™ Clear Adhesive Film.

3. Retire la MicroAmp™ Clear Adhesive Film de la placa de reacción de 96 pocillos (reacciones de la carrera de secuenciación).
4. Dispense 110 µl/pocillo de la solución de trabajo de microesferas magnéticas a cada muestra.

¡IMPORTANTE! Para garantizar que la solución de trabajo de microesferas magnéticas se mezcle completamente, pipetee la solución arriba y abajo entre 3 y 4 veces antes de cada transferencia.

5. Utilice un paño para limpiar o absorber cuidadosamente el líquido presente en la parte superior o entre los pocillos; a continuación, selle la placa con la MicroAmp™ Clear Adhesive Film.
6. Agite en un vórtex la placa durante 30 minutos a 1800 rpm.

¡IMPORTANTE! Asegúrese de que la placa está fijada a la plataforma del agitador según las instrucciones del fabricante.

Nota: Para conocer otros fabricantes y configuraciones compatibles del agitador, consulte la *BigDye XTerminator™ Purification Kit User Guide* (n.º de pub. 4374408).

7. Centrifugue la placa a 1000 × g en una centrífuga de cubeta oscilante durante 2 minutos a temperatura ambiente.
8. Pase inmediatamente a “Realice la electroforesis capilar (EC)” en la página 35.

(Si es necesario) Puede almacenar las reacciones purificadas de la carrera de secuenciación toda la noche a 2-8 °C.

Realice la electroforesis capilar (EC)

Antes de comenzar, consulte la guía de usuario del instrumento de EC para conocer al detalle la configuración y los procedimientos del funcionamiento.

1. Asegúrese de que estén instalados los consumibles correctos en el instrumento de EC.

Instrumento de EC	Consumible
3500/3500xL Genetic Analyzer	POP-7™ Polymer para el 3500 Genetic Analyzer
3500 Dx/3500xL Dx Genetic Analyzer	Matriz de capilares de 50 cm

2. Asegúrese de que el instrumento se haya calibrado con el BigDye™ Terminator v3.1 Dye Set Z.
3. Seleccione la longitud capilar de 50 cm, el número de capilares y el tipo de POP-7™ Polymer.
4. Seleccione o cree un módulo de carrera adecuado de acuerdo con la guía de usuario del instrumento de EC.

Nota: Si el instrumento no contiene los módulos de carrera adecuados, consulte “Asistencia al cliente y soporte técnico” en la página 52.

Instrumento de EC	Módulo de carrera
3500 Genetic Analyzer	BDxFastSeq50_Pop7
3500xL Genetic Analyzer	BDxFastSeq50_Pop7xl
3500 Dx Genetic Analyzer	BDxFastSeq50_Pop7
3500xL Dx Genetic Analyzer	BDxFastSeq50_Pop7xl

5. Utilice el protocolo de análisis proporcionado de fábrica: BDT v3.1_PA_Protocol_POP7.
6. Prepare el grupo de resultados para la carrera de EC.
7. Prepare la el registro de placa para la carrera de EC.

Nota: Asegúrese de seguir la convención correspondiente para la creación del nombre de la muestra para el software de análisis de datos que se emplea en su laboratorio.

8. Retire la película adhesiva de la placa de reacción de 96 pocillos (si está presente); a continuación, sustitúyala con una septa de placa de 96 pocillos.
9. Cargue la placa en el instrumento e inicie la carrera.

¡IMPORTANTE! Solo realice la carrera con una placa a la vez.

10. Cuando la carrera haya finalizado, proceda a “Determinación de la calidad de la secuencia” en la página 36.

Determinación de la calidad de la secuencia

1. Abra el software de recogida de datos y explore los archivos AB1 para ver los parámetros de control de calidad.
Consulte la guía de usuario del instrumento de EC para ver los procedimientos estándares de la detección y el análisis de secuencia.
2. Para analizar los gráficos de secuenciación, puede exportar los archivos AB1 del 3500 Series Genetic Analyzer o el 3500 Dx Series Genetic Analyzer para usarlo en el análisis posterior y el software de elaboración de informes.

Nota: Para obtener más información sobre el software comercial disponible, consulte los documentos de la OMS incluidos en “Documentación relacionada” en la página 52.

4

Características de rendimiento

- Límite de detección (sensibilidad analítica) 37
- Reproducibilidad y precisión 38
- Sustancias interferentes 40
- Reactividad cruzada (especificidad analítica) 41
- Evaluación del rendimiento 42

El rendimiento analítico del TaqPath™ Seq HIV-1 Genotyping Kit se evaluó con el uso de la Exatype™ Platform.

Para analizar sus gráficos de secuenciación, puede exportar los archivos AB1 del 3500 Series Genetic Analyzer o el 3500 Dx Series Genetic Analyzer para usarlo en el análisis posterior y el software de elaboración de informes. Para obtener más información sobre el software comercial disponible, consulte los documentos de la OMS incluidos en Tabla 8.

Tabla 8 Documentos de la OMS

Documento	Origen
Documentos de referencia de la OMS ^[1]	Organización Mundial de la Salud (OMS)
Publicaciones del marco operativo de la HIVResNet de la OMS ^[2]	

^[1] WHO HIVResNet meeting report, Johannesburgo, Sudáfrica, 19 de octubre de 2019. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2021. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

^[2] WHO HIVResNet HIV drug resistance laboratory operational framework, segunda edición. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2020. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Límite de detección (sensibilidad analítica)

El límite de detección (LdD) analítico se define como la carga vírica menor donde $\geq 95\%$ de las réplicas sometidas a pruebas fueron presuntos positivos para la detección de las dianas genómicas de PR, RT e IN del VIH-1.

Tabla 9 ofrece el LdD para plasma EDTA (con base en el ARN extraído de 200 μ l de plasma EDTA), y el LdD para las manchas de sangre seca (con base en el ARN extraído de una mancha de 100 μ l).

Tabla 9 LdD para plasma EDTA y manchas de sangre seca

Tipo de muestra	Subtipo A	Subtipo B	Subtipo C
Plasma EDTA	5000 copias/ml	1000 copias/ml	1000 copias/ml
Manchas de sangre seca	5000 copias/ml	2000 copias/ml	5000 copias/ml

Reproducibilidad y precisión

La reproducibilidad se evaluó en tres centros con un panel de siete (7) muestras que representaban los subtipos A, B, C, F, CRF01_AE, CRF02_AG de VIH-1 y un control positivo con pruebas a 5 veces el LdD para el ARN extraído a partir de muestras de plasma. El análisis BLAST determinó el alineamiento de nucleótidos para cada muestra con la secuencia de referencia de la muestra.

Tabla 10 Detección de muestras de PR/RT e IN entre centros

Centro	Paso del flujo de trabajo	Número de carreras	Detección
1	Amplificación	6	100 % (42/42)
	Secuencia	6	
2	Amplificación	6	100 % (42/42)
	Secuencia	6	
3	Amplificación	6	100 % (42/42)
	Secuencia	6	

Nota: (93,1, 100) IC del 95 % observado.

La concordancia porcentual entre los centros de amplificación es del 100 %.

La concordancia porcentual entre los centros de carrera de secuenciación es del 100 %.

Tabla 11 Detección de mutación del control positivo

Región de interés	Mutación	Centro 1	Centro 2	Centro 3
Transcriptasa inversa (RT)	M41L	6/6	6/6	6/6
	K65R	6/6	6/6	6/6
	M184V	6/6	6/6	6/6
	K103N	6/6	6/6	6/6
	Y181C	6/6	6/6	6/6
Proteasa (PR)	154M	6/6	6/6	6/6
	L90M	6/6	6/6	6/6
Integrasa (IN)	L74M	6/6	6/6	6/6
	E138K	6/6	6/6	6/6
	G140S	6/6	6/6	6/6
	Q148K	6/6	6/6	6/6

Tabla 11 Detección de mutación del control positivo (cont.)

Región de interés	Mutación	Centro 1	Centro 2	Centro 3
Integrasa (IN)	R263K	6/6	6/6	6/6
Total	Todos (12)	100 % (72/72)	100 % (72/72)	100 % (72/72)

Nota: (96,4, 100) IC del 95 % observado.

La concordancia porcentual entre los centros para la detección de mutación de PC es del 100 %.

Tabla 12 Alineamiento de nucleótidos con la secuencia de referencia

Centro	Alineamiento de secuencia de PR/RT				Alineamiento de secuencia de IN			
	Promedio	Efecto aleatorio	Desviación estándar	% CV	Promedio	Efecto aleatorio	Desviación estándar	% CV
Todos los centros	99,7 %	Centro	<0,1	<0,1	99,8 %	Centro	<0,1	<0,1
		Entre ensayos	<0,1	<0,1		Entre ensayos	<0,1	<0,1
		Intraensayo	0,25	0,25		Intraensayo	0,19	0,19
		Total	0,25	0,25		Total	0,19	0,19
1	99,7 %	Entre ensayos	<0,1	<0,1	99,8 %	Entre ensayos	<0,1	<0,1
		Intraensayo	0,25	0,25		Intraensayo	0,17	0,17
		Intralaboratorio	0,25	0,25		Intralaboratorio	0,17	0,17
2	99,7 %	Entre ensayos	<0,1	<0,1	99,8 %	Entre ensayos	<0,1	<0,1
		Intraensayo	0,23	0,23		Intraensayo	0,19	0,19
		Intralaboratorio	0,23	0,23		Total	0,19	0,19
3	99,7 %	Entre ensayos	<0,1	<0,1	99,8 %	Entre ensayos	<0,1	<0,1
		Intraensayo	0,26	0,26		Intraensayo	0,19	0,19
		Intralaboratorio	0,26	0,26		Intralaboratorio	0,19	0,19

Sustancias interferentes

Los resultados del estudio de esta sección se generaron mediante el flujo de trabajo del TaqPath™ Seq HIV-1 Genotyping Kit descrito en este documento.

Las potenciales sustancias interferentes se inocularon al plasma EDTA negativo para valorar la interferencia de falsos positivos. Para valorar la interferencia de falsos negativos, se inocularon las sustancias interferentes al plasma EDTA artificiales con VIH-1 a 3 veces el LdD. El ARN se extrajo con el MagMAX™ Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit.

Las sustancias interferentes en las concentraciones finales sometidas a pruebas no afectan el ensayo. Los resultados se presentan en la Tabla 13.

Tabla 13 Sustancias interferentes

Sustancia interferente	Concentración máxima
Hemoglobina humana	0,05 mg/ml
Estándares de lípidos: triglicéridos	1,9 mg/ml
Albúmina, polvo de V fracciones humanas	55 mg/ml
Bilirrubina (compuesta)	0,012 mg/ml
EDTA (solución de 500 mM)	6,16 mM
Ganciclovir	13,2 µg/ml
Antimicobacteriano (isoniacida)	7 µg/ml
Azitromicina	9,91 µg/ml
Mezcla 1	
Interferón-α 2α (0,2 mg/ml en solución salina tamponada con fosfato [PBS])	2580 pg/ml
Ribavirina	7,08 µg/ml
Mezcla 2	
Amprenavir	12,47 µg/ml
Darunavir etanolato	13,1 µg/ml
Sal acetato de enfuvirtida	14,8 µg/ml
Efavirenz	10 µg/ml
Mezcla 3	
Zidovudina	7,03 µg/ml
Didanosina	12,1 µg/ml
Estavudina	1,276 µg/ml
Ritonavir	27,76 µg/ml

Tabla 13 Sustancias interferentes (cont.)

Sustancia interferente	Concentración máxima
Maraviroc	888 ng/ml
Mezcla 4	
Lamivudina	7 µg/ml
Abacavir sulfato	5,55 µg/ml
Dolutegravir	0,192 µg/ml

Reactividad cruzada (especificidad analítica)

Se llevó a cabo un análisis *informático* de los cebadores en los master mixes de RT-PCR y PCR posicionada con el uso de BLAST frente a cepas/aislados conocidos en GenBank para virus relacionados y otras infecciones.

Tipo	Microorganismos	Descripción
Bacterias	<i>Mycobacterium avium</i>	Microorganismos coinfecciosos
Bacterias	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	Microorganismos coinfecciosos
Bacterias	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Microorganismos coinfecciosos
Hongos	<i>Candida albicans</i>	Microorganismos coinfecciosos
Hongos	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	Microorganismos coinfecciosos
Virus	Citomegalovirus	Microorganismos coinfecciosos
Virus	Virus de Epstein-Barr	Microorganismos coinfecciosos
Virus	Virus de la hepatitis B	Microorganismos coinfecciosos
Virus	Virus de la hepatitis C	Microorganismos coinfecciosos
Virus	Virus linfotrópico de células T humanas tipo I	Virus relacionado
Virus	Virus linfotrópico de células T humanas tipo II	Virus relacionado
Virus	Virus de inmunodeficiencia humana tipo 2	Virus relacionado

Se obtuvieron resultados de BLAST para todos los pares de cebador con un tamaño de amplicón previsto < 10 kb y homología > 80 %.

No hubo resultados de BLAST para los microorganismos con los cebadores de los master mixes de RT-PCR y de PCR posicionada. Es muy poco probable que haya una amplificación no específica de estos microorganismos en la reacción de secuenciación, por lo que no se espera que haya reactividad cruzada.

Evaluación del rendimiento

La evaluación del rendimiento del TaqPath™ Seq HIV-1 Genotyping Kit se midió en un centro para determinar la variación entre lotes del ensayo.

En un centro se examinaron 19 muestras clínicas de pacientes que oscilaban en carga vírica de 5646 copias/ml a 303.497 copias/ml. 10 muestras eran de plasma de pacientes clínicos. Las 9 muestras restantes eran de manchas de sangre seca (MSS), agrupadas a partir de plasma clínico.

Cada una de estas 19 muestras se examinaron con 3 lotes de reactivos distintos. Las mutaciones resistentes a los fármacos (MRF) detectadas a partir de este conjunto de muestras clínicas se registran a continuación.

Tabla 14 MRF detectadas a partir de la evaluación del rendimiento para transcriptasa inversa

Transcriptasa inversa
M184V
K101E
Y181C
M184L
K103N
T215F
T215L
T215S
V179E
M41L
D67N
K70R
T215Y
T219E
K219N
A98G
V106I
H221Y
E138Q
P225H
K219Q

Tabla 14 MRF detectadas a partir de la evaluación del rendimiento para transcriptasa inversa (cont.)

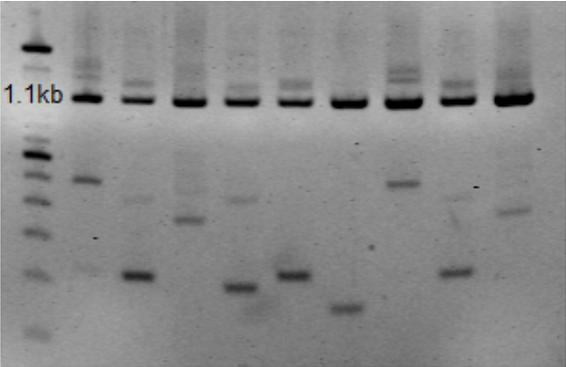
Transcriptasa inversa
G190A
K238T
T251Y

Tabla 15 MRF detectadas a partir de la evaluación del rendimiento para integrasa

Integrasa
G163K



Solución de problemas

Observación	Posible causa	Acción recomendada
No hay bandas en el gel	No se ha podido amplificar la RT-PCR o la PCR posicionada (PR/RT o IN). Es posible que no se hayan agregado enzimas a la RT-PCR Master Mix o la Nested-PCR Master Mix. La cepa tiene mutaciones en el sitio de unión del cebador.	Repita con reactivos nuevos. No combine los números de lote.
Hay tamaños de banda incorrectos en el gel 	Se ha producido un cebado o una delección interna incorrectos.	<p>Las bandas de mayor tamaño no afectan la carrera de secuenciación. Continúe si el tamaño de la banda es correcto.</p> <p>Si hay bandas de menor tamaño de intensidad igual o más brillante, o si hay extensión, repita todo el procedimiento a partir de la RT-PCR. Las bandas de tamaño inferior pueden reducir la calidad de la carrera de secuenciación y dificultar el genotipado.</p>
Hay bandas en el pocillo de control negativo del gel o se han obtenido resultados de secuenciación inesperados	Se ha contaminado la reacción de RT-PCR o de PCR posicionada.	Repita las reacciones. Siempre desplácese por las zonas del laboratorio de forma unidireccional. Descontamine cada espacio después de cada uso y siga los procedimientos estándares de uso y las directrices de PCR de su laboratorio. Para obtener más información, consulte "Directrices" en la página 18.

Observación	Posible causa	Acción recomendada
Resolución deficiente de la banda en el gel de agarosa	Los tampones de procesamiento se han agotado.	Prepare un nuevo gel y vuelva a procesar las muestras. Sustituya los tampones de procesamiento después de 2 o 3 usos. Para obtener sugerencias sobre la electroforesis en gel, vaya a thermofisher.com
	Si hay un problema con la tinción del E-Gel™ o el colorante de carga.	Si emplea el E-Gel™, utilice bromuro de etidio en lugar del colorante en gel SYBR™ Safe DNA para visualizar las bandas. No utilice el tampón de carga en gel BlueJuice™.
	Se ha utilizado un porcentaje o un tipo de agarosa incorrecto.	Vuelva a procesar las muestras en un gel de agarosa de grado biológico y molecular al 1-2 %. No utilice agarosa con punto de fusión bajo.
Secuencia de calidad deficiente	Limpieza deficiente del producto de PCR.	Utilice un ExoSAP-IT™ Reagent nuevo.
	Limpieza deficiente de la carrera de secuenciación.	Utilice el BigDye XTerminator™ Purification Kit. Otros métodos pueden aumentar la incidencia de manchas de colorante y otros artefactos de la carrera de secuenciación,
	Fallo del reactivo.	No congele y descongele los reactivos de la carrera de secuenciación más de 6 veces. No utilice reactivos caducados.
	Se ha producido contaminación.	Descontamine el laboratorio y repita las reacciones de la carrera de secuenciación con reactivos nuevos. Para obtener más información, consulte el <i>Boletín del usuario sobre la resolución de problemas de los datos de la secuenciación de Sanger</i> (n.º de pub. MAN0014435).
	Se ha seleccionado el conjunto de colorantes incorrecto.	Asegúrese de haber seleccionado el protocolo de análisis de BigDye™ Terminator v3.1.

Observación	Posible causa	Acción recomendada
Secuencia de calidad deficiente (cont.)	Se ha utilizado el módulo de procesamiento incorrecto (por ejemplo, un módulo de procesamiento estándar en lugar de un módulo de procesamiento del BigDye XTerminator™ Purification Kit).	Si ha utilizado el BigDye XTerminator™ Purification Kit para la purificación, debe utilizar un módulo de procesamiento que tenga el prefijo “BDX” para la electroforesis capilar.
		Para obtener más información, consulte el <i>Boletín del usuario sobre la resolución de problemas de los datos de la secuenciación de Sanger</i> (n.º de pub. MAN0014435).



Secuencias de controles

Secuencia parcial de RNA Positive Control, PR/RT/IN

Se muestra a continuación una secuencia parcial del control positivo sintético de ARN.

La secuencia abarca:

- la región parcial de proteasa (PR)
- la región parcial de transcriptasa inversa (RT)
- la región completa de integrasa (IN)

```
1  CTTTAACTTC CCTCAAATCA CTCTTTGGCA GCGACCCCTT GTCTCAATAA AAGTAGGGGG CCAGATAAAG
71  GAGGCTCTCT TAGACACAGG AGCAGATGAT ACAGTATTAG AAGAAATAAG TTTGCCAGGA TAATGGAAAC
141 CAAAAATGAT AGGAGGAATT GGAGGTTTTA TGAAAGTAAG ACAGTATGAT CAAATACTTA TAGAAATTTG
211 TGGAAAAAAG GCTATAGGTA CAGTATTAGT AGGACCTACA CCTGTCAACA TAATTGGAAG AAATATGATG
281 ACTCAGCTTG GATGCACACT AAATTTTCCA ATTAGTCCTA TTGAAACTGT ACCAGTATGG CCATTGACAG
351 AAGAGAAAAT AGAAGAAGCT GAGAAGGAAG GAAAAATTAC AAAAATTGGG CCTGAAAATC CATATAACAC
421 TCCAGTATTT GCCATAAAGA GGAAGGACTG AACTAAGTGG AGAAAATTAG TAGATTTTCA GGAAGTTCAA
491 TTAGGAATAC CACACCCAGC AGGGTTAAAA AAGAATAAAT CAGTGACAGT ACTGGATGTG GGGGATGCAT
561 ATTTTTCAGT TCCTTTAGAT GAAGACTTCA GGAAATATAC TGCATTTACC ATACCTAGTA TAAACAATGA
631 AACACCAGGG ATTAGATATC AATATAATGT GCTTCCACAG GGATGGCCAG AAATAGTCAT CTGTCAATAA
701 GTGGATGACT TGTATGTAGG ATCTGACCTA TTAAAGTGGG GACTTACCAC ACCAGACAAG AAACATCAGA
771 AAGAACCCCC ATTTCTTTGG ATGGGGTATG AACTCCATCC TGACAAATGG ACAGTACAGC CTATACAGCT
841 GCCAGAAAAG GATAGCTGGA CTGTCAATGA CATAACAAG TTAGTGGGAA AATTAACTG GGCAAGTCAG
911 ATTTATGCAG GGATTAAGTC ATGGGTACCA GCACATAAAG GAATTGGAGG AAATGAACAA GTAGATGTAA
981 GTAGTGGAAAT CAGGAAAGTG CTGTTTCTAG ATGGAATAGA TAAGGCTCAA GAAGAGCATG AAAAAATCA
1051 CAGCAATTGG AGAGCAATGG CTAGTGAGTT TAATCTGCCA CCCATAGTAG CAAAAGAAAT AGTAGCTAGC
1121 TGTGATAAAT GTCAGCTAAA AGGGGAAGCC ATACATGGAC AAGTAGACTG TAGTCCAGGG ATATGACAAT
1191 TAGATTGTAC ACATTTAGAA GGAAAAATCA TCATGGTAGC AGTCCATGTA GCCAGTGGCT ACATAGAAGC
1261 AGAGGTTATC CCAGCAGAAA CAGGACAAGA AACAGCATA TATATACTAA AATTAGCAGG AAGATGGCCA
1331 GTCAAAGTAA TACATACAGA CAATGGCAGT AATTTCCACA GTGCTGCAGT TAAGGCAGCC TGTGGTGGG
1401 CAGGTATCCA ACAGAAATTT AGCATTCCCT ACAATCCCCA AAGTAAGGGA GTAGTAGAAT CCATGAATTA
1471 AGAATTAAG AAAATCATAG GGCAGGTAAG AGATCAAGCT GAGCACCTTA AGACAGCAGT ACAAATGGCA
1541 GTATTCATTC ACAATTTTAA AAGAAAAGGG GGGATTGGGG GGTACAGTGC AGGGGAAAAGA ATAATAGACA
1611 TAATAGCAAC AGACATACAA ACTAAAGAAT TACAAAAACA AATTATAAAA ATTCAAAATT TTCGGGTTTA
1681 TTACAGAGAC AGCAGAGACC CTATTTGGAA AGGACCAGCC AAATACTCT GGAAAGGTGA AGGGGCAGTA
1751 GTAATACAAG ATAACAGTGA CATAAAGGTA GTACCAAGGA AGAAAGCAA AATCATTAAG GACTATGGCA
1821 AGCAAATGGC AGGTGCTGAT TGTGTGGCAG GTAGACAGGA TGAAGATTAG AACATGGAAT AGTTTAGTAA
1891 AGCACCAGTT CAGAAGTACA CATCCCATTA G
```

Perfil de mutación del control positivo de ARN

El RNA Positive Control contiene las siguientes mutaciones (las mutaciones en negrita generan niveles variables de resistencia a fármacos).

Nota: La numeración de aminoácidos se basa en la posición del codón en el HXB2 de VIH-1 y no en la posición del codón en el RNA Positive Control.

- Proteasa: N37S, R41*, **I54M** y **L90M**
 - Transcriptasa inversa: **M41L**, **K65R**, S68*, **K103N**, K122E, **Y181C**, Y183*, **M184V** y F214L
 - Integrasa: W61*, L74M, E138K, G140S, Q148K, K156* y R263K
-

Nota: * Codones de parada de codificación de la posición 41 de la proteasa, las posiciones 68 y 183 de la transcriptasa inversa y las posiciones 61 y 156 de la integrasa.



Seguridad



¡ADVERTENCIA! SEGURIDAD GENERAL. Si este producto se utiliza de alguna forma que no se especifica en la documentación del usuario, se pueden producir lesiones personales o daños en el instrumento o el dispositivo. Asegúrese de que todo el que utilice este producto haya recibido instrucciones sobre las prácticas de seguridad generales para laboratorios y la información de seguridad facilitada en este documento.

- Antes de utilizar un instrumento o dispositivo, lea y comprenda la información de seguridad facilitada en la documentación de usuario suministrada por el fabricante del instrumento o dispositivo.
- Antes de manipular productos químicos, lea y comprenda todas las fichas de datos de seguridad (FDS o HDS o SDS) y use el equipo de protección individual apropiado (guantes, batas, protección ocular, etc.). Para obtener las FDS, visite [thermofisher.com/support](https://www.thermofisher.com/support).



Seguridad química



¡ADVERTENCIA! MANIPULACIÓN GENERAL DE PRODUCTOS QUÍMICOS. Para reducir al mínimo los riesgos, asegúrese de que el personal del laboratorio lea y ponga en práctica las directrices sobre seguridad generales para el uso, la conservación y la eliminación de productos químicos que se proporcionan a continuación. Consulte las hojas de datos de seguridad (SDS) pertinentes para conocer las precauciones e instrucciones específicas:

- Lea y comprenda las hojas de datos de seguridad (SDS) que proporciona el fabricante de los productos químicos antes de almacenar, manipular o trabajar con cualquier producto químico o material peligroso. Para obtener las SDS, consulte el apartado “Documentación y soporte” de este documento.
- Reduzca al mínimo el contacto con productos químicos. Utilice un equipo de protección individual adecuado durante la manipulación de productos químicos (por ejemplo, gafas de seguridad, guantes o ropa protectora).
- Reduzca al mínimo la inhalación de productos químicos. No deje abiertos los recipientes de productos químicos. Utilícelos únicamente con una ventilación suficiente (por ejemplo, una campana extractora de humos).
- Compruebe periódicamente la ausencia de fugas o derrames de los productos químicos. Si se produce una fuga o un derrame, siga los procedimientos de limpieza del fabricante, tal y como se recomienda en la hoja de datos de seguridad.
- Manipule los residuos químicos bajo una campana extractora de humo.
- Asegúrese de que se utilizan los contenedores de residuos principales y secundarios. (Los contenedores de residuos principales contienen los residuos inmediatos. Los contenedores secundarios contienen cualquier derrame o fuga del contenedor principal. Ambos contenedores deben ser compatibles con el material de residuo y deben cumplir los requisitos nacionales, autonómicos y locales sobre el almacenamiento en contenedores).
- Después de vaciar el contenedor de residuos, séllelo bien con el tapón suministrado.
- Identifique (mediante análisis, si fuera necesario) los residuos generados por las aplicaciones, los reactivos y los sustratos concretos utilizados en su laboratorio.
- Asegúrese de que los residuos se almacenan, transfieren, transportan y eliminan de acuerdo con todas las normativas locales, estatales/provinciales o nacionales.
- **¡IMPORTANTE!** Los materiales radiactivos o que impliquen un peligro biológico pueden requerir una manipulación especial, pudiéndose aplicar limitaciones en materia de eliminación.



Seguridad biológica



¡ADVERTENCIA! RIESGO BIOLÓGICO. Las muestras biológicas como, por ejemplo, tejidos, fluidos corporales, agentes infecciosos y sangre humana o de otros animales, pueden transmitir enfermedades infecciosas. Realice todo el trabajo en instalaciones que dispongan del equipamiento adecuado y con el equipo de seguridad apropiado (por ejemplo, dispositivos de contención física). El equipo de seguridad puede incluir también artículos para protección personal, como guantes, batas, trajes, protectores de zapatos, botas, respiradores, protectores faciales, protección para los ojos o gafas de seguridad. Los trabajadores deben recibir formación de acuerdo con los requisitos de la institución o empresa y los requisitos legales aplicables antes de trabajar con materiales potencialmente peligrosos. Siga todas las normativas locales, estatales/provinciales y/o nacionales aplicables. En las siguientes referencias se proporcionan directrices generales sobre la manipulación de muestras biológicas en un entorno de laboratorio.

- U.S. Department of Health and Human Services, *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL)*, 6.ª edición, n.º de publicación del HHS (CDC) 300859, revisado en junio de 2020
<https://www.cdc.gov/labs/pdf/CDC-BiosafetymicrobiologicalBiomedicalLaboratories-2020-P.pdf>
- Laboratory biosafety manual, fourth edition. Geneva: World Health Organization; 2020 (Laboratory biosafety manual, cuarta edición y documentos monográficos relacionados)
www.who.int/publications/i/item/9789240011311



Documentación y soporte

Documentación relacionada

Documento	Número de publicación
<i>Guía de usuario del 3500/3500xL Genetic Analyzer con el 3500 Series Data Collection Software 3.3</i>	100079380
<i>Guía de usuario del 3500 Dx/3500xL Dx Genetic Analyzer con el 3500 Dx Series Data Collection Software 3.0.1</i>	100027308
<i>Veriti™ Thermal Cycler User Guide</i>	4375799
<i>GeneAmp™ PCR System 9700 Base Module User Manual</i>	4303481
<i>BigDye XTerminator™ Purification Kit User Guide</i>	MAN0028045
<i>Troubleshooting Sanger sequencing data</i>	MAN0014435
WHO HIVResNet meeting report, Johannesburgo, Sudáfrica, 19 de octubre de 2019. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2021. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.	—
WHO HIVResNet HIV drug resistance laboratory operational framework, segunda edición. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2020. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.	—

Asistencia al cliente y soporte técnico

Visite thermofisher.com/support para conocer la última información en servicio y asistencia.

- Números de teléfono de contacto en todo el mundo
- Información de asistencia del producto
 - Preguntas más frecuentes (FAQ) sobre productos
 - Software, parches y actualizaciones
 - Formación para muchas aplicaciones e instrumentos
- Pedidos y soporte web



- Documentación del producto
 - Guías de usuario, manuales y protocolos
 - Certificados de análisis
 - Hojas de datos de seguridad (Safety Data Sheets, SDS; también conocidas como MSDS)

Nota: Para conocer las SDS de los reactivos y productos químicos de otros fabricantes, póngase en contacto con el fabricante.

Garantía limitada del producto

Life Technologies Corporation y/o sus filiales garantizan sus productos tal y como se establece en los términos y condiciones de venta de Life Technologies en www.thermofisher.com/us/en/home/global/terms-and-conditions.html. Si tiene cualquier duda, póngase en contacto con Life Technologies en www.thermofisher.com/support.

thermofisher.com/support | thermofisher.com/askaquestion
thermofisher.com

22 de septiembre de 2022

Página 54 de 64

ThermoFisher
S C I E



Directora Técnica y Apoderada Legal
MNF: 15234

Modelo de rótulos

Sobre-rotulo

Importador: INVITROGEN ARGENTINA S.A.
Iturri 1474 | CABA | Rep. Argentina
T 011 4556 0844 | F 011 4556 0744
Director Tecnico: Brenda Aguiar Mat. Nac. 18284
Autorizado por la A.N.M.A.T PM 1569-32
USO PROFESIONAL EXCLUSIVO – VENTA EXCLUSIVA A LABORATORIOS DE
ANALISIS CLINICOS

Rótulos de origen

A54401 – Applied Biosystems™ TaqPath™ Seq HIV-1 Genotyping Kit

applied biosystems REF A54401
by Thermo Fisher Scientific

TaqPath™ Seq HIV-1 Genotyping Kit

Σ₄₈ LOT 0000000 YYYY-MM-DD (01) 1 0190302 01812 8
(17) 100000
(00) 0 0
(240) A54401

www.thermofisher.com/hivdrIFU

CE IVD EC REP Life Technologies Europe B.V. Kwartsweg 2, 2665 NN Bleiswijk The Netherlands

Life Technologies Corp. 6055 Sunol Blvd. Pleasanton, CA 94566 USA

-25 °C -15 °C

Read SDS

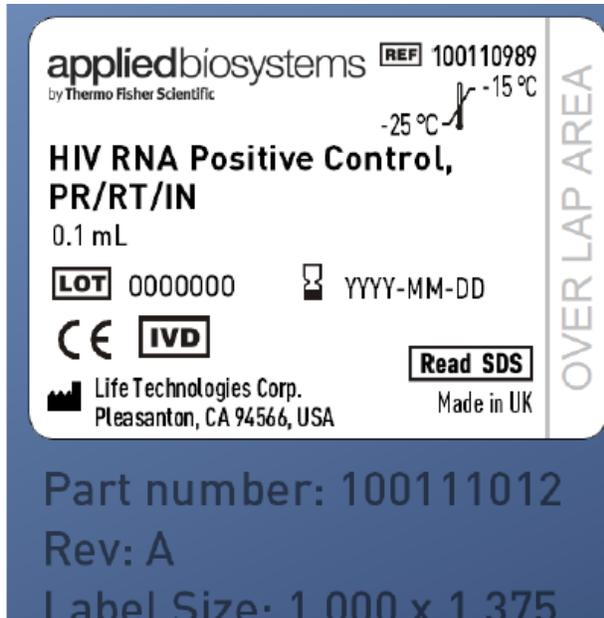
Made in UK

100110496 RevA

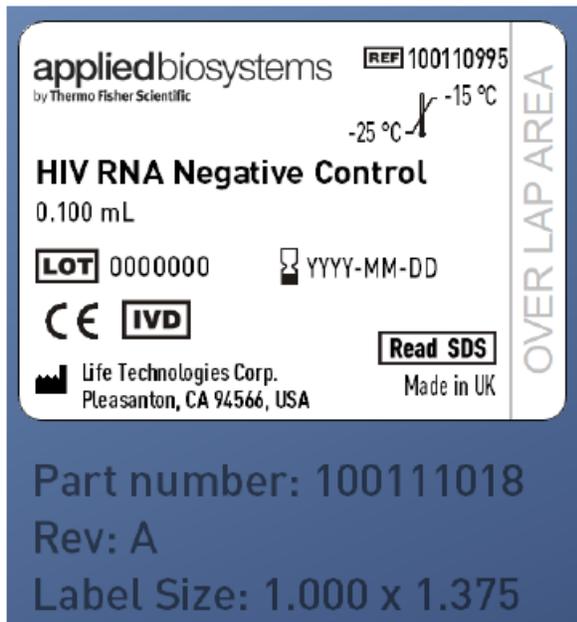
Part number: 100110496
Rev: A
Label Size: 1.563 X 2.391
Blank Label Stock: 4412966

Conteniendo:

- 1) 100110989 RNA Positive Control



- 2) 100110995 HIV RNA Negative Control



3) 100111072 RT-PCR Master Mix, PR/RT

applied biosystems by Thermo Fisher Scientific **REF 100111072**

RT-PCR Master Mix, PR/RT

1.055 mL

LOT 0000000 **YY**YY-MM-DD

CE **IVD** **Read SDS**

Life Technologies Corp.
Pleasanton, CA 94566, USA Made in UK

Overlap - non print area

Part Number: 100111073
Rev: A
Label Size: 1.000 x 1.375
Blank Label Stock: 4467532

4) 100110985 RT-PCR Master Mix, IN

applied biosystems by Thermo Fisher Scientific **REF 100110985**

RT-PCR Master Mix, IN

1.055 mL

LOT 0000000 **YY**YY-MM-DD

CE **IVD** **Read SDS**

Life Technologies Corp.
Pleasanton, CA 94566, USA Made in UK

OVER LAP AREA

Part number: 100111010
Rev: A
Label Size: 1.000 x 1.375

5) 100110997 Nested -PCR Master Mix, PR/RT

appliedbiosystems by Thermo Fisher Scientific REF 100110997
-25 °C -15 °C
Nested-PCR Master Mix, PRRT
1.285 mL
LOT 0000000 YYYY-MM-DD
CE IVD Read SDS
Life Technologies Corp. Pleasanton, CA 94566, USA Made in UK
OVER LAP AREA
Part number: 100111020
Rev: A
Label Size: 1.000 x 1.375

6) 100110987 Nested -PCR Master Mix, IN

appliedbiosystems by Thermo Fisher Scientific REF 100110987
-25 °C -15 °C
Nested-PCR Master Mix, IN
1.285 mL
LOT 0000000 YYYY-MM-DD
CE IVD Read SDS
Life Technologies Corp. Pleasanton, CA 94566, USA Made in UK
OVER LAP AREA
Part number: 100111011
Rev: A
Label Size: 1.000 x 1.375

- 7) 100110998 SuperScript™ III One-Step RT-PCR with Platinum™ Taq High Fidelity Enzyme

applied biosystems REF 100110998
 by Thermo Fisher Scientific
SuperScript™ III One-Step RT-PCR with Platinum™ Taq High Fidelity Enzyme
 0.054 mL
 LOT 0000000 YYYY-MM-DD
 CE IVD Read SDS
 Life Technologies Corp. Made in UK
 Pleasanton, CA 94566, USA
 Part Number: 100111021
 Rev: A
 Label Size: 1.000 x 1.375
 Blank Label Stock: 4467532
 Overlap - non print area

- 8) 100110994 AmpliTaq Gold™ LD DNA Polymerase

applied biosystems REF 100110994
 by Thermo Fisher Scientific
AmpliTaq Gold™ LD DNA Polymerase
 0.054 mL
 LOT 0000000 YYYY-MM-DD
 CE IVD Read SDS
 Life Technologies Corp. Made in UK
 Pleasanton, CA 94566, USA
 Part number: 100111017
 Rev: A
 Label Size: 1.000 x 1.375
 OVER LAP AREA

9) 100110993 HIV Sequencing Mix R12

The label for HIV Sequencing Mix R12 features the Applied Biosystems logo (by Thermo Fisher Scientific) and the reference number REF 100110993. It includes a temperature range of -25 °C to -15 °C. The product name is HIV Sequencing Mix R12, with a volume of 0.435 mL. The lot number is 0000000 and the expiration date is YYYY-MM-DD. It displays CE and IVD certification marks, a 'Read SDS' instruction, and the manufacturer information: Life Technologies Corp., Pleasanton, CA 94566, USA, Made in UK. A vertical 'OVER LAP AREA' label is on the right. Below the label, the part number is 100111016, the revision is A, and the label size is 1.000 x 1.375.

applied biosystems **REF** 100110993
by Thermo Fisher Scientific
-25 °C -15 °C
HIV Sequencing Mix R12
0.435 mL
LOT 0000000 **YYYY-MM-DD**
CE IVD **Read SDS**
Life Technologies Corp.
Pleasanton, CA 94566, USA Made in UK
OVER LAP AREA
Part number: 100111016
Rev: A
Label Size: 1.000 x 1.375

10) 100110992 HIV Sequencing Mix R11

The label for HIV Sequencing Mix R11 features the Applied Biosystems logo (by Thermo Fisher Scientific) and the reference number REF 100110992. It includes a temperature range of -25 °C to -15 °C. The product name is HIV Sequencing Mix R11, with a volume of 0.435 mL. The lot number is 0000000 and the expiration date is YYYY-MM-DD. It displays CE and IVD certification marks, a 'Read SDS' instruction, and the manufacturer information: Life Technologies Corp., Pleasanton, CA 94566, USA, Made in UK. A vertical 'OVER LAP AREA' label is on the right. Below the label, the part number is 100111015, the revision is A, and the label size is 1.000 x 1.375.

applied biosystems **REF** 100110992
by Thermo Fisher Scientific
-25 °C -15 °C
HIV Sequencing Mix R11
0.435 mL
LOT 0000000 **YYYY-MM-DD**
CE IVD **Read SDS**
Life Technologies Corp.
Pleasanton, CA 94566, USA Made in UK
OVER LAP AREA
Part number: 100111015
Rev: A
Label Size: 1.000 x 1.375

11) 100110991 HIV Sequencing Mix F12

The label for HIV Sequencing Mix F12 features the Applied Biosystems logo (REF 100110991) and storage instructions (-25 °C to -15 °C). It includes the product name, volume (0.435 mL), lot number (0000000), and expiration date (YYYY-MM-DD). Regulatory information includes CE and IVD marks, a 'Read SDS' instruction, and manufacturer details (Life Technologies Corp., Pleasanton, CA 94566, USA) and 'Made in UK'. A vertical 'OVER LAP AREA' label is on the right. The bottom section, on a dark blue background, lists: Part number: 100111014, Rev: A, Label Size: 1.000 x 1.375.

12) 100110990 HIV Sequencing Mix F11

The label for HIV Sequencing Mix F11 features the Applied Biosystems logo (REF 100110990) and storage instructions (-25 °C to -15 °C). It includes the product name, volume (0.435 mL), lot number (0000000), and expiration date (YYYY-MM-DD). Regulatory information includes CE and IVD marks, a 'Read SDS' instruction, and manufacturer details (Life Technologies Corp., Pleasanton, CA 94566, USA) and 'Made in UK'. A vertical 'OVER LAP AREA' label is on the right. The bottom section, on a dark blue background, lists: Part number: 100111013, Rev: A, Label Size: 1.000 x 1.375.

13) 100111009 HIV Sequencing Mix R3

appliedbiosystems REF 100111009
by Thermo Fisher Scientific

HIV Sequencing Mix R3
0.435 mL

LOT 0000000 YYYY-MM-DD

CE IVD Read SDS

Life Technologies Corp.
Pleasanton, CA 94566, USA Made in UK

Overlap - non print area

Part Number: 100111027
Rev: A
Label Size: 1.000 x 1.375
Blank Label Stock: 4467532

14) 100111008 HIV Sequencing Mix R2

appliedbiosystems REF 100111008
by Thermo Fisher Scientific

HIV Sequencing Mix R2
0.435 mL

LOT 0000000 YYYY-MM-DD

CE IVD Read SDS

Life Technologies Corp.
Pleasanton, CA 94566, USA Made in UK

Overlap - non print area

Part Number: 100111026
Rev: A
Label Size: 1.000 x 1.375
Blank Label Stock: 4467532

15) 100111002 HIV Sequencing Mix R1

appliedbiosystems by Thermo Fisher Scientific **REF** 100111002

HIV Sequencing Mix R1
0.435 mL

LOT 0000000 **YYYY-MM-DD**

CE **IVD** **Read SDS**

Life Technologies Corp.
Pleasanton, CA 94566, USA **Made in UK**

-25 °C -15 °C

Overlap - non print area

Part Number: 100111025
Rev: A
Label Size: 1.000 x 1.375
Blank Label Stock: 4467532

16) 100111001 HIV Sequencing Mix F3

appliedbiosystems by Thermo Fisher Scientific **REF** 100111001

HIV Sequencing Mix F3
0.435 mL

LOT 0000000 **YYYY-MM-DD**

CE **IVD** **Read SDS**

Life Technologies Corp.
Pleasanton, CA 94566, USA **Made in UK**

-25 °C -15 °C

Overlap - non print area

Part Number: 100111024
Rev: A
Label Size: 1.000 x 1.375
Blank Label Stock: 4467532

17) 100111000 HIV Sequencing Mix F2

applied biosystems REF 100111000
by Thermo Fisher Scientific

HIV Sequencing Mix F2
0.435 mL

LOT 0000000 YYYY-MM-DD

CE IVD Read SDS

Life Technologies Corp.
Pleasanton, CA 94566, USA Made in UK

Overlap - non print area

Part Number: 100111023
Rev: A
Label Size: 1.000 x 1.375
Blank Label Stock: 4467532

18) 100110999 HIV Sequencing Mix F1

applied biosystems REF 100110999
by Thermo Fisher Scientific

HIV Sequencing Mix F1
0.435 mL

LOT 0000000 YYYY-MM-DD

CE IVD Read SDS

Life Technologies Corp.
Pleasanton, CA 94566, USA Made in UK

Overlap - non print area

Part Number: 100111022
Rev: A
Label Size: 1.000 x 1.375
Blank Label Stock: 4467532



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
1983/2023 - 40 AÑOS DE DEMOCRACIA

Hoja Adicional de Firmas
Anexo

Número:

Referencia: INVITROGEN ARGENTINA S.A. rótulos e instrucciones de uso

El documento fue importado por el sistema GEDO con un total de 64 pagina/s.

Digitally signed by GESTION DOCUMENTAL ELECTRONICA - GDE
Date: 2023.12.14 11:02:27 -03:00

Digitally signed by GESTION DOCUMENTAL
ELECTRONICA - GDE
Date: 2023.12.14 11:02:28 -03:00



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
1983/2023 - 40 AÑOS DE DEMOCRACIA

Certificado - Redacción libre

Número:

Referencia: 1-0047-3110-000956-23-3

**CERTIFICADO DE AUTORIZACIÓN E INSCRIPCIÓN
PRODUCTO MÉDICO PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO**

Expediente Nº 1-0047-3110-000956-23-3

La Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) certifica que de acuerdo con lo solicitado por INVITROGEN ARGENTINA S.A ; se autoriza la inscripción en el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica (RPPTM), de un nuevo producto con los siguientes datos identificatorios característicos:

DATOS IDENTIFICATORIOS CARACTERÍSTICOS

Nombre Descriptivo: A54401 – Applied Biosystems™ TaqPath™ Seq HIV-1 Genotyping Kit

Marca comercial: TaqPath™

Modelos:

Conteniendo:

- 2) 100110989 - RNA Positive Control
- 3) 100110995 - HIV RNA Negative Control
- 4) 100111072 - RT-PCR Master Mix, PR/RT
- 5) 100110985 - RT-PCR Master Mix, IN

- 6) 100110997 - Nested-PCR Master Mix, PR/RT
- 7) 100110987 - Nested-PCR Master Mix, IN
- 8) 100110998 - SuperScript™ III One-Step RT-PCR with Platinum™ Taq High Fidelity Enzyme
- 9) 100110994 - AmpliTaq Gold™ LD DNA Polymerase
- 10) 100110993 - HIV Sequencing Mix R12
- 11) 100110992 - HIV Sequencing Mix R11
- 12) 100110991 - HIV Sequencing Mix F12
- 13) 100110990 - HIV Sequencing Mix F11
- 14) 100111009 - HIV Sequencing Mix R3
- 15) 100111008 - HIV Sequencing Mix R2
- 16) 100111002 - HIV Sequencing Mix R1
- 17) 100111001 - HIV Sequencing Mix F3
- 18) 100111000 - HIV Sequencing Mix F2
- 19) 100110999 - HIV Sequencing Mix F1

Indicación/es de uso:

El Applied Biosystems™ TaqPath™ Seq HIV-1 Genotyping Kit (A54401) es un ensayo de diagnóstico in vitro (IVD) basado en la carrera de secuenciación de Sanger para ayudar en la detección de mutaciones genómicas (en las regiones de proteasa, transcriptasa inversa e integrasa del gen pol) en el ácido ribonucleico vírico del VIH-1 extraído de plasma EDTA y manchas de sangre secas, como ayuda en la monitorización y el tratamiento de personas infectadas con VIH-1.

El Applied Biosystems™ TaqPath™ Seq HIV-1 Genotyping Kit se usa junto con los 3500 Series Genetic Analyzers. El ensayo genera resultados para su uso en el genotipado de los subtipos A, B, C, D, F, G, CRF01_AE, CRF02_AG, CRF 06_cpx del VIH-1.

Los resultados se deben evaluar con más información disponible clínica y de laboratorio. Los resultados no están previstos para su uso como ayuda en el diagnóstico de infección por VIH ni para confirmar la presencia de infección por VIH. Los resultados no están previstos para el cribado de donantes de sangre, plasma o células humanas, tejidos, productos basados en tejidos y células.

Solo para uso profesional.

- 2) 100110989 - RNA Positive Control: Control positivo.
- 3) 100110995 - HIV RNA Negative Control: Control negativo.
- 8) 100110998 - SuperScript™ III One-Step RT-PCR with Platinum™ Taq High Fidelity Enzyme: Transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina recombinante.

Forma de presentación: 1) A54401 – Applied Biosystems™ TaqPath™ Seq HIV-1 Genotyping Kit para 48 muestras

Conteniendo:

- 2) 100110989 - RNA Positive Control: 2 × 100 µL
- 3) 100110995 - HIV RNA Negative Control: 2 × 100 µL
- 4) 100111072 - RT-PCR Master Mix, PR/RT: 2 × 1,055 µL
- 5) 100110985 - RT-PCR Master Mix, IN: 2 × 1,055 µL
- 6) 100110997 - Nested-PCR Master Mix, PR/RT: 2 × 1,285 µL
- 7) 100110987 - Nested-PCR Master Mix, IN: 2 × 1,285 µL
- 8) 100110998 - SuperScript™ III One-Step RT-PCR with Platinum™ Taq High Fidelity Enzyme: 2 × 54 µL
- 9) 100110994 - AmpliTaq Gold™ LD DNA Polymerase: 1 × 54 µL

- 10) 100110993 - HIV Sequencing Mix R12: 2 × 435 µL
- 11) 100110992 - HIV Sequencing Mix R11: 2 × 435 µL
- 12) 100110991 - HIV Sequencing Mix F12: 2 × 435 µL
- 13) 100110990 - HIV Sequencing Mix F11: 2 × 435 µL
- 14) 100111009 - HIV Sequencing Mix R3: 2 × 435 µL
- 15) 100111008 - HIV Sequencing Mix R2: 2 × 435 µL
- 16) 100111002 - HIV Sequencing Mix R1: 2 × 435 µL
- 17) 100111001 - HIV Sequencing Mix F3: 2 × 435 µL
- 18) 100111000 - HIV Sequencing Mix F2: 2 × 435 µL
- 19) 100110999 - HIV Sequencing Mix F1: 2 × 435 µL

Período de vida útil: 1) A54401 – Applied Biosystems™ TaqPath™ Seq HIV-1 Genotyping Kit: 12 meses de -25°C a -15°C

Conteniendo:

- 2) 100110989 - RNA Positive Control: 12 meses de -25°C a -15°C
- 3) 100110995 - HIV RNA Negative Control: 12 meses de -25°C a -15°C
- 4) 100111072 - RT-PCR Master Mix, PR/RT: 12 meses de -25°C a -15°C
- 5) 100110985 - RT-PCR Master Mix, IN: 12 meses de -25°C a -15°C
- 6) 100110997 - Nested-PCR Master Mix, PR/RT: 12 meses de -25°C a -15°C
- 7) 100110987 - Nested-PCR Master Mix, IN: 12 meses de -25°C a -15°C
- 8) 100110998 - SuperScript™ III One-Step RT-PCR with Platinum™ Taq High Fidelity Enzyme: 12 meses de -25°C a -15°C
- 9) 100110994 - AmpliTaq Gold™ LD DNA Polymerase: 12 meses de -25°C a -15°C
- 10) 100110993 - HIV Sequencing Mix R12: 12 meses de -25°C a -15°C, protegido de la luz
- 11) 100110992 - HIV Sequencing Mix R11: 12 meses de -25°C a -15°C, protegido de la luz
- 12) 100110991 - HIV Sequencing Mix F12: 12 meses de -25°C a -15°C, protegido de la luz
- 13) 100110990 - HIV Sequencing Mix F11: 12 meses de -25°C a -15°C, protegido de la luz
- 14) 100111009 - HIV Sequencing Mix R3: 12 meses de -25°C a -15°C, protegido de la luz
- 15) 100111008 - HIV Sequencing Mix R2: 12 meses de -25°C a -15°C, protegido de la luz
- 16) 100111002 - HIV Sequencing Mix R1: 12 meses de -25°C a -15°C, protegido de la luz
- 17) 100111001 - HIV Sequencing Mix F3: 12 meses de -25°C a -15°C, protegido de la luz
- 18) 100111000 - HIV Sequencing Mix F2: 12 meses de -25°C a -15°C, protegido de la luz
- 19) 100110999 - HIV Sequencing Mix F1: 12 meses de -25°C a -15°C, protegido de la luz

No utilice los componentes del kit si se han superado las fechas de caducidad indicadas en las cajas del componente.

No supere los 6 ciclos de congelación/descongelación de las RT-PCR Master Mixes, Nested-PCR Master Mixes, RNA Positive Control y HIV Sequencing Mixes.

Mantenga los reactivos en hielo durante la preparación de la reacción.

Restablezca los tubos con enzimas a una temperatura comprendida entre -25 °C y -15 °C de inmediato después del uso.

Nombre del fabricante:

Life Technologies Corporation

Lugar de elaboración:

6055 Sunol Boulevard
Pleasanton CA 94566
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

Grupo de Riesgo: Grupo C

Condición de uso: Uso profesional exclusivo

Se extiende el presente Certificado de Autorización e Inscripción del PRODUCTO PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO PM 1569-32 , con una vigencia de cinco (5) años a partir de la fecha de la Disposición autorizante.

Expediente N° 1-0047-3110-000956-23-3

N° Identificadorio Trámite: 46164

AM

Digitally signed by GESTION DOCUMENTAL ELECTRONICA - GDE
Date: 2023.12.19 17:24:55 -03:00

Digitally signed by GESTION DOCUMENTAL
ELECTRONICA - GDE
Date: 2023.12.19 17:24:55 -03:00