

IndiMag[®] Pathogen Kit Manual

Para la purificación rápida y automatizada de ADN y ARN vírico y ADN bacteriano proveniente de muestras animales con el uso de las estaciones de trabajo IndiMag 48, KingFisher[™] Flex, BioSprint[®] 96 o una equivalente

REF IndiMag Pathogen Kit w/o plastics (n.º de cat. SP947257),
*anteriormente llamado MagAttract[®] 96 cador[®] Pathogen Kit w/o
Plastics (384)*

REF IndiMag Pathogen Kit (N.º de cat. SP947457),
anteriormente llamado MagAttract 96 cador Pathogen Kit (384)



Fabricado por QIAGEN[®] GmbH para INDICAL BIOSCIENCE
INDICAL BIOSCIENCE GmbH, Deutscher Platz 5b,
04103 Leipzig, Alemania

Contenido

Contenido del kit	4
Protocolos y estaciones de trabajo adecuados	5
Estaciones de trabajo	5
Protocolos	5
Almacenamiento	7
Uso previsto	7
Símbolos	8
Información de seguridad	8
Control de calidad	9
Introducción	10
Principio y procedimiento	11
Descripción de los protocolos	13
Protocolo de purificación de ácidos nucleicos	14
Pretratamientos	15
Equipo y reactivos que debe suministrar el usuario	17
Notas importantes	18
Material de partida	18
Cantidad de ácidos nucleicos	21
Uso de Carrier RNA y controles internos	21
Almacenamiento de los ácidos nucleicos	22
Manipulación del ARN	23
Preparación de los reactivos	24
Protocolo: Purification of pathogen nucleic acids from fluid samples	27
Cuestiones importantes antes de comenzar	27

Antes de comenzar	28
Procedimiento para el uso con el IndiMag 48	29
Procedimiento para el uso con procesadores de partículas magnéticas (p. ej., KingFisher Flex, BioSprint 96 o equivalente).....	31
Guía para la resolución de problemas.....	33
Información para pedidos	37
Índice de cambios.....	39

Contenido del kit

IndiMag Pathogen Kit	w/o plastics	
N.º de catálogo	SP947257	SP947457
Número de preparaciones	384	384
Buffer VXL (Tampón VXL) ¹	2 de 30 ml	2 de 30 ml
Buffer ACB (Tampón ACB) ^{1,2}	2 de 60 ml	2 de 60 ml
Proteinase K (Proteinasa K)	2 de 6 ml	2 de 6 ml
Carrier RNA (poly A) (ARN transportador [poly A])	2 de 310 µg	2 de 310 µg
MagAttract Suspension G (Suspensión G MagAttract) ³	1 de 13 ml	1 de 13 ml
Buffer AW1 (concentrate) (Tampón AW1 [concentrado]) ^{1,4}	2 de 75,5 ml	2 de 75,5 ml
Buffer AW2 (concentrate) (Tampón AW2 [concentrado]) ⁴	2 de 54 ml	2 de 54 ml
Buffer AVE (Tampón AVE) ³	1 de 125 ml	1 de 125 ml
Large 96-Rod Cover (cubierta grande para 96 barras)	-	4
S-Block (Bloque S)	-	20
96-Well Microplate MP (microplaca MP de 96 pocillos)	-	4
Quick-Start Protocol (PCard) (protocolo de inicio rápido [PCard])	2	2

1 PRECAUCIÓN: Contiene una sal caótrona. Adopte las medidas de seguridad de laboratorio adecuadas y lleve guantes durante la manipulación. No es compatible con desinfectantes que contengan lejía. Consulte la página 8 si desea obtener información relativa a la seguridad.

2 Antes de utilizarlo por primera vez, añada isopropanol, tal como se indica en el frasco, para obtener una solución de trabajo.

3 PRECAUCIÓN: Contiene azida sódica.

4 Antes de utilizarlo por primera vez, añada etanol (96-100 %), tal como se indica en el frasco, para obtener una solución de trabajo.

Protocolos y estaciones de trabajo adecuados

Estaciones de trabajo

Las siguientes son algunas de las estaciones de trabajo adecuadas cuando se usa el IndiMag Pathogen Kit (SP947457):

- KingFisher Flex
- KingFisher 96
- BioSprint 96
- MagMax™ Express 96

Las siguientes son algunas de las estaciones de trabajo adecuadas cuando se usa el IndiMag Pathogen Kit w/o plastics (SP947257):

- IndiMag 48
- KingFisher
- KingFisher mL
- KingFisher Duo
- BioSprint 15
- MagMax Express

Protocolos

Use el MagAttract 96 cador Pathogen Kit Instrument Protocol (v2). La tabla 1 en la página 6 muestra un resumen de los nombres de scripts en función de los dispositivos respectivos y los sistemas de software utilizados.

Tenga en cuenta que el IndiMag 48 tiene el protocolo “Pathogen” preinstalado.

Tabla 1: Nombre de scripts en función de los dispositivos y los sistemas de software utilizados.

Dispositivo	Software	Nombre del script
BioSprint 96	BioSprint	BS96 cador v2.kf2
BioSprint 15	BioSprint	BS15 cador.kf2
KingFisher Duo	BindIt	KF_Duo_96_cador.bdz
KingFisher Flex	BindIt	KF_Flex_cador_v2.bdz
KingFisher 96	BindIt	KF_96_cador_v2.bdz
KingFisher 96	KingFisher	KF96 cador v2.kf2
KingFisher mL	KingFisher	KFmL cador.kf2

Para obtener más información, o si tiene preguntas técnicas, póngase en contacto con el equipo especializado en asistencia técnica de INDICAL en el correo electrónico **support@indical.com**.

Almacenamiento

Los tampones y los reactivos permanecen estables hasta la fecha de caducidad indicada en la caja del kit, a temperatura ambiente (15-25 °C), sin que se afecte el rendimiento.

El Carrier RNA liofilizado se puede guardar a temperatura ambiente hasta la fecha de caducidad indicada en la caja del kit. Para su uso, el Carrier RNA liofilizado debe disolverse en Buffer AVE y añadirse luego a una mezcla de Buffer VXL, según se describe en la sección “Preparación de los reactivos”, en la página 24. La solución con la mezcla de Carrier RNA, Buffer AVE y Buffer VXL debe estar recién preparada. El Carrier RNA disuelto en Buffer AVE que no se haya utilizado debe congelarse de inmediato en partes alícuotas a una temperatura de entre –30 °C y –15 °C. No someta las partes alícuotas de Carrier RNA a más de 3 ciclos de congelación-descongelación.

La Proteinase K puede guardarse a temperatura ambiente (15-25 °C). Para su almacenamiento durante períodos más largos, o si la temperatura ambiente supera habitualmente los 25 °C, recomendamos una temperatura de almacenamiento de 2-8 °C.

Uso previsto

El IndiMag Pathogen Kit se ha diseñado para la extracción automatizada de ácidos nucleicos patógenos (ARN y ADN víricos y ADN bacteriano) de sangre total, suero, plasma, otros líquidos corporales, exudados, lavados y homogeneizado tisular de animales con las estaciones de trabajo IndiMag 48, KingFisher Flex, Biosprint 96 o equivalente.

Para aplicaciones de biología molecular.

Símbolos



Fabricante legal



Número de lote



Fecha de caducidad



Límites de temperatura para almacenamiento



Manual



Número de catálogo



Número de material

Información de seguridad

Cuando trabaje con productos químicos, use siempre una bata de laboratorio, guantes desechables y gafas de protección adecuados. Para obtener más información, consulte las hojas de datos sobre seguridad (Safety Data Sheet, SDS) correspondientes. Puede solicitarlas a su representante de ventas local o por correo electrónico a **compliance@indical.com**.



PRECAUCIÓN: NO añada lejía ni soluciones ácidas directamente a los residuos de la preparación de las muestras.

El Buffer VXL y el Buffer AW1 contienen clorhidrato de guanidina y el Buffer ACB contiene tiocianato de guanidina; estas sustancias pueden formar compuestos altamente reactivos cuando se combinan con lejía.

Si se derrama el líquido que contiene estos tampones, límpielo con detergente específico de laboratorio y agua. Si el líquido derramado contiene agentes potencialmente infecciosos, limpie el área afectada con detergente de laboratorio y agua en primer lugar y, a continuación, con solución de hipoclorito de sodio al 1 % (v/v).

Control de calidad

En cumplimiento del sistema de gestión de calidad con certificación ISO de INDICAL, cada lote de IndiMag Pathogen Kit se analiza en relación con especificaciones predeterminadas para garantizar la uniformidad de la calidad del producto.

Introducción

La tecnología de microesferas magnéticas permite purificar ácidos nucleicos de alta calidad que carecen de proteínas, nucleasas y otras impurezas. Los ácidos nucleicos purificados están listos para un uso en aplicaciones posteriores, como la amplificación u otras reacciones enzimáticas.

El IndiMag Pathogen Kit permite la purificación rápida de ADN y ARN víricos, y de ADN bacteriano, de una amplia variedad de muestras animales (consulte la tabla 2 en la página 15) con las estaciones de trabajo IndiMag 48, KingFisher Flex, BioSprint 96 o equivalente (consulte la sección “Material de partida” en la página 18). Sin embargo, el usuario debe validar las combinaciones específicas de tipos de muestras y microorganismos patógenos.

Principio y procedimiento

El IndiMag Pathogen Kit usa la tecnología de partículas magnéticas MagAttract para la purificación de ácidos nucleicos. Esta tecnología combina la velocidad y la eficiencia de la purificación de ácidos nucleicos basada en la sílice con la cómoda manipulación de las partículas magnéticas (figura 1, página 11).

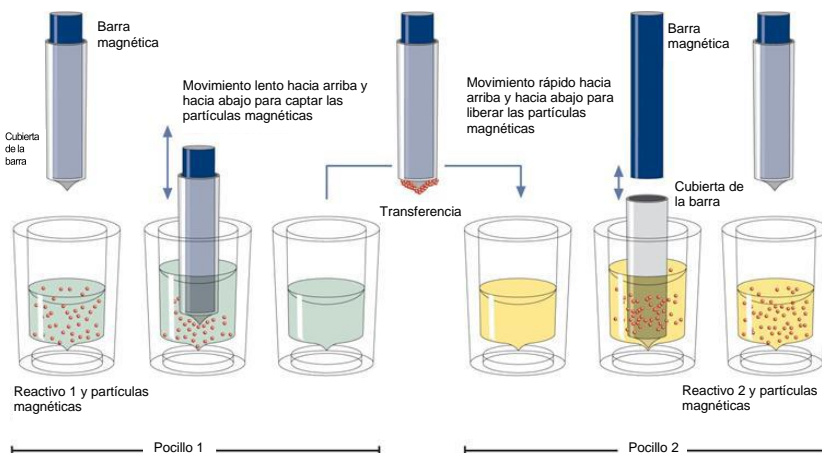


Figura 1. Esquema del principio de las microesferas magnéticas. La estación de trabajo procesa una muestra que contiene partículas magnéticas de la forma siguiente: Paso 1) Una barra magnética protegida por una cubierta de barra entra en un pocillo (vea el pocillo 1 en la figura) que contiene la muestra y atrae las partículas magnéticas. Paso 2) La cubierta de la barra magnética se sitúa encima de otro pocillo (vea el pocillo 2 en la figura) y se liberan las partículas magnéticas. Los pasos 1 y 2 se repiten varias veces durante el procesamiento de las muestras.

El procedimiento de purificación está diseñado para garantizar una manipulación cómoda y reproducible de muestras potencialmente infecciosas (figura 2, página 12).

En función del material de partida, las muestras pueden lisarse en un solo paso en presencia de sales caótropas y Proteinase K, lo que libera ácidos nucleicos para que se acoplen a la superficie de sílice de las partículas magnéticas MagAttract. Se procede a un lavado eficiente del ADN y el ARN ligado a las partículas magnéticas que va seguido de una etapa de secado al aire. Los ácidos nucleicos de alta calidad se eluyen en Buffer AVE. La cantidad de ácidos nucleicos depende del tipo de muestra y del almacenamiento de la muestra.



Figura 2. Descripción esquemática de los pasos del protocolo

Descripción de los protocolos

Hay dos protocolos en este manual. En el primer protocolo, las muestras son sometidas a una purificación de ácidos nucleicos en la estación de trabajo IndiMag 48, mientras que en el segundo protocolo, las muestras son purificadas en la estación de trabajo KingFisher Flex, BioSprint 96 o equivalente.

Para las muestras que requieren un tratamiento previo a la purificación de ácidos nucleicos, la tabla 2 en la página 15 proporciona un resumen de los protocolos de pretratamiento que son adecuados para las diferentes combinaciones de patógenos y materiales de partida.

El tiempo de purificación de las muestras es de aproximadamente 34 minutos, sin incluir los pasos de manipulación previa para el prellenado de los S-Blocks o de las microplacas de 96 pocillos. Las soluciones de lisis y de unión utilizadas en el procedimiento son Buffer VXL y Buffer ACB. Preste atención a la información proporcionada en la sección “Información de seguridad”, página 8.

Protocolo de purificación de ácidos nucleicos

El protocolo “Purification of pathogen nucleic acids from fluid samples” (página 27) está optimizado para la purificación de ADN y ARN víricos, y el ADN de bacterias fáciles de lisar de un máximo de 200 µl de material líquido. Los materiales de partida adecuados para el **procesamiento directo** mediante este método son:

- sangre total
- suero
- plasma
- fluidos orales
- fluidos de cavidades corporales (p. ej., peritoneal, sinovial y cefalorraquídeo)
- extractos líquidos de exudados (p. ej., frotis nasales, faríngeos y de cloaca*)
- fluidos de lavados (p. ej., de lavados broncoalveolares)
- otros fluidos, como suspensiones de heces u orina*

* El procesamiento de muestras con un alto contenido de inhibidores, como la orina o las heces, podría requerir una reducción en el volumen de entrada de muestra o de otras medidas. Para obtener más recomendaciones de pretratamiento, póngase en contacto con el servicio de asistencia de INDICAL (support@indical.com).

Pretratamientos

Los pretratamientos mencionados en este manual han sido optimizados para combinaciones específicas de materiales de partida y patógenos diana. La elección del pretratamiento depende del objetivo principal del flujo de trabajo y debe acompañarse de la purificación de ácidos nucleicos.

La tabla 2 en la página 15 resume los pretratamientos y sus aplicaciones.

Algunos de los pretratamientos podrían requerir componentes adicionales, que se indican en cada protocolo de pretratamiento.

Tabla 2: Protocolos de pretratamiento para muestras de fluidos y tejidos

Muestra	Diana	Pretratamiento	Manual
Fluidos (p. ej., sangre total, suero, plasma, fluido de exudado o de lavado, tejido tratado previamente)	ADN y ARN vírico, ADN de bacterias fáciles de lisar ¹	-	-
Sangre total o tejido tratado previamente	ADN de bacterias difíciles de lisar ¹	Pretratamiento B1 para bacterias difíciles de lisar en sangre total o tejido tratado previamente	HB-2533
Suero, plasma, exudados, lavados, fluidos de cavidades corporales y orina	ADN de bacterias difíciles de lisar ¹	Pretratamiento B2 para bacterias difíciles de lisar en fluidos corporales ²	HB-2534
Tejido (p. ej., hígado, bazo, riñón y ganglio linfático)	Ácidos nucleicos de patógenos	Pretratamiento T1 Disrupción mecánica del tejido	HB-2535
	ADN vírico ³ , ADN bacteriano ⁴	Pretratamiento T2 Digestión enzimática del tejido	HB-2536
Disrupción parcial rápida del tejido	ADN y ARN vírico, ADN de bacterias fáciles de lisar ¹	Pretratamiento T3	HB-2537

Tejido con gran cantidad de lípidos y/o nucleasas (p. ej., cerebro y páncreas)	ADN y ARN vírico, ADN de bacterias fáciles de lisar ¹	Pretratamiento T4	HB-2538
Heces	ADN y ARN vírico	Pretratamiento F1 Método con suspensión no lisante	HB-2513
	ADN bacteriano ¹ y ADN vírico	Pretratamiento F2 Método con suspensión lisante	HB-2514
	ADN de <i>Mycobacterium avium</i> subespecie <i>paratuberculosis</i> (MAP)	Pretratamiento F-MAP	HB-2503
Tarjetas de papel de filtro		Pretratamiento C1	HB-2520
Exudados (traqueal, bucofaríngeo y sangre)		Pretratamiento S1	HB-2516

1 Las bacterias grampositivas son difíciles de lisar por la rigidez de sus paredes celulares. Aunque muchas bacterias gramnegativas son fáciles de lisar, otras no lo son y también sería útil recurrir al pretratamiento B1 o al B2.

2 No es adecuado para sangre total.

3 No es adecuado para el ARN vírico debido a que las condiciones de lisado no conservarían la integridad del ARN lo suficiente.

4 Para bacterias difíciles de lisar, use el Pretratamiento B1.

Puede obtener más información sobre pretratamientos en el sitio web www.indical.com/handbooks o poniéndose en contacto con el servicio de asistencia de INDICAL en el correo electrónico support@indical.com.

Equipo y reactivos que debe suministrar el usuario

Cuando trabaje con productos químicos, use siempre una bata de laboratorio, guantes desechables y gafas de protección adecuados. Para obtener más información, consulte las hojas de datos sobre seguridad (Safety Data Sheet, SDS) correspondientes, que puede solicitar al proveedor del producto.

- Estación de trabajo IndiMag 48, KingFisher Flex, BioSprint 96 o equivalente
- Si corresponde: Cabezal magnético para su uso con Large 96-Rod Covers
- Pipetas y puntas de pipeta desechables con filtros para aerosoles (20-1000 µl)
- Pipeta multicanal y puntas de pipeta desechables de 1000 µl con filtros para aerosoles
- Multidispensador
- Etanol (96-100 %)*
- Isopropanol
- Tampón fosfato salino (Phosphate-buffered saline, PBS), puede ser necesario para diluir las muestras
- Agitador vorticial
- Paño suave o toallita y etanol al 70 % u otro desinfectante para limpiar la mesa de trabajo que se ha utilizado.

Nota: lea el manual del usuario correspondiente para la limpieza y el mantenimiento del dispositivo de extracción

* No utilice alcohol desnaturalizado, que contiene otras sustancias como metanol o metiletilcetona.

Notas importantes

Material de partida

Los protocolos que aparecen en este manual están optimizados para la purificación de ácidos nucleicos bacterianos y virales de muestras fáciles de lisar y complejidad baja a moderada. El protocolo IndiMag Pathogen incluye un paso especial que combina lisis eficaz y unión en un solo paso, lo que permite que el procesamiento de las muestras sea rápido y sencillo. Para muestras de mayor complejidad, como tejidos, heces y algunos patógenos difíciles de lisar, como las bacterias grampositivas, podrían ser necesarios pretratamientos especializados de disrupción y/o de lisis. El usuario debe determinar con antelación los pretratamientos adecuados para dichos materiales. En las siguientes secciones se proporciona información general sobre los tipos de muestras recomendados. Para obtener información adicional, póngase en contacto con el servicio de asistencia de INDICAL en el correo electrónico **support@indical.com**.

Los fluidos altamente viscosos podrían requerir tratamiento para reducir su viscosidad y poder extraer los ácidos nucleicos patógenos de manera eficiente. Para obtener recomendaciones, póngase en contacto con el servicio de asistencia de INDICAL en el correo electrónico **support@indical.com**.

Evite la congelación y descongelación repetida de las muestras, ya que esto podría reducir la calidad y la cantidad de los ácidos nucleicos.

Sangre total de animales

Las muestras de sangre tratadas con EDTA, citrato o heparina como anticoagulante pueden usarse para la purificación de ácidos nucleicos. Las muestras pueden ser frescas o congeladas, siempre y cuando no se hayan congelado y descongelado más de una vez. Congelar y descongelar más de una vez desnaturaliza y precipita las proteínas, lo que da lugar a una posible disminución de los títulos víricos y, por consiguiente, de la cantidad de ácidos nucleicos víricos.

Una vez obtenidas y centrifugadas, las muestras de sangre total pueden conservarse a 2-8 °C hasta seis horas. Para períodos de conservación más largos, recomendamos congelar partes alícuotas a una temperatura de entre -30 °C y -15 °C, o a -70 °C.

Recomendamos usar 50-200 µl de sangre con eritrocitos no nucleados. Sin embargo, los recuentos celulares altamente elevados debido a enfermedades inflamatorias o neoplásicas podrían aumentar sobremanera el contenido de ácidos nucleicos del anfitrión en una muestra. En este caso, reducir la entrada de la muestra a 50 µl podría mejorar los resultados en los ensayos anterógrafos, particularmente en la RT-PCR. Si se usa una cantidad inferior a 200 µl de sangre, ajuste el volumen de muestra a 200 µl con PBS o NaCl al 0,9 %.

Para muestras de sangre con eritrocitos nucleados (p. ej., muestras de aves y peces), use una cantidad inferior a 50 µl de sangre y ajuste el volumen de muestra a 200 µl con PBS o NaCl al 0,9 %.

Muestras de suero, plasma, otros fluidos corporales, exudados y lavados de animales

El plasma o el suero congelados no deben descongelarse más de una vez antes del procesamiento.

Se puede procesar un máximo de 200 µl de suero, plasma, otros fluidos corporales, sobrenadante de medios de cultivo de exudados o fluidos de lavados.

El procesamiento de muestras con un contenido muy alto de inhibidores, como las suspensiones de heces u orina, podría requerir una reducción en el volumen de entrada de muestra y/o un pretratamiento adicional para eliminar los inhibidores. Para reducir el volumen de entrada, use 25-50 µl de la muestra y ajuste el volumen a 200 µl con PBS o NaCl al 0,9 %.

Para la extracción de ADN bacteriano, el volumen de entrada puede aumentarse a más de 200 µl, p. ej., 1,5 ml para una mayor sensibilidad de detección bacteriana. Es posible concentrar las bacterias gramnegativas en fluidos acelulares mediante centrifugación de

volúmenes mayores. Vuelva a poner los sedimentos en suspensión en PBS y use un volumen inicial de 200 µl. Consulte el Pretratamiento B2 para la extracción de ADN de bacterias difíciles de lisar.

Tejidos de animales

Cuando trabaje con muestras de tejidos, se requiere la disrupción mecánica o enzimática de la estructura de los tejidos para la liberación de las células, la liberación posterior de ácidos nucleicos y la permeabilidad de las membranas celulares del material.

Según el tipo de tejido, puede haber gran variación respecto a textura y rigidez, tipos celulares y contenido de sustancias inhibitorias y ácidos nucleicos del anfitrión. Además, la ubicación de ácidos nucleicos patógenos en el tejido puede variar en función del tipo de tejido, del patógeno y de la etapa de la infección. El servicio de asistencia técnica de INDICAL tiene a disposición pretratamientos adicionales para muestras de tejidos, incluido un protocolo rápido y recomendaciones para tejidos difíciles.

Como cantidad inicial se puede usar un máximo de 25 mg de tejido sin congelar o congelado. Para tejidos con un gran número de células por masa seleccionada de tejido, como el bazo, debe usarse una cantidad reducida de material de partida (5-10 mg).

Nota: Si los fragmentos sólidos remanentes en el homogeneizado se agregan a las partículas magnéticas MagAttract, la cantidad de ácidos nucleicos podría disminuir.

Cantidad de ácidos nucleicos

Para muestras con bajo contenido de células (p. ej., suero o plasma), la cantidad de ácidos nucleicos víricos obtenida puede ser inferior a 1 µg, lo que dificultaría la cuantificación con un espectrofotómetro. Adicionalmente, los eluidos preparados con Carrier RNA pueden contener mucho más Carrier RNA que ácidos nucleicos diana. El IndiMag Pathogen Kit recupera la totalidad de ácidos nucleicos. Por lo tanto, el ARN y el ADN celular serán copurificados de las células en la muestra junto con el ADN y el ARN vírico, y el ADN bacteriano, y no podrán distinguirse con mediciones espectrofotométricas. Recomendamos usar métodos de amplificación cuantitativa como real-time PCR o real-time RT-PCR cuantitativa para determinar las cantidades de ácidos nucleicos patógenos.

Uso de Carrier RNA y controles internos

Carrier RNA

Recomendamos añadir Carrier RNA a los fluidos con bajo contenido de células, como suero, plasma, medios de cultivo de exudados y fluidos de lavados. Esto mejora la adsorción de ADN y ARN vírico en las partículas magnéticas, lo que es especialmente importante cuando no abundan las moléculas diana. Además, el uso de grandes cantidades de Carrier RNA reduce las posibilidades de degradación del ARN vírico en el caso poco frecuente de que las ribonucleasas no se desnaturalicen por efecto de las sales caótropas y de los detergentes del tampón de lisis. La recuperación de ácidos nucleicos víricos podría disminuir si no se usa Carrier RNA.

Control interno

En función del sistema de amplificación seleccionado, se puede usar opcionalmente un control interno, como intype IC-DNA o intype IC-RNA. Si se usa el IndiMag Pathogen Kit en combinación con sistemas de amplificación que utilizan un control interno, podría requerirse la introducción de estos controles internos en el procedimiento de purificación para vigilar la eficiencia de la preparación de las muestras y del ensayo anterógrado.

Añada ácidos nucleicos de control interno sin protección (p. ej., ADN plasmídico o ARN transcrito in vitro) únicamente a la mezcla VXL. No añada estos ácidos nucleicos de control interno directamente a la muestra.

La cantidad de control interno que se añade depende del sistema de ensayo y del volumen de elución. La evaluación de la cantidad correcta de ácidos nucleicos de control interno debe realizarla el usuario. Consulte las instrucciones del fabricante para determinar la concentración óptima del control interno o póngase en contacto con el servicio de asistencia de INDICAL (support@indical.com) para obtener información adicional.

Almacenamiento de los ácidos nucleicos

Para el almacenamiento a corto plazo durante un máximo de 24 horas, recomendamos almacenar el ADN y ARN vírico purificado a una temperatura de 2-8 °C. Para un tiempo de almacenamiento superior a 24 horas, recomendamos almacenar los ácidos nucleicos purificados a una temperatura de –30 °C a –15 °C, o incluso a –70 °C en el caso del ARN.

Manipulación del ARN

Las ribonucleasas son enzimas muy estables y activas que, en general, no requieren cofactores para actuar. Dado que las ribonucleasas son difíciles de inactivar y que se necesitan solamente cantidades minúsculas para destruir el ARN, no utilice ningún material de plástico ni de vidrio sin eliminar primero una posible contaminación con ARNasa. Deben tomarse precauciones para evitar introducir involuntariamente ribonucleasas en la muestra de ARN durante o después del procedimiento de purificación.

Preparación de los reactivos

Solución de partida de Carrier RNA

El Carrier RNA liofilizado debe disolverse primero en Buffer AVE para poder utilizarlo. Añada 310 µl de Buffer AVE al tubo con 310 µg de Carrier RNA liofilizado para obtener una solución de partida de 1 µg/µl. Añada esta solución a la mezcla de Buffer VXL como se indica en la tabla 3 en la página 28. El Carrier RNA disuelto en Buffer AVE que no se haya utilizado debe congelarse en partes alícuotas a una temperatura de entre –30 °C y –15 °C. Las partes alícuotas de Carrier RNA no deben someterse a más de 3 ciclos de congelación-descongelación.

Proteinase K

El IndiMag Pathogen Kit contiene una solución de Proteinase K lista para su uso que se suministra en un tampón de almacenamiento especialmente formulado. La actividad de la solución de Proteinase K es de 600 mAU/ml.

La Proteinase K es estable durante un año como máximo después de su entrega si se conserva a temperatura ambiente (15-25 °C). Para almacenar la Proteinase K durante más de un año, o si la temperatura ambiente supera habitualmente los 25 °C, recomendamos el almacenamiento a una temperatura de 2-8 °C.

Buffer ACB

El Buffer ACB se suministra como concentrado. Antes de utilizarlo por primera vez, añada isopropanol (100 %) como se indica en el frasco. Marque la casilla de verificación de la etiqueta del frasco para indicar que se ha añadido isopropanol. Mezcle bien después de añadir isopropanol.

MagAttract Suspension G

Agite el frasco que contiene MagAttract Suspension G y mezcle con una agitadora vorticial durante 3 minutos (antes del primer uso) o durante 1 minuto (antes de usos posteriores) para garantizar que las partículas magnéticas de sílice queden completamente resuspendidas.

Buffer AW1

El Buffer AW1 se suministra como concentrado. Antes de utilizarlo por primera vez, añada etanol (96-100 %) como se indica en el frasco. Marque la casilla de verificación de la etiqueta del frasco para indicar que se ha añadido etanol. El Buffer AW1 reconstituido puede conservarse a temperatura ambiente (15-25°C) durante un año como máximo. Mezcle bien después de añadir etanol.

Buffer AW2

El Buffer AW2 se suministra como concentrado. Antes de utilizarlo por primera vez, añada etanol (96-100 %) como se indica en el frasco. Marque la casilla de verificación de la etiqueta del frasco para indicar que se ha añadido etanol. Mezcle bien después de añadir etanol.

Manipulación del Buffer AVE

El Buffer AVE se entrega sin ribonucleasa. Contiene azida sódica, un agente antimicrobiano que previene el crecimiento de organismos productores de ribonucleasa. No obstante, dado que este tampón no contiene productos químicos degradantes de la ribonucleasa, no inhibirá activamente las ribonucleasas introducidas por una manipulación inadecuada. Cuando manipule el Buffer AVE, extreme la precaución para evitar la contaminación con ribonucleasas. Siga las precauciones generales para trabajar con ARN, por ejemplo, cambiar los guantes con frecuencia y mantener los tubos cerrados en la medida de lo posible.

Protocolo: Purification of pathogen nucleic acids from fluid samples

Este protocolo está indicado para la purificación de ADN y ARN vírico, y el ADN de bacterias fáciles de lisar, de muestras de fluidos o de tejido tratado previamente utilizando la estación de trabajo IndiMag 48, KingFisher Flex, BioSprint 96 o equivalente y el IndiMag Pathogen Kit.

Cuestiones importantes antes de comenzar

- Asegúrese de estar familiarizado con el funcionamiento correcto de la estación de trabajo. Consulte el manual del usuario correspondiente para ver las instrucciones de funcionamiento.
- Antes de comenzar el procedimiento, lea la sección “Notas importantes” (página 18).
- Asegúrese de que el Buffer ACB, el Buffer AW1, el Buffer AW2 y el Carrier RNA se hayan preparado según las instrucciones indicadas en la sección “Preparación de los reactivos” (página 24).
- Compruebe que el Buffer VXL o el Buffer ACB no contengan un precipitado blanco. En caso necesario, incube el Buffer VXL o el Buffer ACB durante 30 minutos a 37 °C, agitando ocasionalmente para disolver el precipitado.
- Si se usa el IndiMag Pathogen Kit (SP947457): Las cubiertas para 96 barras se suministran en paquetes de 2. Cuando use un paquete nuevo de 2, almacene la segunda cubierta para 96 barras en otro S-block o placa. Tenga cuidado de no doblar las cubiertas para 96 barras.

Antes de comenzar

- Descongele las muestras y deje que se equilibren a temperatura ambiente (15-25 °C).
- Si el volumen de la muestra es inferior a 200 µl, añada PBS o NaCl al 0,9 % para obtener un volumen final de 200 µl.
- Prepare la mezcla de Buffer VXL según la tabla 3 en la página 28 para usarla en el paso 3 del procedimiento. Antes de añadir la MagAttract Suspension G, asegúrese de que esté completamente resuspendida. Mezcle con una agitadora vorticial durante 3 minutos antes del primer uso o durante 1 minuto antes de usos posteriores.

Importante: No añada Proteinase K directamente a la mezcla de Buffer VXL. Esto puede ocasionar obstrucciones o precipitados. Siga el procedimiento como se describe más adelante (pipeteo de la Proteinase K en los pocillos, seguido de la muestra y, a continuación, de la mezcla de Buffer VXL).

Tabla 3: Preparación de la mezcla de Buffer VXL

Reactivo	Número de muestras*		
	1	48	96
Buffer VXL	100 µl	4,8 ml	9,6 ml
Buffer ACB	400 µl	19,2 ml	38,4 ml
MagAttract Suspension G	25 µl	1,2 ml	2,4 ml
Carrier RNA (1 µg/µl)	1 µl	48 µl	96 µl

* El volumen preparado es del 105 % del volumen requerido para compensar errores en el pipeteo y la posible evaporación. El exceso de tampón debe desecharse.

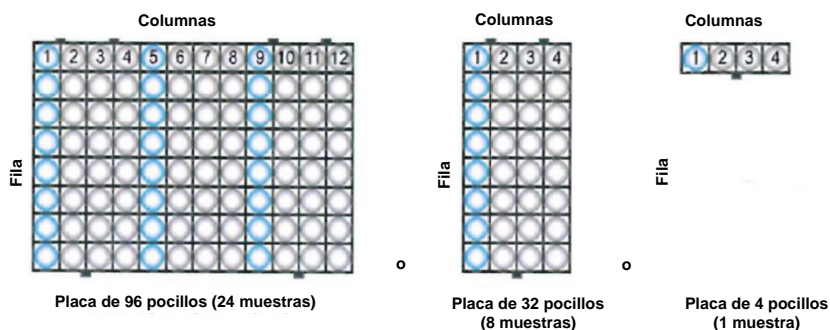
Procedimiento para el uso con el IndiMag 48

1. Etiquete y prepare placas de 4, 32 o 96 pocillos (columnas 2-4) según la tabla 4.

Tabla 4: Preparación del instrumento y volúmenes de reactivo

Columna	Elemento para añadir	Volumen por pocillo
1	Lisado	Lisado*
2	Lavado 1	Buffer AW1
3	Lavado 2	Buffer AW2
4	Elución	Buffer AVE

* Incluye 20 µl de Proteinase K, 200 µl de muestra y 500 µl de mezcla de Buffer VXL



2. Asegúrese de tener suficiente mezcla de Buffer VXL preparada según la tabla 3, página 28.
3. Pipetee 20 µl de Proteinase K en el fondo de la primera columna y añada 200 µl de muestra.

Nota: Si el volumen de la muestra es inferior a 200 µl, añada PBS para completar los 200 µl.

4. Mezcle bien la mezcla de Buffer VXL durante 30 segundos y añada 500 µl de mezcla de Buffer VXL a cada muestra en la placa de pocillos profundos.

5. Cargue inmediatamente las placas preparadas en el IndiMag 48, cargue las tiras de barra magnética con cubierta en las posiciones correctas e inicie el protocolo adecuado.

Nota: el protocolo “Pathogen” está preinstalado en el IndiMag 48.

Procedimiento para el uso con procesadores de partículas magnéticas (p. ej., KingFisher Flex, BioSprint 96 o equivalente)

1. Etiquete y prepare 4 placas de pocillos profundos de 96 pocillos (S-Block) y 1 microplaca de 96 pocillos (ranuras 2-6) según la tabla 5.

Tabla 5: Preparación del instrumento y volúmenes de reactivo

Ranura	Mensaje sobre la carga	Formato	Elemento para añadir	Volumen por pocillo
6	Load Rod Cover (Cargue la cubierta de barra)	Placa de pocillos profundos de 96 pocillos	Cubierta para peine de 96 puntas	—
5	Load Elution (Cargue la elución)	Microplaca de 96 pocillos	Buffer AVE	100 µl
4	Load Wash 3 (Cargue el lavado 3)	Placa de pocillos profundos de 96 pocillos	Etanol (96-100 %)	750 µl
3	Load Wash 2 (Cargue el lavado 2)	Placa de pocillos profundos de 96 pocillos	Buffer AW2	700 µl
2	Load Wash 1 (Cargue el lavado 1)	Placa de pocillos profundos de 96 pocillos	Buffer AW1	700 µl
1	Load Lysate (Cargue el lisado)	Placa de pocillos profundos de 96 pocillos	Lisado*	720 µl

* Incluye 20 µl de Proteinase K, 200 µl de muestra y 500 µl de mezcla de Buffer VXL

2. Asegúrese de tener suficiente mezcla de Buffer VXL preparada según la tabla 3, página 28.
3. Pipetee 20 µl de Proteinase K en el fondo de un pocillo nuevo en la placa de pocillos profundos de 96 pocillos o S-Block y añada 200 µl de muestra.

Nota: Si el volumen de la muestra es inferior a 200 μ l, añada PBS para completar los 200 μ l.

4. Mezcle bien la mezcla de Buffer VXL durante 30 segundos y añada 500 μ l de mezcla de Buffer VXL a cada muestra en la placa de pocillos profundos de 96 pocillos.
5. Cargue inmediatamente las placas preparadas en el procesador e inicie el protocolo respectivo.

Nota: La tabla 1 en la página 6 proporciona un resumen de los dispositivos y sus nombres de script correspondientes.

Guía para la resolución de problemas

Esta guía de resolución de problemas puede ayudarle a resolver cualquier problema que pueda surgir.

Para obtener información adicional o asistencia, póngase en contacto con el servicio de asistencia de INDICAL en el correo electrónico support@indical.com.

Comentarios y sugerencias	
Bajo rendimiento de ADN y ARN	
1 La MagAttract Suspension G no está completamente resuspendida	Asegúrese de que la MagAttract Suspension G esté totalmente resuspendida antes de añadirla a la mezcla de Buffer VXL. Mezcle con una agitadora vorticial durante al menos 3 minutos antes del primer uso, y durante 1 minuto antes de usos posteriores.
2 La mezcla de Buffer VXL no se preparó correctamente	Asegúrese de que la mezcla de Buffer VXL esté preparada con los volúmenes correctos de reactivos adicionales, como se indica en el frasco del tampón. Repita el procedimiento de purificación de ADN con nuevas muestras.
3 Buffer AW1 o Buffer AW2 preparado incorrectamente	Asegúrese de que el concentrado de Buffer AW o Buffer AW2 se haya diluido con el volumen correcto de etanol al 96-100 %, como se indica en el frasco. No utilice alcohol desnaturalizado, que contiene otras sustancias como metanol o metiletilcetona. Repita el protocolo de purificación con nuevas muestras.
4 Los reactivos no se cargaron en la mesa de trabajo en el orden correcto	Asegúrese de que los reactivos se carguen en el orden correcto en la mesa de trabajo BioSprint 96. Repita el protocolo de purificación con nuevas muestras.
5 Lisis insuficiente de la muestra	La Proteinase K se almacenó a temperaturas elevadas durante mucho tiempo. Repita el procedimiento de purificación con muestras nuevas y Proteinase K fresca

	<p>(consulte las recomendaciones de almacenamiento en la página 7).</p> <p>En el caso del ADN de algunos virus y bacterias, el calentamiento puede mejorar la eficiencia de la lisis. Para este fin, se dispone de un protocolo para realizar la lisis fuera del instrumento. Póngase en contacto con el servicio de asistencia de INDICAL en el correo electrónico support@indical.com.</p>
6	<p>El Carrier RNA no se añadió al Buffer VXL o el Carrier RNA se ha degradado</p> <p>Consulte las recomendaciones para la preparación, el almacenamiento y la adición del Carrier RNA.</p>
7	<p>La mezcla de Buffer VXL, Proteinase K y Carrier RNA no se mezcló lo suficiente</p> <p>Mezcle bien pipeteando con una pipeta grande.</p>
8	<p>Contaminación con ribonucleasa en el Buffer AVE</p> <p>Tenga cuidado de no introducir ribonucleasas para no degradar el ARN vírico. Esto puede suceder si los tubos que contienen Buffer AVE se abren repetidamente. En caso de contaminación con ARNasa, sustituya el vial abierto de Buffer AVE con uno nuevo. Repita el procedimiento de purificación con nuevas muestras.</p>
9	<p>Los ácidos nucleicos presentes en las muestras ya estaban degradados antes de la purificación</p> <p>Las muestras se congelaron y descongelaron más de una vez o se almacenaron a temperatura ambiente (15-25 °C) demasiado tiempo. Use siempre muestras frescas o muestras que se hayan descongelado una sola vez. Repita el protocolo de purificación con nuevas muestras.</p>
<p>El ADN o ARN no tiene un buen rendimiento en aplicaciones anterógradas</p>	
1	<p>Poco o ningún ADN o ARN en el eluido</p> <p>Consulte la sección “Bajo rendimiento de ADN y ARN” (arriba) para conocer los posibles motivos. Aumente la cantidad de eluido que se añade a la reacción, si es posible.</p>
2	<p>Arrastre de partículas magnéticas</p> <p>El arrastre de partículas magnéticas en los eluidos no afectará a la mayoría de las aplicaciones anterógradas. El arrastre de partículas magnéticas puede minimizarse si la microplaca que contiene los eluidos se coloca en un imán adecuado (p. ej., 96-Well Magnet Type A o 12-Tube Magnet) durante 1 minuto y se transfieren los eluidos a una microplaca limpia. Si no se dispone de un imán adecuado, centrifugue la microplaca con los eluidos a velocidad</p>

	máxima durante 1 minuto para que las partículas magnéticas restantes se sedimenten y transfiera los sobrenadantes a una microplaca limpia.
3	Cantidad excesiva de eluido en la reacción de amplificación Determine el volumen máximo de eluido adecuado para la reacción de amplificación. Reduzca o aumente el volumen de eluido añadido a la reacción de amplificación según corresponda.
4	ARN degradado El ARN puede haberse degradado por la presencia de ribonucleasas en las muestras originales. Asegúrese de procesar las muestras inmediatamente después de la recogida o de la recuperación del almacenamiento. Repita el protocolo de purificación con nuevas muestras.
5	Los ácidos nucleicos presentes en las muestras ya estaban degradados antes de la purificación Las muestras se congelaron y descongelaron más de una vez o se almacenaron a temperatura ambiente (15-25 °C) demasiado tiempo. Use siempre muestras frescas o muestras que se hayan descongelado una sola vez. Repita el protocolo de purificación con nuevas muestras.
6	El Carrier RNA no se añadió a la mezcla de Buffer VXL Reconstituya el Carrier RNA en el Buffer AVE y mézclelo con el volumen apropiado de Buffer AVE según se describe en la sección "Uso de Carrier RNA y controles internos" (página 21). Repita el protocolo de purificación con nuevas muestras.
7	Cantidad excesiva o insuficiente de Carrier RNA en el eluido Determine la cantidad máxima de Carrier RNA adecuada para la reacción de amplificación. Ajuste la concentración de la solución de Carrier RNA que se añadió a la mezcla de Buffer VXL, según corresponda.
8	Carrier RNA degradado El Carrier RNA reconstituido en el Buffer AVE no se almacenó a una temperatura de entre -30 °C y -15 °C o fue sometido a varios ciclos de congelación-descongelación. Prepare un tubo nuevo de Carrier RNA disuelto en Buffer AVE y almacénelo adecuadamente. Repita el procedimiento de purificación con nuevas muestras.
9	Inhibición de la PCR Algunos tipos de muestras (p. ej., heces y sangre total de animales) pueden contener grandes cantidades de sustancias que inhiben la PCR. Podría necesitarse un tratamiento especial para eliminar todos los inhibidores. Reduzca la cantidad de entrada de muestra y/o la cantidad de eluido que se añade a la reacción de amplificación.

Precipitado en los tampones	
1	<p>Precipitado en el Buffer VXL o el Buffer ACB</p> <p>Puede formarse precipitado si se almacena durante mucho tiempo o a temperaturas bajas. Para disolver el precipitado, incube el Buffer VXL o ACB durante 30 minutos a una temperatura de 37 °C, agitando ocasionalmente.</p>
2	<p>Precipitado en la mezcla de Buffer VXL-muestra</p> <p>Si se usa fluido de muestra con Buffer ATL, p. ej., después de la digestión enzimática del tejido, puede formarse precipitado luego de añadir el Buffer VXL a la muestra. El precipitado no afecta los pasos posteriores del precipitado y puede disolverse con una incubación corta a 56 °C.</p>

Información para pedidos

Nombre del producto	N.º de catálogo
IndiMag Pathogen Kit (384) <i>anteriormente MagAttract 96 cador Pathogen Kit (384)</i>	SP947457
IndiMag Pathogen Kit w/o plastics (384) <i>anteriormente MagAttract 96 cador Pathogen Kit w/o Plastics (384)</i>	SP947257
IndiMag 48	IN-942048
IndiMag 48 PW 1-Sample Block (368)	PW940123
IndiMag 48 PW 8-Sample Block (560)	PW940166
IndiMag 48 PW 24-Sample Block (672)	PW940187
IndiMag 48 PW Rod cover (672)	PW940237
intype IC-DNA	IC289980
intype IC-RNA	IC289970

INDICAL ofrece una amplia variedad de kits ELISA específicos para patógenos y listos para usar, reactivos y ensayos de qPCR/ RT-qPCR.

Para optimizar el flujo de trabajo, manipular las muestras y atender las necesidades de capacidad, INDICAL ofrece otros instrumentos y kits para la extracción eficiente de ácidos nucleicos de diversos tipos de muestras.

Visite **www.indical.com** para obtener más información sobre productos bactotype, cador, cattletype, flocktype, IndiMag, IndiSpin, intype, pigtype y virotype.

Para obtener información actualizada sobre licencias y exenciones de responsabilidad específicas del producto, consulte el manual del usuario el manual o del producto de INDICAL correspondiente.

Acuerdo de licencia limitada para el IndiMag Pathogen Kit

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

1. El producto debe utilizarse exclusivamente de acuerdo con los protocolos proporcionados con el producto y este manual, así como con los componentes contenidos en el kit. INDICAL no ofrece licencia alguna bajo ninguna de sus propiedades intelectuales para utilizar o incorporar los componentes suministrados en este kit con componentes no incluidos en el mismo, excepto según se describe en los protocolos proporcionados con el producto, este manual y los protocolos adicionales disponibles en www.indical.com. Algunos de estos protocolos adicionales no han proporcionado usuarios de INDICAL para usuarios de INDICAL. INDICAL no ha probado ni optimizado estos protocolos en profundidad. Por ello, INDICAL no los garantiza ni asegura que no infrinjan los derechos de terceros.
2. Aparte de las licencias expresamente especificadas, INDICAL no garantiza que este kit y/o su uso no infrinjan los derechos de terceros.
3. Este kit y sus componentes tienen licencia para un solo uso y no se pueden reutilizar, reacondicionar ni revender.
4. INDICAL niega específicamente cualquier otra licencia, explícita o implícita, distinta de las licencias expresamente especificadas.
5. El comprador y el usuario del kit aceptan no llevar a cabo ni permitir que otros lleven a cabo medidas que puedan conducir a acciones prohibidas en las especificaciones anteriores o que puedan facilitarlas. INDICAL se reserva el derecho de emprender acciones legales ante cualquier tribunal para el cumplimiento de las prohibiciones especificadas en este Acuerdo de licencia limitada y recuperará todos los gastos derivados de la investigación y de los gastos judiciales, incluidos los costes procesales, en cualquier acción emprendida para hacer cumplir este Acuerdo de licencia limitada o cualquier otro derecho de propiedad intelectual en relación con este kit y/o con sus componentes.

Para obtener los términos actualizados de la licencia, visite www.indical.com.

Marcas comerciales: bactotype[®], cador[®], cattletype[®], flocktype[®], IndiMag[®], IndiSpin[®], intype[®], pigtype[®], virotype[®] (INDICAL BIOSCIENCE GmbH); BioSprint[®], MagAttract[®], QIAGEN[®] (QIAGEN Group, Hilden, Alemania), MagMax™ (Life Technologies Corporation), BeadRetriever™ y KingFisher™ (Thermo Fisher Scientific, Inc.). Los nombres registrados, las marcas comerciales, etc. utilizados en este documento, incluso cuando no aparecen marcados como tales, están protegidos por la legislación.

HB-1926-ES-004 © 2018 INDICAL BIOSCIENCE GmbH, todos los derechos reservados.

Índice de cambios

Manual	Versión	Cambio
HB-1926-EN-004	Octubre de 2018	Diseño de INDICAL