

IndiMag[®] Pathogen Kit Manual

Para la purificación automatizada de ADN y ARN vírico y ADN bacteriano proveniente de muestras animales con la estación de trabajo IndiMag 2, IndiMag 48/s, KingFisher™ Flex, BioSprint 96 o equivalente



IndiMag Pathogen Kit w/o plastics (n.º de cat. SP947257)



IndiMag Pathogen Kit (n.º de cat. SP947457)



Fabricado por QIAGEN[®] GmbH para
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
Scripts.....	6
Almacenamiento	9
Uso previsto.....	9
Símbolos	10
Información de seguridad	10
Control de calidad	11
Introducción	12
Principio y procedimiento	13
Descripción de los protocolos	15
Protocolo de purificación de ácidos nucleicos	16
Pretratamientos.....	17
Equipo y reactivos que debe suministrar el usuario.....	20
Notas importantes	22
Material de partida.....	22
Cantidad de ácidos nucleicos	26
Uso de Carrier RNA y controles internos.....	26
Almacenamiento de los ácidos nucleicos.....	27
Manipulación del ARN	28

Preparación de los reactivos	29
Protocolo: Purification of pathogen nucleic acids from fluid samples (Purificación de ácidos nucleicos patógenos a partir de muestras de fluidos).....	32
Cuestiones importantes antes de comenzar	32
Antes de comenzar	34
Procedimiento de uso con IndiMag 2: usando tiras de lisis, bloques de 32 pocillos y tiras de elución	35
Procedimiento de uso con el IndiMag 2, usando Solo bloques de 32 pocillos.....	37
Procedimiento de uso con IndiMag 2: usando tiras de lisis y bloques de 32 pocillos	39
Procedimiento de uso con el IndiMag 2, usando Bloques de 32 pocillos y tiras de elución.....	41
Procedimiento para el uso con el IndiMag 48/s.....	43
Procedimiento para el uso con procesadores de partículas magnéticas (p. ej., KingFisher Flex, BioSprint 96 o equivalente)	45
Procedimiento para el uso con procesadores de partículas magnéticas (p. ej., KingFisher Duo o equivalente)	47
Guía de resolución de problemas.....	49
Información para pedidos	53
Índice de cambios	56

Contenido del kit

IndiMag Pathogen Kit	w/o plastics	
N.º de cat.	SP947257	SP947457
Buffer VXL ¹	2 × 30 ml	2 × 30 ml
Buffer ACB ^{1,2}	2 × 60 ml	2 × 60 ml
Proteinase K	2 × 6 ml	2 × 6 ml
Carrier RNA (poly A)	2 × 310 µg	2 × 310 µg
MagAttract® Suspension G ³	1 × 13 ml	1 × 13 ml
Buffer AW1 (concentrate) ^{1,4}	2 × 75,5 ml	2 × 75,5 ml
Buffer AW2 (concentrate) ⁴	2 × 54 ml	2 × 54 ml
Buffer AVE ³	1 × 125 ml	1 × 125 ml
Large 96-Rod Cover	-	4
S-Block	-	20
96-Well Microplate MP	-	4
Quick-Start Protocol (PCard)	2	2

1 PRECAUCIÓN: Contiene una sal caótrica. 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 10 para obtener información sobre 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

El IndiMag Pathogen Kit (SP947457) se puede utilizar con la siguiente lista no exhaustiva de estaciones de trabajo:

- KingFisher Flex
- KingFisher 96
- BioSprint 96
- MagMax™ Express 96
- Allsheng Auto-Pure96

El kit IndiMag Pathogen Kit w/o plastics (SP947257) se puede utilizar con la siguiente lista no exhaustiva de estaciones de trabajo:

- IndiMag 2
- IndiMag 48/s
- KingFisher mL
- KingFisher Duo
- KingFisher Apex
- BioSprint 15

Scripts

Utilice el script "Pathogen instrument" (Instrumento de patógenos).. La tabla 1 en la página 7 muestra un resumen de los nombres de scripts en función de los dispositivos respectivos y los sistemas de software utilizados. Los scripts están disponibles en el sitio web de INDICAL (<https://www.indical.com>) o a través del equipo de soporte técnico de INDICAL.

Además, se puede utilizar el script "Pathogen versión 2" (Patógeno versión 2) con paso de elución optimizado. La tabla 2 en la página 8 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 protocolo "Pathogen" (Patógeno) viene preinstalado en los dispositivos IndiMag 2 e IndiMag 48/s.

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

Dispositivo	Software	Nombre del script (anterior)	Nombre del script (nuevo)
BioSprint 15	BioSprint	BS15 cador.kf2	IndiMag_Pathogen_BS15.kf2
BioSprint 96	BioSprint	BS96 cador v2.kf2	IndiMag_Pathogen_BS96.kf2
KingFisher mL	KingFisher	KFmL cador.kf2	IndiMag_Patógeno_KFmL.kf2
KingFisher 96	KingFisher	KF96 cador v2.kf2	IndiMag_Patógeno_KF96.kf2
KingFisher mL	BindIt	-	IndiMag_Pathogen_KF_mL.bdz
KingFisher 96	BindIt	KF_96_cador_v2.bdz	IndiMag_Patógeno_KF96.bdz
KingFisher Duo	BindIt	KF_Duo_96_cador.bdz	IndiMag_Pathogen_KF_Duo.bdz
KingFisher Flex	BindIt	KF_Flex_cador_v2.bdz	IndiMag_Pathogen_KF_Flex.bdz
King Fisher Apex	BindIx	-	IndiMag Pathogen.kfx
IDEAL 32	-	-	IndiMagPathogen.txt
IDEAL 96	-	-	Pathogen.txt
AutoPure 96	-	-	IndiMagPathogen.txt

Tabla 2: Nombre de scripts en función de los dispositivos y los sistemas de software utilizados (Patógeno 2 con paso de elución optimizado)

Dispositivo	Software	Nombre del script (versión 2)
BioSprint 15	BioSprint	IndiMag_Patho_B15_v2.kf2
BioSprint 96	BioSprint	IndiMag_Patho_B96_v2.kf2
KingFisher mL	KingFisher	IndiMag_Patho_Kml_v2.kf2
KingFisher 96	KingFisher	IndiMag_Patho_K96_v2.kf2
KingFisher mL	BindIt	IndiMag_Pathogen_KF_mL_v2.bdz
KingFisher 96	BindIt	IndiMag_Patógeno_KF96_v2.bdz
KingFisher Duo	BindIt	IndiMag_Pathogen_KF_Duo_v2.bdz
KingFisher Flex	BindIt	IndiMag_Pathogen_KF_Flex_v2.bdz
KingFisher Apex	BindIx	IndiMag Pathogen v2.kfx
AutoPure 96	-	IndiMagPathoV2.txt

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

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 29. La solución de mezcla de Carrier RNA/Buffer AVE/Buffer VXL debe prepararse en el momento. 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 tres 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, heces y homogeneizado tisular de animales con la estación de trabajo IndiMag 2, IndiMag 48/s, 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 Sheets, 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 sódico 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 tipos de muestras (consulte la página 16) con la estación de trabajo using the IndiMag 2, IndiMag 48/s, KingFisher Flex, BioSprint 96 o equivalente (consulte la sección “Material de partida” en la página 22). Sin embargo, el usuario deberá validar combinaciones específicas de tipos de muestras y 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 13).

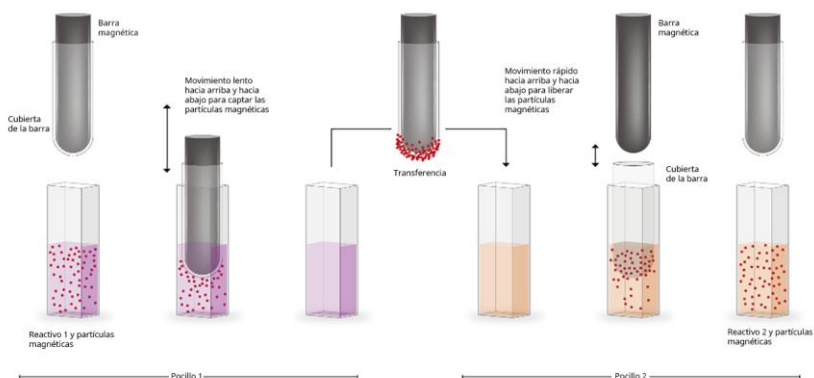


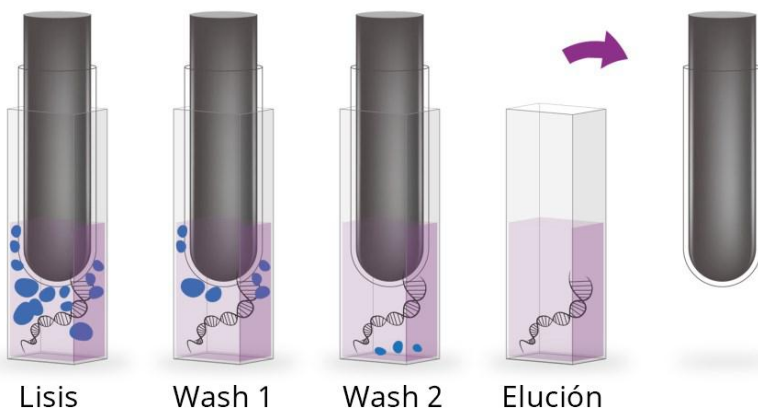
Figura 1. Descripción esquemática del principio de las microesferas magnéticas.

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 14).

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

En este manual se describen diferentes procedimientos para la purificación de ácidos nucleicos que se llevan a cabo en diversas estaciones de trabajo, como IndiMag 2, IndiMag 48/s, KingFisher Flex, BioSprint 96 o equivalentes.

Para las muestras que requieren un tratamiento previo a la purificación de ácidos nucleicos, la tabla 3 en la página 17 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 la muestra es de aproximadamente 34 minutos, sin incluir los pasos de manipulación anteriores para el llenado previo de los bloques S o las microplacas de 96 pocillos. Las soluciones de lisis y unión utilizadas en el procedimiento son el Buffer VXL y el Buffer ACB. Preste atención a la información proporcionada en la sección "Información de seguridad", página 10.

Protocolo de purificación de ácidos nucleicos

El protocolo “Purification of pathogen nucleic acids from fluid samples” (Purificación de ácidos nucleicos patógenos a partir de muestras de fluidos) (página 32) está optimizado para la purificación de ARN y ADN 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
- Leche
- 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 3 en la página 17 resume los pretratamientos y sus aplicaciones.

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

Tabla 3: 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)	ARN y ADN víricos, 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

Fluidos libres de células	ADN de bacterias fáciles de lisar	Pretratamiento B3 para bacterias fáciles de lisar en fluidos libres de células de alto volumen	HB-2549
Fluidos que contienen una gran cantidad de lípidos y/o nucleasas.	ARN y ADN víricos, ADN de bacterias fáciles de lisar ¹	Pretratamiento B4 Extracción orgánica para fluidos difíciles	HB-2642
Tarjetas de papel de filtro	Ácidos nucleicos de patógenos	Pretratamiento C1	HB-2520
Heces	ARN y ADN víricos	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> subsp. <i>paratuberculosis</i> (MAP)	Pretratamiento F-MAP	HB-2503
Aplicaciones de fluidos orales	Ácidos nucleicos de patógenos	Pretratamiento O2	HB-2564
Semen	ARN de semen de toro	Pretratamiento SE-SBV	HB-2640
Exudados (traqueal, bucofaríngeo y sangre)	Ácidos nucleicos de patógenos	Pretratamiento S1	HB-2516

Tejido (p. ej., hígado, bazo, riñón y ganglio linfático)	Ácidos nucleicos de patógenos ADN vírico ³ , ADN bacteriano ⁴	Pretratamiento T1 Disrupción mecánica del tejido Pretratamiento T2 Digestión enzimática del tejido	HB-2535 HB-2536
Disrupción parcial rápida del tejido	ARN y ADN víricos, 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)	ARN y ADN víricos, ADN de bacterias fáciles de lisar ¹	Pretratamiento T4	HB-2538
Tejido (p. ej., hígado, bazo, riñón y ganglio linfático)	ADN de <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> (MAP)	Pretratamiento T-MAP	HB-2644
Plantas	Ácidos nucleicos de patógenos	Pretratamiento P1	HB-2643

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.

Para obtener más información sobre pretratamientos **Error! Hyperlink reference not valid.**, visite www.indical.com/handbooks o póngase 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 2 o IndiMag 48/s, KingFisher Flex, BioSprint 96 o equivalente
- Si corresponde: Cabezal magnético para su uso con Large 96-Rod Covers
- Equipos y consumibles para manipulación de líquidos, incluidas pipetas (multicanal) y puntas de pipeta (se recomiendan puntas de pipeta resistentes a aerosoles con filtros para evitar la contaminación cruzada)
- Multidispensador y puntas correspondientes
- Agitador vorticial
- Etanol (96-100 %)*
- Isopropanol
- **Opcional:** Para diluir las muestras, puede ser necesario utilizar solución salina tamponada con fosfato (PBS), NaCl al 0,9 % o agua libre de nucleasas

- Paño suave o toallita y etanol al 70 % u otro desinfectante para limpiar la mesa de trabajo usada

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

* No utilice alcohol desnaturalizado, ya 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 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, si no se han 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 6 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 anterógrados, 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 agua.

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 agua.

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 elevado de inhibidores, como la orina o las suspensiones fecales, puede requerir una reducción del volumen de muestra inicial 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, NaCl al 0,9 % o agua.

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. Consulte el Pretratamiento B2 para la extracción de ADN de bacterias difíciles de lisar. Consulte el Pretratamiento B3 para obtener información sobre la extracción de ADN bacteriano de bacterias fáciles de lisar a partir de grandes volúmenes de fluidos libres de células.

Tejidos de animales

Cuando trabaje con muestras de tejidos, se requiere la interrupción 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 caótopas 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 únicamente ácidos nucleicos de control interno sin protección (por ejemplo, ADN plásmido o ARN transcrito *in vitro*) 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 ARN y ADN víricos purificados 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 ribonucleasas. 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 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Añada esta solución a la mezcla de Buffer VXL como se indica en la tabla 4 en la página 34. El Carrier RNA disuelto en Buffer AVE que no se haya utilizado debe congelarse en partes alícuotas a una temperatura de entre $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las partes alícuotas de Carrier RNA no deben someterse a más de tres 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 mínimo después de su entrega si se conserva a temperatura ambiente ($15\text{-}25\text{ }^{\circ}\text{C}$). Para almacenar la Proteinase K durante más de un año, o si la temperatura ambiente supera habitualmente los $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, recomendamos el almacenamiento a una temperatura de $2\text{-}8\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Buffer VXL

El Buffer VXL es un tampón de lisis listo para usar y se puede almacenar a temperatura ambiente.

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 min (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 (al 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 máximo de 1 año. Mezcle bien después de añadir etanol.

Buffer AW2

El Buffer AW2 se suministra como concentrado. Antes de utilizarlo por primera vez, añada etanol (al 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 AW2 reconstituido puede conservarse a temperatura ambiente (15-25 °C) durante hasta un año. 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 (Purificación de ácidos nucleicos patógenos a partir de muestras de fluidos)

Este protocolo está indicado para la purificación de ADN y ARN víricos, y el ADN de bacterias fáciles de lisar, de muestras de fluidos o de tejido tratado previamente utilizando la estación de trabajo IndiMag 2, IndiMag 48/s, 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 las “Notas importantes” (página 22).
- 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 29).
- Compruebe que el Buffer VXL o el Buffer ACB no contengan un precipitado blanco. Si es 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).
- Prepare la mezcla de Buffer VXL según la tabla 4 en la página 34 para usarla en el paso 4 del procedimiento. Antes de añadir la MagAttract Suspension G, asegúrese de que esté completamente resuspendida. Mezcle con una agitadora vorticial durante 3 min antes del primer uso o durante 1 min antes de los 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 4: 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 de uso con IndiMag 2: usando tiras de lisis, bloques de 32 pocillos y tiras de elución

1. Etiqueta y prepare los bloques de 32 pocillos (B; columnas 1-4), las tiras de lisis (L) y las tiras de elución (E) según la tabla 5 y la figura 3.

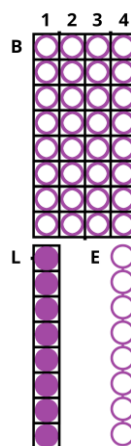
Tabla 5 y figura 3 (derecha): Preparación del instrumento y volúmenes de reactivo

Tira de lisis (L)	Elemento para añadir	Volumen por pocillo
Lisado L	Lisado*	720 µl*

Columna (B)	Elemento para añadir	Volumen por pocillo
1 Wash 1	Buffer AW 1	700 µl
2 Wash 2	Buffer AW 2	700 µl
3 Wash 3	Etanol (96-100 %)	750 µl
4 vacíos	-	-

Tira de elución (E)	Elemento para añadir	Volumen por pocillo
Elución E	Buffer AVE (Tampón AVE)	100 µl

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



2. Prepare la mezcla de Buffer VXL según la tabla 6.

Tabla 6: Preparación de la mezcla de Buffer VXL

Reactivo	1 reacción	8 reacciones	24 reacciones	48 reacciones
Buffer VXL	100 µl	800 µl	2,4 ml	4,8 ml
Buffer ACB	400 µl	3,2 ml	9,6 ml	19,2 ml
MagAttract Suspension G	25 µl	200 µl	0,6 ml	1,2 ml
Carrier RNA (1 µg/µl)	1 µl	8 µl	24 µl	48 µl

3. Pipetee 20 μ l de Proteinase K en la parte inferior de las tiras de lisis y añada 200 μ l de muestra según la tabla 5 y la figura 3 (L; marcada en morado).

Nota: Si trabaja con un volumen de muestra insuficiente, añada PBS, NaCl al 0,9 % o agua libre de nucleasas para obtener un volumen total de muestra de 200 μ l.

4. Mezcle bien la mezcla de Buffer VXL durante 30 s y añada 500 μ l de mezcla de Buffer VXL a cada muestra (L; marcada en morado).
5. Cargue inmediatamente los bloques de 32 pocillos y las tiras preparados en el IndiMag 2, coloque las cubiertas de las barras en las posiciones correctas e inicie el protocolo correspondiente.

Nota: El protocolo "IndiMag Pathogen Lysis/Block/Elution" (Lisis/bloque/elución de patógenos IndiMag) viene preinstalado en el IndiMag 2.

Procedimiento de uso con el IndiMag 2, usando Solo bloques de 32 pocillos

1. Etiquete y prepare los bloques de 32 pocillos (B; columnas 2-4) según la tabla 7 y la figura 4.

Tabla 7 y figura 4 (derecha): Preparación del instrumento y volúmenes de reactivo

Columna (B)	Elemento para añadir	Volumen por pocillo
1 Lisado	Lisado*	720 µl
2 Wash 1	Buffer AW 1	700 µl
3 Wash 2	Buffer AW 2	700 µl
4 Elución	Buffer AVE	100 µl

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



2. Prepare la mezcla de Buffer VXL según la tabla 8.

Tabla 8: Preparación de la mezcla de Buffer VXL

Reactivo	Reacciones			
	1	8	24	48
Buffer VXL	100 µl	800 µl	2,4 ml	4,8 ml
Buffer ACB	400 µl	3,2 ml	9,6 ml	19,2 ml
MagAttract Suspension G	25 µl	200 µl	0,6 ml	1,2 ml
Carrier RNA (1 µg/µl)	1 µl	8 µl	24 µl	48 µl

3. Pipetee 20 µl de Proteinase K en la parte inferior de la primera columna de los bloques de 32 pocillos y añada 200 µl de muestra según la tabla 7 y la figura 4 (B1; marcado en morado).

Nota: Si trabaja con un volumen de muestra insuficiente, añada PBS, NaCl al 0,9 % o agua libre de nucleasas para obtener un volumen total de muestra de 200 µl.

4. Mezcle bien la mezcla de Buffer VXL durante 30 s y añada 500 μ l de mezcla de Buffer VXL a cada muestra de la columna 1 de los bloques de 32 pocillos (B1; marcado en morado).
5. Cargue inmediatamente los bloques de 32 pocillos preparados en el IndiMag 2, coloque las cubiertas de las barras en las posiciones correctas e inicie el protocolo correspondiente.

Nota: El protocolo "IndiMag Pathogen -/Block/-" (-/Block/- de patógenos IndiMag) viene preinstalado en el IndiMag 2.

Procedimiento de uso con IndiMag 2: usando tiras de lisis y bloques de 32 pocillos

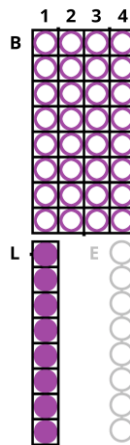
1. Etiquete y prepare los bloques de 32 pocillos (B; columnas 2-4) y las tiras de lisis (L) según la tabla 9 y la figura 5.

Tabla 9 y figura 5 (derecha): Preparación del instrumento y volúmenes de reactivo

Tira de lisis (L)	Elemento para añadir	Volumen por pocillo
1 Lisado	Lisado*	720 µl

Columna (B)	Elemento para añadir	Volumen por pocillo
1 Wash 1	Buffer AW 1	700 µl
2 Wash 2	Buffer AW 2	700 µl
3 Wash 3	Etanol (96-100 %)	750 µl
4 Elución	Buffer AVE	100 µl

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



2. Prepare la mezcla de Buffer VXL según la tabla 10.

Tabla 10: Preparación de la mezcla de Buffer VXL

Reactivo	Reacciones			
	1	8	24	48
Buffer VXL	100 µl	800 µl	2,4 ml	4,8 ml
Buffer ACB	400 µl	3,2 ml	9,6 ml	19,2 ml
MagAttract	25 µl	200 µl	0,6 ml	1,2 ml
Carrier RNA (1 µg/µl)	1 µl	8 µl	24 µl	48 µl

3. Pipetee 20 µl de Proteinase K en la parte inferior de las tiras de lisis y añada 200 µl de muestra según la tabla 9 y la figura 5 (L; marcada en morado).

Nota: Si trabaja con un volumen de muestra insuficiente, añada PBS, NaCl al 0,9 % o agua libre de nucleasas para obtener un volumen total de muestra de 200 µl.

4. Mezcle bien la mezcla de Buffer VXL durante 30 s y añada 500 µl de mezcla de Buffer VXL a cada muestra de las tiras de lisis (L; marcada en morado).
5. Cargue inmediatamente los bloques de 32 pocillos y las tiras de lisis preparados en el IndiMag 2, coloque las cubiertas de las barras en las posiciones correctas e inicie el protocolo correspondiente.

Nota: El protocolo "IndiMag Pathogen Lysis/Block/-" (Lisis/bloque/-de patógenos IndiMag) viene preinstalado en el IndiMag 2.

Procedimiento de uso con el IndiMag 2, usando Bloques de 32 pocillos y tiras de elución

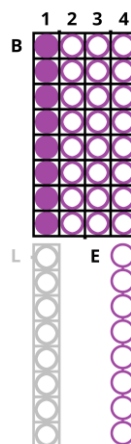
1. Etiquete y prepare los bloques de 32 pocillos (B; columnas 2-4) y las tiras de elución (E) según la tabla 11 y la figura 6.

Tabla 11 y figura 6 (derecha): Preparación del instrumento y volúmenes de reactivo

Columna (B)	Elemento para añadir	Volumen por pocillo
1 Lisado	Lisado*	720 µl
2 Wash 1	Buffer AW 1	700 µl
3 Wash 2	Buffer AW 2	700 µl
4 Wash 3	Etanol (96-100 %)	750 µl

Tira de elución (E)	Elemento para añadir	Volumen por pocillo
Elución E	Buffer AVE	100 µl

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



2. Prepare la mezcla de Buffer VXL según la tabla 12.

Tabla 12: Preparación de la mezcla de Buffer VXL

Reactivo	Reacciones			
	1	8	24	48
Buffer VXL	100 µl	800 µl	2,4 ml	4,8 ml
Buffer ACB	400 µl	3,2 ml	9,6 ml	19,2 ml
MagAttract	25 µl	200 µl	0,6 ml	1,2 ml
Carrier RNA (1 µg/µl)	1 µl	8 µl	24 µl	48 µl

3. Pipetee 20 µl de Proteinase K en la parte inferior de la primera columna de los bloques de 32 pocillos y añada 200 µl de muestra según la tabla 11 y la figura 6 (B1; marcado en morado).

Nota: Si trabaja con un volumen de muestra insuficiente, añada PBS, NaCl al 0,9 % o agua libre de nucleasas para obtener un volumen total de muestra de 200 µl.

4. Mezcle bien la mezcla de Buffer VXL durante 30 s y añada 500 μ l de mezcla de Buffer VXL a cada muestra de los bloques de 32 pocillos (B1; marcados en morado).
5. Cargue inmediatamente las placas de 32 pocillos y las tiras de elución preparadas en el IndiMag 2, coloque las cubiertas de las barras en las posiciones correctas e inicie el protocolo correspondiente.

Nota: El protocolo "IndiMag Pathogen 0/Block/Elution" (0/bloque/elución de patógenos IndiMag) viene preinstalado en el IndiMag 2.

Procedimiento para el uso con el IndiMag 48/s

1. Etiquete y prepare placas de 4/32/96 pocillos (columnas 2-4, figura 7) según la tabla 13.

Tabla 13: Preparación del instrumento y volúmenes de reactivo

Columna	Elemento para añadir	Volumen por pocillo
1 Lisado	Lisado*	720 µl
2 Wash 1	Buffer AW1	700 µl
3 Wash 2	Buffer AW2	700 µl
4 Elución	Buffer AVE	100 µl

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

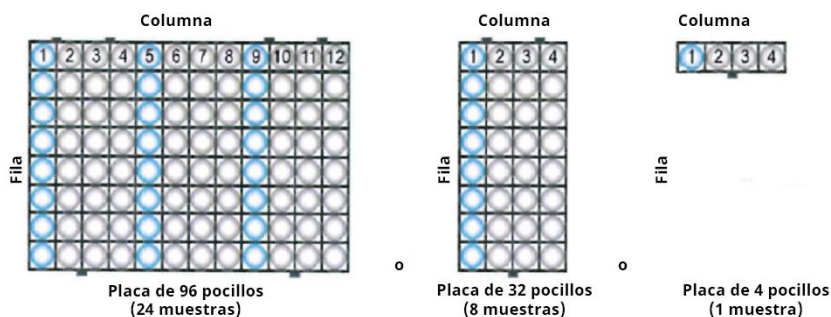


Figura 7. Configuración del instrumento.

2. Asegúrese de tener suficiente mezcla de Buffer VXL preparada según la tabla 4, página 34.
3. Pipetee 20 µl de Proteinase K en el fondo de la primera columna y añada 200 µl de muestra (consulte la figura 7).

Nota: Si es necesario, añada PBS, NaCl al 0,9 % o agua hasta alcanzar un volumen total de muestra de 200 µl.

4. Mezcle bien la mezcla de Buffer VXL durante 30 s y añada 500 μ l de mezcla de Buffer VXL a cada muestra en la placa de pocillos profundos.
5. Cargue inmediatamente las placas preparadas en el IndiMag 48/s, cargue las tiras de barra magnética con cubierta en las posiciones correctas e inicie el protocolo adecuado.

Nota: El protocolo "Pathogen" (Patógeno) está preinstalado en el IndiMag 48/s.

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

1. Etiquete y prepare 4 placas de 96 pocillos profundos (bloque S) y 1 microplaca de 96 pocillos según la tabla 14 (ranuras 2-6).

Tabla 14: 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 4, página 34.

3. Pipetee 20 μl de Proteinase K en el fondo de un pocillo nuevo en la placa de 96 pocillos profundos o un bloque S y añada 200 μl de muestra.

Nota: Si es necesario, añada PBS, NaCl al 0,9 % o agua hasta alcanzar un volumen total de muestra de 200 μl .

4. Mezcle bien la mezcla de Buffer VXL durante 30 s y añada 500 μl 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 (página 7) y la tabla 2 (página 8) proporcionan un resumen de los dispositivos y sus nombres de script correspondientes.

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

1. Etiquete y prepare una placa de 96 pocillos profundos (filas BE) y una tira de elución KingFisher Duo según la tabla 15.

Tabla 15: Preparación del instrumento y volúmenes de reactivo

Fila	Formato	Elemento para añadir	Volumen por pocillo
-	Tira de elución KingFisher Duo	Buffer AVE	100 µl
A	Placa de pocillos profundos de 96 pocillos	Lisado*	720 µl
B	Placa de pocillos profundos de 96 pocillos	Buffer AW1	700 µl
C	Placa de pocillos profundos de 96 pocillos	Buffer AW2	700 µl
D	Placa de pocillos profundos de 96 pocillos	Etanol (96-100 %)	750 µl
E	Placa de pocillos profundos de 96 pocillos	Peine KingFisher Duo de 12 puntas	—

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

2. Prepare la mezcla de Buffer VXL según la tabla 16.

Tabla 16: Preparación de la mezcla de Buffer VXL

Reactivo	Número de muestras*	
	1	12
Buffer VXL	100 µl	1,2 ml
Buffer ACB	400 µl	4,8 ml
MagAttract Suspension G	25 µl	0,3 ml
Carrier RNA (1 µg/µl)	1 µl	12 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.

3. Pipetee 20 µl de Proteinase K en el fondo de un pocillo nuevo en la placa de 96 pocillos profundos y añada 200 µl de muestra (fila A) según la tabla 15.

Nota: Si es necesario, añada PBS, NaCl al 0,9 % o agua hasta alcanzar un volumen total de muestra de 200 µl.

4. Mezcle bien la mezcla de Buffer VXL durante 30 s y añada 500 µl 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 script adecuado.

Guía de 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		
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	Los Buffers AW1, AW2 o ACB se prepararon incorrectamente	Asegúrese de que el concentrado de Buffer AW1 o Buffer AW2 se haya diluido con el volumen correcto de etanol al 96-100 % y que el Buffer ACB se haya diluido con el volumen correcto de isopropanol, como se indica en el frasco. No utilice alcohol desnaturalizado, ya que contiene otras sustancias como metanol o metilacetona. 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 del procesador de partículas magnéticas. Repita el protocolo de purificación con nuevas muestras.
5	Lisis insuficiente de la muestra	<p>La Proteinase K se almacenó a temperaturas elevadas durante mucho tiempo. Repita el procedimiento de purificación con muestras nuevas y Proteinase K fresca (consulte las recomendaciones de almacenamiento en la página 9).</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	El Carrier RNA no se añadió al Buffer VXL o el Carrier RNA se ha degradado	Consulte las recomendaciones para la preparación, el almacenamiento y la adición del Carrier RNA.
7	La mezcla de Buffer VXL no se mezcló lo suficiente	Mezcle bien agitando en vórtex durante al menos 30 s.
8	Contaminación con ribonucleasa en el Buffer AVE	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 ribonucleasas, sustituya el vial abierto de Buffer AVE con uno nuevo. Repita el procedimiento de purificación con nuevas muestras.
9	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.

El ADN o ARN no tiene un buen rendimiento en aplicaciones posteriores		
1	Poco o ningún ADN o ARN en el eluido	Consulte la sección “Bajo rendimiento de ADN y ARN víricos” (arriba) para conocer los posibles motivos. Aumente la cantidad de eluido que se añade a la reacción, si es posible.
2	Arrastre de partículas magnéticas	El arrastre de partículas magnéticas en los eluidos no afectará a la mayoría de las aplicaciones posteriores. El arrastre de partículas magnéticas puede reducirse al mínimo 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 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	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 26). Repita el protocolo de purificación con nuevas muestras.

6	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.
7	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.
8	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	Precipitado en el Buffer VXL o el Buffer ACB	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.
2	Precipitado en mezcla de muestra-Buffer VXL	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.

Información para pedidos

Nombre del producto	N.º de cat.
IndiMag Pathogen Kit	SP947457
IndiMag Pathogen Kit w/o plastics	SP947257
IndiMag 2 (100-240 V)	IN950048
IndiMag 2 PW Lysis Strips (672)	PW950215
IndiMag 2 PW Lysis Rack (6)	PW950225
IndiMag 2 PW Elution Set (384)	PW950235
IndiMag 48s (100-240 V)	IN943048S
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 afosa, bactotype, cador, cattletype, flocktype, IndiMag, IndiSpin, intype, pigtype, Svanovir y virotype.

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

Notas

Acuerto 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 de uso, así como con los componentes contenidos en el kit. INDICAL no ofrece licencia alguna bajo ninguna de sus propiedades intelectuales para incorporar o utilizar los componentes contenidos en este kit con componentes no incluidos en el mismo, excepto según se describe en los protocolos proporcionados con el producto, en este manual y en los protocolos adicionales disponibles en www.indical.com. Algunos de estos protocolos adicionales han sido proporcionados por 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 conocer los términos de licencia actualizados, consulte www.indical.com.

Marcas comerciales: afosa®, bactotype®, cador®, cattletype®, flocktype®, IndiMag®, IndiSpin®, intype®, pigtype®, Svanovir®, virotype® (INDICAL BIOSCIENCE GmbH); MagAttract®, QIAGEN® (Grupo QIAGEN, Hilden, Alemania), MagMax™ (Life Technologies Corporation), 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-005 © 2018-2025 INDICAL BIOSCIENCE GmbH, todos los derechos reservados.

Índice de cambios

Manual	Versión	Cambio
HB-1926-ES-005	Agosto de 2025	Implementación de IndiMag 2 y nuevos protocolos de pretratamiento; cambios editoriales
HB-1926-ES-004	Octubre de 2018	Diseño de INDICAL

INDICAL
BIOSCIENCE

Pedidos: www.indical.com/contact
Servicio técnico: support@indical.com
Sitio web: www.indical.com