

IndiMag[®] Pathogen Cartridge Manual

Para la purificación automatizada de ADN y ARN vírico y ADN bacteriano proveniente de muestras animales con procesadores de partículas magnéticas



2 × 24 bloques (n.º de cat. SP947654P224) para usar con IndiMag 48/s



6 × 8 bloques (n.º de cat. SP947654P608) para usar con IndiMag 48/s



1 × 96 bloques (n.º de cat. SP947855P196) para usar con las estaciones de trabajo KingFisher™ Flex, BioSprint® 96 o equivalentes



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
Protocolo de purificación de ácidos nucleicos	13
Pretratamientos.....	14
Equipo y reactivos que debe suministrar el usuario.....	17
Notas importantes.....	18
Material de partida.....	18
Cantidad de ácidos nucleicos	22
Uso de Carrier RNA y controles internos.....	22
Almacenamiento de los ácidos nucleicos.....	24
Manipulación del ARN	24

Protocolo: Purification of pathogen nucleic acids from fluid samples (Purificación de ácidos nucleicos patógenos a partir de muestras de fluidos).....	25
Cuestiones importantes antes de comenzar	25
Antes de comenzar	25
Procedimiento para su uso con IndiMag 48 o IndiMag 48s	27
Procedimiento de uso con KingFisher Flex (o similar)	28
Guía de resolución de problemas.....	30
Información para pedidos	32
Índice de cambios	36

Contenido del kit

IndiMag Pathogen Cartridge			
N.º de cat.	SP947654P224	SP947654P608	SP947855P196
Número de preparaciones	48	48	96
Cartucho ¹	2 × 24	6 × 8	5 × 96 ³
Tampón de lisis ²	1 × 24 ml	1 × 24 ml	1 × 48 ml
Cubierta de la barra	6 tiras	6 tiras	1 placa
Quick-Start Protocol (PCard)	1	1	1

1 PRECAUCIÓN: Contiene una sal caótrica, etanol y azida de sodio. 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 para obtener información sobre seguridad.

2 PRECAUCIÓN: Contiene una sal caótrica e isopropanol. 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 para obtener información sobre seguridad.

3 1 placa de cada uno: Lysate, Wash Buffer 1, Wash Buffer 2, Wash Buffer 3, Elution

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 Cartridge:

Para uso del IndiMag Pathogen IM48 Cartridge

- IndiMag 48
- IndiMag 48s

Para uso del IndiMag Pathogen KF96 Cartridge

- KingFisher Flex
- KingFisher 96
- BioSprint 96

Protocolos

Tenga en cuenta que los modelos IndiMag 48 e IndiMag 48s vienen con el protocolo "Pathogen" (Patógeno) preinstalado.

Cuando utilice un dispositivo KingFisher Flex o un dispositivo alternativo, utilice el script adecuado que aparece en la Tabla 1 de la página 6.

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

Dispositivo	Software	Nombre del script
KingFisher Flex	BindIt	IndiMag_C_Pathogen_KF_Flex.bdz
KingFisher 96	BindIt	IndiMag_C_Pathogen_KF96.bdz
KingFisher 96	KingFisher	IndiMag_C_Pathogen_KF96.kf2
BioSprint 96	BioSprint	IndiMag_C_Pathogen_BS96.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.

Uso previsto

El IndiMag Pathogen Cartridge 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 un procesador de partículas magnéticas, como las estaciones de trabajo IndiMag 48/s, KingFisher Flex 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 IndiMag Pathogen Cartridge y el tampón de lisis contienen hidrocloreuro de guanidina y tiocianato de guanidina, que pueden formar compuestos altamente reactivos si 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 Cartridge 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 Cartridge 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 un procesador de partículas magnéticas, como las estaciones de trabajo IndiMag 48/s, KingFisher Flex o equivalente (consulte la sección “Material de partida” en la página 18). Sin embargo, el usuario deberá validar combinaciones específicas de tipos de muestras y patógenos.

Principio y procedimiento

El IndiMag Pathogen Cartridge 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).

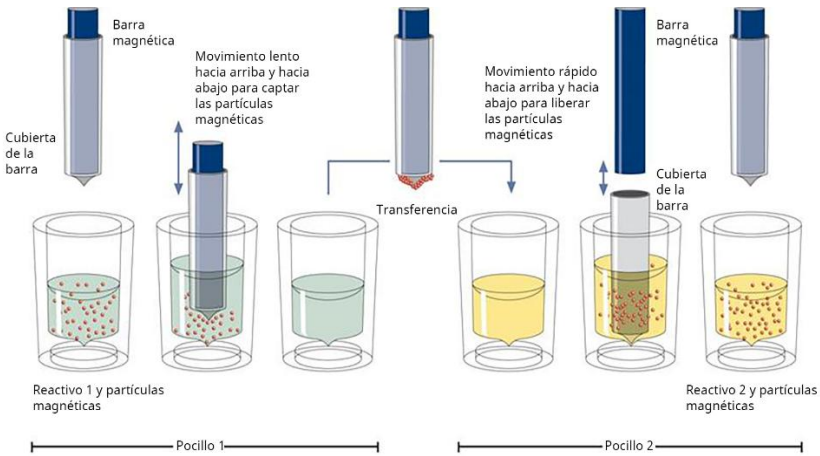


Figura 1. Esquema del principio de las microesferas magnéticas. La estación de trabajo procesa una muestra que contiene partículas magnéticas de la forma siguiente: Paso 1) Una barra magnética protegida por una cubierta de barra entra en un pocillo (vea el pocillo 1 en la figura) que contiene la muestra 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 caótopras 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

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 25) 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
- 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*

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 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).

El tiempo de purificación de la muestra es de aproximadamente 34 minutos, sin incluir los pasos previos de manipulación para la centrifugación y el pipeteo de las muestras y el tampón de lisis.

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)	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 de alto volumen	Bacterias fáciles de lisar	Pretratamiento B3 para bacterias fáciles de lisar en fluidos libres de células de alto volumen	HB-2549
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	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
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
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.

Para obtener más información sobre pretratamientos, 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 48/ IndiMag 48s, KingFisher Flex o equivalente
 - Pipetas y puntas de pipeta desechables con filtros para aerosoles (20-1000 μ l)
 - Pipeta multicanal y puntas de pipeta desechables de 1000 μ l con filtros para aerosoles
 - Multidispensador
 - Tampón fosfato salino (Phosphate-buffered saline, PBS), puede ser necesario para diluir las muestras
 - Agitador vorticial
 - Centrifugue para llevar las gotas hasta el fondo de los cartuchos antes de usarlos
 - Paño suave o toallita y etanol al 70 % u otro desinfectante para limpiar la mesa de trabajo usada
- Nota:** consulte el manual de usuario correspondiente para la limpieza y el mantenimiento del dispositivo de extracción

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 desnatura 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 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 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 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 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 Cartridge 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

El tampón de lisis listo para usar contiene Carrier RNA. 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.

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 Cartridge 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) al tampón de lisis. 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.

Protocolo: Purificación de ácidos nucleicos patógenos a partir de muestras de fluidos

Este protocolo sirve para la purificación de ARN y ADN víricos, y del ADN de bacterias fáciles de lisar a partir de muestras de fluidos o muestras de tejido pretratadas utilizando un procesador de partículas magnéticas, como IndiMag 48/ IndiMag 48s o un KingFisher Flex y el IndiMag Pathogen Cartridge compatible.

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 18).

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.

- Dependiendo del kit que se utilice, invierta el cartucho IndiMag Pathogen IM48 Cartridge o el “Wash 1” del IndiMag Pathogen KF96 Cartridge varias veces antes de usarlo, hasta que las microesferas aparezcan sueltas en la solución. Centrifugue el cartucho a temperatura ambiente (15-25 °C) durante 1 minuto a $500 \times g$.

Nota: La centrifugación de los IndiMag Pathogen IM48 Cartridges requiere un adaptador de centrifugación específico de IndiMag.

Importante: ¡No añada el tampón de lisis directamente a la columna del primer paso! Esto puede ocasionar obstrucciones o precipitados. Siga el procedimiento que se describe a continuación (introduzca las muestras en los pocillos con una pipeta, seguidas del tampón de lisis).

Procedimiento para su uso con IndiMag 48 o IndiMag 48s

1. Invierta el cartucho varias veces antes de usarlo, hasta que las microesferas aparezcan sueltas en la solución.
2. Centrifugue el cartucho en el adaptador de centrifugación específico de IndiMag a temperatura ambiente (15-25 °C) durante 1 minuto a $500 \times g$.
3. Retire con cuidado la lámina que cubre el cartucho.
4. Pipetee 200 μl de muestra en la parte inferior de la primera columna (marcada en azul en la Fig. 3)..

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

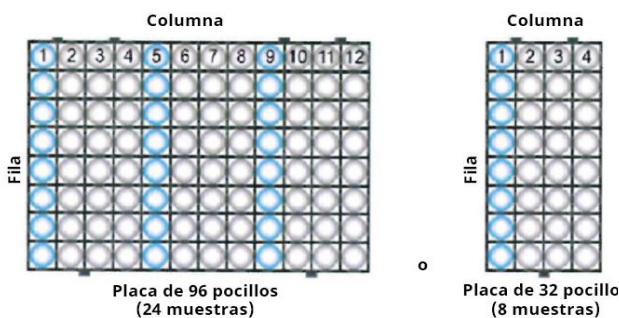


Figura 3. Tipos de cartuchos y configuración

5. Añada 500 μl de tampón de lisis a cada muestra en la primera columna (marcada en azul en la Fig. 3).

6. Cargue inmediatamente las placas preparadas en el IndiMag 48 o IndiMag 48s, 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 y el IndiMag 48s.

Procedimiento de uso con KingFisher Flex (o similar)

1. Invierta el IndiMag Pathogen KF96 Cartridge "Wash 1" (②) varias veces antes de su uso, hasta que las perlas aparezcan sueltas en la solución.
2. Centrifugue los IndiMag Pathogen KF96 Cartridges (① - ⑤) en un adaptador de centrifugación para placas de 96 pocillos profundos a temperatura ambiente (15-25 °C) durante 1 minuto a 500 × *g*.
3. Retire con cuidado la lámina que cubre el "Lysate" del IndiMag Pathogen KF96 Cartridge (①).
4. Pipetee 200 µl de muestra en la parte inferior del "Lysate" del IndiMag Pathogen KF96 Cartridge (①).

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

Tabla 3: Configuración del instrumento KingFisher Flex o alternativo

Ranura	Mensaje sobre la	Formato	Elemento
6	Load Rod Cover	Placa de pocillos	Cubierta de
5	Load Elution	Microplaca de 96 pocillos	Elución
4	Load Wash 3	Placa de pocillos	Wash 3
3	Load Wash 2	Placa de pocillos	Wash 2
2	Load Wash 1	Placa de pocillos	Wash 1
1	Load Lysate	Placa de pocillos	Lisado*

* Incluye 200 µl de muestra y 500 µl de tampón de lisis

5. Añada 500 µl de tampón de lisis a cada muestra en el "Lysate" del IndiMag Pathogen KF96 Cartridge (①).
6. Retire con cuidado la lámina que cubre los IndiMag Pathogen KF96 Cartridges restantes (② - ⑤).
7. Cargue inmediatamente las placas preparadas en el procesador, cargue las tiras de la barra magnética con cubierta en las posiciones correctas e inicie el protocolo 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 Lisis insuficiente de la muestra	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 .
2 Contaminación por ribonucleasas en el tampón de elución	Tenga cuidado de no introducir ribonucleasas para no degradar el ARN vírico. En caso de contaminación con ribonucleasas, repita el procedimiento de purificación con nuevas muestras.
3 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.

<p>2 Arrastre de partículas magnéticas</p>	<p>El arrastre de partículas magnéticas en los eluidos no afectará a la mayoría de las aplicaciones posteriores. 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 máxima durante 1 minuto para que las partículas magnéticas restantes se sedimenten y transfiera los sobrenadantes a una microplaca limpia.</p>
<p>3 Cantidad excesiva de eluido en la reacción de amplificación</p>	<p>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.</p>
<p>4 ARN degradado</p>	<p>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.</p>
<p>5 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>6 Inhibición de la PCR</p>	<p>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.</p>

Información para pedidos

Nombre del producto	N.º de cat.
IndiMag Pathogen IM48 Cartridge (2 × 24)	SP947654P224
IndiMag Pathogen IM48 Cartridge (6 × 8)	SP947654P608
IndiMag Pathogen KF96 Cartridge (1 × 96)	SP947855P196
IndiMag 48s	IN943048
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 o el manual de uso del producto de INDICAL correspondiente.

Notas

Notas

Notas

Acuerdo de licencia limitada para IndiMag Pathogen Cartridge

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: bactotype®, cador®, cattletype®, flocktype®, IndiMag®, IndiSpin®, intype®, pigtype®, virotype® (INDICAL BIOSCIENCE GmbH); MagAttract®, QIAGEN® (Grupo QIAGEN, Hilden, Alemania). Los nombres registrados, las marcas comerciales, etc. utilizados en este documento, incluso cuando no aparecen marcados como tales, están protegidos por la legislación.

B-2552-ES-002 © 2020-2021 INDICAL BIOSCIENCE GmbH, todos los derechos reservados.

Índice de cambios

Manual	Versión	Cambio
HB-2552-ES-002	Septiembre de 2021	Relanzamiento de producto
HB-2552-ES-001	Agosto de 2020	Lanzamiento de producto

INDICAL
BIOSCIENCE

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