Instrucciones de uso
Invisorb® Spin Universal Kit

CE IVD

REF 1050100200
1050100300

Σ 50 preparaciones
250 preparaciones

Invitek Molecular GmbH
Robert-Rössle-Straße 10
13125 Berlin
Alemania

INVITEK
Molecular

Notas importantes

Le agradecemos que haya comprado el **Invisorb® Spin Universal Kit** de Invitek Molecular.

Este producto se utiliza para el aislamiento manual de ácidos nucleicos (ADN genómico, ADN bacteriano y ARN/ADN vírico) a partir de distintas muestras clínicas usando la tecnología de columna de centrifugación.

¡ADVERTENCIA! Una manipulación inadecuada y el uso con fines distintos del previsto pueden causar daños y situaciones peligrosas. Por este motivo, le rogamos que lea detenidamente estas instrucciones de uso y que las respete estrictamente. Téngalas siempre a mano. Cumpla las instrucciones de seguridad para evitar daños personales.

Todas las versiones de las instrucciones de uso se pueden descargar desde nuestro sitio web o se pueden solicitar a través de: www.invitek-molecular.com

Contacto:

Invitek Molecular GmbH

Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlín, Alemania

+ 49 30 9489 2908

www.invitek-molecular.com

Soporte técnico:

techsupport@invitek-molecular.com

© 2022 Invitek Molecular. Todos los derechos reservados.

Este kit es conforme con el REGLAMENTO (UE) 2017/746 sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro. Sin embargo, no puede usarse para el diagnóstico in vitro en países donde no se reconozca el REGLAMENTO (UE) 2017/746 sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro.

Marcas comerciales: Invisorb®, PSP®, InviMag® y Eppendorf®. Todas las marcas registradas, marcas comerciales, etc. que se usan en este documento están protegidas por la ley, aunque no estén identificadas explícitamente como tales.

InviGenius®, InviMag®, Invisorb®, Invitek®, InviTrap®, MSB®, PSP® y RTP® son marcas comerciales registradas de Invitek Molecular GmbH.

Tabla de contenido

1. Instrucciones de seguridad 3
2. Información del producto 4
2.1 Contenido del kit 4
2.2 Reactivos y equipamiento que debe proporcionar el usuario 5
2.3 Almacenamiento, apariencia y caducidad 5
2.4 Uso previsto 6
2.5 Especificaciones e información del producto 6
2.6 Principio y procedimiento 7
3. Extracción de ácido nucleico con el Invisorb® Spin Universal Kit 8
3.1 Antes de iniciar un protocolo 8
3.2 Toma de muestras y almacenamiento del material inicial 9
3.3 Preparación de los materiales iniciales 11
3.3.1 Suero, plasma y otros fluidos corporales sin células 11
3.3.2 Sangre 11
3.3.3 Frotis 11
3.3.4 Muestras de heces (sobrenadante) 11
3.3.5 Cultivos bacterianos 12
3.3.6 Orina 12
3.3.7 Secreciones traqueales, BAL y expectoraciones 12
3.3.8 Tejidos biopsiados 13
3.3.9 Sobrenadantes de cultivo celular 13
3.4 Protocolo resumido del Invisorb® Spin Universal Kit 14
3.5 Protocolo: Aislamiento simultáneo de ácidos nucleicos totales (ADN y ARN) a partir de todas las muestras de líquido 15
4. Apéndice 17
4.1 Solución de problemas 17
4.2 Garantía 18
4.3 Símbolos utilizados en el producto y las etiquetas 18
4.4 Otros documentos e información complementaria 19
4.5 Información para pedidos 19

1. Instrucciones de seguridad

Asegúrese de que todas las personas que usen este producto hayan sido instruidas sobre la seguridad general en laboratorios y conozcan la información de seguridad que contiene el presente documento.

- Al manipular sustancias químicas se debe usar siempre vestimenta de protección, guantes desechables y gafas de seguridad.
- Cambie siempre la punta de las pipetas para transferir distintos líquidos. Se recomienda el uso de puntas de pipeta de barrera para aerosoles para evitar la contaminación cruzada.
- No reutilice los productos consumibles.
- Deseche los guantes si resultan contaminados.
- No combine componentes de distintos kits, salvo que tengan el mismo número de lote.
- Evite la contaminación microbiana de los reactivos del kit.
- Para minimizar el riesgo de infecciones con materiales potencialmente infecciosos, se recomienda trabajar con un flujo de aire laminar hasta que se hayan lisado las muestras.

Antes de manipular sustancias químicas, lea todas las fichas de datos de seguridad (FDS) aplicables y asegúrese de que las comprende. Puede encontrarlas en Internet, en www.invitek-molecular.com.

Deseche los residuos del kit y los fluidos residuales de conformidad con la reglamentación de su país (consulte la FDS). Invitek Molecular no ha verificado la presencia de materiales infecciosos residuales en los residuos líquidos que genera el kit. Si bien es muy improbable que los residuos líquidos se contaminen con materiales infecciosos residuales, no puede excluirse por completo. Por ese motivo, los residuos líquidos deben considerarse infecciosos y deben manipularse y desecharse de conformidad con el reglamento local en materia de seguridad.

A continuación se indican las frases de riesgo y seguridad de la Comunidad Europea en relación con los componentes del **Invisorb® Spin Universal Mini Kit** al que se aplican:

Proteinase K

Peligro

H315-H319-H334-H335-P280-P305+P351+P338

Lysis Buffer HLT

Advertencia

H302-H315-H319-P280-P305+P351+P338

H302: Nocivo en caso de ingestión.
H315: Provoca irritación cutánea.
H319: Provoca irritación ocular grave.
H334: Puede provocar síntomas de alergia o asma o dificultades respiratorias en caso de inhalación.
H335: Puede irritar las vías respiratorias.
P280: Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.
P305+P351+P338: EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar con agua cuidadosamente durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto cuando estén presentes y pueda hacerse con facilidad. Proseguir con el lavado.

Puede solicitar información médica de emergencia las 24 horas a través de infotrac: www.infotrac.net:

Fuera de EE. UU.: 1 – 352 – 323 – 3500
En EE. UU.: 1 – 800 – 535 – 5053

2. Información del producto

2.1 Contenido del kit

	50 purificaciones	250 purificaciones
Ref. catálogo	1050100200	1050100300
Lysis Buffer HLT (tampón de lisis HLT)	15 ml/frasco	60 ml/frasco
Proteinase K (proteinasa K)	1 vial para 1,1 ml de solución de trabajo	3 viales para 3 x 2 ml de solución de trabajo
Carrier RNA (ARN portador)	1 vial para 1,2 ml de solución de trabajo	3 viales para 3 x 2 ml de solución de trabajo
RNAse Free Water (agua sin ARNasa)	2 x 2 ml/vial	15 ml/frasco
Binding Solution (solución de unión)	Frasco vacío (volumen final 15 ml)	Frasco vacío (volumen final 80 ml)
Wash Buffer HLT (tampón de lavado HLT)	30 ml/frasco (volumen final 50 ml)	105 ml/frasco (volumen final 175 ml)
Wash Buffer (tampón de lavado)	2 x 18 ml/frasco (volumen final 2 x 60 ml)	2 x 60 ml/frasco (volumen final 2 x 200 ml)
Elution Buffer M (tampón de elución M)	30 ml/frasco	120 ml/frasco
RTA Spin Filter Set (juego de filtros de centrifugación RTA)	50 unidades	5 x 50 unidades
RTA Receiver Tubes (tubos receptores RTA)	2 x 50 unidades	10 x 50 unidades
1.5 ml Receiver Tubes (tubos receptores de 1,5 ml)	50 unidades	5 x 50 unidades
2.0 ml Safe–Lock-Tubes (tubos Safe-Lock de 2,0 ml)	50 unidades	5 x 50 unidades
Short protocol (Protocolo resumido)	1 folleto	1 folleto

2.2 Reactivos y equipamiento que debe proporcionar el usuario

Equipo de laboratorio:

- Microcentrífuga (*todos los protocolos se han validado con una centrífuga 5415 D Eppendorf)*
- Opcional: centrífuga para 15 o 50 ml
- Agitador térmico (37 °C - 95 °C)
- Probeta graduada (250 ml)
- Guantes desechables
- Pipeta y puntas para pipeta
- Mezclador de vórtice
- Tubos de reacción (1,5 ml y 2,0 ml)

Líquidos y disolventes:

- DNase/RNase free water o 1 x solución salina tamponada con fosfato (PBS) para ajustar el volumen de la muestra
- 96 - 100 % etanol (no desnaturalizado)
- Isopropanol*
- Opcional (para muestras respiratorias muy viscosas): solución saturada de acetilcisteína (ACC) (200 mg/ml)
- Opcional: Lisozima (10 mg/ml)

*El kit se ha validado con propan-2-ol; Rotipuran® > 99,7 %, p.a., ACS, ISO (ref. 6752) de Carl Roth

*** Posibles proveedores de isopropanol:**

Carl Roth Propan-2-ol Rotipuran® > 99,7 %, p.a., ACS, ISO Ref. 6752	**Applichem** Propan-2-ol para biología molecular Ref. A3928	**Sigma** Propan-2-ol Ref. 59304-1L-F

2.3 Almacenamiento, apariencia y caducidad

Caducidad: Todos los tampones y componentes del kit deben almacenarse a temperatura ambiente, respetando el plazo de caducidad indicado en la etiqueta del envase exterior del kit.
Una vez abiertos, tanto los componentes individuales del kit como los preparados antes del primer uso deben usarse antes de 3 meses.
Antes de cada uso, asegúrese de que todos los componentes estén a temperatura ambiente. Si en las soluciones se forman precipitados como consecuencia de la temperatura, disuélvalos con mucho cuidado aplicando calor (hasta 30 °C).
La temperatura ambiente (TA) se define como el intervalo de temperatura entre 15 y 30 °C.
Wash Buffer: después de añadir etanol, debe cerrarse herméticamente y guardarse a temperatura ambiente.
Wash Buffer HLT y **Binding Solution:** después de añadir isopropanol, deben cerrarse herméticamente y guardarse a temperatura ambiente.
Carrier RNA: una vez disuelto en DNase/RNase free water, el Carrier RNA debe almacenarse a -20 °C.
Proteinase K: una vez disuelta en DNase/RNase free water, la Proteinase K se puede almacenar a 2-8 °C durante un plazo de hasta dos meses. Para almacenar durante más tiempo, se debe conservar a –20 °C. Solo se puede congelar y descongelar una vez.

2.4 Uso previsto

El **Invisorb® Spin Universal Kit** es un kit de extracción de ácido nucleico que utiliza la tecnología de columna de centrifugación para el aislamiento y la purificación simultáneos de ADN genómico, ADN bacteriano y ARN/ADN vírico.

El kit puede utilizarse para una variedad de tipos de muestras humanas, como sangre total venosa fresca o congelada anticoagulada con EDTA o citrato o las respectivas preparaciones de plasma, suero, líquido enjuagado de hisopos, esputo pretratado, BAL, secreción traqueal, bacterias cultivadas, sobrenadante de suspensión de heces, líquido cefalorraquídeo, sobrenadantes de cultivos celulares, material/tejido de biopsia, orina y otros fluidos corporales libres de células.

El producto no está diseñado para el uso con muestras de sangre heparinizada. El producto está destinado exclusivamente a personal profesional, como técnicos de laboratorio, personal médico y biólogos formados en técnicas de biología molecular y procedimientos de diagnóstico *in vitro*.

2.5 Especificaciones e información del producto

Material inicial	Rendimiento	Calidad	Tiempo
Hasta 200 µl • Suero, plasma, otros fluidos corporales sin células y orina • Frotis (secos, estabilizados) • Sobrenadante de suspensiones fecales • Cultivos bacterianos • Secreciones traqueales, BAL y expectoraciones • Sobrenadante de cultivo celular Hasta 100 µl: • Sangre fresca o congelada (estabilizada con citrato/EDTA, pero no con heparina) Hasta 10 mg de muestra de tejido	Depende de la muestra (almacenamiento y origen) Sangre entera: de media, 1 µg de ADN	ADN genómico de sangre: A_{260}: A_{280} 1,8 – 2,1 Otros tipos de muestras: depende del tipo de muestra, ácidos nucleicos objetivo	aprox. 30 min para 12 muestras (sin lisis)

El rendimiento y la calidad de los ácidos nucleicos purificados dependen del tipo de muestra, el origen de la muestra, el transporte, el almacenamiento, la edad, el título viral y, en el caso de las muestras de sangre, también el recuento de leucocitos.

Al determinar el rendimiento se debe tener en cuenta que los ácidos nucleicos purificados con este kit contienen Carrier DNA (5 µg por muestra de 200 µl), que constituye la mayoría de los ácidos nucleicos presentes en el eluido. En especial, los ácidos nucleicos virales procedentes de muestras biológicas suelen tener una concentración muy baja, por lo que la cuantificación

fotométrica resulta casi imposible. Para determinar el rendimiento se recomienda la RT-PCR cuantitativa.

El **Invisorb® Spin Universal Kit** ofrece un método eficaz para el aislamiento de ácidos nucleicos de alta calidad. El kit está diseñado para el aislamiento simultáneo de ARN/ADN vírico, ADN bacteriano y ADN genómico usando un protocolo de columna de centrifugación de lisis, unión, lavado y elución.

El kit está validado para recuentos de leucocitos de 3 x 10^6-1 x 10^7 células/ml. Un recuento celular excesivamente alto puede causar la obstrucción del RTA Spin Filter, lo que tendría efectos contraproducentes en el proceso de purificación. Por este motivo, se recomienda tener en cuenta el volumen de entrada de la muestra durante la implementación de nuestro protocolo de diagnóstico *in vitro*. Si es necesario, las muestras se pueden prediluir con PBS o DNase/RNase free water antes del proceso de aislamiento y purificación.

Aplicaciones posteriores:
El rendimiento y la calidad de los ácidos nucleicos aislados son, en general, adecuados para muchas aplicaciones de diagnóstico molecular, como las técnicas de PCR, NGS, métodos de hibridación y tipificación de HLA. Las aplicaciones posteriores deben realizarse de acuerdo con las especificaciones de los respectivos fabricantes.

2.6 Principio y procedimiento

1. Muestras lisadas
Las muestras se lisan a temperaturas altas. La lisis se realiza en presencia de Lysis Buffer HLT, Proteinase K y, opcionalmente, Lysozyme para descomponer las paredes celulares de las bacterias y digerir las proteínas.

Es necesario añadir Carrier RNA para mejorar y estabilizar la recuperación del ARN/ADN vírico y purificar muy pequeñas cantidades de ácidos nucleicos víricos.

2. Unión de ácidos nucleicos
Mediante la adición de Binding Solution al lisado se ajustan las condiciones óptimas de unión. Luego, cada lisado se aplica a un RTA Spin Filter y los ácidos nucleicos se absorben a la membrana.

3. Lavado para eliminar la contaminación residual
La contaminación se lava eficazmente con Wash Buffer y Wash Buffer HLT, mientras que los ácidos nucleicos permanecen unidos a la membrana.

4. Eluir los ácidos nucleicos
Los ácidos nucleicos se eluyen del RTA Spin Filter usando 100-200 µl de Elution Buffer M.

3. Extracción de ácido nucleico con el Invisorb® Spin Universal Kit

3.1 Antes de iniciar un protocolo

La primera vez que utilice el kit, asegúrese de que se preparen todos los tampones y reactivos siguiendo las indicaciones:

Preparación de los tampones antes del primer uso: 50 preparaciones
Carrier RNA: Resuspenda el **Carrier RNA** liofilizado incorporando 1,2 ml de **DNase/RNase free water** al vial y mezcle bien hasta que se diluya por completo (1 minuto como mínimo). **Proteinase K:** Resuspenda la **Proteinase K** liofilizada incorporando 1,1 ml de **DNase/RNase free water** al vial y mezcle bien hasta que se diluya por completo. **Binding Solution (frasco vacío)**: Añada 15 ml de **isopropanol al 99,7 %** (para biología molecular) al frasco. El frasco debe mantenerse cerrado herméticamente en todo momento. **Wash Buffer HLT:** Añada 20 ml de **isopropanol al 99,7 %** al frasco**.** Mezcle bien, manteniendo el frasco cerrado herméticamente en todo momento. **Wash Buffer:** Añada 42 ml de **etanol al 96-100 %** al frasco. Mezcle bien, manteniendo el frasco cerrado herméticamente en todo momento.
Preparación de los tampones antes del primer uso: 250 preparaciones
Carrier RNA: Resuspenda el **Carrier RNA** liofilizado incorporando 1 ml de **DNase/RNase free water** al vial y mezcle bien hasta que se diluya por completo (1 minuto como mínimo). A continuación, añada 1 ml más de DNase/RNase free water. **Proteinase K:** Resuspenda la **Proteinase K** liofilizada incorporando 2 ml de **DNase/RNase free water** al vial y mezcle bien hasta que se diluya por completo. **Binding Solution (frasco vacío)**: Añada 80 ml de **isopropanol al 99,7 %** (para biología molecular) al frasco. **Wash Buffer HLT:** Añada 70 ml de **isopropanol al 99,7 %** al frasco**.** Mezcle bien, manteniendo el frasco cerrado herméticamente en todo momento. **Wash Buffer:** Añada 140 ml de **etanol al 96-100 %** al frasco. Mezcle bien, manteniendo el frasco cerrado herméticamente en todo momento.

- Ajuste el agitador térmico a 65 °C.
- Caliente la cantidad necesaria de **Elution Buffer M** a 65 °C (se necesitan 50-200 µl de **Elution Buffer M** por muestra).
- Determine el número de reacciones necesarias, incluidos los controles, y etiquete el número necesario de RTA Spin Filters (tapa) y el número necesario de 1.5 ml Receiver Tubes (por muestra: se necesita 1 Receiver Tube).

Mezcla maestra

Para simplificar el proceso, se recomienda preparar una mezcla maestra que consista en Lysis Buffer HLT, Proteinase K y, si procede, Carrier RNA. Al preparar la mezcla maestra, se recomienda que el volumen preparado sobrepase el número total de reacciones en un 5 %.

La mezcla maestra debe estar recién hecha, por lo que debe prepararse poco antes de usarla.

Aislamiento del ADN genómico, el ADN bacteriano y el ARN/ADN vírico:
Se necesita 200 µl de Lysis Buffer HLT, 20 µl de Proteinase K y 20 µl de Carrier RNA por muestra.

Aislamiento del ADN genómico:
Se necesita 220 µl de Lysis Buffer HLT y 20 µl de Proteinase K por muestra. No es necesario usar Carrier RNA.

Control de extracción

Consulte las instrucciones del fabricante para determinar la cantidad óptima del control de extracción para aplicaciones posteriores concretas.

Los volúmenes bajos de control de extracción (ADN o ARN) deben combinarse en una mezcla con el Carrier RNA. Los viales con Carrier RNA contienen 1,2 ml o 2,0 ml de solución madre, según el tamaño del paquete. Añada la cantidad correspondiente de ácido nucleico del control de extracción al Carrier RNA; si se requiere un volumen alto (> 25 % del volumen total de Carrier RNA), reemplace la cantidad adecuada de DNase/RNase free water durante la dilución del Carrier RNA.

3.2 Toma de muestras y almacenamiento del material inicial

Para maximizar el rendimiento y la reproducibilidad, es fundamental que las muestras se almacenen correctamente. El rendimiento puede variar en función de factores como el estado de salud del donante, la edad y el tipo de la muestra, el transporte y el almacenamiento.

Debe evitarse que las muestras se sometan a varios ciclos de congelación y descongelación para evitar la degradación del ácido nucleico. En general, las muestras frescas son las que dan mejores resultados. Se recomienda utilizar asesoramiento técnico, como las normas CEN/TS e ISO sobre el proceso de análisis previo para diagnóstico molecular según el reglamento europeo de diagnóstico in vitro (IVDR), como señala G. Dagher, et al. (https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.05.002).

Suero, plasma y otros fluidos corporales sin células: Para la extracción se puede usar suero o plasma derivado de sangre entera venosa (tratada con anticoagulantes como EDTA o citrato, pero no con heparina), muestras de líquido sinovial u otros fluidos corporales sin células. La sangre entera no se debe agitar para evitar la hemólisis. Deje reposar los tubos de suero al menos 30 minutos antes del centrifugado. Siga las instrucciones del sistema de extracción de sangre para la preparación del suero o plasma. Se recomienda separar el plasma/suero por centrifugación dentro de un plazo de 12 h. Los sobrenadantes obtenidos mediante sistemas sin separador de gel deben transferirse a tubos de muestras sin usar. Las muestras se pueden conservar en hielo durante 1 o 2 horas para el uso a corto plazo. Las muestras se pueden guardar a -20 °C durante un máximo de 24 horas. Para el almacenamiento a largo plazo, se recomienda congelar las muestras a –80 °C en partes alícuotas. Los ciclos reiterados de congelación y descongelación pueden afectar negativamente a la integridad de la muestra y causar, por ejemplo, desnaturalización/precipitación de proteínas, lo que podría reducir el rendimiento, la calidad y los títulos virales. Adicionalmente, los crioprecipitados que se forman durante los ciclos de congelación y descongelación pueden causar problemas. Si se observa crioprecipitado, centrifugue a 6800 x *g* durante 3 minutos. El sobrenadante transparente debe usarse de inmediato.

Sangre: Las muestras de sangre (estabilizadas con EDTA o citrato, pero no heparinizadas) se pueden conservar a temperatura ambiente durante 2-3 horas. Para el almacenamiento a corto plazo (hasta 24 h), las muestras se deben guardar a 2-8 °C. Para el almacenamiento a largo plazo, se recomienda congelar las muestras a -20 °C u -80 °C.

Frotis:
Frotis secos: prepare las muestras tal como se describe en el método correspondiente de preparación de muestras. Conserve en seco a 4-8 °C.

Frotis en medio de estabilización: el líquido de estabilización se puede manipular como fluido corporal sin células. Tenga en cuenta que algunos agentes estabilizadores pueden reducir el rendimiento debido a la incompatibilidad con las sustancias químicas del kit. Conserve respetando los requisitos del fabricante.

Muestras de heces: Las muestras contienen ADNasas y ARNasas que pueden causar la degradación rápida del ADN y el ARN. Por este motivo, las muestras deben conservarse congeladas a –80 °C.

Cultivos bacterianos: Tras el cultivo, las bacterias se deben pelletizar y congelar a -20 °C o -80 °C para el almacenamiento a largo plazo. La resuspensión se describe en el método correspondiente de preparación de muestras.

Orina: Dependiendo del título bacteriano y la aplicación, se recomienda un volumen inicial de 15-50 ml de orina. Centrifugue la muestra para pelletizar las bacterias y retire el sobrenadante por completo (la contaminación por urea puede inhibir las reacciones PCR). En algunas aplicaciones se puede usar orina fresca directamente. Para el almacenamiento a largo plazo, se recomienda congelar las muestras a -20 °C u -80 °C.

Secreciones traqueales, BAL y expectoraciones: Las muestras contienen ADNasas y ARNasas que pueden causar la degradación rápida del ADN y el ARN. Por este motivo, las muestras deben conservarse congeladas a –80 °C.

Tejidos biopsiados*:* Las muestras deben congelarse inmediatamente y almacenarse a –20 °C o –80 °C. Debe evitarse que se sometan a varios ciclos de congelación y descongelación. La cantidad de ADN purificado depende del tipo de material inicial. Descongele la muestra en la mezcla de lisis.

Sobrenadantes de cultivo celular: Prepare las muestras de sobrenadante igual que las muestras de otros fluidos corporales sin células que se describen en el método correspondiente de preparación de muestras. Para el almacenamiento a largo plazo, se recomienda congelar las muestras a -20 °C u -80 °C.

3.3 Preparación de los materiales iniciales

A continuación se describe la preparación de la lisis de la muestra para distintos materiales iniciales. Utilice tubos Safe-Lock de 2 ml para la preparación de la muestra, ya que también son necesarios en el paso de lisis posterior.

Cuando haya preparado los materiales iniciales, consulte el capítulo 3.5 «Protocolo: Aislamiento simultáneo de ácidos nucleicos totales (ADN y ARN) a partir de todas las muestras de líquido» y siga los pasos 1a) - d) del protocolo, salvo que se indique lo contrario.

3.3.1 Suero, plasma y otros fluidos corporales sin células

Mezcle bien la muestra siempre antes de la extracción.
Utilice 200 µl de muestra para la extracción. Si el volumen de la muestra es inferior a 200 µl, ajústelo con tampón PBS o DNase/RNase free water hasta alcanzar un volumen final de 200 µl.

3.3.2 Sangre

Mezcle bien la muestra siempre antes de la extracción.
Diluya 100 µl de sangre fresca o descongelada con 100 µl de DNase/RNase free water.

3.3.3 Frotis

a) Frotis secos

Aclare los frotis en un vial adecuado con el menor volumen posible de PBS o DNase/RNase-free water (aproximadamente 400 µl para los frotis nasofaríngeos, aproximadamente 600 µl para los frotis orales). Presione el frotis contra la pared interna del vial para obtener la máxima cantidad posible de muestra.
Utilice 200 µl de la solución aclarada para la extracción.
Como alternativa, los frotis se pueden aclarar directamente en una mezcla de 200 µl de Lysis Buffer HLT, 20 µl de Proteinase K, 20 µl de Carrier DNA (opcional para la preparación de ADN genómico) y 200 µl de DNase/RNase free water. Incube los frotis a temperatura ambiente durante 5-10 min, mezclando de forma ocasional. Tenga mucho cuidado de que no se produzca contaminación cruzada.

b) Frotis en medio de estabilización

Utilice 200 µl de la solución de estabilización para la extracción.
Algunos medios de estabilización pueden interferir en la reacción de la lisis (si tiene alguna pregunta, consulte las preguntas frecuentes o contacte con el servicio de asistencia).

3.3.4 Muestras de heces (sobrenadante)

a) Extracción de ácido nucleico de virus

Para preparar el sobrenadante, transfiera 100 µl/100 mg de la muestra de heces a un vial de 2 ml y añada 900 µl de DNase/RNase free water. Agite durante 30 s y luego centrifugue 1 minuto a 12 000 x g.

Transfiera 200 µl de sobrenadante a un vial de extracción de muestras limpio. Asegúrese de que la muestra no contenga partículas sólidas.

b) Extracción de ADN bacteriano

Para preparar el sobrenadante, transfiera 100 µl/100 mg de la muestra de heces a un vial de 2 ml y añada 300 µl de DNase/RNase free water. Agite durante 30 s y luego centrifugue 30 s a 1000 x g.

Transfiera 200 µl de sobrenadante a un vial de extracción de muestras limpio. Asegúrese de que la muestra no contenga partículas sólidas.

3.3.5 Cultivos bacterianos

Transfiera 1 ml de cultivo nocturno bacteriano a un tubo Safe-Lock de 2,0 ml. Centrifugue durante 2 minutos a 10 000 x g y retire el sobrenadante por completo. Resuspenda el pellet en 200 µl de tampón PBS e inicie la extracción de la muestra.

3.3.6 Orina

Dependiendo del título bacteriano y la aplicación, se recomienda un volumen inicial de 15-50 ml de orina. Centrifugue la muestra para pelletizar las bacterias y retire el sobrenadante por completo (la contaminación por urea puede inhibir las reacciones PCR). Resuspenda el pellet bacteriano en 200 µl de tampón PBS.
En algunas aplicaciones se puede usar directamente 200 µl de orina fresca.

3.3.7 Secreciones traqueales, BAL y expectoraciones

a) Muestras no viscosas o poco viscosas

Mezcle bien la muestra siempre antes de la extracción.
Utilice 200 µl de muestra para la extracción. Si el volumen de la muestra es inferior a 200 µl, ajústelo con tampón PBS o DNase/RNase free water hasta alcanzar un volumen final de 200 µl.

b) Aislamiento de ADN bacteriano de muestras viscosas

Transfiera 150 µl de la muestra de expectoración o 1 ml de secreción traqueal o BAL a un tubo Safe- Lock y, a continuación, añada 150 µl o 1 ml de solución saturada de acetilcisteína (ACC) (la proporción entre la muestra y el tampón debe ser de 1:1).
Incube a 95 °C durante 10 minutos sin dejar de agitar.
Centrifugue a 10 000 x g durante 5 minutos. Deseche el sobrenadante.
Resuspenda el pellet bacteriano en 200 µl de PBS o DNase/RNase free water y proceda con la extracción de la muestra.

c) Aislamiento de ARN/ADN vírico de muestras viscosas

Transfiera 150 µl de la muestra a un tubo Safe- Lock y añada 150 µl de solución saturada de acetilcisteína (ACC) a la muestra (la proporción entre la muestra y el tampón debe ser de 1:1).
Incube a 95 °C durante 10 minutos sin dejar de agitar.
Deje enfriar la muestra.
Utilice 200 µl de muestra para la extracción.

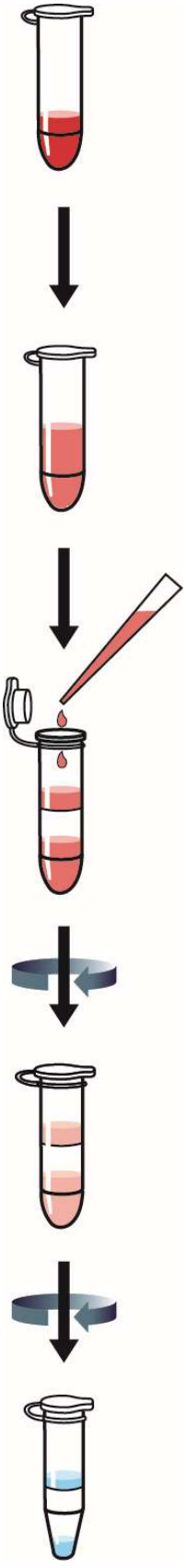
3.3.8 Tejidos biopsiados

Transfiera 1-10 mg de tejido biopsiado a un tubo Safe-Lock de 2,0 ml y añada 200 µl de DNase/RNase free water o PBS, 200 µl de Lysis Buffer HLT, 20 µl de Carrier RNA (opcional, para las muestras bajas en ADN/ARN) y 20 µl de Proteinase K a cada muestra.
Para los tejidos difíciles de lisar, como el cartílago, el riñón y el miocardio: se recomienda la agitación con perlas de zirconio (se venden por separado).
Cuando finalice el tratamiento mecánico, incube a 65 °C durante 10 minutos sin dejar de agitar.
Incube a 95 °C durante 10 minutos sin dejar de agitar.
Centrifugue a 10 000 x g durante 1 minuto y transfiera el sobrenadante a un tubo nuevo.
Continúe con el paso 2 del protocolo de extracción: añada Binding Solution.

3.3.9 Sobrenadantes de cultivo celular

Utilice 200 µl de muestra para la extracción.

3.4 Protocolo resumido del Invisorb® Spin Universal Kit



Muestras lisadas

Consulte el tratamiento previo específico de la muestra en el capítulo 3.3 «Preparación del material inicial».

1.a) Purificación de ácidos nucleicos bacterianos
Mezcle 200 µl de la muestra con 20 µl de lisozima en un tubo Safe-Lock de 2,0 ml
Incube a 37 °C durante 10 min
Añada 20 µl de Carrier RNA, 200 µl de **Lysis Buffer HLT** y 20 µl de **Proteinase K**
Incube a 65 °C durante 15 minutos sin dejar de agitar

1.b) Purificación simultánea de ácidos nucleicos víricos y bacterianos
Mezcle 200 µl de la muestra con 20 µl de lisozima en un tubo Safe-Lock de 2,0 ml
Incube a temperatura ambiente durante 10 min
Añada 20 µl de Carrier RNA, 200 µl de **Lysis Buffer HLT** y 20 µl de **Proteinase K**
Incube a 65 °C durante 10 minutos sin dejar de agitar
Incube a 95 °C durante 10 minutos sin dejar de agitar

1.c) Purificación de ácidos nucleicos víricos
Mezcle 200 µl de muestra* con 200 µl de **Lysis Buffer HLT**, 20 µl de **Carrier RNA** y 20 µl de **Proteinase K** en un tubo Safe-Lock de 2,0 ml
Incube a 65 °C durante 10 minutos sin dejar de agitar
Incube a 95 °C durante 10 minutos sin dejar de agitar

1.d) Purificación de ADN genómico
Mezcle 200 µl de muestra* con 220 µl de **Lysis Buffer HLT** y 20 µl de **Proteinase K** en un tubo Safe-Lock de 2,0 ml
Incube a 65 °C durante 10 minutos sin dejar de agitar
Incube a 95 °C durante 10 minutos sin dejar de agitar (omita este paso para las muestras de sangre)

*Si el volumen de la muestra es inferior a 200 µl, ajústelo con PBS o DNase/RNase free water

Unión de ácidos nucleicos

2. Añada 260 µl de **Binding Solution** y mezcle mediante absorción y expulsión con una pipeta o mediante agitación.
   Incube a temperatura ambiente durante 5 min
   Transfiera la muestra a un juego de RTA Spin Filters
   Centrifugue a 11 000 x g durante 1 min
   Deseche el RTA Receiver Tube con filtrado y coloque el RTA Spin Filter en un RTA Receiver Tube nuevo.

Lavado para eliminar la contaminación residual

3. Añada 600 µl de **Wash Buffer HLT** y centrifugue a 11 000 x g durante 1 minuto
   Deseche el RTA Receiver Tube con filtrado y coloque el RTA Spin Filter en un RTA Receiver Tube nuevo.
4. Añada 700 µl de **Wash Buffer** y centrifugue a 11 000 x g durante 1 min
   Deseche el filtrado y vuelva a colocar el RTA Spin Filter en el RTA Receiver Tube.
5. Repita este paso de lavado una vez
6. Centrifugue a velocidad máxima durante 5 minutos para eliminar los restos de etanol
   Deseche el RTA Receiver Tube con filtrado

Eluir los ácidos nucleicos

7. Coloque el filtro de centrifugación en un 1.5 ml Receiver Tube
   Añada 50-200 µl de **Elution Buffer M** (precalentado a 65 °C) directamente al RTA Spin Filter.
   Incube a temperatura ambiente durante 1 minuto y centrifugue a 11 000 x g durante 1 minuto
   Deseche el RTA Spin Filter y guarde los ácidos nucleicos eluidos en hielo

3.5 Protocolo: Aislamiento simultáneo de ácidos nucleicos totales (ADN y ARN) a partir de todas las muestras de líquido

Consulte el tratamiento previo específico de la muestra en capítulo 3.3 «Preparación del material inicial».

1.a) Lisis de la muestra para la purificación de ácidos nucleicos bacterianos

Mezcle 200 µl de la muestra o resuspenda el pellet bacteriano con 20 µl de lisozima en un tubo Safe-Lock de 2 ml.
Incube a 37 °C durante 10 min
Añada 20 µl de Carrier RNA. Mezcle mediante agitación.
Añada 200 µl de **Lysis Buffer HLT** y 20 µl de **Proteinase K.**
Como alternativa, añada 240 µl de mezcla maestra a cada muestra.
Mezcle bien durante 10 s por agitación e incube a 65 °C durante 10-15 min sin dejar de agitar.
Opcionalmente, para las bacterias difíciles de lisar, como las *micobacterias*: incube a 95 °C durante 10 minutos

1.b) Lisis de la muestra para la purificación simultánea de ácidos nucleicos víricos y bacterianos

Mezcle 200 µl de la muestra con 20 µl de lisozima en un tubo Safe-Lock de 2 ml.

Incube a temperatura ambiente durante 10 min.
Añada 20 µl de Carrier RNA. Mezcle mediante agitación.
Añada 200 µl de **Lysis Buffer HLT** y 20 µl de **Proteinase K.**
Como alternativa, añada 240 µl de mezcla maestra a cada muestra.
Mezcle bien durante 10 s por agitación e incube a 65 °C durante 10 min sin dejar de agitar.
Incube a 95 °C durante 10 minutos sin dejar de agitar.

1.c) Lisis de la muestra para la purificación de ácidos nucleicos víricos

Mezcle 200 µl de la muestra con 200 µl de **Lysis Buffer HLT**, 20 µl de **Carrier RNA** y 20 µl de **Proteinase K** en un tubo Safe-Lock de 2 ml.
Como alternativa, añada 240 µl de mezcla maestra a cada muestra.
Mezcle bien durante 10 s por agitación e incube a 65 °C durante 10-15 min sin dejar de agitar.
Incube a 95 °C durante 10 min

1.d) Lisis de la muestra para la purificación de ADN genómico

Mezcle 200 µl de la muestra con 220 µl de **Lysis Buffer HLT** y 20 µl de **Proteinase K** en un tubo Safe-Lock de 2 ml.
Como alternativa, añada 240 µl de mezcla maestra a cada muestra.
Mezcle bien durante 10 s por agitación e incube a 65 °C durante 10-15 min sin dejar de agitar.
Incube a 95 °C durante 10 minutos (omita este paso para el aislamiento de ADN genómico a partir de muestras de sangre diluida)

> ***Nota:*** *Si quiere añadir ácidos nucleicos para el control de extracción, hágalo en este momento, antes del paso de unión.*

2. Añada 260 µl de **Binding Solution** y mezcle por completo mediante absorción y expulsión con una pipeta o mediante agitación.
   Incube la muestra a temperatura ambiente durante 5 minutos.
   Agarre un juego de RTA Spin Filters. Transfiera la mezcla al RTA Spin Filter.
   Centrifugue a 11 000 x g durante 1 minuto.
   Deseche el RTA Receiver Tube con filtrado y coloque el RTA Spin Filter en un RTA Receiver Tube nuevo.
3. Añada 600 µl de **Wash Buffer HLT** al RTA Spin Filter y centrifugue a 11 000 x g durante 1 minuto.
   Deseche el RTA Receiver Tube con filtrado y coloque el RTA Spin Filter en un RTA Receiver Tube nuevo.
4. Añada 700 µl de **Wash Buffer** al RTA Spin Filter y centrifugue a 11 000 x g durante 1 minuto.
   Deseche el filtrado y vuelva a colocar el RTA Spin Filter en el RTA Receiver Tube usado.
5. Añada 700 µl de **Wash Buffer** al RTA Spin Filter y centrifugue a 11 000 x g durante 1 minuto.
   Deseche el filtrado y vuelva a colocar el RTA Spin Filter en el RTA Receiver Tube usado.
6. Centrifugue a 11 000 x g durante 5 min para eliminar el etanol por completo.
   Deseche el RTA Receiver Tube con filtrado.
7. Coloque el RTA Spin Filter en un 1.5 ml Elution Tube.
   Añada 50-200 µl del **Elution Buffer M** precalentado (65 °C) directamente a la superficie del RTA Spin Filter.
   Incube a temperatura ambiente durante 1 minuto.
   Centrifugue a 11 000 x g durante 1 minuto.
   Deseche el RTA Spin Filter.
   Cierre el 1.5 ml Receiver Tube y guarde la muestra a entre -20 °C y -80 °C.

4. Apéndice

4.1 Solución de problemas

Problema	Causa posible	Recomendación
Cantidad reducida de ácidos nucleicos	Lisis celular insuficiente	Incremente el tiempo de lisis con **Lysis Buffer HLT** La agitación continua mejora la eficiencia de la lisis Reduzca la cantidad de material inicial para evitar que se sobrecargue la columna
	Elución incompleta	Incremente el tiempo de incubación con **Elution Buffer M** precalentado a 5-10 min Eluya dos veces con 100 µl de **Elution Buffer M** Utilice un volumen más alto de **Elution Buffer M**
	Concentración baja de ácido nucleico en la muestra	Eluya los ácidos nucleicos con un volumen menor de tampón de elución M; no utilice menos de 30 µl.
	Almacenamiento incorrecto del material inicial	Asegúrese de que el material inicial se almacene correctamente. Evite congelar y descongelar varias veces el material de la muestra.
	Preparación incorrecta de los tampones de lavado	Asegúrese de que se añada la cantidad correcta de etanol/isopropanol a los tampones de lavado y que todas las soluciones se guarden cerradas herméticamente.
	Volumen/concentración de Proteinase K demasiado bajo	Asegúrese de que la Proteinase K liofilizada se resuspenda con el volumen adecuado de agua antes de usarla
Degradación de los ácidos nucleicos	Almacenamiento incorrecto del material inicial	Asegúrese de que la muestra se extraiga y almacene correctamente. Para obtener más información, consulte la sección de preguntas frecuentes de nuestra página web
	Material viejo	Asegúrese de que el material inicial se almacene en las condiciones adecuadas (–20 °C/-80 °C).
Mal rendimiento de los ácidos nucleicos en las aplicaciones posteriores (p. ej. NGS o PCR)	Transferencia de etanol durante la elución	Aumente la duración de la fase de secado para eliminar el etanol.
	Transferencia de sal durante la elución	Compruebe si hay precipitados de sal en los **Wash Buffer**. Si se observan precipitados, caliente a una temperatura de hasta 30 °C para eliminarlos Asegúrese de que los **Wash Buffer** estén a temperatura ambiente antes de usarlos.
Residuos de color en el RTA Spin Filter tras el lavado	Lisis celular insuficiente	Vea más arriba
	Lavado insuficiente	Repita el lavado con **Wash Buffer**
	Preparación incorrecta de los tampones de lavado	Vea más arriba

4.2 Garantía

Invitek Molecular garantiza que el kit funciona correctamente para las aplicaciones descritas en este manual y de conformidad con el uso previsto. De acuerdo con el sistema de gestión de calidad de Invitek Molecular certificado por EN ISO 13485, se ha probado el rendimiento de todos los componentes del kit para garantizar la calidad del producto.
Cualquier problema, incidente o defecto se deberá notificar inmediatamente a Invitek Molecular. En cuanto reciba el producto, inspecciónelo para verificar que no falte nada y esté en buenas condiciones. Si se encuentra algún problema, informe inmediatamente a Invitek Molecular por escrito. Cualquier modificación en el kit y los protocolos, así como el uso distinto del previsto, invalidará todas las garantías.

Invitek Molecular se reserva el derecho a cambiar, alterar o modificar cualquier producto en cualquier momento para mejorar su diseño y su rendimiento.
Invitek Molecular ofrece una garantía para sus productos de conformidad con lo expuesto en los Términos y condiciones generales, que se pueden consultar en www.invitek-molecular.com. Si tiene alguna duda, le rogamos que contacte con nosotros a través de techsupport@invitek-molecular.com.

4.3 Símbolos utilizados en el producto y las etiquetas

Fabricante

Número de lote

Identificador único de un dispositivo médico

Número de catálogo

Fecha de caducidad

Consultar las instrucciones de uso

Limitación de temperatura

No reutilizar

Cantidad de preparaciones de muestra

Productos sanitarios para diagnóstico in vitro

4.4 Otros documentos e información complementaria

Visite www.invitek-molecular.com para acceder a lo siguiente:

- Preguntas frecuentes y consejos para solucionar problemas
- Manuales en distintos idiomas
- Fichas de datos de seguridad (FDS)
- Asistencia web
- Vídeos de productos

Si sigue necesitando ayuda tras leer detenidamente las instrucciones de uso y la información adicional, le rogamos que contacte con nosotros a través de techsupport@invitek-molecular.com o que contacte con su distribuidor.

4.5 Información para pedidos

Producto	Tamaño del paquete	Ref. catálogo
Invisorb® Spin Universal Kit	50 preparaciones	1050100200
Invisorb® Spin Universal Kit	250 preparaciones	1050100300

Historial de revisiones

Revisión	Fecha	Descripción
ES-v1-2022	2022-05-18	Nuevo documento

INVITEK
Molecular

Invitek Molecular GmbH
Robert-Rössle-Str. 10
13125 Berlin
Alemania

Teléfono: +49 30 9489 2908
Fax: +49 30 9489 3795
info@invitek-molecular.com

www.invitek-molecular.com

https://www.invitek-molecular.com/resources/manuals.html

2022-05-18 ES-v1-2022