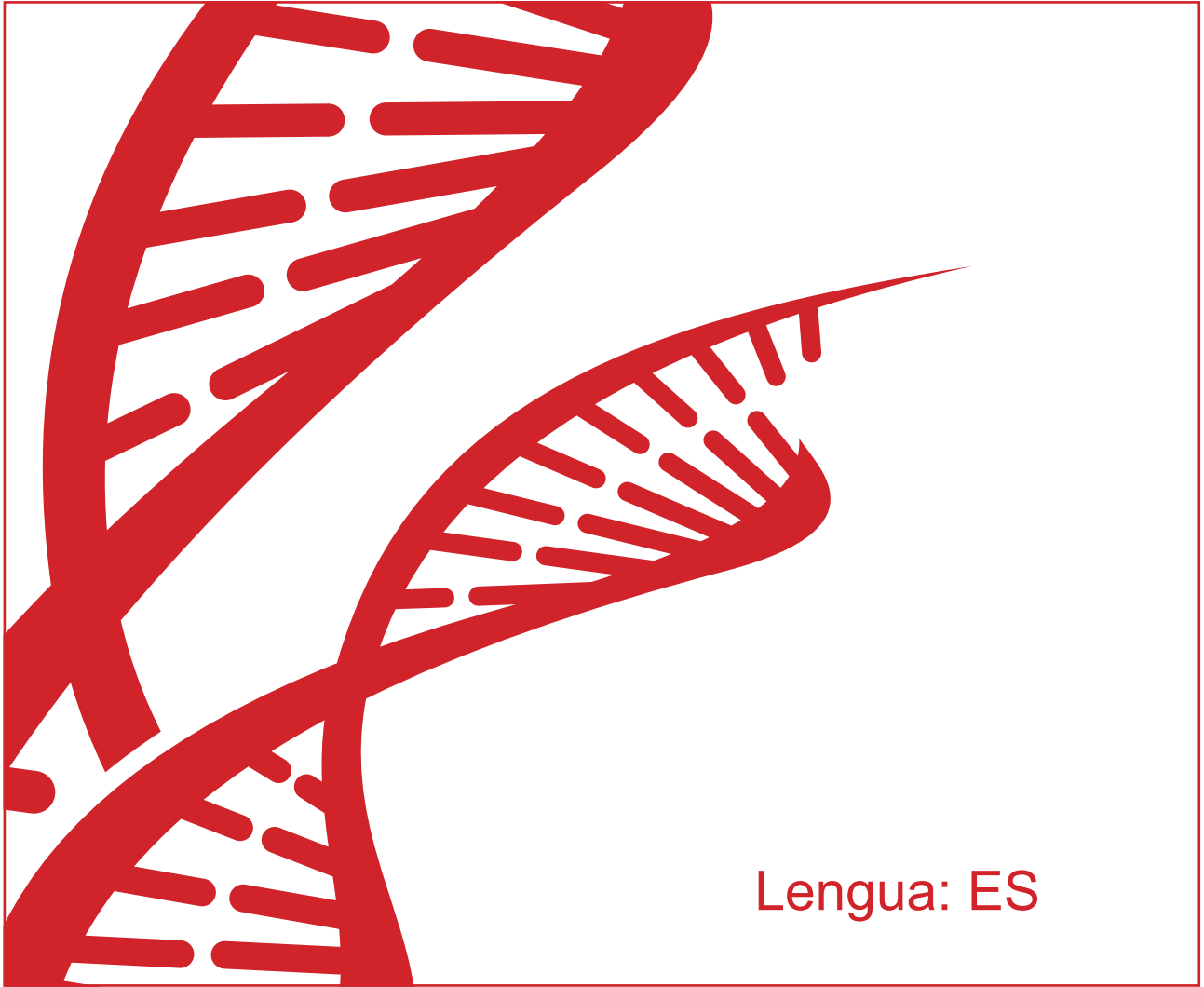


Instrucciones de uso RTP® Pathogen Kit



REF 1040500200
1040500300



50 preparaciones
250 preparaciones



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

INVITEK
Molecular

Notas importantes

Le agradecemos que haya comprado el **RTP® Pathogen Kit** de Invitek Molecular.

Este producto se utiliza para el aislamiento manual de ácidos nucleicos (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 RTP® Pathogen 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	10
3.3.1	Suero, plasma y otros fluidos corporales sin células	10
3.3.2	Frotis.....	10
3.3.3	Muestras de heces (sobrenadante).....	11
3.3.4	Cultivos bacterianos.....	11
3.3.5	Orina	11
3.3.6	Secreciones traqueales, BAL y expectoraciones.....	12
3.3.7	Tejidos biopsiados	12
3.3.8	Sobrenadantes de cultivo celular	12
3.4	Protocolo resumido del RTP® Pathogen.....	13
3.5	Protocolo: Aislamiento simultáneo de ADN bacteriano y ADN/ARN viral de muestras líquidas	14
4.	Apéndice	15
4.1	Solución de problemas.....	15
4.2	Garantía	16
4.3	Símbolos utilizados en el producto y las etiquetas	16
4.4	Otros documentos e información complementaria.....	17
4.5	Información para pedidos	17

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). Elimine los residuos del kit y los fluidos residuales de acuerdo con la normativa de su país; consulte la hoja de 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 **RTP® Pathogen Kit** al que se aplican:

Extraction Tube



Advertencia

H302-H315-H319-H335-H411-P280-
P305+P351+P338-EUH208

Wash Buffer R1



Advertencia

H302-H332-H412-P280-P305+P351+P338-EUH032

H302: Nocivo en caso de ingestión.

H315: Provoca irritación cutánea.

H319: Provoca irritación ocular grave.

H332: Nocivo en caso de inhalación.

H335: Puede irritar las vías respiratorias.

H411: Tóxico para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.

H412: Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.

P280: Llevar guantes/ropa de protección/equipo de protección para los ojos/la cara.

P305+P351+P338: EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.

EUH208: Contiene proteinasa, serina de *Tritirachium album*. Puede provocar una reacción alérgica.

EUH032: En contacto con ácidos libera gases muy tóxicos

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	1040500200	1040500300
Extraction Tube (tubo de extracción)	50 viales	5 x 50 viales
Resuspension Buffer R (tampón de resuspensión R)	30 ml/frasco	150 ml/frasco
Binding Solution (solución de unión) (99,7 % de isopropanol)	Frasco vacío (volumen final 30 ml)	Frasco vacío (volumen final 1200 ml)
Wash Buffer R1 (tampón de lavado R1)	20 ml/frasco (volumen final 40 ml)	80 ml/frasco (volumen final 160 ml)
Wash Buffer R2 (tampón de lavado R2)	12 ml/frasco (volumen final 60 ml)	50 ml/frasco (volumen final 250 ml)
Elution Buffer R (tampón de elución R)	15 ml/frasco	60 ml/frasco
RTA Spin Filter Set (juego de filtros de centrifugación)	50 juegos	5 x 50 juegos
RTA Receiver Tubes (tubos receptores RTA)	3 x 50 viales	15 x 50 viales
1.5 ml Receiver Tubes (tubos receptores de 1,5 ml)	50 viales	5 x 50 viales
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:

- 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)

*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 R1 y Wash Buffer R2: después de añadir etanol, deben cerrarse herméticamente y guardarse a temperatura ambiente.

Binding Solution: después de añadir isopropanol, debe cerrarse herméticamente y guardarse a temperatura ambiente

2.4 Uso previsto

El **RTP® Pathogen 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 bacteriano y ARN/ADN vírico.

El kit puede utilizarse para una variedad de tipos de muestras humanas, como suero y plasma (de sangre estabilizada en EDTA o citrato pero no en heparina), líquido enjuagado de hisopos, esputo pretratado, BAL, secreción traqueal, sobrenadante de suspensión de heces, bacterias cultivadas, 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
<ul style="list-style-type: none">Suero, plasma, otros fluidos corporales sin células y orinaFrotis (secos, estabilizados)Sobrenadante de suspensiones fecalesCultivos bacterianosSecreciones traqueales, BAL y expectoracionesSobrenadante de cultivo celular Hasta 10 mg de muestra de tejido	Depende de la muestra (almacenamiento y origen)	Depende del tipo de muestra, ácidos nucleicos objetivo	aprox. 20 min (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 y el título viral.

El kit solo es adecuado para las muestras de plasma y suero que contengan EDTA o citrato (no heparina) como anticoagulante. Al determinar el rendimiento se debe tener en cuenta que los ácidos nucleicos purificados con este kit contienen Carrier RNA (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 **RTP® Pathogen 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 y ADN bacteriano usando un protocolo de columna de centrifugación de lisis, unión, lavado y elución.

Aplicaciones posteriores:

El rendimiento y la calidad de los ácidos nucleicos aislados son generalmente adecuados para muchas aplicaciones de diagnóstico molecular, como técnicas PCR, NGS y métodos de hibridación. Las aplicaciones posteriores deben realizarse siguiendo las especificaciones del fabricante relevante.

2.6 Principio y procedimiento

1. Muestras lisadas

El kit incluye Extraction Tubes que contienen una mezcla liofilizada de Carrier RNA, Proteinase K, enzimas líticas y Lysis Buffer para realizar una lisis de la muestra en 1 paso. Para iniciar el proceso de extracción, añada la muestra al Extraction Tube.

Las muestras se lisan a distintos niveles de alta temperatura sin dejar de agitarse.

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 R1 y Wash Buffer R2, 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 60-200 µl de Elution Buffer R.

3. Extracción de ácido nucleico con el RTP® Pathogen 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
Binding Solution (frasco vacío): Añada 30 ml de isopropanol al 99,7 % (para biología molecular) al frasco. El frasco debe mantenerse cerrado herméticamente en todo momento.
Wash Buffer R1: Añada 20 ml de isopropanol al 99,7 % al frasco. Mezcle bien, manteniendo el frasco cerrado herméticamente en todo momento.
Wash Buffer R2: Añada 48 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
Binding Solution (frasco vacío): Añada 120 ml de isopropanol al 99,7 % (para biología molecular) al frasco. El frasco debe mantenerse cerrado herméticamente en todo momento.
Wash Buffer R1: Añada 80 ml de isopropanol al 99,7 % al frasco. Mezcle bien, manteniendo el frasco cerrado herméticamente en todo momento.
Wash Buffer R2: Añada 200 ml de etanol al 96-100 % al frasco. Mezcle bien, manteniendo el frasco cerrado herméticamente en todo momento.

- Ajuste el agitador térmico a 37 °C.
- Ajuste el agitador térmico/los bloques de calentamiento a 65 °C y 95 °C
- Caliente la cantidad necesaria de **Elution Buffer R** a 65 °C (se necesitan 60-200 µl de **Elution Buffer R** 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).

Control de extracción

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

El ADN o ARN de control de extracción debe añadirse al lisado tras el paso de calentamiento. Para maximizar la eficiencia de la purificación, las moléculas del control de extracción deben ser superiores a 100 nucleótidos, ya que las moléculas más pequeñas no se recuperan con eficacia.

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.

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, hay que pelletizar y resuspender las bacterias tal como se describe en el método correspondiente de preparación de la muestra.

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.

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 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tejidos biopsiados: Las muestras deben congelarse inmediatamente y almacenarse a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ o $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. 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.

3.3 Preparación de los materiales iniciales

A continuación se describe la preparación de la lisis de la muestra para distintos materiales iniciales.

Cuando haya preparado los materiales iniciales, consulte el capítulo 3.5 «Protocolo: Aislamiento simultáneo de ADN bacteriano y ADN/ARN viral de muestras líquidas» y siga el paso 1a) o 1b) 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 hasta 200 μl de muestra y ajuste el volumen a 400 μl con Resuspension Buffer R.

3.3.2 Frotis

a) Frotis secos

Aclare los frotis en un vial adecuado con el menor volumen posible de PBS o Resuspension Buffer R (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 400 μl para el protocolo de extracción.

Como alternativa, coloque 400 μl de Resuspension Buffer R en el Extraction Tube y aclare el frotis directamente en el tampón de lisis disuelto.

b) Frotis en líquido de estabilización

Utilice 200 μl de la solución de estabilización y ajuste el volumen a un total de 400 μl con Resuspension Buffer R. Aclare el frotis y presiónelo contra la pared interna del vial antes de extraerlo.

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).

3.3.3 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 Resuspension Buffer R. Agite durante 30 s y, a continuación, centrifugue a 12 000 x g durante 1 minuto. Utilice hasta 200 µl de sobrenadante y ajuste el volumen a 400 µl con Resuspension Buffer R. 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 Resuspension Buffer R. Agite durante 30 s y, a continuación, centrifugue a 1000 x g durante 1 minuto. Utilice hasta 200 µl de sobrenadante y ajuste el volumen a 400 µl con Resuspension Buffer R. Asegúrese de que la muestra no contenga partículas sólidas.

3.3.4 Cultivos bacterianos

Transfiera 1 ml del 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 400 µl de Resuspension Buffer R.

3.3.5 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 400 µl de Resuspension Buffer R.

En algunas aplicaciones se puede usar orina fresca directamente: Utilice hasta 200 µl de muestra, ajuste el volumen a 400 µl con Resuspension Buffer R e inicie el protocolo de extracción.

3.3.6 Secreciones traqueales, BAL y expectoraciones

a) Muestras no viscosas o poco viscosas

Mezcle bien la muestra siempre antes de la extracción.

Utilice hasta 200 µl de muestra y ajuste el volumen a 400 µl con Resuspension Buffer R.

b) Aislamiento de bacterias 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 400 µl de PBS o Resuspension Buffer R.

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 hasta 200 µl de muestra y ajuste el volumen a 400 µl con Resuspension Buffer R.

3.3.7 Tejidos biopsiados

Coloque 400 µl de Resuspension Buffer R en el Extraction Tube. Añada 1-10 mg de muestra de tejido biopsiado al tampón de lisis disuelto.

Para la lisis, con tejidos difíciles de lisar, como el cartílago, el riñón y el miocardio, se recomienda la agitación con perlas de zirconio.

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. No permita las partículas sólidas.

Continúe con el paso 2 del protocolo

3.3.8 Sobrenadantes de cultivo celular

Utilice hasta 200 µl de muestra y ajuste el volumen a 400 µl con Resuspension Buffer R.

3.4 Protocolo resumido del RTP® Pathogen



Muestras lisadas

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

1. Añada 400 µl de material de muestra con el volumen ajustado al Extraction Tube

Realice los pasos de calentamiento que se indican a continuación en un mezclador térmico sin dejar de agitar:

a) Aislamiento simultáneo de ácidos nucleicos víricos y bacterianos:

Incube a 37 °C durante 10 min

Incube a 65 °C durante 15 min

Opcional: Incube a 95 °C durante 10 min

b) Aislamiento de ácidos nucleicos víricos:

Incube a 65 °C durante 10 min

Opcional: incube a 95 °C durante 10 min

Añada el control de extracción tras la lisis.

Unir ácidos nucleicos

2. Añada 400 µl de **Binding Solution** y mezcle mediante absorción y expulsión con una pipeta o mediante agitación.

Transfiera la muestra a un juego de RTA Spin Filters

Incube durante 1 min

Centrifugue a 11 000 x g durante 2 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

- c) Añada 500 µl de **Wash Buffer R1** 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.

- d) Añada 700 µl de **Wash Buffer R2** 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.

- e) Centrifugue a velocidad máxima durante 4 minutos para eliminar los restos de etanol

Deseche el RTA Receiver Tube con filtrado.

Eluir los ácidos nucleicos

- f) Coloque el filtro de centrifugación en un 1.5 ml Receiver Tube
Añada 60 µl de **Elution Buffer R** (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 ADN bacteriano y ADN/ARN viral de muestras líquidas

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

1. Añada 400 µl de material de muestra al **Extraction Tube**. Dependiendo del material inicial, el volumen de la muestra debe ajustarse a 400 µl con **Resuspension Buffer R** o tampón PBS; agite brevemente.

Dependiendo del tipo de muestra y del ácido nucleico objetivo, realice los pasos de a) o b) en un mezclador térmico sin dejar de agitar:

a) Aislamiento de ADN bacteriano o aislamiento simultáneo de ácidos nucleicos víricos y bacterianos

Incube a 37 °C durante 10 min.

Incube a 65 °C durante 15 min.

Para los tejidos o bacterias difíciles de lisar (como las micobacterias), se recomienda una incubación adicional de 10 min a 95 °C.

b) Aislamiento de ácidos nucleicos víricos

Incube a 65 °C durante 10 min.

Para las muestras difíciles de lisar, como los tejidos, se recomienda una incubación adicional de 10 min a 95 °C.

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

2. Añada 400 µl de **Binding Solution** y mezcle la muestra por completo mediante absorción y expulsión con una pipeta o mediante agitación.
Transfiera la muestra a un juego de RTA Spin Filters e incube durante 1 min.
Centrifugue a 11 000 x g durante 2 min.
Deseche el RTA Receiver Tube con filtrado y coloque el RTA Spin Filter en un RTA Receiver Tube nuevo.
3. Añada 500 µl de **Wash Buffer R1** 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 R2** 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.
5. Elimine los restos de etanol con una fase final de centrifugación de 4 min a máxima velocidad.
Deseche el RTA Receiver Tube con filtrado.
6. Coloque el filtro de centrifugación en un 1.5 ml Receiver Tube y añada 60 µl de **Elution Buffer R** (precalentado a 65 °C) directamente a la superficie del RTA Spin Filter.
Incube a temperatura ambiente durante 1 minuto y centrifugue a 11 000 x g durante 1 minuto.

4. Apéndice

4.1 Solución de problemas

Problema	Causa posible	Recomendación
Cantidad reducida de ácidos nucleicos	Lisis celular insuficiente	Incremente el tiempo de la lisis 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 R precalentado a 5-10 min Eluya dos veces con 100 µl de Elution Buffer R Utilice un volumen más alto de Elution Buffer R
	Concentración baja de ácido nucleico en la muestra	Eluya los ácidos nucleicos con un volumen menor de Elution Buffer R ; no utilice menos de 40 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.
Degradación de los ácidos nucleicos	Material viejo	Asegúrese de que el material inicial se almacene en las condiciones adecuadas (-20 °C/-80 °C).
	Transferencia de etanol durante la elución	Aumente la duración de la fase de secado para eliminar el etanol.
Mal rendimiento de los ácidos nucleicos en las aplicaciones posteriores (p. ej. NGS o PCR en tiempo real)	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.
	Lisis celular insuficiente	Vea más arriba
Residuos de color en el RTA Spin Filter tras el lavado	Lavado insuficiente	Repita el paso de lavado
	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
RTP® Pathogen Kit	50 preparaciones	1040500200
RTP® Pathogen Kit	250 preparaciones	1040500300

Historial de revisiones

Revisión	Fecha	Descripción
ES-v1-2022	2022-05-18	Nuevo documento
ES-v2-2022	2022-06-30	Error de forma relativo a la designación Resuspension Buffer R

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>

2022-06-30 ES-v2-2022