

MACHEREY-NAGEL

Manual del usuario



Aislamiento de ácido nucleico viral

■ NucleoSpin® Dx Virus



IVD Producto sanitario para diagnóstico *in vitro*

REF 740895.50

 MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG
Valenciener Str. 11 · 52355 Düren · Alemania

 50 preparaciones

 Abril 2022/Rev. 07



Contact MN

Germany and international

MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG
Valenciener Str. 11 · 52355 Düren · Germany
Tel.: +49 24 21 969-0
Toll-free: 0800 26 16 000 (Germany only)
E-mail: info@mn-net.com

Technical Support Bioanalysis

Tel.: +49 24 21 969-270
E-mail: tech-bio@mn-net.com

USA

MACHEREY-NAGEL Inc.
924 Marcon Blvd. · Suite 102 · Allentown PA, 18109 · USA
Toll-free: 888 321 6224 (MACH)
E-mail: sales-us@mn-net.com

France

MACHEREY-NAGEL SAS
1, rue Gutenberg – BP135 · 67720 Hoerdt Cedex · France
Tel.: +33 388 68 22 68
E-mail: sales-fr@mn-net.com

MACHEREY-NAGEL SAS (Société par Actions Simplifiée) au capital de 186600 €
Siret 379 859 531 00020 · RCS Strasbourg B379859531 · N° intracommunautaire FR04 379 859 531

Switzerland









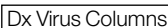

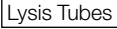
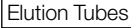

MACHEREY-NAGEL AG
Hirsackerstr. 7 · 4702 Oensingen · Switzerland
Tel.: +41 62 388 55 00
E-mail: sales-ch@mn-net.com

Índice

1 Componentes	4
1.1 Contenido del kit	4
1.2 Reactivos, consumibles y equipos que debe proporcionar el usuario	5
1.3 Acerca de este manual del usuario	6
2 Descripción del producto	7
2.1 Uso previsto	7
2.2 Limitaciones de uso del producto	7
2.3 Control de calidad	8
2.4 Introducción y especificaciones del kit	8
2.5 Rendimiento analítico y clínico	10
2.6 Observaciones sobre la calidad y la preparación de las muestras	12
2.7 Observaciones relativas a la elución	12
3 Condiciones de almacenamiento y preparación de las soluciones de trabajo	13
4 Instrucciones de seguridad	14
4.1 Eliminación	14
5 Purificación de ácido nucleico viral con NucleoSpin® Dx Virus	15
5.1 Protocolo de un vistazo	16
5.2 Procedimiento de aislamiento de ARN viral	18
5.3 Procedimiento de aislamiento de ADN viral	20
5.4 Procedimiento de aislamiento simultáneo de ARN y ADN virales	22
6 Anexo	24
6.1 Resolución de problemas	24
6.2 Obligación de notificación	25
6.3 Bibliografía general	25
6.4 Información para pedidos	25
6.5 Explicación de los símbolos	26
6.6 Restricción de uso del producto/garantía	26

1 Componentes

1.1 Contenido del kit

NucleoSpin® Dx Virus		
REF	Símbolo	50 preparaciones 740895.50
Lysis Buffer RAV1		35 mL
Wash Buffer RAW		30 mL
Wash Buffer RAV3 (Concentrate)*		12 mL
RNase-free H ₂ O		13 mL
Elution Buffer RE**		13 mL
Carrier RNA (lyophilized)*		1 mg
Proteinase Buffer PB		1.8 mL
Proteinase K (lyophilized)*		30 mg
NucleoSpin® Dx Virus Columns (dark blue rings -plus Collection Tubes)		50
Collection Tubes (2 mL)		4 × 50
Lysis Tubes (1.5 mL)		50
Elution Tubes (1.5 mL)		50
User manual		1

* Para la preparación de las soluciones de trabajo y las condiciones de almacenamiento, consulte el apartado 3.

** Composición de Elution Buffer RE: 5 mM de Tris/HCl, pH 8,5

1.2 Reactivos, consumibles y equipos que debe proporcionar el usuario

Reactivos

- Etanol al 96 – 100 % (para ajustar las condiciones de unión del ácido nucleico y para preparar Wash Buffer RAV3)

Consumibles

- Puntas de pipeta desechables (se recomiendan puntas de pipetas de barrera de aerosol para evitar contaminaciones cruzadas)

Equipo

- Pipeteadores manuales
- Centrifugadora para tubos de microcentrifugadora
- Agitadora vorticial
- Bloque calefactor o baño de agua para incubación a 70 °C
- Equipo de protección personal (p. ej., bata de laboratorio, guantes, gafas)

1.3 Acerca de este manual del usuario

Se recomienda encarecidamente leer el apartado detallado de protocolo de este manual del usuario. Resumiendo, el protocolo está diseñado para usarse únicamente como herramienta complementaria para una consulta rápida mientras se realiza el procedimiento de purificación.

Los manuales del usuario MACHEREY-NAGEL están disponibles en Internet, en www.mn-net.com.

Diríjase al servicio técnico para informarse sobre los cambios del manual de usuario actual con respecto a las revisiones anteriores o actualizadas.

Datos de contacto

MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG
Valenciennner Str. 11
52355 Duren
Alemania
Tel.: +49 24 21 969-0
Llamada gratuita: 0800 26 16 000 (solo Alemania)
Correo electrónico: info@mn-net.com

Soporte técnico Bioanálisis

Tel.: +49 24 21 969-270
Correo electrónico: tech-bio@mn-net.com

Benutzerhandbuecher in weiteren Sprachen sind im Download-Bereich auf der Produktseite verfügbar.

Les manuels d'utilisation dans d'autres langues sont disponibles dans la section Telechargements de la page du produit.

Los manuales del usuario en otros idiomas están disponibles en la sección de descargas de la página del producto.



2 Descripción del producto

2.1 Uso previsto

NucleoSpin® Dx Virus es un kit para el aislamiento de ácidos nucleicos virales a partir de suero y plasma humanos tanto recién extraídos como congelados, estabilizados con EDTA o citrato, obtenidos mediante los sistemas de extracción de sangre habituales para el posterior análisis *in vitro*. Con este producto se obtienen ácidos nucleicos virales purificados que después se utilizan en análisis posteriores, como (RT)-PCR, qPCR, qRT-PCR o secuenciación, para obtener información sobre las infecciones por virus. Este producto lo emplean profesionales en laboratorios de diagnóstico.

El kit **NucleoSpin® Dx Virus** no es adecuado para el autoanálisis ni los análisis inmediatos. El usuario debe tener experiencia con las técnicas de biología molecular, por ejemplo, con el suero, el plasma y otros materiales de muestra humanos potencialmente infecciosos.

Se recomienda el uso de controles adecuados, como internos, de extracción y positivos/negativos.

2.2 Limitaciones de uso del producto

El kit **NucleoSpin® Dx Virus** no está destinado al uso con sangre humana completa, tejidos, muestras de heces o células cultivadas.

El rendimiento del kit no se ha evaluado con otras muestras de líquidos sin células como orina o líquido cefalorraquídeo.

El kit tampoco está especificado para el aislamiento y la purificación de ácidos nucleicos de bacterias, hongos o parásitos procedentes de muestras humanas, ni para el aislamiento de ácidos nucleicos virales procedentes de muestras de frotis humanos u otros sistemas de recogida de muestras.

Además de muestras humanas, con el kit **NucleoSpin® Dx Virus** también se pueden utilizar fácilmente muestras animales recién extraídas y congeladas. Las muestras son, p. ej., de suero, plasma o frotis. Hay que señalar que el marcado CE IVD del kit no se aplica a las muestras animales, sino que se limita al uso diagnóstico humano.

2.3 Control de calidad

De acuerdo con el sistema de gestión de calidad de MACHEREY-NAGEL, cada lote del kit **NucleoSpin® Dx Virus** se somete a pruebas con especificaciones predeterminadas para garantizar la calidad homogénea del producto.

2.4 Introducción y especificaciones del kit

NucleoSpin® Dx Virus se basa en la consolidada tecnología de membranas de sílice **NucleoSpin®** y brinda una manera sencilla de aislar simultáneamente el ARN y el ADN virales a partir de 150 µL de muestras de suero o plasma. El ARN y el ADN purificados están listos para el uso en amplificaciones posteriores como RT-PCR o PCR.

El método **NucleoSpin® Dx Virus** se basa en una serie de pasos sencillos:

En primer lugar, las muestras de suero o plasma se lisan en presencia de sales caotrópicas. Para purificar el ADN viral, se añade Proteinase K a la reacción de lisis. El tampón de lisis y el etanol crean condiciones propicias para la unión de los ácidos nucleicos a la membrana de sílice de las **NucleoSpin® Dx Virus Columns**. Carrier RNA mejora la unión y la recuperación del ARN y ADN virales de baja concentración. Las contaminaciones (inhibidores potenciales de la PCR), como sales, metabolitos y componentes celulares macromoleculares solubles, se eliminan en los pasos de lavado con los tampones etanólicos RAW y RAV3. Los ácidos nucleicos se eluyen finalmente en 50 µL de tampón de baja salinidad o en agua.

Carrier RNA

Se incluye Carrier RNA para un rendimiento óptimo. Carrier RNA mejora la unión de los ácidos nucleicos virales a las **NucleoSpin® Columns** y reduce el riesgo de degradación del ARN viral. Tenga en cuenta que los eluidos del kit **NucleoSpin® Dx Virus** contienen tanto ácidos nucleicos virales como Carrier RNA, pudiendo ser las cantidades de Carrier RNA mayores que las de ácidos nucleicos virales. Por lo tanto, no es posible cuantificar los ácidos nucleicos aislados con el kit por medio de métodos fotométricos o fluorométricos si se utiliza Carrier RNA. Por consiguiente, se recomiendan otros métodos de cuantificación, como sistemas específicos de PCR cuantitativa o RT-PCR. Además, Carrier RNA puede inhibir en casos aislados las reacciones de PCR. En consecuencia, la cantidad de Carrier RNA añadida puede optimizarse cuidadosamente en función del sistema de PCR concreto utilizado.

Especificaciones del kit

- **NucleoSpin® Dx Virus** está diseñado para la preparación rápida de ARN y ADN virales de alta pureza (p. ej., VHC, VIH, VHB, CMV, H1N1) a partir de plasma y suero.
- **NucleoSpin® Dx Virus** es adecuado para 150 µL de muestras de suero o plasma.
- Los ácidos nucleicos virales aislados y purificados con **NucleoSpin® Dx Virus** pueden utilizarse en aplicaciones cualitativas (p. ej., RT-PCR o PCR para el cribado de sangre), así como en aplicaciones cuantitativas (p. ej., detección de la carga viral mediante qPCR), empleando técnicas diagnósticas de amplificación de ácidos nucleicos.
- En el manual del usuario se incluyen los protocolos para el aislamiento del ARN viral y el ADN viral y el aislamiento simultáneo del ARN y el ADN virales.
- Los ácidos nucleicos preparados son aptos para aplicaciones como la secuenciación automatizada del ADN por terminador fluorescente, la RT-PCR o cualquier tipo de reacción enzimática. El límite de detección de determinados virus depende de los

procedimientos individuales (p. ej., [RT-]PCR con cebadores internos). Para minimizar las irregularidades en los resultados diagnósticos, se deben utilizar controles adecuados para las aplicaciones posteriores (p. ej., controles de extracción, controles positivos/negativos) a fin de supervisar el proceso de purificación, amplificación y detección.

- Además de muestras humanas, con el kit **NucleoSpin® Dx Virus** también se pueden utilizar fácilmente muestras animales recién extraídas y congeladas. Las muestras son, p. ej., de suero, plasma o frotis. Hay que señalar que el marcado CE IVD del kit no se aplica a las muestras animales, sino que se limita al uso diagnóstico humano.

Tabla 1: Especificaciones del kit de un vistazo

Parámetro	NucleoSpin® Dx Virus
Tecnología	Tecnología de membranas de sílice
Material de muestra	Suero o plasma
Volumen de muestra	150 µL
Volumen de elución	50 µL
Tiempo de preparación	30 min/4 – 6 preparaciones
Procesamiento	Centrifugado

2.5 Rendimiento analítico y clínico

El intervalo lineal del procedimiento **NucleoSpin® Dx Virus** se ha determinado para el ARN del VHC y el ADN del VHB en ensayos diagnósticos posteriores (Figura 1 y Figura 2). El kit muestra una linealidad de varios órdenes de magnitud, que comprende valores virales relevantes para el diagnóstico. Se analizó la repetibilidad en las series mediante RT-qPCR de MS2-ARN y qPCR de T7-ADN. Para seis cantidades de espículas (cada una por triplicado, abarcando diferentes órdenes de magnitud), el coeficiente de variación (CV) de los valores Cp fue 0,2–0,9 % para T7-ADN y 0,6–5,6 % para MS2-ARN. Se analizó la repetibilidad entre series en 2 series independientes. Con seis muestras de plasma cada una, la diferencia entre los valores Ct medios de las dos series fue 0,1 ciclos, lo que corresponde a un 0,4 %. Se analizó la repetibilidad de un lote a otro con tres lotes de NucleoSpin® Dx Virus. Se aisló el gDNA a partir de muestras de plasma para cada lote (n= 6). El valor Ct medio para los tres lotes analizados fue 27,63 Ct, con una desviación estándar de 0,07 valor Ct. De manera similar, se aisló una espícula de MS2-ARN a partir de muestras de plasma, la cual se analizó mediante qRT-PCR. El valor Ct medio para los tres lotes analizados fue 25,34 Ct, con una desviación estándar de 0,25 valor Ct.

Se analizó la reproducibilidad entre operadores mediante RT-qPCR de MS2-ARN. En dos series realizadas por dos operadores con seis muestras de plasma cada una, la diferencia entre los valores Ct medios de los dos operadores fue de 0,6 ciclos, es decir, del 3 %.

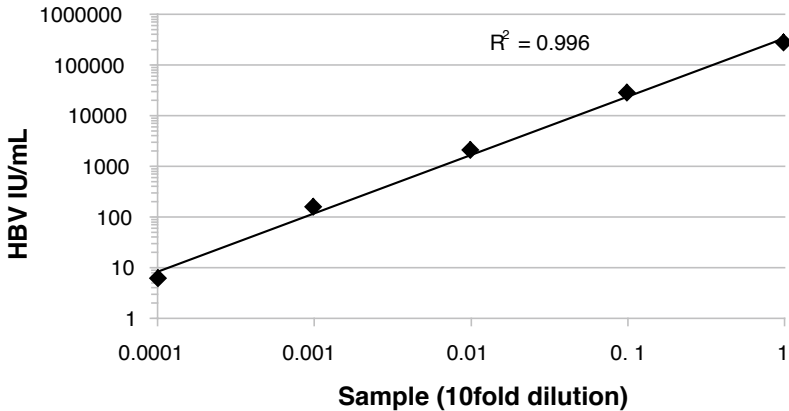


Figura 1 Dilución en serie de una muestra de plasma con alta carga viral por VHB.
PCR en tiempo real del ADN del VHB: Artus RealArt HBV DNA, cuantificación en Roche LightCycler® 480.

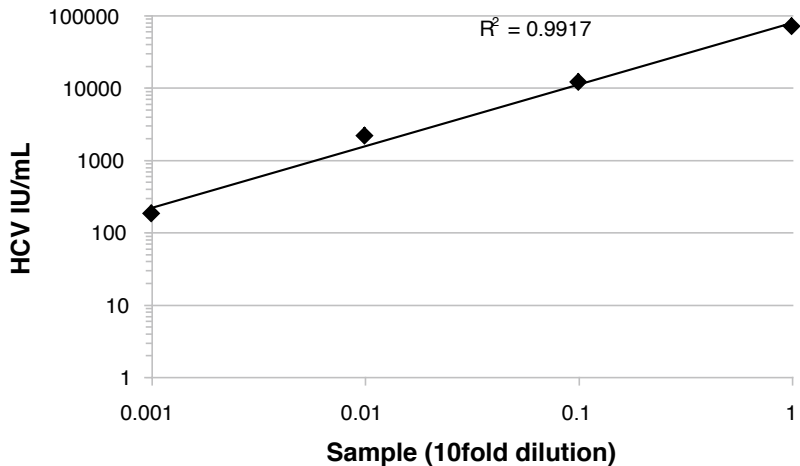


Figura 2 Dilución en serie de una muestra de plasma con alta carga viral por VHC.

RT-PCR en tiempo real del ARN del VHC: Artus RealArt HCV RNA, cuantificación en Roche LightCycler® 480.

Para la evaluación del rendimiento clínico, se aislaron los ácidos nucleicos virales de muestras de plasma y se amplificaron en análisis qPCR y RT-qPCR. La carga viral obtenida con NucleoSpin® Dx Virus se comparó con un sistema de referencia (sistema automatizado de aislamiento de ácido nucleico de Abbott). Para cada virus, se evaluaron 8 muestras positivas y 2 negativas, así como 1 control positivo y otro negativo. Para el VHB, la sensibilidad y la especificidad diagnósticas fueron del 100 %. Para el VHC, la sensibilidad diagnóstica fue del 89 % y la especificidad diagnóstica, del 100 %. Para el VIH, la sensibilidad diagnóstica fue del 78 % y la especificidad diagnóstica, del 100 %.

El uso diagnóstico *in vitro* de **NucleoSpin® Dx® Virus** se ejemplifica en las siguientes publicaciones:

Raharinosy, V. *et al.* (2019) Fast, Sensitive and Specific Detection of Thailand orthohantavirus and its Variants Using One-Step Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction Assay. *Viruses*, 11(8), 718.

Kassela, K. *et al.* (2019) Intergenotypic 2k/1b hepatitis C virus recombinants in the East Macedonia and Thrace region of Greece. *Ann Gastroenterol.*, 32(1), 88–92.

Mousavi, S. H. *et al.* (2019) First Report of Prevalence of Blood-Borne Viruses (HBV, HCV, HIV, HTLV-1 and Parvovirus B19) Among Hemophilia Patients in Afghanistan. *Sci Rep.*, 9(1), 7259.

Hesamizadeh, K. *et al.* (2016) Molecular Epidemiology of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpes Virus, and Risk Factors in HIV-infected Patients in Tehran, 2014. *Iran Red Crescent Med J.*, 18(11), e32603.

Lescure, F.-X. *et al.* (2020) Clinical and virological data of the first cases of COVID-19 in Europe: a case series. *The Lancet Infectious Diseases*, 20(6), 697.

Thacker, V. V. *et al.* (2020) Rapid endothelialitis and vascular inflammation characterise SARS-CoV-2 infection in a human lung-on-chip model, *BioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2020.08.10.243220>, 2020

Gabaro, F. *et al.* (2020) Introductions and early spread of SARS-CoV-2 in France, BioRxiv, <https://doi.org/10.1101/2020.04.24.059576>

2.6 Observaciones sobre la calidad y la preparación de las muestras

- **NucleoSpin® Dx Virus** es apto para muestras de suero o plasma humanos. Es muy importante no aclarar las muestras por centrifugado/filtración antes del paso de lisis RAV1, ya que los virus pueden estar asociados a partículas o agregados.
- Para una purificación correcta del ácido nucleico, es importante obtener un lisado de muestra homogéneo, claro y no viscoso antes de ajustar las condiciones de unión y cargar la muestra en la **NucleoSpin® Dx Virus** Column. Comprobar todos los lisados (especialmente de muestras antiguas o congeladas) para ver si hay precipitados. La incubación con Buffer RAV1 se puede prolongar para disolver y digerir las estructuras celulares residuales, los precipitados y las partículas de virus. Sin embargo, el ARN es sensible y una incubación prolongada puede reducir el rendimiento.

2.7 Observaciones relativas a la elución

- Los ácidos nucleicos puros se eluyen finalmente en condiciones de baja fuerza iónica con RNase-free H₂O (pH de aprox. 7–8) o Buffer RE ligeramente alcalino (5 mM Tris-HCl, pH 8,5), ambos suministrados con **NucleoSpin® Dx Virus**.
- El ARN se debe eluir con RNase-free H₂O y el ADN con Elution Buffer RE.
- Para eluir ambos tipos de ácidos nucleicos juntos, utilice el RNase-free H₂O que se suministra con el kit, precalentado a 70 °C.

Almacenamiento de los ácidos nucleicos

Recomendación:

Almacenamiento a corto plazo (hasta 24 h): 2–8 °C

Almacenamiento a largo plazo (más de 24 h): -20 °C

3 Condiciones de almacenamiento y preparación de las soluciones de trabajo

Atención: Buffer RAV1 contiene tiocianato de guanidinio y Buffer RAW contiene clorhidrato de guanidina, que pueden formar compuestos altamente reactivos si se combinan con lejía (hipoclorito de sodio). NO añada lejía ni soluciones ácidas directamente a los residuos de la preparación de la muestra.

- Tras la recepción del kit, compruebe si los componentes están dañados. Si el contenido del kit, como los frascos de tampón o los envases blíster, están dañados, diríjase al servicio técnico y al servicio de atención al cliente o al distribuidor local de MACHEREY-NAGEL.
- No utilice componentes del kit dañados.
- A su recepción, el kit **NucleoSpin® Dx Virus** se debe almacenar a temperatura ambiente (18–25 °C). NO es necesario abrir el kit tras la recepción y extraer los componentes individuales para guardarlos por separado.
- Las **NucleoSpin® Dx Virus Columns** se pueden utilizar hasta la fecha de caducidad indicada en la caja del kit.
- Utilice material sin ribonucleasa.

Antes de iniciar el protocolo **NucleoSpin® Dx Virus**, prepare lo siguiente:

- La **Proteinase K liofilizada** se puede almacenar a temperatura ambiente (18–25 °C) hasta la fecha de caducidad, sin disminución del rendimiento. Antes de utilizar el kit por primera vez, añada el volumen indicado de **Proteinase Buffer PB** para disolver la Proteinase K liofilizada. La Proteinase K reconstituida se debe almacenar a -20 °C durante un máximo de 6 meses, pero solo hasta la fecha de caducidad.
- Carrier RNA: Antes del primer uso, añada 1 mL de **Lysis Buffer RAV1** al vial de **Carrier RNA**. Disuelva Carrier RNA y vuelva a pipetear la solución al frasco de RAV1.
Nota: Debido al procedimiento de elaboración y a la pequeña cantidad de Carrier RNA que contiene el vial, Carrier RNA puede ser apenas visible.

Lysis Buffer RAV1, incluido Carrier RNA, se puede almacenar a 4 °C hasta 4 semanas. El almacenamiento a 4 °C o menos puede provocar la precipitación de sales. Si se aprecian precipitados, asegúrese de disolverlos antes del uso calentándolos a 40–60 °C durante un máximo de 5 minutos. Carrier RNA disuelto en Buffer RAV1 y guardado a -20 °C es estable como mínimo durante un año.

No caliente el Buffer RAV1 que contiene Carrier RNA más de 4 veces. El calentamiento frecuente, las temperaturas superiores a 80 °C y la incubación térmica prolongada acelerarán la degradación de Carrier RNA.

- **Wash Buffer RAV3:** Añada el volumen indicado (ver tabla inferior o el frasco) de etanol (96–100 %) al **Wash Buffer RAV3 Concentrate**. Marque la etiqueta del frasco para indicar que se ha añadido etanol. Guarde Wash Buffer RAV3 a temperatura ambiente. Wash Buffer RAV3 se puede almacenar a temperatura ambiente (18–25 °C) durante un máximo de un año, pero solo hasta la fecha de caducidad.

NucleoSpin® Dx Virus	
REF	50 preparaciones 740895.50
Wash Buffer RAV3 (concentrado)	12 mL Añadir 48 mL de etanol
Proteinase K	30 mg Añadir 1,35 mL de Proteinase Buffer PB

4 Instrucciones de seguridad

Cuando trabaje con el kit **NucleoSpin® DX Virus**, use prendas de protección adecuadas (p. ej., bata de laboratorio, guantes desechables y gafas de protección). Para más información, consulte las fichas de datos de seguridad (FDS, disponibles en línea en <http://www.mn-net.com/msds>).



Atención: El clorhidrato de guanidina en Buffer RAW y el tiocianato de guanidinio en Buffer RAV1 pueden formar compuestos altamente reactivos si se combinan con lejía. Por ello, no añada lejía ni soluciones ácidas directamente a los residuos de la preparación de la muestra.

No se ha analizado la presencia de materiales infecciosos residuales en los residuos generados con el kit **NucleoSpin® DX Virus**. Una contaminación de los residuos líquidos con material infeccioso residual es altamente improbable, debido al tampón de lisis intensamente desnaturalizante y al tratamiento con Proteinase K, pero no se puede excluir por completo. Por lo tanto, los residuos líquidos se deben considerar infecciosos y se deben manipular y eliminar de acuerdo con las normas de seguridad locales.

4.1 Eliminación

Elimine los materiales peligrosos, infecciosos o biológicamente contaminados de manera segura y aceptable y de acuerdo con todos los requisitos locales y reglamentarios.

5 Purificación de ácido nucleico viral con NucleoSpin® Dx Virus

Los procedimientos siguientes proporcionan instrucciones para procesar una única muestra de plasma o suero. Sin embargo, se pueden procesar varias muestras al mismo tiempo; el número depende de la capacidad de la microcentrifugadora utilizada.

Antes de iniciar la preparación:

- Verifique que Wash Buffer RAV3 y Proteinase K se hayan preparado de acuerdo con el apartado 3.
- Compruebe que Carrier RNA se haya disuelto en Lysis Buffer RAV1 de acuerdo con el apartado 3.
- Compruebe que se dispone de etanol al 96–100 % (desnaturalizado o no desnaturalizado) para ajustar las condiciones de unión del ácido nucleico.
- Ajuste una incubadora (p. ej., un bloque calefactor) o un baño de agua a 70 °C.
- Deje que las muestras de plasma/suero se ajusten a la temperatura ambiente (18–25 °C). Asegúrese de mezclar bien las muestras.
- Si se ha formado un precipitado en Lysis Buffer RAV1 o Buffer RAW, incube el tampón a 40–60 °C hasta que se haya disuelto el precipitado.
- Por regla general, no mezcle reactivos ni columnas de diferentes kits o lotes.
- Caliente RNase-free H₂O/Elution Buffer RE a 70 °C para la elución final de ácidos nucleicos.
- No añada la solución de Proteinase K directamente a Lysis Buffer RAV1. La muestra se debe combinar con Lysis Buffer RAV1 antes de añadir Proteinase K.
- Todos los pasos del centrifugado se deben llevar a cabo a temperatura ambiente (18–25 °C).

5.1 Protocolo de un vistazo

Vista general complementaria del protocolo:

Lea detenidamente el protocolo detallado (apartado 5.2 5.4) antes de iniciar el procedimiento.

Nota: Los protocolos solo difieren en el paso de lisis con Proteinase K (paso 3) y en el paso de elución (paso 24).

		Procedimiento de aislamiento de ARN viral (apartado 5.2)	Procedimiento de aislamiento de ADN viral (apartado 5.3)	Procedimiento de aislamiento de ARN +ADN virales (apartado 5.4)
Proporcionar la muestra, lisar los virus, aclarar el lisado	1	150 µL de muestra en Lysis Tubes	150 µL de muestra en Lysis Tubes	150 µL de muestra en Lysis Tubes
	2	600 µL de Buffer RAV1 con Carrier RNA	600 µL de Buffer RAV1 con Carrier RNA	600 µL de Buffer RAV1 con Carrier RNA
	3	<i>Nota: No se utiliza Proteinase K para aislar solo ARN viral</i>	20 µL de Proteinase K <i>(incubar al menos 1 min a temperatura ambiente)</i>	20 µL de Proteinase K <i>(incubar al menos 1 min a temperatura ambiente)</i>
	4	Pipetear la mezcla hacia arriba y abajo y agitar bien en una agitadora vorticial	Pipetear la mezcla hacia arriba y abajo y agitar bien en una agitadora vorticial	Pipetear la mezcla hacia arriba y abajo y agitar bien en una agitadora vorticial
	5	Incubar a 70 °C durante 5 min	Incubar a 70 °C durante 5 min	Incubar a 70 °C durante 5 min
	6	Giro rápido para limpiar la tapa	Giro rápido para limpiar la tapa	Giro rápido para limpiar la tapa
Ajustar las condiciones de unión	7	600 µL de etanol	600 µL de etanol	600 µL de etanol
	8	Mezclar con agitadora vorticial (10–15 s)	Mezclar con agitadora vorticial (10–15 s)	Mezclar con agitadora vorticial (10–15 s)
Unir el ARN/ADN	9	Cargar 700 µL de lisado en NucleoSpin® Dx Virus Column	Cargar 700 µL de lisado en NucleoSpin® Dx Virus Column	Cargar 700 µL de lisado en NucleoSpin® Dx Virus Column
	10	8000 g, 1 min	8000 g, 1 min	8000 g, 1 min

	11	Transferir la NucleoSpin® Dx Virus Column a un nuevo Collection Tube	Transferir la NucleoSpin® Dx Virus Column a un nuevo Collection Tube	Transferir la NucleoSpin® Dx Virus Column a un nuevo Collection Tube
	12	Cargar el lisado residual (aprox. 650 µL) en la columna	Cargar el lisado residual (aprox. 650 µL) en la columna	Cargar el lisado residual (aprox. 650 µL) en la columna
	13	8000 g, 1 min	8000 g, 1 min	8000 g, 1 min
	14	Transferir la NucleoSpin® Dx Virus Column a un nuevo Collection Tube	Transferir la NucleoSpin® Dx Virus Column a un nuevo Collection Tube	Transferir la NucleoSpin® Dx Virus Column a un nuevo Collection Tube
Lavar la membrana de sílice	15	500 µL de RAW	500 µL de RAW	500 µL de RAW
	16	8000 g, 1 min	8000 g, 1 min	8000 g, 1 min
	17	Transferir la NucleoSpin® Dx Virus Column a un nuevo Collection Tube	Transferir la NucleoSpin® Dx Virus Column a un nuevo Collection Tube	Transferir la NucleoSpin® Dx Virus Column a un nuevo Collection Tube
	18	600 µL de RAV3	600 µL de RAV3	600 µL de RAV3
	19	8000 g, 1 min	8000 g, 1 min	8000 g, 1 min
	20	Transferir la NucleoSpin® Dx Virus Column a un nuevo Collection Tube	Transferir la NucleoSpin® Dx Virus Column a un nuevo Collection Tube	Transferir la NucleoSpin® Dx Virus Column a un nuevo Collection Tube
	21	200 µL de RAV3	200 µL de RAV3	200 µL de RAV3
	22	11000 g, 3 min	11000 g, 3 min	11000 g, 3 min
Eluir el ARN/ ADN	23	Transferir la NucleoSpin® Dx Virus Column a un Elution Tube	Transferir la NucleoSpin® Dx Virus Column a un Elution Tube	Transferir la NucleoSpin® Dx Virus Column a un Elution Tube
	24	50 µL de RNase-free H₂O (70 °C); incubar 1–2 min	50 µL de Buffer RE (70 °C); incubar 1–2 min	50 µL de RNase-free H₂O (70 °C); incubar 1–2 min
	25	11 000 g, 1 min	11 000 g, 1 min	11 000 g, 1 min

5.2 Procedimiento de aislamiento de ARN viral

- 1 Proporcione **150 µL de muestra** en un Lysis Tube (1,5 mL, suministrado).
 - 2 Añada **600 µL de Buffer RAV1** con Carrier RNA al Lysis Tube.
 - 3 *Nota: No se utiliza Proteinase K para aislar solo ARN viral.*
 - 4 Pipetee la mezcla hacia arriba y abajo y agítela bien en una agitadora vorticial.
 - 5 Incube durante **5 min a 70 °C**.
 - 6 **Centrifugue brevemente** el Lysis Tube (aprox. 1 s a 2000 g) para eliminar las gotas de la tapa (solo un breve giro).
-
- 7 Añada **600 µL de etanol** (96–100 %) al lisado aclarado.
 - 8 Mezcle con la agitadora vorticial (10–15 s).
-
- 9 Cargue con cuidado **700 µL del lisado** introducido en un Collection Tube en la **NucleoSpin® Dx Virus Column** y cierre la tapa.
 - 10 **Centrifugue 1 min a 8000 g**.
 - 11 Introduzca la **NucleoSpin® Dx Virus Column** en un nuevo Collection Tube (2 mL, suministrado) y elimine el Collection Tube con el flujo del paso anterior.
 - 12 Cargue el **lisado residual** (aprox. 650 µL) en la NucleoSpin® Dx Virus Column y cierre la tapa.
 - 13 **Centrifugue 1 min a 8000 g**.
 - 14 Introduzca la NucleoSpin® Dx Virus Column en un nuevo Collection Tube (2 mL, suministrado) y elimine el Collection Tube con el flujo del paso anterior.
-
- 15 Añada **500 µL de Buffer RAW** a la NucleoSpin® Dx Virus Column.
 - 16 **Centrifugue 1 min a 8000 g**.
 - 17 Introduzca la NucleoSpin® Dx Virus Column en un nuevo Collection Tube (2 mL, suministrado) y elimine el Collection Tube con el flujo del paso anterior.
 - 18 Añada **600 µL de Buffer RAV3** a la NucleoSpin® Dx Virus Column.
 - 19 **Centrifugue 1 min a 8000 g**.
 - 20 Introduzca la NucleoSpin® Dx Virus Column en un nuevo Collection Tube (2 mL, suministrado) y elimine el Collection Tube con el flujo del paso anterior.
 - 21 Añada **200 µL de Buffer RAV3** a la NucleoSpin® Dx Virus Column.
 - 22 **Centrifugue 3 min a 11000 g**.
-
- 23 Introduzca la NucleoSpin® Dx Virus Column en un nuevo Elution Tube (1,5 mL, suministrado) y elimine el Collection Tube con el flujo del paso anterior.

- 24** Añada **50 µL de RNase-free H₂O** (precalentada a 70 °C) e incube durante 1 –2 min.
 - 25** **Centrifugue 1 min a 11 000 g** para eluir el ácido nucleico de la columna.
-

5.3 Procedimiento de aislamiento de ADN viral

- 1 Proporcione **150 µL de muestra** en un Lysis Tube (1,5 mL, suministrado).
 - 2 Añada **600 µL de Buffer RAV1** con Carrier RNA al Lysis Tube.
 - 3 Añada **20 µL de solución de Proteinase K** al Lysis Tube.
Nota: Proteinase K es necesaria para lisar los virus de ADN.
 - 4 Pipetee la mezcla hacia arriba y abajo y agítela bien en una agitadora vorticial.
Nota: Asegúrese de incubar la mezcla al menos 1 minuto a temperatura ambiente antes de iniciar la incubación térmica.
 - 5 Incube durante **5 min a 70 °C**.
 - 6 **Centrifugue brevemente** el Lysis Tube (aprox. 1 s a 2000 g) para eliminar las gotas de la tapa (solo un breve giro).
-
- 7 Añada **600 µL de etanol** (96–100 %) al lisado aclarado.
 - 8 Mezcle con la agitadora vorticial (10–15 s).
-
- 9 Cargue con cuidado **700 µL del lisado** introducido en un Collection Tube en la **NucleoSpin® Dx Virus Column** y cierre la tapa.
 - 10 **Centrifugue 1 min a 8000 g**.
 - 11 Introduzca la **NucleoSpin® Dx Virus Column** en un nuevo Collection Tube (2 mL, suministrado) y elimine el Collection Tube con el flujo del paso anterior.
 - 12 Cargue el **lisado residual** (aprox. 650 µL) en la NucleoSpin® Dx Virus Column y cierre la tapa.
 - 13 **Centrifugue 1 min a 8000 g**.
 - 14 Introduzca la NucleoSpin® Dx Virus Column en un nuevo Collection Tube (2 mL, suministrado) y elimine el Collection Tube con el flujo del paso anterior.
-
- 15 Añada **500 µL de Buffer RAW** a la NucleoSpin® Dx Virus Column.
 - 16 **Centrifugue 1 min a 8000 g**.
 - 17 Introduzca la NucleoSpin® Dx Virus Column en un nuevo Collection Tube (2 mL, suministrado) y elimine el Collection Tube con el flujo del paso anterior.
 - 18 Añada **600 µL de Buffer RAV3** a la NucleoSpin® Dx Virus Column.
 - 19 **Centrifugue 1 min a 8000 g**.
 - 20 Introduzca la NucleoSpin® Dx Virus Column en un nuevo Collection Tube (2 mL, suministrado) y elimine el Collection Tube con el flujo del paso anterior.
 - 21 Añada **200 µL de Buffer RAV3** a la NucleoSpin® Dx Virus Column.

22 Centrifugue 3 min a 11 000 g.

23 Introduzca la NucleoSpin® Dx Virus Column en un nuevo Elution Tube (1,5 mL, suministrado) y elimine el Collection Tube con el flujo del paso anterior.

24 Añada **50 µL de Buffer RE** (precalentado a 70 °C) e incube durante 1 – 2 min.

25 Centrifugue 1 min a 11 000 g para eluir el ácido nucleico de la columna.

5.4 Procedimiento de aislamiento simultáneo de ARN y ADN virales

- 1 Proporcione **150 µL de muestra** en un Lysis Tube (1,5 mL, suministrado).
 - 2 Añada **600 µL de Buffer RAV1** con Carrier RNA al Lysis Tube.
 - 3 Añada **20 µL de solución de Proteinase K** al Lysis Tube.
Nota: Proteinase K es necesaria para lisar los virus de ADN.
 - 4 Pipetee la mezcla hacia arriba y abajo y agítela bien en una agitadora vorticial.
Nota: Asegúrese de incubar la mezcla al menos 1 minuto a temperatura ambiente antes de iniciar la incubación térmica.
 - 5 Incube durante **5 min a 70 °C**.
 - 6 **Centrifugue brevemente** el Lysis Tube (aprox. 1 s a 2000 g) para eliminar las gotas de la tapa (solo un breve giro).
-
- 7 Añada **600 µL de etanol** (96–100 %) al lisado aclarado.
 - 8 Mezcle con la agitadora vorticial (10–15 s).
-
- 9 Cargue con cuidado **700 µL del lisado** introducido en un Collection Tube en la **NucleoSpin® Dx Virus Column** y cierre la tapa.
 - 10 **Centrifugue 1 min a 8000 g**.
 - 11 Introduzca la NucleoSpin® Dx Virus Column en un nuevo Collection Tube (2 mL, suministrado) y elimine el Collection Tube con el flujo del paso anterior.
 - 12 Cargue el **lisado residual** (aprox. 650 µL) en la NucleoSpin® Dx Virus Column y cierre la tapa.
 - 13 **Centrifugue 1 min a 8000 g**.
 - 14 Introduzca la NucleoSpin® Dx Virus Column en un nuevo Collection Tube (2 mL, suministrado) y elimine el Collection Tube con el flujo del paso anterior.
-
- 15 Añada **500 µL de Buffer RAW** a la NucleoSpin® Dx Virus Column.
 - 16 **Centrifugue 1 min a 8000 g**.
 - 17 Introduzca la NucleoSpin® Dx Virus Column en un nuevo Collection Tube (2 mL, suministrado) y elimine el Collection Tube con el flujo del paso anterior.
 - 18 Añada **600 µL de Buffer RAV3** a la NucleoSpin® Dx Virus Column.
 - 19 **Centrifugue 1 min a 8000 g**.
 - 20 Introduzca la NucleoSpin® Dx Virus Column en un nuevo Collection Tube (2 mL, suministrado) y elimine el Collection Tube con el flujo del paso anterior.
 - 21 Añada **200 µL de Buffer RAV3** a la NucleoSpin® Dx Virus Column.

22 Centrifugue 3 min a 11 000 g.

23 Introduzca la NucleoSpin® Dx Virus Column en un nuevo Elution Tube (1,5 mL, suministrado) y elimine el Collection Tube con el flujo del paso anterior.

24 Añada **50 µL de RNase-free H₂O** (precalentada a 70 °C) e incube durante 1 – 2 min.

25 Centrifugue 1 min a 11 000 g para eluir el ácido nucleico de la columna.

6 Anexo

6.1 Resolución de problemas

Problema	Posible causa y sugerencias
Pequeñas cantidades o ausencia de ácidos nucleicos virales en el eluido	<i>Carga viral baja en la muestra</i>
	<ul style="list-style-type: none"> El rendimiento de ácido nucleico depende de la carga viral de la muestra.
	<i>Problemas con Carrier RNA</i>
	<ul style="list-style-type: none"> No se ha añadido Carrier RNA. Consulte las observaciones relativas al almacenamiento de Buffer RAV1 con Carrier RNA (apartado 3).
	<i>Puede ser necesaria una digestión con Proteinase K</i>
Problemas con la detección posterior	<ul style="list-style-type: none"> Elija el protocolo adecuado para el aislamiento del ARN o del ADN virales; ver apartado 5.1.
	<i>Los ácidos nucleicos virales se han degradado</i>
	<ul style="list-style-type: none"> Las muestras se deben procesar inmediatamente. Garantice condiciones de almacenamiento adecuadas hasta el procesamiento. Compruebe que todos los tampones se hayan preparado y almacenado correctamente. Si tiene dudas, utilice nuevas alícuotas de Buffer RAV1, Carrier RNA y Elution Buffer RE.
Problemas con la detección posterior	<i>Sensibilidad reducida</i>
	<ul style="list-style-type: none"> Cambie el volumen del eluido añadido a la PCR/RT-PCR.
Problemas con la detección posterior	<i>Arrastre de etanol</i>
	<ul style="list-style-type: none"> Prolongue el paso de centrifugado (paso 22) para eliminar completamente Buffer RAV3.

Dirjase a:
MACHEREY-NAGEL Alemania
Tel.: +49 (0) 24 21 969 270
Correo electrónico: TECH-BIO@mn-net.com

6.2 Obligación de notificación

Tenga en cuenta que cualquier incidente grave que se haya producido en relación con el producto deberá ser comunicado inmediatamente al fabricante y a la autoridad competente del Estado miembro en el que se haya producido el incidente. Puntos de contacto europeos de vigilancia: https://ec.europa.eu/health/md_sector/contact_en

6.3 Bibliografía general

Thiemann F. *et al.* (2006) Leitfaden Molekulare Diagnostik -Grundlagen, Gesetze, Tipps und Tricks, WILEY-VCH, ISBN 3-527-31471-7.

Sawoo, O. *et al.* (2014) Cleavage of Hemagglutinin-Bearing Lentiviral Pseudotypes and Their Use in the Study of Influenza Virus Persistence. PLoS One. 9(8), e106192. Published online 2014 Aug 28. doi: 10.1371/journal.pone.0106192.











Sundararajan S. *et al.* (2018) Addressing false negatives in viral diagnostic polymerase chain reactions: A new approach. International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research, IJAMBR 6, 32 – 49.

6.4 Información para pedidos

Producto	REF	Unidades
Kits con marca CE-IVD		
NucleoSpin® Dx Virus	740895.50	50
NucleoSpin® Dx Blood	740899.50/.250	50/250
Kits para investigación		
NucleoSpin® Virus	740983.10/.50/.250	10/50/250
NucleoSpin® RNA Virus F	740958	25
NucleoSpin® totalRNA FFPE XS	740969.10/.50/.250	10/50/250
NucleoSpin® totalRNA FFPE	740982.10/.50/.250	10/50/250
NucleoSpin® DNA FFPE XS	740980.10/.50/.250	10/50/250
NucleoSpin® Blood	740951.10/.50/.250	10/50/250
NucleoSpin® Tissue	740952.10/.50/.250	10/50/250
NucleoSpin® Tissue XS	740901.10/.50/.250	10/50/250
NucleoSpin® miRNA	740971.10/.50/.250	10/50/250
Proteinase K	740506	100 mg
Collection Tubes (2 mL)	740600	1000

Para información más detallada sobre el producto, visite www.mn-net.com.

6.5 Explicación de los símbolos

 REF	Número de catálogo		Suficiente para < n> análisis
 LOT	Código de lote		Intervalo permitido de temperaturas de almacenamiento
	Fabricante		Fecha de caducidad
 IVD	Productos para diagnóstico <i>in vitro</i>		Atención: más información en el manual del usuario
	Leer las instrucciones de uso		No reutilizar

6.6 Restricción de uso del producto/garantía

El kit **NucleoSpin® Dx Virus** es un sistema genérico para el aislamiento y la purificación de ácidos nucleicos virales procedentes de muestras de plasma o suero humanos para fines de diagnóstico *in vitro*.

El kit está diseñado para utilizarse con cualquier aplicación posterior que utilice amplificación enzimática y detección de ARN y ADN (p. ej., RT-PCR, PCR).

Todos y cada uno de los resultados diagnósticos generados con ácidos nucleicos aislados con el kit **NucleoSpin® Dx Virus** en combinación con un análisis diagnóstico deben interpretarse teniendo en cuenta los resultados clínicos o de laboratorio adicionales.

El kit **NucleoSpin® Dx Virus** no proporciona un resultado diagnóstico. Es responsabilidad exclusiva del usuario utilizar y validar el kit en combinación con un análisis diagnóstico *in vitro* posterior. SOLO los productos MACHEREY-NAGEL especialmente etiquetados como IVD son adecuados para uso diagnóstico *in vitro*.

Consulte las instrucciones de seguridad en el capítulo correspondiente del manual del usuario. El kit **NucleoSpin® Dx Virus** se debe utilizar exclusivamente en un entorno de análisis adecuado, es decir, en un entorno de laboratorio adecuado. El usuario correspondiente es responsable de todos y cada uno de los daños resultantes de la aplicación del kit **NucleoSpin® Dx Virus** para un uso distinto al previsto especificado en el manual del usuario.

Este producto MACHEREY-NAGEL se envía con documentación que contiene las especificaciones y otra información técnica. MACHEREY-NAGEL garantiza el cumplimiento de las especificaciones indicadas. La única obligación de MACHEREY-NAGEL y el único recurso del cliente se limita a la sustitución de productos de forma gratuita en caso de que los productos no funcionen según lo garantizado. Se hace referencia complementaria a los términos y condiciones comerciales generales de MACHEREY-NAGEL, que están impresos en la lista de precios. Póngase en contacto con nosotros si desea obtener una copia adicional.

No existe garantía alguna y MACHEREY-NAGEL no se hace responsable de los daños o defectos que surjan en el envío y la manipulación (excluido el seguro de transporte para los clientes), o por accidente o uso inadecuado o anormal de este producto; defectos en productos o componentes no fabricados por MACHEREY-NAGEL, o daños resultantes de tales componentes o productos que no son de MACHEREY-NAGEL. MACHEREY-NAGEL no

ofrece ninguna otra garantía de ningún tipo, Y ESPECÍFICAMENTE RECHAZA Y EXCLUYE TODAS LAS DEMÁS GARANTÍAS DE CUALQUIER TIPO O NATURALEZA, DIRECTAS O INDIRECTAS, EXPRESAS O IMPLÍCITAS, INCLUYENDO, SIN LIMITACIÓN, EN CUANTO A LA IDONEIDAD, LA REPRODUCTIVIDAD, LA DURABILIDAD, LA APTITUD PARA UN PROPÓSITO O USO PARTICULAR, LA COMERCIALIZACIÓN, EL ESTADO O CUALQUIER OTRO ASUNTO CON RESPECTO A LOS PRODUCTOS DE MACHEREY-NAGEL. MACHEREY-NAGEL no será responsable en ningún caso de las reclamaciones por cualquier otro daño, ya sea directo, indirecto, incidental, compensatorio, previsible, consecuente o especial (incluyendo, entre otros, la pérdida de uso, ingresos o beneficios), ya sea basado en la garantía, contrato, agravio (incluyendo negligencia) o responsabilidad estricta que surge en relación con la venta o la falta de funcionamiento de los productos MACHEREY-NAGEL según las especificaciones indicadas. Esta garantía es exclusiva y MACHEREY-NAGEL no da ninguna otra garantía expresa o implícita. La garantía aquí proporcionada y los datos, especificaciones y descripciones de este producto MACHEREY-NAGEL que aparecen en los catálogos publicados DE MACHEREY-NAGEL y en la literatura del producto son las únicas representaciones DE MACHEREY-NAGEL con respecto al producto y la garantía. No se autorizan otras declaraciones o manifestaciones, escritas u orales, de los empleados, agentes o representantes de MACHEREY-NAGEL, excepto las declaraciones escritas firmadas por un funcionario debidamente autorizado de MACHEREY-NAGEL; el cliente no debe basarse en ellas y no forman parte del contrato de venta ni de esta garantía.

Las afirmaciones sobre el producto están sujetas a cambios. Por lo tanto, diríjase a nuestro equipo de servicio técnico para obtener la información más reciente sobre los productos MACHEREY-NAGEL. También puede dirigirse a su distribuidor local para obtener información científica general. Las aplicaciones mencionadas en la literatura DE MACHEREY-NAGEL se proporcionan únicamente con fines informativos. MACHEREY-NAGEL no garantiza que todas las aplicaciones se hayan probado en laboratorios de MACHEREY-NAGEL utilizando productos MACHEREY-NAGEL. MACHEREY-NAGEL no garantiza la exactitud de ninguna de esas aplicaciones.

Última actualización: Abril 2022/Rev. 07

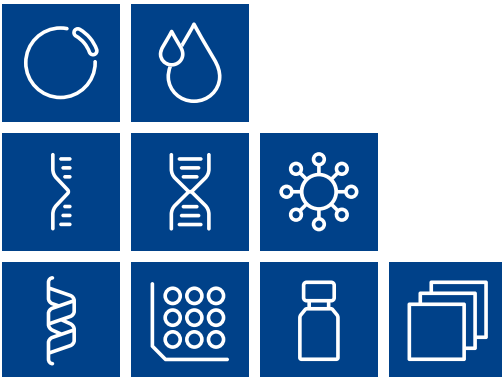
Motivo de la revisión:

Adición de los datos de rendimiento analítico y clínico al capítulo 2.5. Referencia a los nuevos idiomas del manual del usuario (capítulo 1.3).

Marcas comerciales:

LightCycler es una marca registrada de Roche Group
NucleoSpin® es una marca comercial de MACHEREY-NAGEL GmbH & Co KG

Todos los nombres y denotaciones utilizados pueden ser marcas, marcas comerciales o marcas registradas de sus respectivos titulares, también si no son denotaciones especiales. La mención de productos y marcas es solo un tipo de información (es decir, no atenta contra las marcas comerciales ni puede considerarse un tipo de recomendación o valoración). En cuanto a estos productos o servicios, no podemos conceder ninguna garantía en cuanto a su selección, eficacia o funcionamiento.



Plasmid DNA

Clean up

RNA

DNA

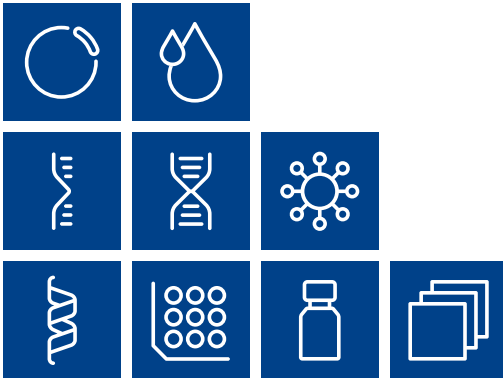
Viral RNA and DNA

Protein

High throughput

Accessories

Auxiliary tools



www.mn-net.com

MACHEREY-NAGEL



MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG
Valenciennner Str. 11
52355 Düren · Germany

DE	Tel.: +49 24 21 969-0	info@mn-net.com
CH	Tel.: +41 62 388 55 00	sales-ch@mn-net.com
FR	Tel.: +33 388 68 22 68	sales-fr@mn-net.com
US	Tel.: +1 888 321 62 24	sales-us@mn-net.com