

Enero 2021

Instrucciones de uso del QIAamp[®] DSP Viral RNA Mini Kit (manual de uso)



Versión 1

IVD

Para uso en diagnóstico in vitro

REF

61904



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden
Tel.: +49-2103-29-0

R6 **MAT**

1122786ES



Contenido

Uso previsto	5
Descripción y principio.....	6
Adsorción sobre la membrana QIAamp	8
Eliminación de los contaminantes residuales	8
Elución con Buffer AVE.....	8
Contaminación con ADN celular	9
Volumen de las muestras	9
Lisis	9
ARN transportador	10
Adición de controles internos	11
Procedimientos de centrifugación y vacío	11
Purificación automatizada de ARN vírico en el QIAcube/QIAcube Connect MDx.....	12
Resumen y explicación	14
Materiales suministrados	15
Contenido del kit.....	15
Materiales necesarios pero no suministrados	16
Advertencias y precauciones.....	18
Información de seguridad.....	18
Almacenamiento y manipulación de reactivos.....	21
Manipulación y almacenamiento de material de muestra	22
Procedimiento	22

Cuestiones importantes antes de comenzar.....	22
Preparación de reactivos y tampones.....	24
Manipulación de las columnas de centrifugación QIAamp Mini.....	27
Montaje del QIAvac 24 Plus vacuum manifold.....	Error! Bookmark not defined.
Centrifugación	31
Protocolo: Concentración de las muestras.....	32
Protocolo: purificación de ARN vírico mediante una microcentrifugadora o los instrumentos QIAcube/QIAcube Connect MDx	33
Protocolo: purificación del ARN vírico (protocolo de vacío)	36
Control de calidad.....	40
Limitaciones	40
Símbolos	41
Información de contacto	43
Apéndice.....	44
Información para pedidos.....	48
Historial de revisiones del documento	50

Uso previsto

El QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit es un sistema que utiliza la tecnología de membrana de gel de sílice (tecnología QIAamp) para el aislamiento y la purificación del ARN vírico procedente de muestras biológicas.

El producto está concebido para que lo utilicen usuarios profesionales, como técnicos y médicos formados en técnicas de biología molecular.

El QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit se ha diseñado para el uso diagnóstico in vitro.

Descripción y principio

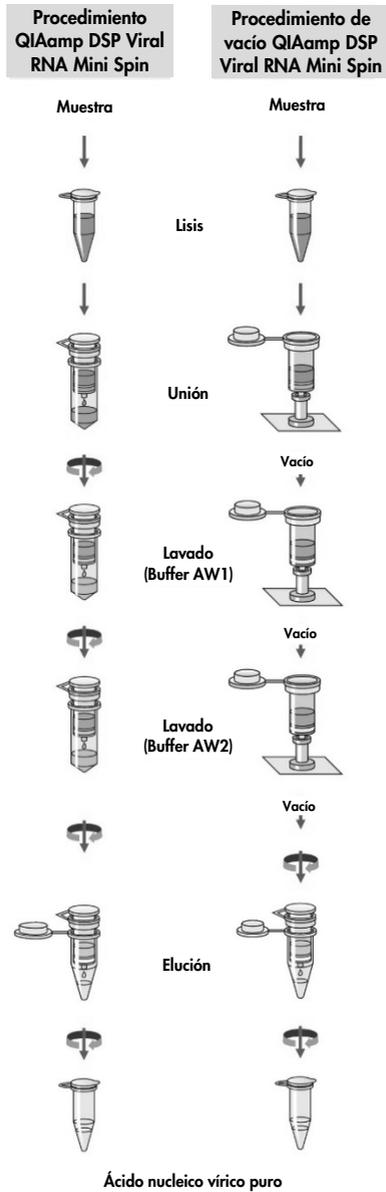
El QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit refleja una tecnología bien consolidada para la preparación de ARN vírico. El kit combina las propiedades de unión selectiva de una membrana de gel de sílice con la velocidad de centrifugado o la tecnología de vacío. Asimismo, el kit es adecuado para el procesamiento simultáneo de varias muestras. Los protocolos de centrifugación del QIAamp DSP Viral RNA se pueden automatizar en el QIAcube® y el QIAcube Connect MDx.

En primer lugar, la muestra se lisa en condiciones altamente desnaturalizantes para inactivar las ARNasas y garantizar el aislamiento del ARN vírico intacto. Posteriormente, se ajustan las condiciones de tamponado para la unión del ARN a la membrana QIAamp sea óptima y la muestra se carga en la columna de centrifugación QIAamp Mini. El ARN se une a la membrana y los agentes contaminantes se eliminan con eficacia en dos pasos con el uso de dos diferentes tampones de lavado. El ARN de gran calidad se eluye en un tampón especial sin ARNasas, listo para usarlo directamente o almacenarlo de forma segura.

La membrana QIAamp especial proporciona una alta recuperación del ARN puro e intacto en solo 20 minutos sin usar la extracción con fenol y cloroformo ni el precipitado con alcohol.

Está garantizado que todos los tampones y los reactivos no contienen ARNasas.

Procedimiento automatizado en los instrumentos QIAcube y QIAcube Connect MDx



Adsorción sobre la membrana QIAamp

Las condiciones de tamponado del lisado se deben ajustar para que las condiciones de unión sean óptimas para el ARN vírico antes de cargar la muestra en la columna de centrifugación QIAamp Mini. Debido al gran volumen del lisado, este deberá cargarse en la columna de centrifugación QIAamp Mini siguiendo varios pasos. El ARN vírico se adsorbe en la membrana de gel de sílice QIAamp durante dos breves pasos de centrifugación o mediante vacío. Las sales y el pH de lisado garantizan que las proteínas y otros contaminantes que pueden inhibir las reacciones enzimáticas anterógradas no se retengan en la membrana QIAamp.

Eliminación de los contaminantes residuales

Se eliminan los agentes contaminantes del ARN vírico que está unido a la membrana QIAamp durante dos breves pasos de centrifugación o vacío. El uso de dos tampones de lavado diferentes, AW1 y AW2, mejora significativamente la pureza del ARN eluido. Las condiciones de lavado optimizadas garantizan la eliminación de todos los residuos contaminantes sin que ello afecte a la unión del ARN.

Elución con Buffer AVE

El Buffer AVE consta de agua sin ARNasas que contiene un 0,04 % de azida sódica para prevenir el crecimiento microbiano y la contaminación posterior con ARNasas. La azida sódica afecta a las lecturas de la absorbancia espectrofotométrica de entre 220 y 280 nm, pero no afecta a las aplicaciones posteriores, como la RT-PCR. Si desea determinar la pureza del ARN eluido, le recomendamos calibrar el espectrofotómetro con Buffer AVE antes de medir la absorbancia.

Contaminación con ADN celular

El QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit no se ha diseñado para separar el ARN vírico del ADN celular y ambos se purificarán de forma paralela si están presentes en la muestra. Para evitar la purificación conjunta del ADN celular, se recomienda el uso de líquidos y secreciones corporales extracelulares para la preparación del ARN vírico. Las muestras que contienen células, como el líquido cefalorraquídeo, la médula ósea, la orina y la mayoría de los frotis, primero se deben filtrar o centrifugar durante 10 minutos a aproximadamente $1500 \times g$, así como el sobrenadante utilizado. Si el ARN y el ADN se han aislado de forma paralela, el eluido se podrá digerir con la ADNasa utilizando ADNasa sin ARNasas para posteriormente realizar un tratamiento térmico ($15 \text{ minutos} \pm 1 \text{ minuto}$, $70 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$) a fin de inactivar la ADNasa.

Volumen de las muestras

El procedimiento QIAamp DSP Viral RNA se ha optimizado para su uso con muestras de $140 \mu\text{l}$. Las muestras pequeñas se deben ajustar a $140 \mu\text{l}$ con tampón fosfato salino (phosphate-buffered saline, PBS) antes de cargarlas, y las muestras con una baja concentración vírica se deben concentrar a $140 \mu\text{l}$ antes de su procesamiento. Consulte el apartado "Protocolo: Concentración de las muestras", en la página 32.

Lisis

En primer lugar, la muestra se lisa en condiciones altamente desnaturalizantes que proporciona el Buffer AVL para inactivar las ARNasas y garantizar el aislamiento del ARN vírico intacto. El ARN transportador que se ha añadido al Buffer AVL mejora la unión de ARN vírico con la membrana QIAamp (especialmente en el caso de las muestras con concentración baja) y limita la posible degradación del ARN vírico debido a la actividad de los residuos de ARNasas.

ARN transportador

El ARN transportador tiene dos funciones. En primer lugar, potencia la unión de los ácidos nucleicos víricos a la membrana de la columna de centrifugación QIAamp Mini, especialmente si en la muestra hay pocas moléculas diana. En segundo lugar, la adición de grandes cantidades de ARN transportador reduce las posibilidades de degradación del ARN vírico en el caso poco frecuente de que las moléculas de ARNasa no se desnaturalicen por efecto de las sales caótropas y del detergente de Buffer AVL. Si no se añade ARN transportador al Buffer AVL, la recuperación del ARN vírico puede ser menor.

La cantidad de ARN transportador liofilizado suministrado es suficiente para el volumen de Buffer AVL proporcionado con el kit. La concentración de ARN transportador se ha ajustado de modo que el QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit se pueda utilizar como un sistema de purificación genérico compatible con un gran número de sistemas de amplificación y es adecuada para una amplia gama de virus de ARN.

La eficacia de los diferentes sistemas de amplificación varía en función de la cantidad total de ácido nucleico presente en la reacción. Los eluidos de este kit contienen ácidos nucleicos víricos y ARN transportador y las cantidades de ARN transportador superarán ampliamente las cantidades de ácidos nucleicos víricos. Por consiguiente, la cantidad de eluido que se debe añadir a las amplificaciones anterógradas debe calcularse en función de la cantidad de ARN transportador añadido. Para obtener los niveles máximos de sensibilidad en las reacciones de amplificación, puede ser necesario ajustar la cantidad de ARN transportador añadido al Buffer AVL.

Adición de controles internos

Para utilizar los protocolos del QIAamp DSP Viral RNA Mini junto con los sistemas de amplificación disponibles en el mercado, se recomienda encarecidamente la introducción de un control interno en el procedimiento de purificación para garantizar que se obtengan resultados de análisis fiables. El ARN o ADN de control interno se debe añadir junto con el ARN transportador al tampón de lisis. Para optimizar la eficacia de purificación, las moléculas de control interno deben tener una longitud superior a 200 nucleótidos, ya que las moléculas más pequeñas no se recuperan eficazmente.

Consulte las instrucciones del fabricante para determinar la concentración óptima. Si no se utiliza la concentración recomendada, la eficacia de amplificación puede ser menor.

Procedimientos de centrifugación y vacío

El procedimiento de purificación del QIAamp DSP Viral RNA se lleva a cabo en tres pasos utilizando las columnas de centrifugación QIAamp Mini en una microcentrifugadora convencional, en un colector de vacío o en el instrumento QIAcube. Los procedimientos se han diseñado para garantizar que no haya contaminación cruzada entre muestras y permitir la manipulación segura de muestras potencialmente infecciosas.

Las columnas de centrifugación QIAamp Mini se pueden utilizar en la mayoría de tubos de microcentrifugadora convencionales. En el caso del protocolo de centrifugación, los tubos de lavado (WT) (suministrados) de 2 ml son necesarios para sostener la columna de centrifugación QIAamp Mini durante los pasos de carga y lavado debido al volumen del filtrado. En el caso del protocolo de vacío, son necesarios el colector de vacío (QIAvac 24 Plus o uno equivalente; consulte la página 16) y una bomba que pueda producir un vacío de entre -800 y -900 mbar (por ejemplo, QIAGEN® Vacuum Pump).

El ARN eluido se puede recoger en tubos de microcentrifugadora convencionales de 1,5 ml (suministrados). Estos tubos no deben contener ARNasas para que estas no fomenten la degradación del ARN vírico.

Purificación automatizada de ARN vírico en el QIAcube/QIAcube Connect MDx

Los instrumentos QIAcube y QIAcube Connect MDx realizan el aislamiento y la purificación de ácidos nucleicos de forma automatizada. Pueden procesar hasta 12 muestras en una sola serie.

Al automatizar el QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit en el QIAcube o en el QIAcube Connect MDx, el instrumento quizá procese menos de 50 muestras debido a volúmenes muertos, evaporación y consumo adicional de reactivos por el pipeteado automatizado. QIAGEN únicamente garantiza 50 preparaciones de muestras con el uso manual del QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit.



Figura 1. El QIAcube.



Figura 2. El instrumento QIAcube Connect MDx.

Resumen y explicación

El QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit proporciona el método para purificar el ARN vírico y utilizarlo de manera fiable en las tecnologías de amplificación. El ARN vírico se puede purificar a partir de plasma (tratado con anticoagulantes distintos a la heparina), suero y otros líquidos y secreciones corporales extracelulares.

Materiales suministrados

Contenido del kit

QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit			(50)
N.º de catálogo			61904
Número de preparaciones			50†
QIAamp Mini Spin	QIAamp Mini Spin Columns con Wash Tubes (QIAamp Mini Spin Columns con tubos de lavado)		50
ET	Elution Tubes (1,5 ml) (Tubos de elución [1,5 ml])		50
LT	Lysis Tubes (Tubos de lisis [2 ml])		50
WT	Wash Tubes (Tubos de lavado [2 ml])		4 × 50
AVL	Buffer AVL* (Tampón AVL)		31 ml
AW1	Buffer AW1* (concentrate) (Tampón AW1 [concentrado])		19 ml
AW2	Buffer AW2† (concentrate) (Tampón AW2 [concentrado])		13 ml
AVE	Buffer AVE† (Tampón AVE)		3 × 2 ml
Carrier	Carrier RNA (poly A) (ARN transportador [poli A])		310 µg
–	Instructions for Use (Handbook) (Instrucciones de uso [manual de uso])		1

* Contiene sales caótropas. No es compatible con desinfectantes que contengan lejía. Consulte la página 18 si desea ver las advertencias y precauciones correspondientes.

† Contiene azida sódica como conservante.

‡ Al automatizar el QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit en el instrumento QIAcube o el QIAcube Connect MDx, es posible que estos procesen menos de 50 muestras debido a volúmenes muertos, evaporación y consumo adicional de reactivos por el pipeteado automatizado. QIAGEN únicamente garantiza 50 preparaciones de muestras con el uso manual del QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit.

Materiales necesarios pero no suministrados

Siempre que trabaje con productos químicos, utilice una bata de laboratorio, guantes desechables y gafas de protección adecuados. Para obtener más información, consulte las hojas de datos sobre seguridad (Safety Data Sheets, SDS) correspondientes, que puede solicitar al proveedor del producto.

- Etanol (96-100%)*
- Tubos de microcentrifugadora de 1,5 ml
- Pipetas estériles sin ARNasas†
- Puntas de pipeta estériles sin ARNasas (para evitar la contaminación cruzada, recomendamos puntas de pipeta con filtros para aerosoles)
- Microcentrifugadora† (con rotor para tubos de 1,5 ml y 2 ml)

Para protocolos de vacío

- Colector de vacío QIAvac 24 Plus (n.º de cat. 19413) o equivalente
- VacConnectors (n.º de cat. 19407)
- Vacuum Regulator (n.º de cat. 19530) para la sencilla supervisión de las presiones de vacío y una fácil liberación de vacío
- Vacuum Pump (n.º de cat. 84010 o bomba equivalente que pueda producir un vacío de entre -800 y -900 mbar)
- Opcional: VacValves (n.º de catálogo 19408)
- Opcional: QIAvac Connecting System (n.º de catálogo 19419)

* No utilice alcohol desnaturalizado, que contiene otras sustancias como metanol o metiletilcetona.

† Para garantizar el correcto procesamiento de las muestras en los procedimientos QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit, es muy recomendable calibrar los instrumentos (por ejemplo, las microcentrifugadoras) siguiendo las recomendaciones de los fabricantes.

Solo para el procedimiento automatizado

- Rotor Adapters, n.º de cat. 990394
- Rotor Adapter Holder, n.º de cat. 990392
- Sample Tubes CB (2 ml), n.º de cat. 990382 (tubo de entrada de la muestra)
- Shaker Rack Plugs, n.º de cat. 9017854
- Reagent Bottles, 30 ml, n.º de cat. 990393
- Filter-Tips, 1000 µl, n.º de cat. 990352

Advertencias y precauciones

Tenga en cuenta que puede ser necesario que tenga que comunicar los sucesos graves que hayan ocurrido en relación con el dispositivo al fabricante y a la autoridad sanitaria del país en el que el usuario o el paciente esté establecido.

Información de seguridad

Para uso en diagnóstico in vitro

Siempre que trabaje con productos químicos, utilice una bata de laboratorio, guantes desechables y gafas de protección adecuados. Para obtener más información, consulte las hojas de datos sobre seguridad (Safety Data Sheets, SDS) correspondientes. Puede obtenerlas en línea en el práctico y compacto formato PDF en www.qiagen.com/safety, desde donde también podrá buscar, ver e imprimir las hojas de datos SDS de todos los kits y componentes de los kits QIAGEN.

El ARN tiene una alta sensibilidad a la ARNasas y debe prepararse con el cuidado necesario en todo momento. Las manos y el polvo pueden ser portadores de bacterias y hongos y constituyen las fuentes más frecuentes de contaminación con ARNasa. Consulte el apartado "Manipulación del ARN" del Apéndice (página 44) de este manual de uso antes de ponerse en marcha.

La PCR siempre se debe llevar a cabo siguiendo las prácticas recomendadas de laboratorio. Por lo tanto, un laboratorio de PCR siempre debe estar dividido en tres áreas: un área de preparación de reactivos, un área de preparación de muestras y un área de amplificación y detección. Debido a la alta sensibilidad de la PCR, es completamente necesario que todos los reactivos conserven su pureza y no se contaminen, y se deben supervisar de manera cuidadosa y sistemática. Se deben desechar los reactivos contaminados.



PRECAUCIÓN: NO añada lejía ni soluciones ácidas directamente al Buffer AVL ni al Buffer AW1.

Los tampones Buffer AVL y Buffer AW1 contienen sales de guanidina, susceptibles de formar compuestos altamente reactivos cuando se combinan con lejía. Si se derrama el líquido de estos tampones, límpielo con un detergente de laboratorio adecuado y agua. Si el líquido derramado contiene microorganismos potencialmente infecciosos, limpie primero la zona afectada con agua y detergente de laboratorio y, a continuación, con hipoclorito sódico al 1 % (v/v).

Si los frascos de tampones sufren algún daño o pierden líquido, use guantes y gafas de protección al desecharlos para evitar lesiones personales o lesiones a terceros.

QIAGEN no ha analizado los residuos líquidos generados por los procedimientos QIAamp DSP Viral RNA Mini para determinar si contienen materiales residuales infecciosos. La contaminación del residuo líquido con materiales residuales infecciosos es muy improbable, pero no se puede descartar completamente. Por consiguiente, el residuo líquido debe considerarse como infeccioso, y manipularse y desecharse siguiendo las normas de seguridad aplicables.

Las siguientes instrucciones de prevención y riesgos son aplicables a los componentes del QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit:

Buffer AVL



Contiene: tiocianato de guanidina. ¡Peligro! Nocivo en contacto con la piel y por inhalación. Puede ser nocivo por ingestión. Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares. Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos a largo plazo. En contacto con ácidos libera gases muy tóxicos. Eliminar el contenido/el recipiente en un centro de eliminación de residuos aprobado. 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. Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas. EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o el pelo): Quítese inmediatamente la ropa manchada o salpicada. Lávese la piel con agua o dúchese. Llamar inmediatamente a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico. Consérvese bajo llave. Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

Buffer AW1



Contiene: clorhidrato de guanidina. ¡Advertencia! Nocivo en caso de ingestión o inhalación. Provoca irritación cutánea. Provoca irritación ocular grave. Llamar a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA o a un médico en caso de malestar. Eliminar el contenido/el recipiente en un centro de eliminación de residuos aprobado. Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas. Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

Almacenamiento y manipulación de reactivos

Las columnas de centrifugación QIAamp Mini se deben almacenar en seco a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C; no se deben almacenar a mayores temperaturas. Todas las soluciones se deben almacenar a temperatura ambiente (15-25 °C), a menos que se indique lo contrario. Las columnas de centrifugación QIAamp Mini y todos los tampones y reactivos pueden almacenarse en estas condiciones hasta su fecha de caducidad en la caja del kit sin que presenten ninguna reducción en su rendimiento.

El ARN transportador liofilizado se puede guardar a temperatura ambiente hasta la fecha de caducidad indicada en la caja del kit. El ARN transportador solo puede disolverse en Buffer AVE; para el procedimiento manual, el ARN transportador disuelto debe añadirse inmediatamente al Buffer AVL, tal y como se describe en la página 24. Esta solución debe prepararse nueva; es estable a 2 °C-8 °C hasta 48 horas. Buffer AVL: el ARN transportador crea un precipitado cuando se almacena a una temperatura de entre 2 °C-8 °C y se debe volver a disolver calentándolo a una temperatura de 80 °C ± 3 °C antes de usarlo. Las porciones no utilizadas de ARN transportador disuelto en el Buffer AVE deben congelarse en alícuotas a una temperatura de entre -30 °C y -15 °C. No congele y descongele las alícuotas del ARN transportador más de 3 veces.

NO caliente la solución de Buffer AVL y ARN transportador más de 6 veces. NO incubar a 80 °C durante más de 5 minutos. El calentamiento frecuente y la incubación prolongada generarán la degradación del ARN transportador y esto reducirá la recuperación del ARN vírico. Eventualmente, se generarán resultados falsos negativos de la RT-PCR. Particularmente cuando se utilicen muestras con una concentración baja.

Manipulación y almacenamiento de material de muestra

Una vez obtenidos y centrifugados, el plasma (tratado o no tratado con anticoagulantes distintos de la heparina) o el suero pueden conservarse a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C hasta 6 horas. Para el almacenamiento prolongado, se recomienda congelarlo en alícuotas a una temperatura de -80 °C a -20 °C. Las muestras de plasma o suero congeladas no deben descongelarse más de una vez. La congelación y descongelación repetidas desnaturaliza y precipita las proteínas, lo que provoca una reducción de la concentración vírica y, por consiguiente, de la cantidad de ARN vírico aislado. Además, los crioprecipitados que se forman durante la congelación y descongelación obstruyen la membrana QIAamp. Si aparecen crioprecipitados, conviene eliminarlos mediante una breve centrifugación a aproximadamente 6800 × g durante 3 minutos ± 30 segundos. Se debe eliminar el sobrenadante transparente sin romper el sedimento y se debe procesar de inmediato.

Procedimiento

Cuestiones importantes antes de comenzar

- Tras recibir el kit, compruebe que los componentes no hayan sufrido ningún daño. Si los blísteres o los frascos de tampones están dañados, póngase en contacto con el servicio técnico de QIAGEN o con su distribuidor local. Si se derrama algún líquido, consulte el apartado “Advertencias y precauciones” (página 18). No utilice los componentes dañados de un kit, ya que su rendimiento podría verse afectado.
- Utilice siempre un equipo sin ribonucleasa.
- Cambie siempre las puntas de pipeta entre transferencias de líquidos. Para evitar la contaminación cruzada, recomendamos usar puntas de pipeta con filtro para aerosoles.
- Todos los pasos de centrifugación se realizan a temperatura ambiente (15-25 °C).

- Use siempre guantes desechables y compruebe periódicamente que no se hayan contaminado con el material de las muestras. Deseche los guantes si se contaminan.
- Para minimizar la contaminación cruzada, no abra más de un tubo a la vez.
- No utilice componentes de kits distintos del que está utilizando, a menos que tengan el mismo número de lote.
- Procure evitar la contaminación microbiana de los reactivos del kit.
- Para aumentar la seguridad al máximo frente a material potencialmente infeccioso, se recomienda trabajar bajo un flujo de aire laminar hasta que las muestras estén lisadas.
- Para el proceso automatizado, siga las instrucciones que aparecen en las hojas de protocolo (QIAcube) o en la pantalla del software (QIAcube Connect MDx), y consulte los manuales del usuario correspondientes (de los instrumentos QIAcube y QIAcube Connect MDx).
- Este kit solo debe utilizarlo personal cualificado para los métodos de laboratorio de diagnóstico in vitro.

Notas importantes

Dedique unos minutos a leer este manual de uso detenidamente antes de iniciar la preparación. Los comentarios en los protocolos del QIAamp DSP Viral RNA Mini que empiezan en la página 32 son muy importantes.

Si es la primera vez que prepara ARN, consulte el apartado “Manipulación del ARN” del Apéndice en este manual de uso (página 44). Se deben realizar todos los pasos de los protocolos del QIAamp DSP Viral RNA Mini con rapidez y a temperatura ambiente. El procedimiento QIAamp DSP Viral RNA Mini no se ha diseñado para separar el ARN del ADN. Para evitar la contaminación con ADN celular, siga las directrices que se indican en el apartado “Contaminación con ADN celular” de la página 9 de este manual de uso. El procedimiento QIAamp DSP Viral RNA Mini aísla todas las moléculas de ARN que tienen una cantidad de nucleótidos mayor a 200. Las moléculas de ARN inferiores no se unirán cuantitativamente en las condiciones utilizadas.

Preparación de reactivos y tampones

- Adición del ARN transportador al Buffer AVL* (solo para el procedimiento manual)
Añada 310 µl de Buffer AVE al tubo con 310 µg de ARN transportador liofilizado para obtener una solución de 1 µg/µl. Disuelva bien el ARN transportador, repártalo en alícuotas del tamaño adecuado y guárdelas a una temperatura de -25 °C a -15 °C. No congele y descongele las alícuotas del ARN transportador más de 3 veces.
- Compruebe si hay precipitado en el Buffer AVL y, si es necesario, incúbelo a una temperatura de 80 °C ± 3 °C hasta que se disuelva el precipitado. Calcule el volumen necesario de mezcla de Buffer AVL y ARN transportador por lote de muestras; para ello, seleccione en la Tabla 1 (página 25) el número de muestras que se van a procesar simultáneamente.

Para grandes cantidades de muestras, se pueden calcular los volúmenes con el cálculo de muestras que aparece a continuación:

$$n \times 0,56 \text{ ml} = y \text{ ml}$$

$$y \text{ ml} \times 10 \text{ µl/ml} = z$$

donde: n = número de muestras que se van a procesar simultáneamente

y = volumen calculado del Buffer AVL

z = volumen de ARN transportador y Buffer AVE que se debe añadir al Buffer AVL

Mezcle cuidadosamente invirtiendo el tubo diez veces. Para evitar la formación de espuma, no realice una agitación vorticial.

Nota: El procedimiento de preparación de la muestra está optimizado para 5,6 µg de ARN transportador por muestra. Si ha comprobado que para su sistema de amplificación es preferible una menor cantidad de ARN transportador, transfiera solo la cantidad necesaria de ARN transportador disuelto a los tubos que contienen el Buffer AVL. (El uso de menos de 5,6 µg de ARN transportador por muestra debe validarse para cada tipo de muestra y de ensayo anterógrado concreto).

* Contiene sales caótopas. Adopte las medidas de seguridad de laboratorio adecuadas y utilice guantes durante la manipulación. No compatible con agentes desinfectantes que contengan lejía. Consulte la página 17 si desea obtener información de seguridad.

La solución de Buffer AVL y ARN transportador debe prepararse nueva, y esta es estable a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C hasta 48 horas. Esta solución crea un precipitado cuando se almacena a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C, y se debe volver a disolver calentándola a una temperatura de 80 °C ± 3 °C antes de su uso. No caliente la solución de Buffer AVL y ARN transportador más de 6 veces. No incube a una temperatura de 80 °C ± 3 °C durante más de 5 minutos. El calentamiento frecuente y la incubación prolongada degradan el ARN transportador y reducen la recuperación de ARN vírico, además de generar resultados falsos negativos de la RT-RCP con el tiempo. Esto sucede especialmente en el caso de las muestras con una concentración baja.

En el caso del procedimiento automatizado, los instrumentos QIAcube y QIAcube Connect MDx realizarán la preparación de la mezcla del Buffer AVL y el ARN transportador.

Tabla 1. Volúmenes (Vol.) de Buffer AVL y de mezcla de ARN transportador y Buffer AVE necesarios para números específicos (N.º) de muestras para el procedimiento QIAamp DSP Viral RNA Mini

N.º de muestras	Vol. de Buffer AVL (ml)	Vol. de ARN transportador y AVE (µl)	N.º de muestras	Vol. de Buffer AVL (ml)	Vol. de ARN transportador y AVE (µl)
1	0,56	5,6	13	7,28	72,8
2	1,12	11,2	14	7,84	78,4
3	1,68	16,8	15	8,40	84,0
4	2,24	22,4	16	8,96	89,6
5	2,80	28,0	17	9,52	95,2
6	3,36	33,6	18	10,08	100,8
7	3,92	39,2	19	10,64	106,4
8	4,48	44,8	20	11,20	112,0
9	5,04	50,4	21	11,76	117,6
10	5,60	56,0	22	12,32	123,2
11	6,16	61,6	23	12,88	128,8
12	6,72	67,2	24	13,44	134,4

Buffer AW1 *

El Buffer AW1 se suministra como concentrado. Antes de usarlo por primera vez, añada la cantidad adecuada de etanol (96-100 %) según se indica en el frasco y en la Tabla 2. El Buffer AW1 es estable durante un periodo de 6 meses si se conserva cerrado y a temperatura ambiente, pero solo hasta la fecha de caducidad del kit.

Tabla 2. Preparación del Buffer AW1

N.º de catálogo del kit	N.º de preparaciones	Concentrado de AW1	Etanol	Volumen final
61904	50	19 ml	25 ml	44 ml

Buffer AW2†

El Buffer AW2 se suministra como concentrado. Antes de usarlo por primera vez, añada la cantidad adecuada de etanol (96-100 %) al concentrado de Buffer AW2 según se indica en el frasco y en la Tabla 3.

El Buffer AW2 es estable durante un periodo de 6 meses si se conserva cerrado y a temperatura ambiente, pero solo hasta la fecha de caducidad del kit.

Tabla 3. Preparación del Buffer AW2

N.º de catálogo del kit	N.º de preparaciones	Concentrado de AW2	Etanol	Volumen final
61904	50	13 ml	30 ml	43 ml

* Contiene sales caótopas. Adopte las medidas de seguridad de laboratorio adecuadas y utilice guantes durante la manipulación. No compatible con agentes desinfectantes que contengan lejía. Consulte la página 17 si desea obtener información de seguridad.

† Contiene azida sódica como conservante.

Manipulación de las columnas de centrifugación QIAamp Mini

Dada la sensibilidad de las tecnologías de amplificación de los ácidos nucleicos, cuando se manipulen las columnas de centrifugación QIAamp Mini deben adoptarse las siguientes medidas de precaución con el fin de evitar una posible contaminación cruzada entre las preparaciones de muestras:

- Dispense la muestra o la solución cuidadosamente en la columna de centrifugación QIAamp Mini. Pipetee la muestra en la columna de centrifugación QIAamp Mini procurando no mojar el borde de la columna.
- Cambie siempre las puntas de pipeta entre transferencias de líquidos. Recomendamos el uso de puntas de pipeta con filtro para aerosoles.
- Evite tocar la membrana de la columna de centrifugación QIAamp Mini con la punta de pipeta.
- Tras haber realizado todos los pasos de agitación vorticial de pulsos, centrifugue brevemente los tubos de microcentrifugadora con el fin de eliminar las gotas del interior de las tapas.
- Abra cada vez solamente una columna de centrifugación QIAamp Mini y procure no generar aerosoles.
- Use guantes durante todo el procedimiento. Si los guantes entran en contacto con la muestra, cámbieselos inmediatamente.

Protocolo de vacío del QIAvac

El QIAvac 24 Plus está diseñado para un procesamiento de vacío rápido y eficaz de hasta 24 columnas de centrifugación QIAGEN en paralelo. Las muestras y las soluciones de lavado se extraen a través de las membranas de la columna mediante vacío y no mediante centrifugación, lo cual proporciona mayor velocidad y menos tiempo de manipulación en los procedimientos de purificación.

Junto con el QIAvac Connecting System (opcional), se puede utilizar el QIAvac 24 Plus como sistema de filtrado. El filtrado de la muestra se recoge en un frasco de residuos por separado.

Para obtener información sobre el mantenimiento del QIAvac 24 Plus, consulte las directrices de manipulación en el *Manual de uso del QIAvac 24 Plus*.

Directrices del QIAvac 24 Plus

- Coloque siempre el QIAvac 24 Plus sobre una mesa o área de trabajo segura. Si se cae, el colector QIAvac 24 Plus puede agrietarse.
- Mantenga siempre el QIAvac 24 Plus limpio y seco. Para obtener información sobre los procedimientos de limpieza, consulte el *Manual de uso del QIAvac 24 Plus*.
- Los componentes del QIAvac 24 Plus no son resistentes a ciertos disolventes (Tabla 4). Si estos disolventes de derraman sobre la unidad, enjuáguela bien con agua.
- Para garantizar un rendimiento constante, no aplique silicona ni grasa para vacío en ninguna parte del colector QIAvac 24 Plus.
- Tenga siempre precaución y use gafas protectoras al trabajar cerca de un colector de vacío bajo presión.
- Póngase en contacto con el servicio técnico o con el distribuidor local de QIAGEN para obtener información sobre piezas de repuesto o de recambio.
- La presión de vacío es la presión diferencial entre el interior del colector de vacío y la atmósfera (presión atmosférica estándar de 1013 milibares o 760 mm Hg) y se puede medir con el QIAvac Connecting System o un regulador de vacío (consulte la figura 3 en la página 29). El protocolo de vacío requiere una bomba de vacío capaz de producir un vacío de entre -800 y -900 mbar (p. ej., QIAGEN Vacuum Pump). Deben evitarse las presiones de vacío más altas. El uso de presiones de vacío más bajas que las recomendadas puede reducir el rendimiento y la pureza del ADN y aumentar la frecuencia de membranas obstruidas.

Tabla 4. Propiedades de la resistencia química del QIAvac 24 Plus

Resistente a:		No resistente a:
Ácido acético	Sales caótropas	Benceno
Ácido crómico	Alcoholes concentrados	Fenol
SDS	Cloruro sódico	Cloroformo
Tween® 20	Urea	Tolueno
Lejía con cloro	Ácido clorhídrico	Éteres
Hidróxido de sodio		

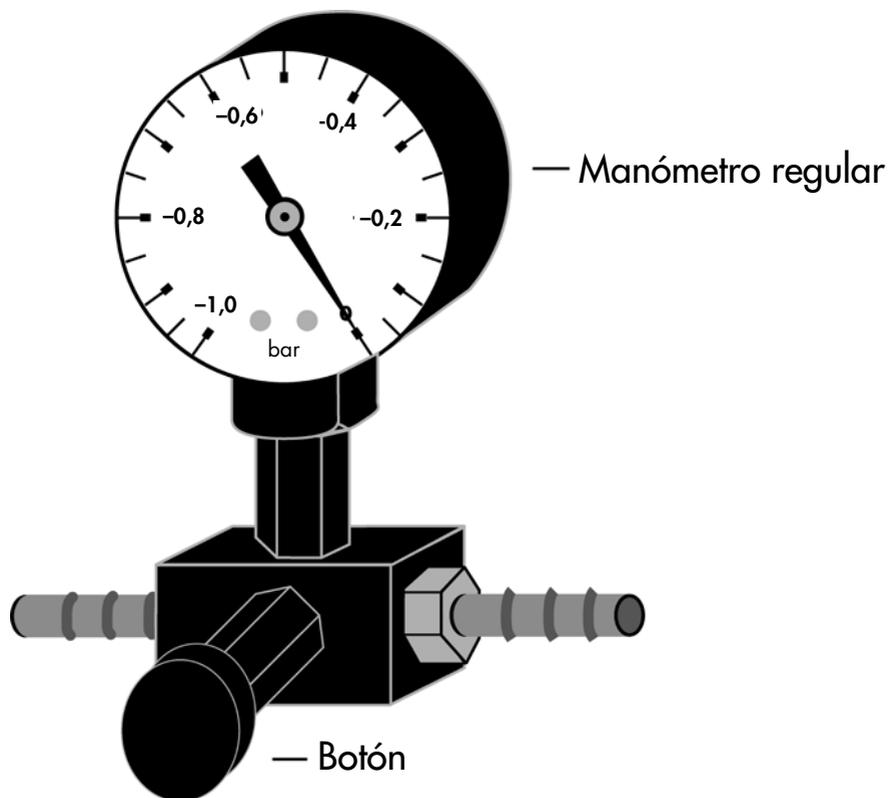


Figura 3. Diagrama esquemático del regulador de vacío.

Montaje del colector de vacío QIAvac 24 Plus

1. Conecte el QIAvac 24 Plus a una fuente de vacío. Si utiliza el QIAvac Connecting System, conecte el sistema al colector y a la fuente de vacío tal como se describe en el Apéndice A del *Manual de uso del QIAvac 24 Plus*.

2. Recomendación: Inserte una VacValve en cada ranura luer del QIAvac 24 Plus que se va a utilizar (consulte la figura 4 en la página 31).

Las VacValves deben usarse si las velocidades de flujo de las muestras difieren significativamente para garantizar un vacío uniforme.

3. Inserte un VacConnector en una VacValve (consulte la figura 4) o directamente en cada ranura luer del QIAvac 24 Plus que se va a utilizar. Cierre las ranuras luer con conexiones luer o cierre la VacValve insertada.

Lleve a cabo este paso directamente antes de iniciar la purificación para evitar la exposición de los VacConnectors a posibles contaminantes en el aire.

4. Coloque las columnas de centrifugación QIAamp Mini en los VacConnectors en el colector (consulte la figura 4).

5. Para la purificación de ácidos nucleicos, siga las instrucciones del protocolo de vacío. Deseche correctamente los VacConnectors después de su uso.

Deje abierta la tapa de la columna de centrifugación QIAamp Mini mientras aplica el vacío. Desconecte el vacío entre los pasos para garantizar que se aplique un vacío constante y uniforme durante el procesamiento. Se debe utilizar un regulador de vacío para que la liberación del vacío sea más rápida (consulte la figura 3 en la página 29).

Nota: Cada VacValve puede cerrarse individualmente cuando la muestra atraviese por completo la columna de centrifugación, lo que permite un procesamiento en paralelo de muestras de diferentes volúmenes o viscosidades.

6. Después de procesar las muestras, limpie el QIAvac 24 Plus (consulte «Limpieza y descontaminación del QIAvac 24 Plus» en el *Manual de uso del QIAvac 24 Plus*).

Nota: Los tampones Buffer AVL y Buffer AW1 utilizados en el procedimiento QIAamp DSP Viral RNA Mini no son compatibles con los agentes desinfectantes que contienen lejía. Consulte la página 18 si desea obtener información de seguridad.

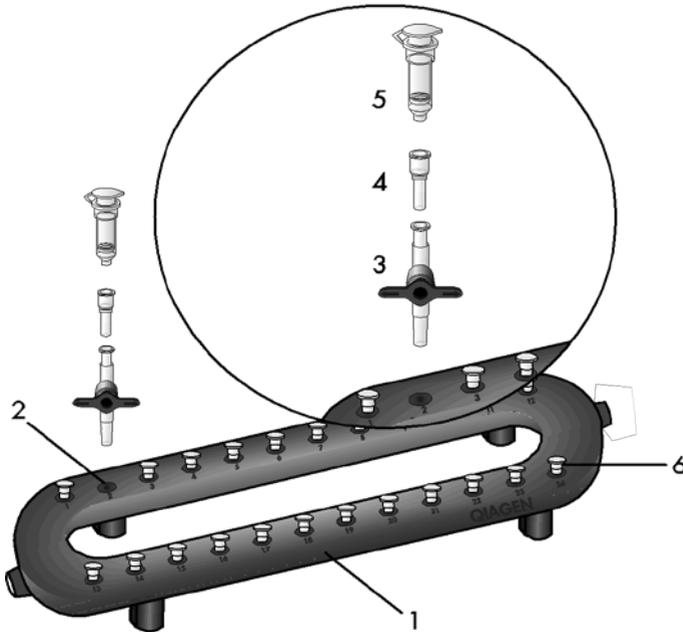


Figura 4. Preparación del QIAvac 24 Plus con las columnas de centrifugación QIAamp Mini mediante el uso de VacValves y VacConnectors.

1. Colector de vacío QIAvac 24 Plus
2. Ranura luer del QIAvac 24 Plus
3. VacValve (opcional)*
4. VacConnector*
5. Columna de centrifugación QIAamp Mini
6. Ranura luer cerrada con tapón luer

* Debe adquirirse por separado.

Centrifugación

La centrifugación de las columnas de centrifugación QIAamp Mini se debe realizar a aproximadamente $6000 \times g$ para reducir el ruido de centrifugado. La centrifugación a máxima velocidad no mejora el rendimiento del ARN. También es aceptable la

centrifugación a velocidades inferiores para la carga del lisado y el primer paso de lavado, siempre toda la solución se transfiera a través de la membrana. En el segundo paso de lavado, es muy recomendable la centrifugación a máxima velocidad.

Todos los pasos de centrifugación deben realizarse a temperatura ambiente.

Protocolo: Concentración de las muestras

El plasma, el suero, la orina, el líquido cefalorraquídeo, la médula ósea y otros líquidos y secreciones corporales generalmente tienen concentraciones víricas muy bajas. En estos casos, se recomienda la concentración de las muestras de hasta 3,5 ml a un volumen final de 140 µl.

Cuestión importante antes de comenzar

- Utilice microconcentradores de centrifugación como Microsep 100 (Filtron: 3,5 ml, n.º de cat. OD100C40), Ultrafree®-CL (Millipore: 2 ml, n.º de cat. UFC4 THK 25) o equivalentes de otros proveedores.

Procedimiento

1. Dispense hasta 3,5 ml de muestra al microconcentrador siguiendo las instrucciones del fabricante.
2. Realice la centrifugación de acuerdo con las instrucciones del fabricante hasta lograr un volumen final de 140 µl.

Puede resultar complicado que algunas muestras, en concreto el plasma, se concentren a 140 µl debido a su elevada viscosidad. Es posible que sea necesaria una centrifugación de hasta 6 horas.

3. Pipete 140 µl de la muestra concentrada en un tubo de microcentrifugadora de 1,5 ml y siga el protocolo de centrifugado QIAamp DSP Viral RNA que se indica en la página 33.

Protocolo: purificación de ARN vírico mediante una microcentrifugadora o los instrumentos QIAcube/QIAcube Connect MDx

Para la purificación de ARN vírico a partir de 140 µl de plasma, suero, orina, medio de cultivos celulares o líquidos y secreciones corporales extracelulares con una microcentrifugadora o de forma automatizada con los instrumentos QIAcube o QIAcube Connect MDx. Los volúmenes iniciales superiores, de hasta 560 µl (en múltiplos de 140 µl), se pueden procesar incrementando los volúmenes iniciales de manera proporcional y cargando la columna de centrifugación QIAamp Mini varias veces, como se describe a continuación en el protocolo. Algunas muestras con concentraciones víricas muy bajas deben concentrarse antes del procedimiento de purificación; consulte el apartado "Protocolo: Concentración de las muestras" (página 32).

Cuestiones importantes antes de comenzar

- Consulte el apartado "Procedimiento" (páginas 22-29) antes de iniciar el protocolo.
- Todos los pasos de centrifugación se realizan a temperatura ambiente (15-25 °C).
- El procesamiento automatizado de 2-10 o 12 muestras se puede realizar en los instrumentos QIAcube y QIAcube Connect MDx.
- Para el proceso automatizado, siga las instrucciones que aparecen en las hojas de protocolo (QIAcube) o en la pantalla del software (QIAcube Connect MDx), y consulte los manuales del usuario correspondientes (de los instrumentos QIAcube y QIAcube Connect MDx).

Antes de comenzar

- Deje que las muestras se equilibren a temperatura ambiente.
- Para la elución en el paso 11, deje que el Buffer AVE se equilibre a temperatura ambiente.
- Asegúrese de que el Buffer AW1 y el Buffer AW2 se hayan preparado siguiendo las instrucciones que se indican en la página 26.
- Solo para el procedimiento manual: añada ARN transportador reconstituido en el Buffer AVE al Buffer AVL según las instrucciones de la página 24.

Procedimiento

- Para efectuar el procedimiento manual con una microcentrifugadora, siga los pasos 1-11.
- Este procedimiento se puede automatizar en dos distintas versiones:
 - Estándar: automatización completa con 140 µl de muestra (a partir del paso 1)
 - Lisis manual: automatización parcial con lisis manual fuera del instrumento (empezando después del paso 4)

1. Pipetee 560 µl de Buffer AVL preparado que contenga ARN transportador en un tubo de lisis (LT).

Si el volumen de la muestra es mayor a 140 µl, incremente la cantidad de Buffer AVL y ARN transportador de manera proporcional (por ejemplo, una muestra de 280 µl requerirá 1120 µl de Buffer AVL y ARN transportador) utilice un tubo más grande.

2. Añada 140 µl de plasma, suero, orina, sobrenadante de cultivo celular o líquidos y secreciones corporales extracelulares a Buffer AVL y ARN transportador en el tubo de lisis (LT). Mezcle mediante agitación vorticial de pulsos durante 15 segundos.

Para garantizar la eficiencia de la lisis, es fundamental que la muestra se mezcle bien con el Buffer AVL a fin de obtener una solución homogénea. También se pueden utilizar las muestras congeladas que únicamente se han descongelado una vez.

3. Incube a temperatura ambiente durante 10 minutos ± 1 minuto.

La lisis de la partícula vírica se finaliza después de haber lisado durante 10 minutos a temperatura ambiente.

4. Centrifugue brevemente el tubo de lisis (LT) para eliminar las gotas del interior del tapón.

Nota: Si se ha realizado una lisis manual (pasos 1-4) fuera del instrumento, se pueden automatizar los siguientes pasos (pasos 5-11) en los instrumentos QIAcube o QIAcube Connect MDx siguiendo las instrucciones que aparecen en la pantalla para el protocolo Lisis manual.

5. Añada 560 µl de etanol (96-100 %) a la muestra, mezcle mediante agitación vorticial de pulsos durante al menos 15 segundos. Una vez finalizada la mezcla, centrifugue brevemente el tubo para eliminar las gotas del interior de la tapa.

Solo se debe utilizar etanol ya que el uso de otros alcoholes puede reducir el rendimiento y la pureza del ARN. No utilice alcohol desnaturalizado, que contiene otras sustancias como metanol o metiletilcetona. Si el volumen de la muestra es mayor a 140 µl, incremente la cantidad de etanol de manera proporcional (por ejemplo, una muestra de 280 µl requerirá 1120 µl de etanol). Para que la unión sea eficaz, es esencial que la muestra y el etanol se mezclen bien a fin de obtener una solución homogénea.

6. Dispense cuidadosamente 630 µl de la solución obtenida en el paso 5 en la columna de centrifugación QIAamp Mini (en un tubo de lavado [WT]) procurando no mojar el borde. Cierre la tapa y centrifugue a aproximadamente 6000 × g durante al menos 1 minuto. Ponga la columna de centrifugación QIAamp Mini en un tubo de lavado (WT) limpio de 2 ml y deseche el tubo de lavado que contiene el filtrado.

Selle cada columna de centrifugación para evitar que haya una posible contaminación cruzada durante la centrifugación.

La centrifugación se debe realizar a aproximadamente 6000 × g para limitar el ruido de la microcentrifugadora. La centrifugación a máxima velocidad no afectará al rendimiento ni a la pureza del ARN vírico. Si la solución todavía no ha atravesado completamente la membrana, repita el centrifugado a una velocidad mayor hasta que toda la solución haya atravesado.

7. Abra cuidadosamente la columna de centrifugación QIAamp Mini y repita el paso 6. Repita este paso hasta que todo el lisado se haya cargado en la columna de centrifugación.
8. Abra cuidadosamente la columna de centrifugación QIAamp Mini y añada 500 µl de Buffer AW1. Cierre la tapa y centrifugue a aproximadamente 6000 × g durante al menos 1 minuto. Ponga la columna de centrifugación QIAamp Mini en un tubo de lavado (WT) limpio de 2 ml y deseche el tubo de lavado que contiene el filtrado.

No es necesario aumentar el volumen del Buffer AW1, incluso si el volumen original de la muestra era mayor a 140 µl.

9. Abra cuidadosamente la columna de centrifugación QIAamp Mini y añada 500 µl de Buffer AW2. Cierre la tapa y centrifugue a velocidad máxima (aproximadamente 20.000 × g) durante 3 minutos ± 30 segundos.

10. Coloque la columna de centrifugación QIAamp Mini en un nuevo tubo de lavado (WT) de 2 ml y deseche el tubo de lavado que contiene el filtrado. Centrifugue a velocidad máxima durante 1 minuto.

11. Introduzca la columna de centrifugación QIAamp Mini en un tubo de elución limpio (ET). Elimine el tubo de lavado que contiene el filtrado. Abra cuidadosamente la columna de centrifugación QIAamp Mini y añada 60 µl de Buffer AVE equilibrado a temperatura ambiente. Cierre la tapa e incube a temperatura ambiente durante al menos 1 minuto.

Centrifugue a aproximadamente 6000 × g durante al menos 1 min.

Nota importante: En el caso de que todos los procedimientos sean automatizados, elimine los eluidos del instrumento directamente después de que haya finalizado el análisis y almacénelos adecuadamente.

Protocolo: purificación del ARN vírico (protocolo de vacío)

Este protocolo se ha diseñado para la purificación del ARN vírico a partir de 140 µl de plasma, suero, orina, medios de cultivo celular o líquidos y secreciones corporales extracelulares utilizando del QIAvac 24 Plus o un colector de vacío equivalente. Los volúmenes iniciales superiores, de hasta 560 µl (en múltiplos de 140 µl), se pueden procesar incrementando los volúmenes iniciales de manera proporcional y cargando la columna de centrifugación QIAamp Mini varias veces, como se describe a continuación en el protocolo. Algunas muestras con concentraciones víricas muy bajas deben concentrarse antes del procedimiento de purificación; consulte "Protocolo: concentración de las muestras" (página 32).

Cuestiones importantes antes de comenzar

- Consulte el apartado "Procedimiento" (páginas 22-29) antes de iniciar el protocolo.
- Todos los pasos de centrifugación se realizan a temperatura ambiente (15-25 °C).

Antes de comenzar

- Deje que las muestras se equilibren a temperatura ambiente.

- Para la elución en el paso 14, deje que el Buffer AVE se equilibre a temperatura ambiente.
- Asegúrese de que el Buffer AW1 y el Buffer AW2 se hayan preparado siguiendo las instrucciones que se indican en la página 26.
- Añada ARN transportador reconstituido en Buffer AVE al Buffer AVL según las instrucciones de la página 24.
- Para el procesamiento con el uso de los VacConnectors y VacValves, prepare el QIAvac 24 Plus como se describe en la página **Error! Bookmark not defined.**

Procedimiento

1. Pipetee 560 µl de Buffer AVL preparado que contenga ARN transportador en un tubo de lisis (LT).

Si el volumen de la muestra es mayor a 140 µl, incremente la cantidad de Buffer AVL y ARN transportador de manera proporcional (por ejemplo, una muestra de 280 µl requerirá 1120 µl de Buffer AVL y ARN transportador) utilice un tubo más grande.

2. Añada 140 µl de plasma, suero, orina, sobrenadante de cultivo celular o líquidos y secreciones corporales extracelulares a Buffer AVL y ARN transportador en el tubo de lisis (LT). Mezcle mediante agitación vorticial de pulsos durante al menos 15 segundos.

Para garantizar la eficiencia de la lisis, es fundamental que la muestra se mezcle bien con el Buffer AVL a fin de obtener una solución homogénea. También se pueden utilizar las muestras congeladas que únicamente se han descongelado una vez.

3. Incube a temperatura ambiente durante 10 minutos ± 1 minuto.

La lisis de la partícula vírica se finaliza una vez que se haya realizado el lisado durante 10 minutos ± 1 minuto a temperatura ambiente.

4. Centrifugue brevemente el tubo para eliminar las gotas del interior de la tapa.
5. Añada 560 µl de etanol (96-100 %) a la muestra, mezcle mediante agitación vorticial de pulsos durante al menos 15 segundos. Una vez finalizada la mezcla, centrifugue brevemente el tubo para eliminar las gotas del interior de la tapa. Inserte la columna de centrifugación QIAamp Mini en el VacConnector del colector de vacío del QIAvac 24 Plus.

Solo se debe utilizar etanol, ya que el uso de otros alcoholes puede reducir el rendimiento y la pureza del ARN. No utilice alcohol desnaturalizado, que contiene otras sustancias como metanol o metiletilcetona. Para que la unión sea eficaz, es esencial que la muestra y el etanol se mezclen bien a fin de obtener una solución homogénea. El tubo de recogida del blíster se puede almacenar para la centrifugación que se indica en el paso 13.

6. Asegúrese de que la válvula de vacío principal (entre la bomba de vacío y el colector de vacío) y la válvula con tapón de rosca (en el colector de vacío del QIAvac 24 Plus) estén cerradas. Conecte la bomba de vacío pulsando el interruptor de encendido.

El vacío solamente se aplica al sistema de conexión (si se utiliza) y no al colector de vacío.

Nota: Para tener una liberación práctica de la presión de vacío, se debe utilizar el QIAvac Connecting System o el Vacuum Regulator; consulte el apartado "Materiales necesarios pero no suministrados" (página 16).

7. Dispense cuidadosamente 630 µl del lisado obtenido en el paso 5 en la columna de centrifugación QIAamp Mini procurando no mojar el borde. Evite tocar la membrana de la columna de centrifugación QIAamp Mini con la punta de pipeta.
8. Abra la válvula principal de vacío. Asegúrese de dejar abierta la tapa de la columna de centrifugación QIAamp Mini mientras aplica vacío. Una vez que todos los lisados hayan atravesado la columna de centrifugación QIAamp Mini, cierre la válvula principal de vacío y abra la válvula con tapón de rosca para ventilar el colector. Cierre la válvula con tapón de rosca una vez que el vacío haya desaparecido del colector.

Tras cerrar la válvula principal de vacío, el vacío solamente se aplica al sistema de conexión (si se utiliza) y no al colector de vacío. Si los lisados de muestras individuales no han atravesado por completo la membrana a pesar de que las VacValves de las demás columnas de centrifugación QIAamp Mini estaban cerradas, ponga la columna de centrifugación QIAamp Mini en un tubo de lavado (WT) limpio de 2 ml, cierre la tapa y centrifugue a máxima velocidad durante 3 minutos o hasta que hayan atravesado la membrana por completo. Continúe con los pasos 7-11 del protocolo de centrifugado que se indica en la página 35 para finalizar el procedimiento. La centrifugación se debe realizar a aproximadamente 6000 × g para limitar el ruido de la microcentrifugadora. La centrifugación a máxima velocidad no afectará al rendimiento ni a la pureza del ARN vírico.

9. Dispense 750 µl de Buffer AW1 en la columna de centrifugación QIAamp Mini procurando no mojar el borde. Evite tocar la membrana de la columna de centrifugación QIAamp Mini con la punta de pipeta.
10. Abra la válvula principal de vacío. Una vez que el Buffer AW1 haya atravesado la columna de centrifugación QIAamp Mini, cierre la válvula principal de vacío y abra la válvula con tapón de rosca para ventilar el colector. Cierre la válvula con tapón de rosca una vez que el vacío haya desaparecido del colector.
11. Dispense 750 µl de Buffer AW2 en la columna de centrifugación QIAamp Mini procurando no mojar el borde. Evite tocar la membrana de la columna de centrifugación QIAamp Mini con la punta de pipeta. Deje abierta la tapa de la columna.
12. Abra la válvula principal de vacío. Una vez que el Buffer AW2 haya atravesado la columna de centrifugación QIAamp Mini, cierre la válvula principal de vacío y abra la válvula con tapón de rosca para ventilar el colector. Cierre la válvula con tapón de rosca una vez que el vacío haya desaparecido del colector.
13. Cierre la tapa de la columna de centrifugación QIAamp Mini. Retírela del colector de vacío y deseche el VacConnector. Ponga la columna de centrifugación QIAamp Mini en un tubo de lavado (WT) limpio de 2 ml apartado en el paso 5 y centrifúguela a velocidad máxima durante 1 minuto para secar completamente la membrana.
14. Ponga la columna de centrifugación QIAamp Mini en un tubo de elución (ET) limpio. Deseche el tubo de recogida que contiene el filtrado. Abra cuidadosamente la columna de centrifugación QIAamp Mini. Añada 60 µl de Buffer AVE equilibrado a temperatura ambiente. Cierre la tapa e incube a temperatura ambiente durante 1 minuto. Centrifugue a aproximadamente 6000 × g durante al menos 1 minuto.

Control de calidad

Conforme al sistema de gestión de la calidad con certificación ISO de QIAGEN, cada lote de los QIAamp DSP Viral RNA Mini Kits se someten a pruebas frente a una serie de especificaciones predeterminadas con el fin de garantizar una calidad constante del producto.

Limitaciones

El rendimiento del sistema se ha establecido con el uso de muestras de plasma y suero, líquidos y secreciones corporales extracelulares y sobrenadantes de cultivos celulares para el aislamiento del ARN vírico.

Es responsabilidad del usuario validar el rendimiento del sistema con los procedimientos utilizados en cada laboratorio que no estén contemplados en los estudios de rendimiento de QIAGEN. Para reducir al mínimo el riesgo de que se produzcan efectos negativos sobre los resultados diagnósticos, deben utilizarse controles apropiados para las aplicaciones posteriores. Para realizar validaciones adicionales, se recomienda seguir las directrices de la International Conference on Harmonization of Technical Requirements (Conferencia Internacional sobre Armonización de los requisitos técnicos) (ICH) detalladas en *ICH Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*.

Todo resultado diagnóstico que se genere debe interpretarse en combinación con otros datos clínicos o de laboratorio.

Símbolos

En las instrucciones de uso o en el embalaje y en el etiquetado pueden aparecer los siguientes símbolos:

Símbolo	Definición del símbolo
	Contiene suficientes reactivos para <N> reacciones
	Fecha de caducidad
	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
	A su recepción
	Abrir a la entrega; almacenar las QIAamp Mini Spin Columns at 2-8 °C
	Número de catálogo
	Número de lote
	Número de material (p. ej., el etiquetado de los componentes)
	Componentes
	Volumen
	Adición
	Limitación de temperatura
	Fabricante

Símbolo	Definición del símbolo
	Consultar las instrucciones de uso
	Anotar la fecha actual tras añadir etanol al frasco
EtOH	Etanol
CONT	Contiene
LYOPH	Liofilizado
RCNS	Reconstituir en
→	Conduce a
GuHCl	Clorhidrato de guanidina
GITC	Tiocianato de guanidina
GTIN	Número mundial de artículo comercial
NUM	Número
Rn	"R" es la revisión de las Instrucciones de uso y "n" es el número de revisión
	Mantener alejado de la luz solar
	Advertencia/precaución

Información de contacto

Para recibir asistencia técnica y solicitar más información, consulte nuestro centro de servicio técnico en el sitio www.qiagen.com/Support, llame al 800-362-7737 o póngase en contacto con uno de los departamentos de servicio técnico de QIAGEN o con los distribuidores locales (consulte la contraportada o visite www.qiagen.com).

Apéndice

Manipulación del ARN

Las ribonucleasas (ARNasas) son enzimas muy estables y activas que, en general, no requieren cofactores para actuar. Dado que las ARNasas son difíciles de inactivar y que se necesitan solamente cantidades minúsculas para destruir el ARN, no utilice ningún material de plástico ni de vidrio sin eliminar primero una posible contaminación con ARNasas. Deben extremarse las precauciones para evitar introducir accidentalmente ARNasas en la muestra de ARN durante el procedimiento de purificación o después de este. Para crear y mantener un entorno libre de ARNasa, durante el tratamiento previo y el uso de los recipientes desechables y no desechables y de las soluciones deben adoptarse las siguientes medidas de precaución mientras se trabaja con el ARN.

Manipulación general

Siempre que se trabaje con ARN debe utilizarse una técnica aséptica microbiológica adecuada. Las manos y el polvo pueden ser portadores de bacterias y hongos y constituyen las fuentes más frecuentes de contaminación con ARNasa. Al manipular los reactivos y las muestras de ARN, use siempre guantes de látex o de vinilo para prevenir la contaminación con ARNasa procedente de la superficie de la piel o de un equipo de laboratorio con polvo. Cámbiese los guantes con frecuencia y mantenga los tubos cerrados siempre que sea posible. Durante el procedimiento, trabaje con rapidez para evitar la degradación del ARN a causa de ARNasas residuales o endógenas.

Material de plástico desechable

Se recomienda usar tubos de polipropileno estériles durante todo el procedimiento. Estos tubos generalmente no contienen ARNasas y no requieren de un tratamiento previo para inactivar las ARNasas.

Material de plástico no desechable

Los materiales plásticos no desechables se deben tratar antes de su uso para garantizar que no presentan ARNasas. Los materiales de plástico se deben lavar meticulosamente con 0,1 M de NaOH,* 1 mM de ácido etilendiaminetetraacético* (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) y enjuagar a continuación con agua sin ARNasas (consulte el apartado “Soluciones” de la página 46). Alternativamente, los materiales de plástico resistentes al cloroformo pueden lavarse con cloroformo* para inactivar las ARNasas.

Materiales de vidrio

Antes de usarse, los materiales de vidrio deben tratarse para garantizar que están libres de ARNasa. Antes de usarse, los materiales de vidrio utilizados para trabajar con ARN deben limpiarse con detergente,† enjuagarse meticulosamente y calentarse en el horno a una temperatura superior a 240 °C durante cuatro horas o más (si se prefiere, incluso durante toda la noche). Solo el autoclave no inactivará totalmente muchas ARNasas. El calentamiento en horno inactivará las ribonucleasas. Alternativamente, puede tratar los materiales de vidrio con dietilpirocarbonato* (diethylpyrocarbonate, DEPC). Lave los materiales de vidrio con dietilpirocarbonato (diethylpyrocarbonate, DEPC) al 0,1 % (0,1 % en agua) durante toda la noche (12 horas) a una temperatura de 37 °C y, a continuación, esterilícelos en un autoclave o caliéntelos a 100 °C durante 15 minutos para eliminar los posibles restos de dietilpirocarbonato (diethylpyrocarbonate, DEPC).

Nota: Las ARNasas deben eliminarse de los tubos Corex® mediante un tratamiento con dietilpirocarbonato (diethylpyrocarbonate, DEPC) y no calentándolos. De este modo, se reducirá la tasa de fallos para este tipo de tubos durante el centrifugado.

* Siempre que trabaje con productos químicos, utilice una bata de laboratorio, guantes desechables y gafas de protección adecuados. Para obtener más información, consulte las hojas de datos sobre seguridad (Safety Data Sheet, SDS) correspondientes, que puede solicitar al proveedor del producto.

† Siempre que trabaje con productos químicos, utilice una bata de laboratorio, guantes desechables y gafas de protección adecuados. Para obtener más información, consulte las hojas de datos sobre seguridad (Safety Data Sheet, SDS) correspondientes, que puede solicitar al proveedor del producto.

Tanques de electroforesis

Los tanques de electroforesis se deben limpiar con una solución de detergente (p. ej., dodecilsulfato sódico [sodium dodecyl sulfate, SDS] al 0,5 %)*, enjuagar con agua, secar con etanol** y llenar, a continuación, con una solución de H₂O₂ al 3 %.* Después de 10 minutos a temperatura ambiente, los tanques de electroforesis se deben enjuagar meticulosamente con agua sin ARNasas.

Soluciones

Las soluciones (agua y otras soluciones)* se deben tratar con dietilpirocarbonato (diethylpyrocarbonate, DEPC) al 0,1 %. El dietilpirocarbonato (diethylpyrocarbonate, DEPC) reaccionará con las aminas primarias y no puede utilizarse directamente para tratar los tampones Tris*. El DEPC es altamente inestable en presencia de tampones Tris y se descompone rápidamente en etanol y CO₂. Cuando prepare tampones Tris, en primer lugar trate el agua con DEPC y, a continuación, disuelva el Tris para preparar el tampón adecuado.

El DEPC es un inhibidor potente, pero no absoluto, de las ARNasas. Se utiliza habitualmente a una concentración del 0,1 % para inactivar las ARNasas en materiales de vidrio o de plástico o para preparar soluciones y agua sin ARNasas. El DEPC inactiva las ARNasas por medio de una modificación covalente. Las cantidades mínimas de DEPC modificarán los residuos de purinas en el ARN por medio de una carbetoxilación. El ARN carbetoxilado se convierte con una eficacia muy baja en sistemas libres de células. No obstante, su capacidad de formar híbridos de ADN:ARN o ARN:ARN no se ve seriamente afectada, salvo que se haya modificado una gran fracción de residuos de purinas. El dietilpirocarbonato (diethylpyrocarbonate, DEPC) residual siempre se debe eliminar de las soluciones o de los recipientes en el autoclave o calentándolos a 100 °C durante 15 minutos.

* Los plásticos utilizados para determinados tanques de electroforesis no son resistentes al etanol. Preste la atención debida y consulte las instrucciones de los proveedores.

Añada 0,1 ml de dietilpirocarbonato (diethylpyrocarbonate, DEPC) a 100 ml de la solución que se tratará. Agite enérgicamente para disolver el dietilpirocarbonato (diethylpyrocarbonate, DEPC) en la solución u hornéela durante 12 horas a 37 °C. Esterilice en autoclave durante 15 minutos para eliminar cualquier resto de dietilpirocarbonato (diethylpyrocarbonate, DEPC). Puede ser recomendable analizar si las fuentes de agua contienen ARNAsas contaminantes, dado que muchas fuentes de agua destilada no presentan actividad ARNasa.

Nota: Las ARNAsas no se eliminan de los tampones del QIAamp DSP Viral RNA mediante un tratamiento con dietilpirocarbonato (diethylpyrocarbonate, DEPC) y, por consiguiente, estos no presentan ninguna contaminación por dietilpirocarbonato (diethylpyrocarbonate, DEPC).

Información para pedidos

Producto	Contenido	N.º de cat.
QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit (50)	Para 50 preparados de ARN: QIAamp Mini Spin Columns, ARN transportador, Collection Tubes (2 ml), tampones exentos de ARNasas	61904
Productos relacionados		
QIAcube Connect MDx*	Instrumento y garantía de 1 año para piezas y mano de obra	9003070
Accesorios		
QIAvac 24 Plus vacuum manifold	Colector de vacío para procesar entre 1 y 24 columnas de centrifugación: se incluye el colector de vacío QIAvac 24 Plus, Luer Plugs, Quick Couplings	19413
VacConnectors	500 conectores desechables para usar con las columnas de centrifugación QIAamp en los conectores luer	19407
Vacuum Regulator	Para su uso con colectores QIAvac	19530
Vacuum Pump	Bomba de vacío universal	84010
VacValves	24 válvulas para usar con el QIAvac 24 y el QIAvac 24 Plus	19408
QIAvac Connecting System	Sistema para conectar el colector de vacío con la bomba de vacío: incluye bandeja, frascos de residuos, tubos, acoplamientos, válvula, manómetro y 24 VacValves	19419

Producto	Contenido	N.º de cat.
Rotor Adapters	Para 240 preparaciones: 240 adaptadores de rotor desechables y 240 tubos de elución (1,5 ml); para usar con el instrumento QIAcube	990394
Rotor Adapter Holder	Soporte para 12 adaptadores de rotor desechables; para su uso con el instrumento QIAcube	990392
Sample Tubes CB	1000 tubos (2 ml) con tapa de rosca cónicos sin base de apoyo para usar con los instrumentos QIAcube y QIAcube Connect	990382
Shaker Rack Plugs	Para cargar la gradilla del agitador del QIAcube	9017854
Reagent Bottles, 30 ml	Frascos de reactivos (30 ml) con tapas; paquete de 6; para usar con el instrumento QIAcube	990393
Filter-Tips, 1000 µl	Puntas con filtro desechables, engradilladas (8 × 128). Para usar con el instrumento QIAcube	990352

* El instrumento QIAcube Connect MDx no está disponible en todos los países. Si desea obtener más información, póngase en contacto con el servicio técnico de QIAGEN.

Para obtener información actualizada sobre licencias y exenciones de responsabilidad específicas del producto, consulte el manual de uso o la guía del usuario del kit de QIAGEN correspondiente. Los manuales de uso y las guías del usuario del kit de QIAGEN están disponibles en www.qiagen.com o pueden solicitarse al servicio técnico de QIAGEN o a su distribuidor local.

Historial de revisiones del documento

Revisión	Descripción
R6, 01/2021	<p>Se han actualizado las siguientes secciones: "Purificación automatizada de ARN vírico en el QIAcube o el QIAcube Connect MDx", "Materiales requeridos pero no suministrados", "Advertencias y precauciones", "Protocolo: purificación de ARN vírico mediante una microcentrifugadora o los instrumentos QIAcube/QIAcube Connect MDx", "Símbolos" e "Información para pedidos".</p> <p>Se ha eliminado la sección "Referencias".</p> <p>Se ha insertado una nueva figura (la imagen del instrumento QIAcube Connect MDx)</p> <p>Se han añadido referencias sobre el instrumento QIAcube Connect MDx y sus accesorios.</p> <p>Se han efectuado cambios editoriales y de diseño.</p>

Esta página se ha dejado en blanco intencionadamente.

Acuerdo de licencia limitada para el QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit

La utilización de este producto implica por parte de cualquier comprador o usuario del producto la aceptación de los siguientes términos:

1. El producto puede utilizarse únicamente conforme a los protocolos suministrados con el producto y a este manual de uso y para su uso exclusivo con los componentes incluidos en el panel. QIAGEN no ofrece licencia alguna bajo ninguna de sus propiedades intelectuales para utilizar o incorporar los componentes suministrados en este panel con componentes no incluidos en el mismo, excepto según se describe en los protocolos proporcionados con el producto, este manual de uso y otros protocolos disponibles en www.qiagen.com. Algunos de estos protocolos adicionales han sido proporcionados por usuarios de QIAGEN para usuarios de QIAGEN. QIAGEN no ha probado ni optimizado estos protocolos en profundidad. Por ello, QIAGEN no los garantiza ni asegura que no infrinjan los derechos de terceros.
2. Aparte de las licencias expresamente especificadas, QIAGEN no garantiza que este panel ni su(s) uso(s) no infrinjan derechos de terceros.
3. Este panel y sus componentes tienen licencia para un solo uso y no se pueden reutilizar, reacondicionar ni revender.
4. QIAGEN renuncia específicamente a cualquier otra licencia, explícita o implícita, distinta de las licencias expresamente especificadas.
5. El comprador y el usuario del panel aceptan no realizar ni permitir a otros realizar ningún paso que pueda conducir a acciones prohibidas en las especificaciones anteriores o que pueda facilitarlas. QIAGEN se reserva el derecho de emprender acciones legales ante cualquier tribunal para el cumplimiento de las prohibiciones especificadas en este Acuerdo de licencia limitada y recuperará todos los gastos derivados de la investigación y de los gastos judiciales, incluidos los honorarios de abogacía, en cualquier acción emprendida para hacer cumplir este Acuerdo de licencia limitada o cualquier otro derecho de propiedad intelectual en relación con este panel o con sus componentes.

Para consultar los términos actualizados de la licencia, visite www.qiagen.com.

Marcas comerciales: QIAGEN®, QIAamp®, QIAcube® (QIAGEN Group); Correx® (Corning, Inc.); Tween® (ICI Americas Inc.); UltraFree® (Millipore Corporation); Sarsted® (Sarstedt AG & Co.). No debe considerarse que los nombres registrados, marcas comerciales, etcétera, que se utilizan en este documento no están protegidos por la ley, aunque no se indique específicamente.

01/2021 HB-0418-008 1122786 © 2021 QIAGEN. Reservados todos los derechos.

Pedidos www.qiagen.com/shop | Servicio técnico support.qiagen.com | Sitio web www.qiagen.com