

CEA-NANO+ RNA 3.0

Sistema de Extracción Magnética de ARN a partir de muestras biológicas

Instrucciones para el Uso

ANTES DE USAR ESTE ESTUCHE LEA EN SU TOTALIDAD LAS INSTRUCCIONES DE USO ESPECIALMENTE SI NO ESTÁ FAMILIARIZADO CON EL PROTOCOLO



Fabricado por:



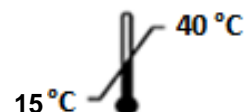
CENTRO DE ESTUDIOS AVANZADOS DE CUBA

Dirección: Autopista Carretera de San Antonio- Km 1 1/2
La Lisa- La Habana- Cuba

Teléfono: (+53) 7 250 2103

e-mail: cea@cea.cu

www.cea.cu





1. EXPLICACIÓN DEL ESTUCHE (SISTEMA DE EXTRACCIÓN MAGNÉTICA)

CEA-NANO+ RNA 3.0 permite una rápida y eficiente extracción de ARN viral mediante el método de extracción magnética a partir de muestras biológicas como:

- Exudado nasofaríngeo
- Exudado faríngeo
- Macerados de tejidos



¡IMPORTANTE!- Todas las muestras biológicas deben ser manejadas según los procedimientos y normas de Bioseguridad aplicables al nivel de riesgo del agente biológico en cuestión. **Para el SARS-CoV-2, aunque la Solución Lisis-Unión RNA 3.0 logra la inactivación viral¹⁻².**

En el primer paso de extracción la muestra que contiene virus ARN es lisada mediante incubación en la Solución Lisis-Unión RNA 3.0 (**SLU-RNA 3.0**) rico en detergentes iónicos y agentes caotrópicos que permite la lisis celular y la desnaturalización de las proteínas, liberando así el ARN. De igual manera contiene agentes que inhiben las RNasas presentes en las muestras biológicas y estabilizan el ARN. La adición posterior de Solución de Precipitación RNA 3.0 (**SP-RNA 3.0**) a la muestra lisada crea las condiciones adecuadas para la unión del ARN a las nanopartículas **NESP-A380** incluida en el kit. Este paso de unión es reversible y específico para cada tipo ácidos nucleicos, y depende de la Solución Lisis-Unión RNA 3.0 utilizada (**SLU-RNA 3.0**).

El **Carrier RNA** contenido en la **SLU-3.0**, unido a las **NESP-A380** mejora la unión y el rendimiento en muestras diluidas o con baja concentración de ARN viral. Los contaminantes presentes en la muestra (sales, metabolitos, componentes celulares solubles) son eliminados mediante sucesivos lavados del ARN unido a las **NESP-A380** con soluciones de concentración crecientes de etanol contenido en las Soluciones de Lavado (**SLV-1, 2 y 3**). Las **NESP-A380** se seca para eliminar restos de las **SLV** y el ARN es finalmente eluido en Solución de Elución RNA 3.0 (**SE-RNA 3.0**) que contiene baja concentración de sales específicas y compuestos que garantizan una máxima lixiviación y estabilización del ARN.

2. REACTIVOS INCLUIDOS EN EL ESTUCHE

La ausencia de RNasas, así como el rendimiento y eficiencia del proceso de purificación han sido ensayados con RT-PCR. Los diferentes componentes del estuche se detallan a continuación:

Componentes	CEA-P-01A 500 determinaciones	CEA-P-01B 250 determinaciones
SLU-RNA 3.0 - Solución de Lisis-Unión RNA 3.0	1 x 110 mL	1 x 55 mL
NESP-A380 - Solución de NESP-A380	1 x 60 mL	1 x 30 mL
SLV- 1 - Solución de Lavado 1	1 x 260 mL	1 x 130 mL
SLV- 2 - Solución de Lavado 2	1 x 260 mL	1 x 130 mL
SLV- 3 - Solución de Lavado 3	1 x 260 mL	1 x 130 mL
SP-RNA 3.0 – Solución de Precipitación	1 x 260 mL	1 x 130 mL
SE-RNA 3.0 - Solución de Elución RNA 3.0	1 x 100 mL	1 x 50 mL
Instrucciones para el uso (instructivo)	1	1

El kit **CEA-NANO+ RNA 3.0** está diseñado para la extracción y purificación de ARN de origen viral a partir de **200 µL** de muestras biológicas como exudados respiratorios, secreciones respiratorias o macerados de tejidos. Su uso, en principio, no está indicado para extracciones a partir de muestras sanguíneas, plasma, suero, orina u otras; sin embargo, puede realizarse realizando pequeñas modificaciones en el protocolo (dilución 1:10 de la muestra en PBS). REV.01



El ácido nucleico obtenido es adecuado para posteriores usos como secuenciación, RT-PCR, u otras determinaciones. El kit evita contaminaciones cruzadas entre muestras al ser un sistema de pasos cerrados.

El límite de detección de algunos virus depende del sistema de detección empleado (ej. *in-house nested* RT-PCR). Se recomienda utilizar controles internos, controles positivos y negativos para monitorizar los procesos de purificación, amplificación y detección.

La inclusión de **Carrier RNA** a la **SLU-RNA 3.0** incrementa la unión de los ácidos nucleicos virales y reduce los riesgos de degradación del ARN viral. Los ácidos nucleicos virales purificados con el **CEA-NANO+ RNA 3.0** no podrán ser cuantificados por espectrofotometría o fluorimetría ya que los eluatos contendrán ARN extraído mas **Carrier RNA**; para su cuantificación puede utilizarse otros métodos como PCR o RT-PCR cuantitativas..

Características Generales del Estuche⁵	
Material de partida	hasta 200 µL
Rendimiento Medio	> 90%
Volumen de Elución	50 µL
Capacidad de Unión	40 µg
Tiempo / Preparación	38 min

Muestras líquidas⁴

Fluidos biológicos o muestras semi-fluidas pueden ser procesados con el estuche (ej. Exudados). Para una purificación exitosa es importante que la muestra de partida, sea homogénea, límpida y no viscosa; corroborar la ausencia de precipitados en las muestras (en particular las muestras congeladas o almacenadas).

Debido a que los virus presentes en la muestra pueden encontrarse asociados con partículas o agregados, no se recomienda eliminar las partículas o agregados antes de la lisis. No es conveniente prolongar la incubación excesivamente ya que el ARN es sensible y puede degradarse aminorando el rendimiento de la extracción.

Muestras semisólidas o sólidas (ej. tejido, esputo)⁴

Preparar una solución 10 % (w/v) de la muestra sólida en un buffer idóneo (ej. PBS) utilizando un homogeneizador comercial. Centrifugar 15 min a 1500 rpm para eliminar detritus. Tomar 200 µL del sobrenadante para extracción.

Lisis de muestra

Para la extracción de ARN viral la fase de lisis se realiza con **SLU-RNA 3.0** incubando a **temperatura ambiente** (20–25 °C) durante **15 min**.

Para extracción de ARN viral a partir de *muestras viscosas* como esputo, sobrenadante de tejidos macerados en suspensión, se recomienda lisar a **65 °C**.

Fase de elución

Para la elución final del ARN utilizar solo **SE-RNA 3.0**. La elución recupera alrededor de un **90%** de los ácidos nucleicos unidos a la NESP-A380.

3. PREPARACIÓN DE REACTIVOS E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO



¡IMPORTANTE! La solución **SLU RNA 3.0** contiene sales que pueden irritar la piel y las mucosas, utilice guantes y gafas de protección durante su manipulación.

Los reactivos incluidos en el estuche pueden almacenarse a temperatura ambiente (15-40 °C) hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta exterior.



¡IMPORTANTE! – antes de utilizar la solución de **NESP-A380**, homogenizar bien por inversión del frasco varias veces (10 veces) - **NO DAR VÓRTEX- homogenizar constante y enérgicamente, rotando el frasco antes de adicionar a cada pocillo.**



¡IMPORTANTE! No almacenar ninguno de los componentes del estuche a temperaturas superiores a 40 °C. La degradación se acelerará si se conserva incorrectamente, se incuba a temperaturas >80 °C, o se prolonga el tiempo de incubación a 50 °C durante la lisis a más de 15 min. La degradación reduce el rendimiento de la extracción y puede producir falsos negativos en la RT-PCR, en particular si se trabaja con muestras con una baja carga viral. No almacenar a temperaturas inferiores a 15 °C, puesto que puede aparecer precipitados de sales que pueden interferir con el proceso de extracción. **NO REFRIGERAR.**, puesto que puede aparecer precipitados de sales que pueden interferir con el proceso de extracción. No obstante, desaparecen al calentar a 37°C.

4. INSTRUCCIONES DE USO

Procedimiento para extracción en equipo Allsheng 32A

En una placa de 96 pocillos del equipo Allsheng 32A:

1. Adicionar a cada pocillo de la columna **1 y 7** - 200 µL de **SLU-RNA 3.0**



¡IMPORTANTE! – La **SLU-RNA 3.0** ya contiene un **carrier** para la precipitación del ARN, por lo que no es necesario adicionarle uno externo a la misma

2. **Opcional-** Adicionar a cada pocillo el control interno del PCR (de forma individual)
3. Adicionar a cada pocillo de la columna **1 y 7** - 100 µL de Solución de **NESP-A380**
4. Adicionar a cada pocillo de la columna **2 y 8**- 500 µL de **SLV-1**
5. Adicionar a cada pocillo de la columna **3 y 9**- 500 µL de **SLV-2**
6. Adicionar a cada pocillo de la columna **4 y 10**- 500 µL de **SLV-3**
7. Adicionar a cada pocillo de la columna **5 y 11**- 50 µL de **SE-RNA 3.0**
8. Adicionar a cada pocillo de la columna **1 y 7**- 200 µL de la muestra clínica y homogenizar con ayuda de la pipeta
9. Incubar **10 min** a temperatura ambiente (20 –25 °C)
10. Adicionar a cada pocillo de la columna **1 y 7**- 400 µL de **SP-RNA 3.0**
11. Colocar en equipo



Programación del equipo Allsheng 32A

Step	Well	Name	Mix time (min)	Magnet (seg)	Wait time (min)	Volumen (uL)	Mix speed (1-10)	Temp (°C)
1	1	Mix	15	60	0	900	8	50
2	2	Wash1	1	60	0	500	7	OFF
3	3	Wash2	1	60	0	500	7	OFF
4	4	Wash3	1	60	5	500	7	OFF
5	5	Elution	5	60	0	50	10	OFF
6	3	Wash	1	60	0	500	5	OFF
		-End-						

12. Colectar el ARN de cada pocillo de la columna **5 y 11**- conservar a -80 °C o realizar el PCR inmediatamente.

5. EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO

La evaluación del desempeño del sistema de extracción magnética (SEM) CEA-NaNo+ RNA 3.0- se realizó según los requisitos de la Norma Cubana NC-EN 13612: 2006: EVALUACIÓN DEL FUNCIONAMIENTO DE LOS DIAGNOSTICADORES (EN 13612:2002, IDT)⁵.

Resultados obtenidos a partir de las muestras clínicas⁵

El estuche CEA-NANO+ RNA 3.0 ha sido validado en el Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí, utilizando 36 muestras verdaderamente positivas y 80 muestras verdaderamente negativas, analizadas previamente mediante el estuche de extracción magnética suministrado con los equipos de extracción Allsheng, y un posterior RT-PCR para SARS-CoV-2. Se demostró que al utilizar el estuche CEA-NANO+ RNA 3.0 se mantiene la amplificación del Control interno y la detección en las muestras positivas de SARS-CoV-2 en su totalidad. Los valores de C_T del Control Interno fueron mayormente coincidentes en ambas pruebas, aunque en particular en los resultados del RT-PCR del genE de SARS-CoV-2, el estuche CEA-NANO+ RNA 3.0 muestran valores de la mediana del C_T menores que el estuche Allsheng, de lo que se induce una mayor extracción y concentración de ARN viral.

Valores de desempeño

		SEM-Allsheng		Total
		Positivas	Negativas	
SEM-CEA-NaNo+ RNA 3.0	Positivas	36	0	36
	Negativas	0	80	80
Total		36	80	116

Concordancia.....100 %

Sensibilidad.....100 %

Especificidad.....100 %

Kappa..... 1

El estuche CEA-NANO+RNA 3.0 está validado para los siguientes medios de transportes para virus:

-BTV-fabricante (BioCen, Cuba).

-Medio inactivación 1.1-fabricante (BioCen, Cuba).

-VPM- fabricante (China).

El empleo de otro medio de transporte para virus debe ser previamente evaluado por el CEA.

6. RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Problema	Posible causa y sugerencias
El eluido contiene concentraciones muy bajas (o nada) de ácidos nucleicos virales	<p>Problema con la SLU-RNA 3.0</p> <p>La SLU-RNA 3.0 se ha degradado o hay precipitado de sales.</p> <ul style="list-style-type: none"> Véase las condiciones de almacenamiento de la SLU-RNA 3.0 (Sección 3). <p>Los ácidos nucleicos virales han sido degradados</p> <ul style="list-style-type: none"> Las muestras deben procesarse inmediatamente tras su recogida. Asegúrese que las condiciones de almacenamiento de la muestra son apropiadas. Revise que todas las soluciones hayan sido preparados con agua libre de RNAsa y almacenados correctamente (Sección 3).
El ARN obtenido presenta problemas de uso en posteriores procesos	<p>Sensibilidad baja</p> <ul style="list-style-type: none"> Incrementar el volumen de eluido a añadir a PCR/RT-PCR. La temperatura y el tiempo de incubación son factores críticos para la lisis y para la estabilidad del ARN. Para preparaciones de ARN extremadamente sensible a la degradación, incubar la muestra a temperatura ambiente.
Las NESP-A380 quedan resuspendidas o se auto aglomeran en las soluciones de lavado y/o de elución	<p>Inhibición de la PCR- ausencia de ARN eluido</p> <ul style="list-style-type: none"> Oxidación de NESP-A380 con la consecuente pérdida de las propiedades paramagnéticas Comprobar que el medio de transporte de la muestra es compatible con el estuche y no altera el pH de la SLU-RNA 3.0

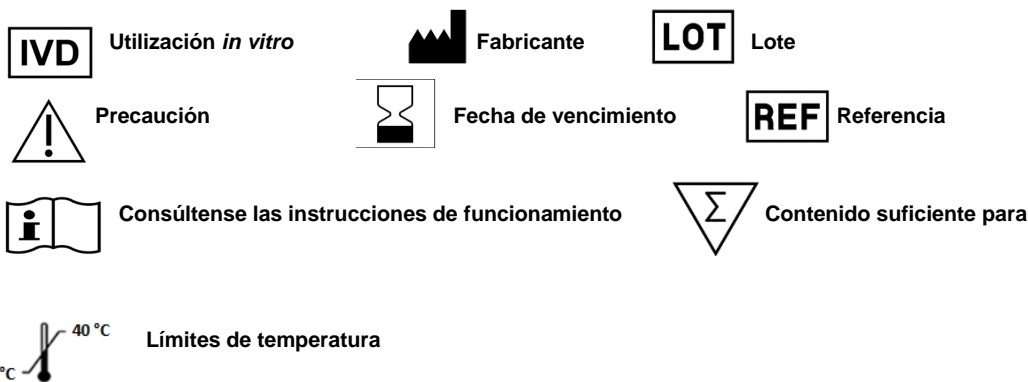
7. LIMITACIONES Y GARANTÍA

- Producto para diagnóstico *in vitro*.
- Es responsabilidad del usuario verificar la validez de uso del estuche para una aplicación específica, pues el estuche no ha sido validado para todos los microorganismo o tipo de células diferentes.
- La documentación incluida en el estuche específica su uso, deben seguirse fielmente las instrucciones con el fin de obtener ácidos nucleico viral de alta calidad.
- Todas las muestras biológicas deben ser manejadas según los procedimientos y normas de Bioseguridad aplicables al agente biológico en cuestión. Para el SARS-CoV-2, debe ser manejadas según procedimientos BSL3.
- Algunos medios de transporte viral para la colecta de muestras, que tienen un pH alcalino (>7.8) u otras sustancias interferentes (sales, detergentes...), pueden resultar incompatibles con el estuche CEA-NANO+ RNA 3.0. Por lo que el uso de medios de transporte nuevos deben ser evaluados por el usuario.
- El CEA garantiza la conformidad del estuche con las especificaciones del producto.
- El CEA no se responsabilizará de daños o defectos debidos al transporte. Las reclamaciones por mercancía dañada han de dirigirse al transportista. El seguro de transporte de mercancías es responsabilidad del cliente.
- El CEA no tendrá responsabilidad sobre ningún daño directo, indirecto, consecuencia o incidental resultante del uso, mal uso, resultado del uso o de la incapacidad de uso del estuche. Tampoco se responsabiliza de los defectos en productos o componentes no manufacturados por el CEA, o daños consecuencia de esos productos o componentes exógenos al CEA.
- Ninguna otra garantía de ningún tipo, directa o indirecta, expresa o implícita, incluyendo sin limitación, garantías implícitas de capacidad de comercialización, o adecuación para un propósito determinado, son dadas por el CEA.
- La garantía de este instructivo, así como las especificaciones y descripciones de este estuche que aparecen en el mismo son los únicos documentos válidos. Comunicados escritos u orales por los comerciales, distribuidores o técnicos del CEA, excepto declaraciones escritas firmadas por un directivo autorizado del CEA, carecen de valor y no forman parte de la garantía del contrato de venta.
- No se deben mezclar componentes de diferentes lotes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Pastorino, B et al.** Evaluation of chemical protocols for inactivating SARS-CoV-2 infectious samples. **Viruses** 2020, 12, 624; doi:10.3390/v12060624
2. **Sagripanti, J et al.** Microbial inactivation safe and rapid diagnostics of infectious samples. **Appl. Environ. Microbiol.** 2011, 77, 7289–7295
3. Laboratory Biosafety Guidance Related to the Novel Coronavirus (2019-nCoV)-Interim Guidance. 2020. Available online: [https://www.who.int/publications/i/item/laboratory-biosafety-guidance-related-to-coronavirus-disease-2019-\(covid-19\)\(accessed on 8 June 2020\)](https://www.who.int/publications/i/item/laboratory-biosafety-guidance-related-to-coronavirus-disease-2019-(covid-19)(accessed on 8 June 2020)).
4. **Klemm, P et al.** Preparation of lysis buffers for the extraction of viral RNA for the detection of a SARS-CoV-2-infection. **Friedrich Schiller University Jena / University Hospital Jena. March 25, 2020**
5. **Mondeja, BA et al.** Protocolo de evaluación del desempeño del sistema de extracción magnética (estuche CEA-NANO+ RNA 3.0- según los requisitos de la Norma Cubana NC-EN 13612: 2006: EVALUACIÓN DEL FUNCIONAMIENTO DE LOS DIAGNOSTICADORES (EN 13612:2002, IDT). **CEA. Septiembre de 2020**

SÍMBOLOS



Fabricado por:



Los laboratorios del **Centro de Estudios Avanzados de Cuba (CEA)** han sido evaluados y certificados en cuanto al cumplimiento de los requisitos de Buenas Prácticas de Fabricación para las siguientes actividades: investigación, desarrollo y fabricación de productos para diagnóstico *in vitro* (IVDs) por el Órgano Regulador Cubano (CECMED). **Licencia de fabricación: 00-00-000.** Autopista Carretera de San Antonio- Km 1 ½ . La Lisa- La Habana. Cuba

© 2020- CEA. Todos los derechos reservados.