

 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:



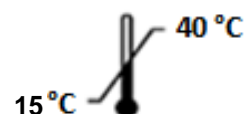
**CENTRO DE ESTUDIOS AVANZADOS DE CUBA**

**Dirección:** Autopista San Antonio de los Baños entre 179 y 340, Reparto Valle Grande La Lisa- La Habana- Cuba

**Teléfono:** (+53) 7 250 2103

**e-mail:** [cea@cea.cu](mailto:cea@cea.cu)

[www.cea.cu](http://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 viral<sup>1-2</sup>.**

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
<b>SLU-RNA 3.0</b> - Solución de Lisis-Unión RNA 3.0	1 x 110 mL	1 x 55 mL
<b>NESP-A380</b> - Solución de NESP-A380	1 x 60 mL	1 x 30 mL
<b>SLV- 1</b> - Solución de Lavado 1	1 x 260 mL	1 x 130 mL
<b>SLV- 2</b> - Solución de Lavado 2	1 x 260 mL	1 x 130 mL
<b>SLV- 3</b> - Solución de Lavado 3	1 x 260 mL	1 x 130 mL
<b>SP-RNA 3.0</b> – Solución de Precipitación	1 x 260 mL	1 x 130 mL
<b>SE-RNA 3.0</b> - Solución de Elución RNA 3.0	1 x 100 mL	1 x 50 mL
<b>Instrucciones para el uso (instructivo)</b>	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..

<b>Características Generales del Estuche<sup>5</sup></b>	
<b>Material de partida</b>	hasta 200 µL
<b>Rendimiento Medio</b>	> 90%
<b>Volumen de Elución</b>	50 µL
<b>Capacidad de Unión</b>	40 µg
<b>Tiempo / Preparación</b>	38 min

#### **Muestras líquidas<sup>4</sup>**

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)<sup>4</sup>

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)<sup>5</sup>.

### Resultados obtenidos a partir de las muestras clínicas<sup>5</sup>

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

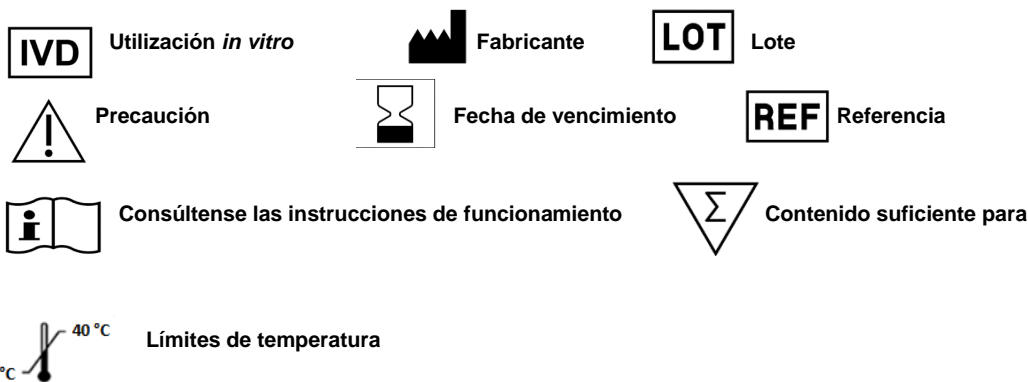
## 7. LIMITACIONES Y GARANTÍA

- 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: LSFN No. 001-21-1D.** Autopista San Antonio de los Baños entre 179 y 340, Reparto Valle Grande. La Lisa. La Habana. Cuba

© 2020- CEA. Todos los derechos reservados.