

K 1501



ADN/ARN PuriPrep-VIRUS kit

Extracción y purificación rápida
de ADN/ARN a partir de hisopado
nasofaríngeo y orofaríngeo

USO EN DIAGNÓSTICO
IN VITRO



ADN/ARN PuriPrep-VIRUS kit

Versión 1.3
25/11/2020

Índice

Presentación.....	6
Importante.....	6
Componentes del Kit	6
Condiciones de conservación.....	7
Garantía.....	7
Advertencias	7
Preparación de los reactivos	9
Protocolo a partir de muestras respiratorias (hisopado nasofaríngeo y orofaríngeo)	10
Solución de inconvenientes	12

PRESENTACIÓN

Highway® ADN/ARN PuriPrep-VIRUS kit (K1501) permite la extracción y purificación rápida y sencilla de ácidos nucleicos virales, ADN y ARN, a partir de hisopados nasofaríngeos y orofaríngeos. Es apto para ser empleado en la extracción y purificación de ARN de SARS CoV-2. (ver “**Advertencias**”)

El producto obtenido puede emplearse inmediatamente en PCR y qPCR, o ser conservado por hasta 24 hs a -80°C.

Si se requiere un eluido libre de ADN, puede ser tratado con DNasa (libre de RNasas), que luego se inactiva con tratamiento térmico (10 minutos a 65°C).

IMPORTANTE

Antes de dirigirse a la sección de Protocolo es importante leer las secciones Condiciones de Conservación, Garantía, Advertencias y Preparación de los reactivos.

COMPONENTES DEL KIT

Se presenta en dos versiones: para 50 y 250 extracciones/purificaciones de ADN/ARN.

Highway® ADN/ARN PuriPrep-VIRUS kit		
Catálogo	K1501-50	K1501-250
Cantidad de muestras	50	250
Minicolumnas con tubos colectores	50	250
Buffer de binding (BB) conc., ml (B0700)	18	88
Buffer de activación (BA), ml (B0702)	18	90
Buffer de lavado (BLav) conc., ml (B0703)	11	49
Agua bidestilada pH: 8.0, ml (B0705)	6	27

ADN/ARN PuriPrep-VIRUS kit

Materiales que aportará el usuario:

Microcentrífuga con rotor para viales de 1,5 y 2 ml; micropipetas hasta 200 y 1000 µl; agitador tipo Vortex; microtubos de 1,5 ó 2,0 ml; etanol (96-100%); PBS 1X estéril.

CONDICIONES DE CONSERVACIÓN

Los buffers y componentes del kit se conservan a temperatura ambiente (15-30°C)

GARANTÍA

Highway® ADN/ARN PuriPrep-VIRUS kit (K1501) debe emplearse siguiendo las especificaciones indicadas en el manual de procedimientos provisto. El uso en aplicaciones no especificadas será responsabilidad del usuario, siendo recomendable la validación correspondiente. Cualquier falla que se produjera en el uso del kit, habiendo respetado los protocolos del fabricante, queda cubierta por la garantía de *Inbio Highway®*. En ese caso se reemplazará el kit por otro semejante. Por otra parte el fabricante atenderá toda duda planteada por el usuario en el empleo del kit o interpretación del manual.

ADVERTENCIAS

Producto apto para ser empleado en la extracción y purificación de ARN de SARS CoV-2. El agregado del buffer binding BB en el primer paso del protocolo produce la inactivación del virus SARS CoV-2, debido a la presencia de sales de guanidinio y Tritón X-100 (*Evaluation of Chemical Protocols for Inactivating SARS-CoV-2 Infectious Samples. B Pastorino, F Touret, M Gilles, L Luciani, X de Lamballerie, RN Charrel. Viruses 12 (6), 624-630 (2020).*

Una vez finalizado este paso, se puede continuar el protocolo fuera de la cabina de bioseguridad tipo II. **Producto de uso para diagnóstico *in vitro*.**

El aislamiento de ARN a partir de muestras clínicas sospechosas de COVID-19 debe realizarse bajo normas de bioseguridad indicadas por la OPS/Organización Mundial de la Salud.

<https://www.paho.org/es/documentos/directrices-provisionales-bioseguridad-laboratorio-para-manejo-transporte-muestras>

Algunos de los reactivos contienen sustancias caotrópicas y detergentes no iónicos. Se recomienda el uso de guantes de látex en el empleo de este kit, ya sea para evitar la contaminación de las muestras o para prevenir posibles irritaciones de la piel. No obstante, en caso de salpicaduras lavar con agua y jabón.

El ARN es muy sensible a RNasas presentes en la piel y en superficies del laboratorio, a fin de evitar la degradación de las muestras y la contaminación cruzada en el procesamiento de muestras múltiples, se recomienda:

- a) Trabajar con guantes de látex y cambiárselos con frecuencia, especialmente si se produce contacto entre la muestra y los guantes, o luego de tocar superficies o elementos que no hayan sido previamente tratados para eliminar RNasas.
- b) No tocar la membrana del fondo de la columna con el tip cuando se agregan los reactivos. Cambiar de tip cada vez que se toquen las paredes de la columna, cuando se dispensan los reactivos seriadamente en el procesamiento de varias muestras.
- c) Asegurarse de emplear materia plástico descartable libre de DNasas y RNasas. Usar tips con filtro.
- d) Las centrifugaciones deben realizarse a temperatura ambiente (15-30°C) y los buffers de extracción y de lavados deben estar también a esa temperatura.

ADN/ARN PuriPrep-VIRUS kit

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

1. Buffer de activación (BA)

Se entrega **concentrado**. Conservar a temperatura ambiente (15-30°C). Si se observa un precipitado (antes del agregado de etanol), calentar la solución en un baño maría a 70°C hasta su completa disolución. Requiere la adición de etanol (96-100%) en las cantidades indicadas a continuación:

Tipo de kit	BA conc. (ml)	Etanol (ml)	Vol. final (ml)
K1501-50	18	11	29
K1501-250	90	55	145

Homogeneizar antes de usar. Marcar en la etiqueta la adición de etanol (X).

2. Buffer de lavado (BLav)

Se entrega **concentrado**. Conservar a temperatura ambiente (15-30°C). Requiere la adición de etanol (96-100%) en las cantidades indicadas a continuación:

Tipo de kit	BLav conc. (ml)	Etanol (ml)	Vol. final (ml)
K1501-50	11	44	55
K1501-250	49	196	245

Homogeneizar antes de usar. Marcar en la etiqueta la adición de etanol (X).

IMPORTANTE: luego de agregar etanol a los buffer de Activación y Lavado, marcar una (X) en el casillero de la etiqueta, a la derecha del texto “**ADICIÓN DE ETANOL**”

PROCOLO A PARTIR DE MUESTRAS RESPIRATORIAS (HISOPADO NASOFARÍNGEO Y OROFARÍNGEO)

Acciones previas

- Si se observa un precipitado en el Buffer de Binding **BB** o en el Buffer de Activación **BA** (previo al agregado del etanol), calentar la solución en un baño maría a 70°C hasta su completa disolución.
- Controlar que los Buffers de Activación **BA** y de Lavado **BLav** hayan sido preparados como se indica en “**Preparación de los reactivos**”.

Nota: Los hisopados nasofaríngeos y orofaríngeos deben conservarse en el mismo tubo para aumentar la carga vírica. Los hisopos a utilizar deben ser de torunda de nylon, dacrón o viscosa con manguito plástico. Los mismos se deberán sumergir en 2 ml de medio de transporte para virus o en su defecto 2 ml de solución salina de uso parenteral. Deberán ser contenidos en un tubo plástico, estéril, con tapa a rosca y hermético.

PROCOLO

1. Cortar la punta del hisopo con una tijera estéril y colocarla en un microtubo de 1,5 ml junto con 200 µl de la solución en donde se encontraba sumergido el hisopo. Si el volumen de líquido fuese menor a 200 µl, completar con PBS 1X estéril.

Nota: En el caso de hisopos secos, cortar la punta y colocarla en microtubo de 1,5 ml junto a 200 µl de PBS 1X estéril, vortexear durante varios segundos. Si el buffer de transporte excede el volumen indicado, emplear para el análisis 200 µl, junto con la punta del hisopo.

2. Agregar 300 µl de Buffer de Binding **BB**. Mezclar en vortex durante varios segundos.

3. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente. Al finalizar dar un pulso en microcentrífuga.

4. Agregar 500 µl de etanol (96-100%). Mezclar en vortex y dar un pulso en microcentrífuga.
5. Transferir 500 µl del contenido del microtubo a una minicolumna colocada sobre uno de los tubos colectores de 2 ml. Centrifugar a 8.000 g durante 1 minuto o hasta que haya escurrido todo el contenido. Descartar el filtrado, colocando nuevamente la columna en el tubo colector. Repetir este paso con el resto del contenido del microtubo.
6. Agregar 500 µl de Buffer de activación **BA**, cuidando que el tip no toque la membrana. Centrifugar a 8.000 g durante 1 minuto. Descartar el filtrado, colocando nuevamente la columna en el tubo colector.
7. Agregar 450 µl de Buffer de lavado **BLav**. Centrifugar a 8.000 g durante 1 minuto. Descartar el filtrado, colocando nuevamente la columna en el tubo colector.
8. Agregar otros 450 µl de Buffer de lavado **BLav**. Centrifugar a 8.000 g durante 1 minuto. Descartar el filtrado, colocando nuevamente la columna en el tubo colector.
9. Centrifugar a máxima velocidad (aproximadamente 13.000 g) durante 3 minutos. Es muy importante eliminar todo vestigio de buffer de lavado de la columna ya que puede resultar inhibitor en varias técnicas a realizar con el ADN/ARN final. De ser necesario repetir la centrifugación anterior.
10. Descartar el tubo colector y colocar la columna en un microtubo de 1,5 ml rotulado. Agregar 30 µl de **Agua bidestilada pH: 8**. Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos. Centrifugar a 13.000 g durante 1 minuto. Los ácidos nucleicos virales eluirán al microtubo. Conservar a - 80°C.

Nota:

Puede eluirse con 50 µl de agua pero disminuirá la concentración de ácidos nucleicos. Si se requiere un eluido libre de ADN, el producto obtenido puede ser tratado con DNasa (libre de RNasas), que luego se inactiva con tratamiento térmico (10 minutos a 65°C).

SOLUCIÓN DE INCONVENIENTES

Inconveniente	Posible causa
<p>Bajo rendimiento en el ADN/ARN eluído</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Asegurarse de haber realizado una buena agitación luego del agregado del BB y de respetar el tiempo de incubación. • Revisar que se haya adicionado etanol, antes de transferir el contenido a la minicolumna. • Chequear el correcto agregado de etanol (96-100%) en los Buffers de Activación y Lavado. • Revisar que el agua empleada para eluir tenga un pH ligeramente alcalino. El pH del agua del kit es pH: 8,0. • No eluir con menos de 30 µl de agua. • Permitir que el agua de elución humecte la columna durante 5 minutos antes de centrifugar. • Recordar chequear que el Buffer de Activación no se encuentre cristalizado (previo al agregado de etanol). Ver “preparación de los reactivos”, pag. 8
<p>Baja relación A_{260}/A_{280} en el eluído</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Asegurarse de haber realizado una buena agitación, luego del agregado del BB y de respetar el tiempo de incubación. • Revisar que se haya adicionado etanol, antes de transferir el contenido a la minicolumna. • Chequear el correcto agregado de etanol (96-100%) en los Buffers de Activación y Lavado. • Efectuar los dos lavados indicados.

ADN/ARN PuriPrep-VIRUS kit

Inconveniente	Posible causa
Falla en reacciones enzimáticas posteriores del ADN/ARN eluído	<ul style="list-style-type: none">• Ver “Bajo rendimiento del ADN/ARN eluído”• Presencia de inhibidores en el eluído. Ver “Baja relación A_{260}/A_{280} en el eluído”• Presencia residual de Buffer de Lavado, asegurarse de respetar los 3 minutos de centrifugación a máxima velocidad (13.000 g) del paso 9.• Chequear que el orden en que se emplearon el Buffer de Activación y el Buffer de Lavado sea el indicado en el manual.

INBIO HIGHWAY S.A.

Serrano 1414 - (7000) - Tandil - Argentina

Dir. Téc. Dra Yanil R. Parma

Tel: + 54 (249) 442 0193

Autorizado por ANMAT. PM 2709-001

contacto@inbiohw.com.ar

www.inbiohw.com.ar



PRODUCIDO
EN ARGENTINA

ES UN PRODUCTO DE

