

# VIASURE

Extraction Kit



## DNA/RNA Pathogens

CE IVD



This instruction for use applies to the following references / *Estas instrucciones de uso aplican para las siguientes referencias:*

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIAS
VIASURE DNA/RNA Pathogens Extraction Kit, 96 prep	VS-EAP0196OP

Table A 1. References

## Content

1. Intended use .....	4
2. Safety information .....	4
3. Summary and Explanation .....	5
4. Principle of the procedure .....	6
5. Reagents provided .....	7
6. Reagents and equipment to be supplied by the user .....	8
7. Transport and storage conditions .....	8
8. Warnings and Precautions .....	9
9. Test procedure .....	10
10. Result interpretation .....	15
11. Limitations of the procedure .....	15
12. Quality control .....	15
13. Performance characteristic .....	16
14. Troubleshooting .....	16

## Contenido

1. Uso previsto .....	19
2. Información de seguridad .....	19
3. Introducción y explicación .....	20
4. Procedimiento .....	21
5. Reactivos suministrados .....	22
6. Material requerido y no suministrado .....	23
7. Condiciones de transporte y almacenamiento .....	23
8. Advertencias y precauciones .....	24
9. Procedimiento del test .....	26
10. Interpretación de los resultados .....	31
11. Limitaciones del procedimiento .....	31
12. Control de calidad .....	32
13. Características de rendimiento .....	32
14. Solución de problemas .....	33
Bibliography/Bibliografía .....	35
Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico <i>in vitro</i> .....	35
Trademarks .....	35

## ENGLISH

### 1. Intended use

The VIASURE DNA/RNA Pathogens Extraction Kit is designed for the isolation and purification of viral, bacterial, parasitic, and fungal DNA and RNA from different clinical samples (swabs, saliva, sputum, feces and urine) for subsequent diagnostic purposes using an automated extraction System. The kit contains different reagents to process clinical samples and facilitate the sensible detection of pathogens with downstream application. This product is not intended for the diagnosis, prevention, or treatment of a disease.

This Kit is intended for use by qualified and trained clinical laboratory personnel specifically instructed and trained in molecular techniques and diagnostic procedures, and experience with potentially infectious human samples or materials.

### 2. Safety information

VIASURE DNA/RNA Pathogens Extraction Kit contains hazardous contents. For more information, please consult appropriate material safety data sheets (MSDS).

#### GSH classification




Reagent/Material	GHS symbol	Hazard phrases	Precaution phrases
Lysis Buffer	 Inflamable, corrosive y toxic	Danger H226, H302, H314, H412	P210, P260, P264, P280, P305+P351+P338, P310, P370+P378
Wash 1 Buffer	 Corrosive and toxic	Danger H302, H314,	P260, P264, P280, P303+P361+P353, P305+P351+P338, P310, P501
Proteinase K	 Danger	Danger H334	P264, P280, P304+340, P342+311

Table 1. GHS classification

#### Hazard phrases

H226; Flammable liquid and vapour.

H302; Harmful if swallowed.

H314; Causes severe skin burns and eye damage.

H412; Harmful to aquatic life with long lasting effects.

H334; May cause allergy or asthma symptoms or breathing difficulties if inhaled.

### **Precaution phrases**

P210; Keep away from heat/sparks/open flames/hot surfaces. - No smoking.

P260; Do not breathe dust/fume/gas/mist/vapours/spray.

P264; Wash hands thoroughly after handling.

P280; Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.

P304+340 IF INHALED; Remove person to fresh air and keep comfortable for breathing.

P305+P351+P338; IF IN EYES; Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

P303+P361+P353; IF ON SKIN (or hair); Take off immediately all contaminated clothing. Rinse skin with water [or shower].

P310; Immediately call a POISON CENTER or doctor/physician.

P370+P378; In case of fire: Use ... for extinction.

P501; Dispose of contents/container to ...

P342+P311; If experiencing respiratory symptoms: Call a POISON CENTER or doctor/physician.

## **3. Summary and Explanation**

Infectious diseases are communicable disorders caused by pathogenic microorganisms such as bacteria, viruses, parasites, or fungi that can be spread directly or indirectly from one individual to another, with negative economic and social consequences all over the world. The correct and fast diagnosis of infections is crucial to manage the pathology, select the appropriate treatment, reduce morbidity and mortality, as well as prevent or control infectious diseases outbreaks.

The diagnosis of pathogens is traditionally based on cultures and time-consuming methods, which have special requirements. The signs and symptoms of infectious diseases are superimposed; therefore, an etiological diagnosis based only on the clinical symptoms is not reliable. The development of molecular techniques based on nucleic acid amplification (NAAT) are a sensitive and specific diagnostic tool for determining more than one pathogen in one single assay. In this sense, real time PCR is the preferred molecular diagnostic method for infections.

Nevertheless, this technique requires a previous nucleic acid (NA) extraction. The procedure to do so includes three main steps: extracting or releasing the NA from the sample and the cell or organism by lysis; separating or isolating NA from other cellular or sample material; and purification by removal of inhibitory substances. A fourth optional step, concentrating, is important for detection of low-concentration analytes.

An extraction kit for the simultaneous isolation of high quality and quantity DNA and/or RNA, from different clinical samples, and pathogens, is essential for their specific detection through molecular diagnostic assays. Nowadays, the increased number of samples to be processed at clinical laboratories requires the possibility of automating this procedure. The adaptation of the reagents to a robotic platform can improve daily workflow, standardization of sample treatment, decrease variability, reduce biohazards, and avoid contamination by reducing the analyst final hands-on time.

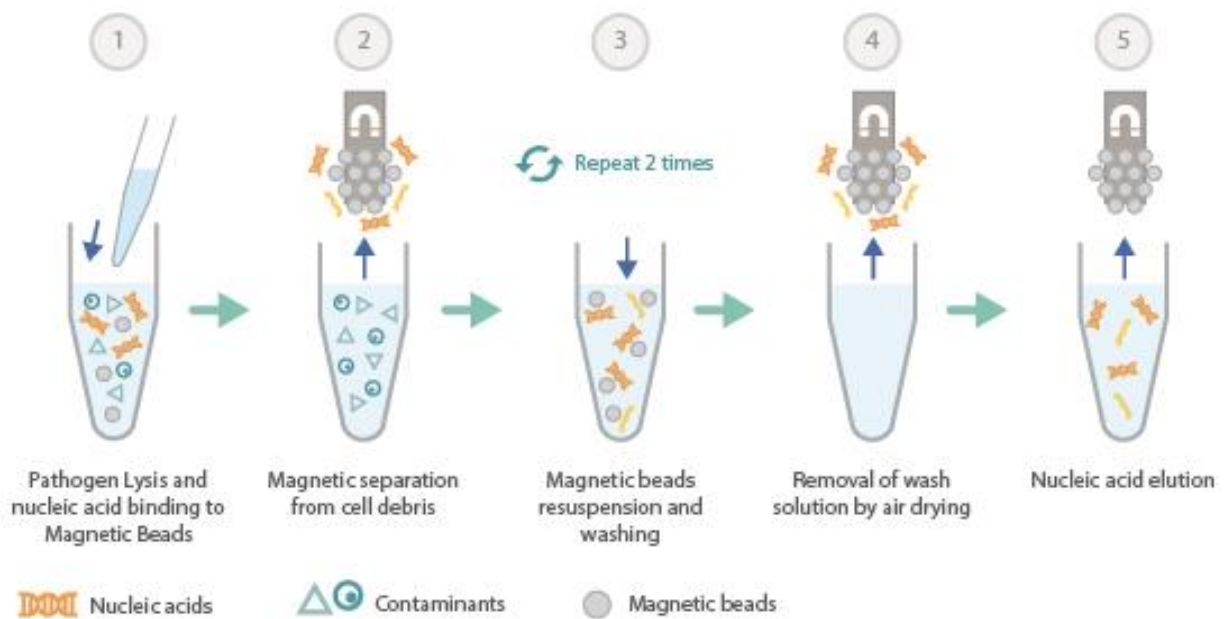
VIASURE DNA/RNA Pathogens Extraction Kit is designed for the isolation and purification of viral, bacterial, parasites and fungal pathogens nucleic acids from different human clinical samples such as swabs, saliva, sputum, urine, and feces.

## 4. Principle of the procedure

The VIASURE DNA/RNA Pathogens Extraction Kit procedure is based on the spontaneous and reversible adsorption of nucleic acids to superparamagnetic beads with a functionalized surface under appropriate buffer conditions. After some washing steps the nucleic acids are eluted in a purified and concentrated solution. The use of magnetic particles as solid phase for adherence of nucleic acids allows the processing of an elevated number of samples by their simultaneous exposition to a magnetic field, and therefore the automation of the process.

VIASURE DNA/RNA Pathogens Extraction Kit has been designed for the automatic platform KingFisher™ Flex (ThermoScientific). This type of platform procedure transfers the magnetic beads between tube/wells from one reagent to the next, by magnetic field attraction. The activation and de-activation of the magnetic field allows beads attraction and beads resuspension within different buffers. Figure 1 shows the basic principle of this type of automated extraction. First, the Magnetic Beads are added to the lysate and after an incubation, the adsorption of the nucleic acids occurs (1). The magnetic particles are attracted to the surface of a magnet covered with plastic tips (2), to be transferred to other wells containing Wash Buffer 1 y Wash Buffer 2, to eliminate cell debris and salts. After some washing steps (3), beads are dried to eliminate organic solvent residues (4). Finally, the DNA or RNA is released from the magnetic particles with an Elution Buffer (5), which results in a pure sample ready for quantification and analysis. Purified DNA and RNA can be directly used for downstream applications. It is highly recommended to use extraction controls, positive/negative controls, internal controls to evaluate the complete workflow (See Procedure sections).

Figure 1. Magnetic beads extraction basic principle for a magnetic beads handling automated instrument.



VIASURE DNA/RNA Pathogens Extraction Kit facilitates the simultaneous processing of different samples in the same extraction run, increases daily workflow, robustness and reproducibility, reduces contamination, and contact with biological hazards.

## 5. Reagents provided

VIASURE DNA/RNA Pathogens Extraction Kit includes the following reagents detailed in Table 2.

Reagent/Material	Comments	Description	Amount
Lysis Buffer *	Liquid reagents mixture for pathogen lysis and nucleases inactivation	White bottle	1 bottle x 65 ml
Wash 1 Buffer	Wash solution in which absolute ethanol (not included) must be added	White bottle	1 bottle x 27 ml
Wash 2 Buffer	Wash solution in which absolute ethanol (not included) must be added	White bottle	1 bottle x 18 ml
Elution Buffer	Solution for nucleic acid recovery	White bottle	1 bottle x 50 ml
Magnetic Beads	Magnetized beads suspension for nucleic acid adsorption	Transparent vial with cap	1 vial x 1.6 ml
Proteinase K	Enzyme solution for pathogen lysis	Transparent vial with cap	1 vial x 1.6 ml
Extraction Control (EC)	Non-infectious nucleic acid lyophilized	Green vial with cap	1 vial
Water RNase/DNase Free	Rehydration buffer for Extraction Control vial resuspension	White vial with cap	1 vial x 1 ml

\* Contains chaotropic salt. Not compatible with disinfectants containing bleach. See section 8 "Warning and precautions".

Table 2. Reagents and materials provided in VIASURE DNA/RNA Pathogens Extraction Kit.

## 6. Reagents and equipment to be supplied by the user

The following list includes the materials that are required for use but not included in the VIASURE DNA/RNA Pathogens Extraction Kit.

- Sample collection and transport system.
- Absolute ethanol.
- Micropipettes.
- Filter tips.
- Powder free disposable gloves.
- Biosafety cabinet.
- Pipettes and/or graduate test tube.
- Vortex.
- Thermomixer.
- Real-Time PCR instrument (thermocycler).
- Real-Time PCR assay.
- Ribonuclease (RNase)/ Deoxyribonuclease (DNase) free tubes for nucleic acid collection and storage.
- Positive and negative controls for the monitoring the Extraction process. It is recommended the use of positive and negative extraction controls. (For example, to test SARS-CoV-2, the kit VIASURE Viral SARS-CoV-2 Positive Control Kit (Ref: VS-VP1NCO or VS-VP101NCO)).

*Note: In case that processes other than those indicated in this Instructions for use are validated, it is recommended to assess whether it is necessary to use materials other than those described in this section.*

The specific materials required when using the for the KingFisher™ Flex (ThermoScientific) system are listed below:

- KingFisher™ deep-well 96 plate - ThermoScientific™ (Number catalogue: 95040450) Units: 4/96 preps
- KingFisher™ 96 plate 200µL - ThermoScientific™ (Number catalogue: 97002540) Units: 1/96 preps
- KingFisher™ 96 tip comb for DW Magnets - ThermoScientific™ (Number catalogue: 97002534) Units: 1/96 preps

## 7. Transport and storage conditions

- The kit reagents can be shipped at 2-40 °C and stored until the expiration date which is stated on the label. Check all components for damages after receiving the kit. Do not use damaged kit components.
- It is recommended to keep components at room temperature (15-30 °C) away from light and store in a vertical position to avoid any possible spillage.
- It is recommended to keep Magnetic Beads vials under refrigeration 4°C-8°C after receiving the kit.
- Lysis Buffer and Wash 1 Buffer contain guanidine salts that may precipitate. If there is visible precipitate at the bottom of the cartridge, resuspend by mild heating and shake.
- Once the Extraction Control has been re-suspended, store it at -20°C.
- It is recommended to store the supernatant obtained in the processing at 4°C for up to 8 hours until its addition to the different downstream applications. This addition should be performed as soon as possible. After use, the remanent of the supernatant can be stored at -20°C minimizing freeze-thaw cycles in the case of retest (up to 2 times). If sample treatment and amplification assay cannot be performed on the same day, the supernatant obtained must be kept at -20°C until use (up to one week).



## 8. Warnings and Precautions

- The product is intended for use by qualified and trained clinical laboratory personnel specifically instructed and trained in the techniques of nucleic acid extraction procedures and real-time PCR and in vitro diagnostic procedures, including training on nucleic acid extraction system and the real-time PCR instrument (thermocycler).
- Do not use past expiration date.
- Do not use the kit if the label that seals the outer box is broken.
- Do not use reagents if the protective external box or the protective pouches are opened or damaged upon arrival.
- Do not use Extraction Control if desiccant is not present or broken inside reagent pouch. Do not remove desiccant from reagent pouch once is open.
- Do not mix reagents from different pouches and / or kits and / or lots and / or another supplier.
- Design a unidirectional workflow. Do not reuse reagents and do not recover the remaining liquid volume into the original bottle of the reagent once used.
- Always avoid microbial and ribonuclease (RNase)/deoxyribonuclease (DNase) contamination of reagents. The use of sterile RNase/DNase-free disposable aerosol resistant or positive displacement pipette tips is recommended. Use a new tip for each specimen. Gloves must be changed before manipulating reagents. In cases where other extraction procedures are performed in the same general area of the laboratory, care must be taken to ensure that the VIASURE DNA/RNA Pathogens Extraction Kit and any additional reagents or equipment required for testing are not contaminated.
- Do not reuse any disposable items.
- Store positive materials used separated from the kit's reagents.
- Use screw-capped tubes and prevent any potential splashing or cross contamination of specimens during preparation.
- Avoid possible contamination of reagents with extracted nucleic acids, PCR products, and positive control. To prevent contamination of reagents, use of filter-tips is recommended.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposable gloves, goggles, and mask. Do not eat, drink or smoke or apply cosmetic products in the working area. Once you finish the test wash your hands.
- Specimens must be treated as potentially infectious and/or biohazardous, as well as all the reagents and materials that have been exposed to the samples and they must be handled according to the national safety regulations. Take necessary precautions during the collection, transport, storage, handling, and disposal of samples.
- Samples and reagents must be handled in a biological safety cabinet. Use personal protective equipment (PPE) consistent with current guidelines for the handling of potentially infectious samples. Dispose of waste in compliance with local, state, and federal regulations.
- All reagents should be handled with care, minimizing the time of exposure to the open, especially those reconstituted with absolute ethanol. Consult the hazards and precautions when handling ethanol in the Material Safety Data Sheet.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.
- When working with the VIASURE DNA/RNA Pathogens Extraction Kit wear suitable protective clothing (e.g., lab coat, disposable gloves, and protective goggles).
- Reliability of the results depends on adequate specimen collection, storage, transport, and processing procedure. Synthetic fibre swabs with plastic shafts are recommended for sample collection. Calcium alginate swabs or

swabs with wooden shafts are not recommended, as they may contain substances that inhibit PCR testing. Make sure that the swab head is completely submerged in the sample collection tube and if necessary, press the swab against the wall of the tube to squeeze out the liquid.

- Use graduated test tubes to fill the bottles with isopropanol or ethanol.
- In the case of a subsequent qPCR analysis, consult each qPCR kit or real-time PCR instrument's reference manual for additional warnings, precautions, and procedures.
- The waste generated with the VIASURE DNA/RNA Pathogens Extraction Kit has not been tested for residual infectious material. A contamination of the liquid waste with residual infectious material is highly unlikely due to strong denaturing Lysis Buffer and Proteinase K treatment but it cannot be excluded completely. Therefore, liquid waste must be considered infectious and should be handled and discarded according to local safety regulations.
- Lysis Buffer contains chaotropic salt. Not compatible with disinfectants containing bleach. Consult the hazards and precautions when handling Lysis Buffer in the Material Safety Data Sheets provided with the Device.
- Make sure there is not precipitate in the supplied reagents. Lysis Buffer and Wash 1 Buffer contain guanidine salts that may precipitate. If there is visible precipitate at the bottom of the bottle, resuspend by mild heating and shake until its complete dissolution.
- If the Proteinase K present a yellowish colour, note that this does not affect the functionality of the kit.
- Make sure that the beads are completely resuspended. Shake vigorously the storage vial on a Vortex.
- Make sure all tubes, plates or cartridges have been properly placed following the indicated layout and fit correctly into the specific adapters of the Automated extraction system.
- Before dispensing VIASURE DNA/RNA Pathogens Extraction Kit into the platform consumables open carefully each reservoir avoiding reagent spilling and reconstitute the indicated wells as indicated in the procedure section.

## 9. Test procedure

### 9.1. Sample collection and transport

VIASURE DNA/RNA Pathogens Extraction Kit is suitable for various potentially infectious human clinical samples: respiratory and sexual swabs samples, saliva, sputum, urine, and feces. For reproducible and high yields appropriate sample storage is essential. Yields may vary from sample to sample depending on factors such as health and age of the donor, kind of sample, collection date, transport, and storage conditions.

As general recommendations, the specimens should be collected as soon as possible, depending on the pathogen during the acute phase of illness or at any time during the clinical course, and before antimicrobial therapy begin, if possible. Specimens should be collected in a sterile container avoiding touching adjacent tissues and organ secretions that are not of interest. All specimens must be labeled with the name and identification number of the person from whom the sample was collected, the source of the specimen, and the date and time it was collected. After collection, specimens should be placed in a biohazard bag and transported to the laboratory as soon as possible.

Depending on the type of specimen, the collection differs. Follow the recommendations by McPherson R.A., Pincus M.R. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 23RD edition. Elsevier Health Sciences; 2017.

According to the literature, the conditions of transport, storage and stability depend on the type of the sample matrix and the pathogen to be detected. It is recommended to use fresh specimens for the test. The specimens should be refrigerated for urine, respiratory specimens, and stool; or held at room temperature for cerebrospinal fluid (CSF), blood

and other body fluids. If a delay is unavoidable (< 2 hours until they can be sent), the general rule is to ship at -20°C or ideally at -70°C or 80°C.

Optimally, all specimen containers should be opened in a biological safety cabinet. Appropriate barriers should be used to prevent exposure of skin and mucous membranes to the specimen. Gloves and a lab coat must always be worn when handling clinical specimens. Masks, goggles (or working behind a plastic shield), and impermeable gowns or aprons must be worn when there is a risk for splashes or droplet formation. Wash your hands once the proceeding has finished.

Specimens submitted for molecular testing must be stored in controlled conditions so that nucleic acids do not degrade during storage. Avoid freezing and thawing cycles. Some pathogens from specimens that are frozen and then thawed could be degraded and may result in false-negative test results.

Depending on the clinical specimen and pathogen different sample pretreatments may be needed. Follow the appropriate protocol laboratory guideline in each case. Refer to the CDC guideline (Specimen collection guidelines. Website <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf> and Interim Guidelines.

For Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens for COVID-19 consult: Website <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html>) and the IDSA guideline (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018). A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94).

It is recommended to work with inactivated clinical samples. VIASURE DNA/RNA Pathogens Extraction Kit is compatible with inactivating transport media such as guanidinium salts media.

## 9.2. Sample pretreatment

Depending on the clinical specimen and pathogen different sample pretreatments may be needed. It is important to avoid substances or objects that may interfere in sample pipetting during the automated process, therefore, caps or swabs should be removed before introducing the samples into the sample racks, and solid or highly viscous samples must be pretreated.

- Feces: Mix vigorously approximately 100 mg with 900 µL of distilled water, then centrifuge 90 seconds at 1000 g. Recover supernatant with the suspected pathogen for extraction.
- Urine. Centrifuge 10 mL at 5200 g for 15 min, remove supernatant and resuspend pellet in 1 mL of TE 10X Ph
- Viscous samples such as saliva, sputum or bronchoalveolar lavages may require pretreatment with acetyl cysteine 20 mg/mL. Add as many volume as required to make sample is liquid enough to be aspirate with the pipette. If its needed mix and heat during pre-treatment.

Rest of samples can be directly introduced into the platform.

## 9.3. Buffer's addition

Before starting with the nucleic acid extraction and purification, it is necessary in some reagents to add a certain volume of other reagents (not included in the kit). The following table indicates which reagent should be added and the required volume:

Reagent/Material	Reagent for resuspension	Volume
Wash 1 Buffer*	Absolute ethanol	63 mL
Wash 2 Buffer*	Absolute ethanol	72 mL

Table 3. Reagents and volumes to be resuspended in the Wash 1 Buffer and Wash 2 Buffer.

\*Note: To facilitate the process, a mark has been included on the label of each reagent to tick when the reagents are added.

Besides, it is recommended to make sure to write with indelible marker the specific automated extraction system cartridges used once resuspended in the space with the resuspension date and other required information.

Use graduated test tubes to fill the bottles with ethanol.

Lysis Buffer contain guanidine salts that may precipitate. If there is visible precipitate at the bottom of the bottle, resuspend by mild heating and shake.

#### 9.4. Lyophilized extraction control

The use of the Extraction Control (EC) will be required only for VIASURE Real Time PCR products which do not include an internal control in the lyophilized reaction mix. Please consult Instructions for use of each VIASURE product to check this information. For these VIASURE Real Time PCR products use the Extraction Control (EC) provided in the VIASURE DNA/RNA Pathogens Extraction Kit.

Recommendation is to open and manipulate the Extraction Control (EC) in pre-PCR laboratory area away from the PCR-Amplification area. Reconstitute the lyophilized Extraction Control (green vial) adding 550 µL of Water RNase/DNase free (white vial) supplied and vortex thoroughly.

Once the Extraction Control has been re-suspended, store it at -20°C and minimize freeze and thaw cycles (up to 3 cycles).

Add 5 µL of the rehydrated EC to each required well with preloaded Lysis Buffer to monitor the extraction process and/or discard the inhibition of the polymerase activity.

#### 9.5. Extraction procedure

The procedure below provides instructions the steps to process samples. The specific extraction procedure to follow within KingFisher® Flex automatic platforms is listed below. (Note: In case of using VIASURE DNA/RNA Pathogens Extraction Kit with another automated extraction system different from the one mentioned in these Instructions for use, the procedure must be validated by the user).

##### 1. Load with reagents 96 Deep well plates

Load all plates with the following reagents and volumes in the required wells depending on the number of samples to analyze.

- Plate 1: Lysis Buffer 265 µL.
- Plate 2: Wash 1 Buffer 500 µL.
- Plate 3: Wash 2 Buffer 500 µL.
- Plate 4: Elution Buffer 100 µL.

## 2. Sample inactivation

Add 200 µl of sample to the preloaded Lysis Buffer plate making sure that the sample has been properly mixed with the Lysis Buffer, and incubate at room temperature for 15 min. If it is needed to control the complete molecular diagnosis workflow add 5 µl of rehydrated Extraction Control before incubation.

## 3. Magnetic Beads and Proteinase K

Add to each sample 15 µl of Proteinase K and 15 µl of Magnetic Beads.

It is recommended to vortex the Magnetic Beads at least 2 minutes until they are completely resuspended.

## 4. Plate Set Up into the instrument.

Configure the protocol of the Instrument following the table below that describes the complete setup of the extraction process:

Step	Procedure	Setting
<b>Pick Up</b>	<b>96 Tip Comb plate</b>	
<b>Binding</b>	<b>Sample plate</b>	
Beginning of step	Precollect of Magnetic Beads	No
Mixing/Heating	Release beads Mixing time, speed Heating temperature Preheat	5 min, Fast 65°C Yes
End of step	Postmix Collect count Collect time	No 5 0 sec
<b>Wash 1</b>	<b>Wash 1 plate</b>	
Beginning of step	Precollect of Magnetic Beads	No
Mixing/Heating	Release time, speed First shake time, speed Second shake time, speed Loop count Heating during mixing	20 sec, Bottom mix 10 sec, Bottom mix 10 sec, Fast 3 No
End of step	Postmix Collect count Collect time	No 4 1 sec
<b>Wash 2</b>	<b>Wash 2 plate</b>	
Beginning of step	Precollect of Magnetic Beads	No
Mixing/Heating	Release time, speed First shake time, speed Second shake time, speed Loop count Heating during mixing	20 sec, Fast 10 sec, Bottom mix 10 sec, Fast 2 No
End of step	Postmix Collect count Collect time	No 4 1 sec
<b>Dry</b>	<b>Wash 2 plate</b>	
	Dry time Tip position	2 min Outside well/tube
<b>Elution</b>	<b>Elution plate</b>	
Beginning of step	Precollect	No

Mixing/Heating	Release beads First shake time, speed Second shake time, speed Loop count Heating temperature	Yes 15 sec, Bottom mix 45 sec, Medium 6 70 °C
End of step	Preheat Postmix Collect cout Collect time	Yes No 5 0 sec
<b>Collection beads</b>	<b>Elution plate</b>	
Beginning of step	Precollect	No
Mixing/Heating	Release beads Mixing time, speed Heating during mixing	No 1 min 30 sec, Slow No
End of step	Postmix Collect beads	No No
<b>Leave</b>	<b>Tip comb plate</b>	

Table 4. Complete settings of the extraction process to be followed within KingFisher® Flex automatic platforms.

Make sure all plates are loaded in the same direction, with the well A1 facing the top right. Then fill the platform with the plates following the next order:

- 1st. Tip comb.
- 2nd. Elution plate.
- 3rd. Wash 2 Buffer plate.
- 4th. Wash 1 Buffer plate.
- 5th. Lysis Buffer with inactivated sample plate.

Once plates have been loaded click start and the run will be done in 28 minutes.

#### Purified nucleic acids recovery

Eluted samples can be used directly or stored at 4°C if the qPCR is performed immediately after the extraction. For long term storage, keep at -20°C or -80°C minimizing freeze-thaw cycles. Consult Section Transport and storage conditions for more information. Once the extraction and PCR setup transfer the loaded plate to thermocycler for nucleic acid amplification following Manufacturer's indications.

#### 5. Decontamination

Decontaminate properly the platform inner surfaces with appropriate disinfectant solvents and discard used plastic consumables.

For more details consult KingFisher™ Flex (ThermoScientific) user manual.

### 9.6 Real-Time PCR

The nucleic acids obtained with VIASURE DNA/RNA Pathogens Extraction Kit are compatible with any commercially available qPCR or RT-qPCR kit, although it has only been validated with the VIASURE Real Time PCR Detection kits.

Manufacturer's instructions for the VIASURE Real Time PCR Detection Kits must be followed (consult <https://www.certest.es/es/viasure/>). The positive and negative controls included in the extraction step must not substituted the positive and negative controls provided with the qPCR kits.

Recommendation is to use the thermocycler VIASURE V-Lab96 Cyclor (CerTest Biotec S.L) and the decision-support software VIASURE V-Smart (CerTest Biotec S.L) for the analysis and interpretation of the results.

## 10. Result interpretation

To correctly interpret the results of the controls and clinical samples, please consult the Manufacturer's Instructions of the different downstream applications.

If the chosen downstream application is qPCR assay, the recommendation is to use the decision-support software VIASURE V-Smart (CerTest Biotec S.L) for the analysis and interpretation of the results.

## 11. Limitations of the procedure

- The efficiency of the performance characteristics of VIASURE DNA/RNA Pathogens Extraction Kit for KingFisher™ Flex (ThermoScientific) depends on the specimens' collection, transport, storage, and/or handling methods and the efficiency of the flowchart used by each laboratory: qPCR assay and thermocycler. Each complete procedure, different from the one mentioned in these Instructions for use, must be validated by the end user.
- For appropriate yield and quantity, sample collection, storage, and pre-treatment must be performed following the specific recommendations of official laboratory guidelines.
- This sample processing system is compatible with transport media containing guanidium thiocyanate or other guanidium salts. Other transport media different from those indicate in this instruction for use, must be validated by the user.
- If the consumable materials used differ from those recommended for this format, they must be validated by user.
- VIASURE DNA/RNA Pathogens Extraction Kit can be automated in the automated platform KingFisher™ Flex (ThermoScientific). Be sure to read this Instruction Manual and the KingFisher™ Flex's User Manual carefully before use. If the automatation is performed in a different magnetic bead handling platform with other consumables, it must be validated by user.
- Once the extraction has finished to ensure nucleic acid viability, keep under refrigeration until use, and at -20/-80°C for long term storages. Consult Section Transport and storage conditions for more information.

## 12. Quality control

The expected values of VIASURE DNA/RNA Pathogens Extraction Kit depend on the diagnostic procedure (extraction and qPCR assay), so each complete procedure must be validated by the final user.

It is recommended to use the VIASURE DNA/RNA Pathogens Extraction Kit in conjunction with appropriate controls to monitor the entire process for different downstream applications. To control the complete process, from sample processing to analysis, perform the following controls: Positive Control (not provided but recommended), Negative Control (not provided but recommended) and Extraction Control (provided with the kit).

### 13. Performance characteristic

The efficiency of the PCR reaction is not altered with this extraction method.

The clinical performance of VIASURE DNA/RNA Pathogens Extraction Kit was tested using VIASURE Real Time PCR Detection Kits with 750 clinical samples (from the respiratory tract (343 samples): oropharyngeal/nasopharyngeal swabs, sputum, bronchoalveolar lavage (BAL), and bronchial aspirate (BAS); from genital tract (248 samples): vaginal swab and vagino-rectal specimens; and from gastrointestinal tract (159 samples): feces) from patients with suspicion of respiratory tract infections (RTIs), genital tract infections or gastrointestinal infection.

The respiratory pathogen panel tested were SARS-CoV-2, Influenza A, RSV, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* and *Pneumocystis jirovecii*; pathogens which caused genital tract infection: Human Papillomavirus and *Streptococcus B*; and gastrointestinal pathogens: *Salmonella* sp., *Campylobacter* sp., *Clostridium difficile*, *Cryptosporidium* sp., *Giardia lamblia*, Rotavirus, Norovirus GII, and Astrovirus.

VIASURE DNA/RNA Pathogens Extraction Kit was compared with MagMAX™ Viral/Pathogen II (MVP II) Nucleic Acid Isolation Kit for KingFisher™ Flex Purification System (Thermo Scientific™). The VIASURE qPCR tests used were the following: VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit, VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection Kit, VIASURE *H. influenzae*, *S. pneumoniae* & *M. catarrhalis* Real Time PCR Detection Kit, VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit, VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit and VIASURE *Streptococcus B* Real Time PCR Detection Kit, VIASURE *Salmonella*, *Campylobacter* & *Shigella/EIEC* Real Time PCR Detection Kit, VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit, VIASURE Rotavirus Real Time PCR Detection Kit, VIASURE Norovirus GII Real Time PCR Detection Kit, VIASURE Astrovirus Real Time PCR Detection Kit and VIASURE *Clostridium difficile* toxins A+B Real Time PCR Detection Kit.

The results obtained during the performance evaluation show high agreement using VIASURE DNA/RNA Pathogens Extraction Kit in combination with VIASURE Real Time PCR Detection Kits and VIASURE V-Lab96 Cycler.

### 14. Troubleshooting

Issues/Symptoms/Error	Possible Causes and Suggestions
Warnings/Observation	
Poor yield or low sensitivity	<p>Degradation of the microorganism during shipping/storage and/or processing.</p> <p>Wrong loading of the reagents into the platform. It is recommended to label the reagents 96 deep Well plates to avoid confusion. Preloaded reagents plates must be introduced by locating the first well (A1) in the up-right corner of the rotatory module positions, and in the required order (follow platform user manual).</p> <p>Incomplete sample lysis</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Inadequate sample pretreatment. Sputum and feces must be pretreated to be liquid enough for pipetting.</li> </ul>



	<ul style="list-style-type: none"> <li>- No addition or addition of reduced volume of Lysis Buffer, Proteinase K and/or sample.</li> <li>- Not enough heating during the incubation step may reduce the efficiency of lysis and insufficient nucleases inactivation.</li> </ul> <p>Incomplete nucleic acid adsorption to beads</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Not enough agitation for Magnetic Beads complete resuspension before addition to the plate.</li> <li>- Magnetic Beads degraded because of wrong storage. Do not mix remaining magnetic beads between kits and storage them as recommended.</li> </ul> <p>Not appropriate washing</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Not enough volume of ethanol to resuspend Wash 1 Buffer and/or Wash 2 Buffer, may cause the desorption of nucleic acids from magnetic beads or dragging of inhibitory substances to downstream applications. Add the recommended quantity of ethanol to each reservoir, and once rehydrated store it as recommended above.</li> </ul> <p>Elution</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Nucleic acid degradation because of contaminated consumables. The elution vials or elution plate should be sterile and free from RNAses.</li> <li>- Wrong storage of the purified nucleic acids could cause their degradation.</li> <li>- Contamination of eluted nucleic acid with ethanol before analysis. Avoid platform decontamination with the opened vials or reservoirs containing nucleic acid nearby.</li> </ul>
Malfunction of the automatic platform	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Make sure the labware has been placed in the indicated position before starting an extraction run.</li> <li>- Wrong heating and/or shaking. Perform periodical platform maintenance reviews. Abrasive cleaning agents are not recommended, because they are likely to damage the paint finish. For cleaning use a soft cloth or tissue paper.</li> <li>- Run stop because of wrong fasten tip-comb. Try first to manually stretch the tips both lengthwise and width wise to level the tip comb.</li> </ul>
Reagent's degradation	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Wrong storage of the Extraction Kit reagents before opening.</li> <li>- Wrong storage after the rehydration of the reagents.</li> </ul>
False positive results in qPCR assay	<p>Cross contamination</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- During sample loading, to avoid caps sample mixing, is recommended to label caps and keep them separately among them.</li> <li>- During Proteinase K or Magnetic Beads on the mixture of Lysis Buffer and sample. Change pipette tip among samples.</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cross-contamination with the qPCR VIASURE Positive Controls (in case a qPCR VIASURE Positive Control is used).</li> <li>- Contamination due to qPCR products or samples from previous processing. It is highly recommended to perform properly the end-of-the-day protocol and clean with ethanol to eliminate microbiological risk and contamination sources.</li> <li>- Contamination with ubiquitous microorganisms. It is recommended to decontaminate the platform surface with ethanol after every run. It is highly recommended to perform properly the end-of-the-day protocol and clean with ethanol to eliminate microbiological risk and contamination sources.</li> </ul>
False negative	<p>Analysis of samples with a microbial concentration under limit of detection (LoD).</p> <p>False negative results because of loss of sensitivity.</p> <p>Incorrect run programming of the extraction by user</p>
Variation of fluorescence values in the qPCR assay	<p>They may vary due to multiple factors such as: PCR equipment, treatment procedure, type of sample, previous treatment of the sample, etc... among others.</p>

Table 5. Troubleshooting.

## ESPAÑOL

### 1. Uso previsto

VIASURE DNA/RNA Pathogens Extraction Kit está diseñado para el aislamiento y purificación de DNA y RNA de virus, bacterias, parásitos y hongos a partir de muestras clínicas (hisopos, saliva, esputo, heces y orina) con fines de diagnóstico posterior mediante un sistema de extracción automática. El kit contiene diferentes reactivos para procesar muestras clínicas y facilitar la detección sensible de patógenos con una aplicación posterior. Este producto no está destinado al diagnóstico, prevención ni tratamiento de enfermedades.

El kit está concebido para su uso por personal de laboratorio clínico cualificado y formado que haya recibido instrucciones y formación específicas en técnicas moleculares y procedimientos diagnósticos, y que tenga experiencia en la manipulación de muestras de origen humano o materiales potencialmente infecciosos.

### 2. Información de seguridad

VIASURE DNA/RNA Pathogens Extraction Kit contiene materiales peligrosos. Para obtener más información, consultar las hojas de datos de seguridad de los materiales (MSDS) correspondientes.

#### Clasificación GHS




Reactivo/Material	Símbolo GHS	Indicaciones de peligro	Consejos de prudencia
Lysis Buffer	 Inflamable, corrosivo y tóxico	Peligro H226, H302, H314, H412	P210, P260, P264, P280, P305+P351+P338, P310, P370+P378
Wash 1 Buffer	 Corrosivo y tóxico	Peligro H302, H314,	P260, P264, P280, P303+P361+P353, P305+P351+P338, P310, P501
Proteinase K	 Peligro	Peligro H334	P264, P280, P304+340, P342+311

Tabla 1. Clasificación GHS

#### Indicaciones de peligro

H226; Líquidos y vapores inflamables.

H302; Nocivo en caso de ingestión.

H314; Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves.

H412; Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.

H334; Puede provocar síntomas de alergia o asma o dificultades respiratorias en caso de inhalación.

### Consejos de prudencia

P210; Mantener alejado de fuentes de calor, chispas, llama abierta o superficies calientes. -No fumar.

P260; No respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol.

P264; Lavarse las manos concienzudamente tras la manipulación.

P280; Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

P304+340; EN CASO DE INHALACIÓN: Transportar a la víctima al exterior y mantenerla en reposo en una posición confortable para respirar.

P305+P351+P338; 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.

P303+P361+P353; EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL(o el pelo): Quitarse inmediatamente las prendas contaminadas. Aclararse la piel con agua [o ducharse].

P310; Llamar inmediatamente a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico.

P370+P378; En caso de incendio: Utilizar ... para apagarlo.

P501; Eliminar el contenido/el recipiente en ...

P342+P311; En caso de síntomas respiratorios: Llamar a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico.

## 3. Introducción y explicación

Las enfermedades infecciosas contagiosas son causadas por microorganismos patógenos como bacterias, virus, parásitos u hongos, que pueden propagarse de forma directa o indirecta de un individuo a otro, con consecuencias económicas y sociales negativas en todo el mundo. El diagnóstico rápido y correcto de las infecciones es crucial para controlar la enfermedad, seleccionar el tratamiento adecuado, reducir la morbilidad y prevenir o controlar los brotes epidémicos de enfermedades infecciosas.

El diagnóstico de los patógenos se basa tradicionalmente en los cultivos y métodos que requieren mucho tiempo y que tienen unos requisitos especiales. Los signos y síntomas de las enfermedades infecciosas se solapan; por tanto, no es fiable establecer un diagnóstico etiológico basándose exclusivamente en los síntomas clínicos. El desarrollo de técnicas moleculares basadas en la amplificación de ácidos nucleicos (TAAN) ofrece una herramienta diagnóstica sensible y específica para la determinación de más de un patógeno en un solo ensayo. En este sentido la PCR en tiempo real es el método de diagnóstico molecular de elección para las infecciones.

No obstante, para esta técnica es precisa la extracción previa de ácidos nucleicos (AN). Este procedimiento consta de tres pasos principales: extracción o liberación del AN de la muestra y de la célula o microorganismo mediante lisis;

separación o aislamiento del AN de otras células o materiales de la muestra, y purificación mediante la eliminación de sustancias inhibitoras. Un cuarto paso opcional, la concentración, es importante para la detección de analitos presentes en concentraciones bajas.

Es imprescindible un kit de extracción para el aislamiento simultáneo de DNA y/o RNA de gran calidad y en una cantidad suficiente a partir de diferentes muestras clínicas y patógenos para su detección específica mediante los ensayos de diagnóstico molecular. En la actualidad, el número cada vez mayor de muestras que deben procesar los laboratorios clínicos exige la posibilidad de automatizar este procedimiento. La adaptación de los reactivos a una plataforma robótica puede mejorar el flujo de trabajo diario, normalizar el tratamiento de las muestras, reducir la variabilidad, reducir los peligros biológicos y evitar la contaminación al reducir el tiempo final de manipulación por el analista.

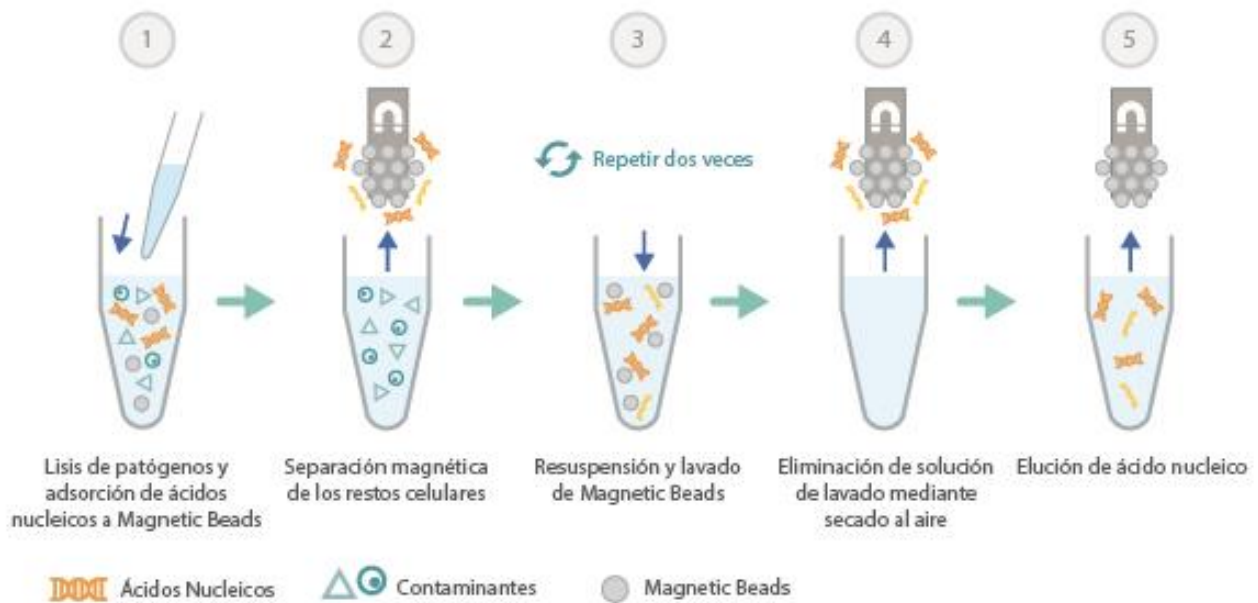
VIASURE DNA/RNA Pathogens Extraction Kit está diseñado para el aislamiento y purificación de ácidos nucleicos de patógenos víricos, bacterianos, parasitarios y fúngicos a partir de diferentes muestras clínicas humanas como hisopos, saliva, esputo, orina y heces.

## 4. Procedimiento

El procedimiento de VIASURE DNA/RNA Pathogens Extraction Kit se basa en la adsorción espontánea y reversible de los ácidos nucleicos a microesferas superparamagnéticas con una superficie funcionalizada en las condiciones de tamponamiento adecuadas. Después de varios pasos de lavado, los ácidos nucleicos se eluyen en una solución purificada y concentrada. El uso de partículas magnéticas como fase sólida para la adhesión de los ácidos nucleicos permite procesar un número elevado de muestras mediante su exposición simultánea a un campo magnético y, por tanto, automatizar el proceso.

VIASURE DNA/RNA Pathogens Extraction Kit se ha diseñado para usarlo con la plataforma automática KingFisher™ Flex (ThermoScientific). El tipo de procedimiento de la plataforma transfiere las Magnetic Beads entre los tubos/pocillos de un reactivo al siguiente mediante atracción de campos magnéticos. La activación y desactivación del campo magnético permite la atracción y la resuspensión de las microesferas en distintos tampones. En la figura 1 se muestra el principio básico de este tipo de extracción automática. En primer lugar, las Magnetic Beads se añaden al lisado y, después de una incubación, se produce la adsorción de los ácidos nucleicos (1). Las partículas magnéticas se ven atraídas a la superficie de un imán cubierto con puntas de plástico (2) y son transferidas así a otros pocillos que contienen Wash Buffer 1 y Wash Buffer 2 para eliminar los restos celulares y las sales. Después de varios pasos de lavado (3), las microesferas se secan para eliminar los residuos de disolvente orgánico (4). Por último, el DNA o RNA se libera de las partículas magnéticas con un Elution Buffer (5), obteniéndose una muestra pura lista para la cuantificación y el análisis. El DNA y el RNA purificados se pueden utilizar directamente en aplicaciones posteriores. Es muy recomendable el uso de controles de extracción, controles positivos/negativos y controles internos para evaluar el flujo de trabajo completo (véanse los apartados sobre los procedimientos).

Figura 1. Principio básico de extracción basado en partículas magnéticas para un instrumento automático de transferencia de partículas magnéticas.



VIASURE DNA/RNA Pathogens Extraction Kit facilita el procesamiento simultáneo de diferentes muestras en el mismo procesamiento de extracción, aumenta el flujo de trabajo diario, la robustez y la reproducibilidad y reduce la contaminación y el contacto con materiales biológicos peligrosos.

## 5. Reactivos suministrados

VIASURE DNA/RNA Pathogens Extraction Kit incluye los reactivos siguientes, que se detallan en la Tabla 2.

Reactivo/Material	Comentarios	Descripción	Cantidad
Lysis Buffer *	Mezcla de reactivos líquidos para la lisis de patógenos y la inactivación de nucleasas	Botella blanca	1 botella x 65 ml
Wash 1 Buffer	Solución de lavado a la que debe añadirse etanol absoluto (no incluido)	Botella blanca	1 botella x 27 ml
Wash 2 Buffer	Solución de lavado a la que debe añadirse etanol absoluto (no incluido)	Botella blanca	1 botella x 18 ml
Elution Buffer	Solución para recuperación de ácidos nucleicos	Botella blanca	1 botella x 50 ml
Magnetic Beads	Suspensión de partículas magnéticas para la adsorción de ácidos nucleicos	Vial transparente con tapón	1 vial x 1,6 ml
Proteinase K	Solución enzimática para la lisis de los patógenos	Vial transparente con tapón	1 vial x 1,6 ml
Extraction Control (EC)	Ácido nucleico no infeccioso liofilizado	Vial verde con tapón	1 vial
Water RNase/DNase Free	Tampón de rehidratación para resuspender el vial del Extraction Control	Vial blanco con tapón	1 vial x 1 ml

\* Contiene una sal caotrópica. No es compatible con desinfectantes que contengan lejía. Véase el apartado 8 «Advertencias y precauciones».

Tabla 2. Reactivos y materiales proporcionados con VIASURE DNA/RNA Pathogens Extraction Kit.

## 6. Material requerido y no suministrado

La siguiente lista incluye los materiales que se requieren para el uso pero que no se incluyen en VIASURE DNA/RNA Pathogens Extraction Kit.

- Sistema de recogida y transporte de las muestras.
- Etanol absoluto.
- Micropipetas.
- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.
- Cámara de bioseguridad.
- Pipetas y/o probeta graduada.
- Vortex.
- Termobloque con agitación.
- Equipo de PCR en tiempo real (termociclador).
- Ensayo de PCR en tiempo real.
- Tubos libres de ribonucleasa (RNasa)/desoxirribonucleasa (DNasa) para la recogida y almacenamiento de ácidos nucleicos.
- Controles positivos y negativos para supervisar el proceso de extracción. Se recomienda el uso de controles de extracción positivos y negativos. (Por ejemplo, para realizar análisis de SARS-CoV-2, el kit VIASURE Viral SARS-CoV-2 Positive Control Kit (Ref: VS-VP1NCO o VS-VP101NCO)).

*Nota: En caso de que se validen procesos distintos de los indicados en estas instrucciones de uso, se recomienda evaluar si es necesario utilizar materiales distintos de los descritos en este apartado.*

Los materiales específicos necesarios para su uso con el sistema KingFisher™ Flex (ThermoScientific) se enumeran a continuación:

- KingFisher™ deep-well 96 plate - ThermoScientific™ (número de catálogo: 95040450) Unidades: 4/96 preparaciones
- KingFisher™ 96 plate 200µL - ThermoScientific™ (número de catálogo: 97002540) Unidades: 1/96 preparaciones
- KingFisher™ 96 tip comb for DW Magnets - ThermoScientific™ (número de catálogo: 97002534) Unidades: 1/96 preparaciones

## 7. Condiciones de transporte y almacenamiento

- Los reactivos del kit se pueden transportar a 2-40 °C y almacenar hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Cuando reciba el kit, revisar todos los componentes para comprobar que no presentan daños. No utilizar los componentes del kit si presentan daños.
- Se recomienda almacenar los componentes a temperatura ambiente (15-30 °C), protegidos de la luz y almacenados en posición vertical para evitar posibles vertidos.
- Se recomienda almacenar los viales de Magnetic Beads refrigerados a 4-8 °C después de recibir el kit.
- Los componentes Lysis Buffer y Wash 1 Buffer contienen sales de guanidina que pueden precipitar. Si se observa precipitación visible en el fondo del cartucho, resuspender mediante calentamiento y agitación suaves.
- Una vez resuspendido el Extraction Control, almacenarlo a -20 °C.

- Se recomienda almacenar el sobrenadante obtenido en el procesamiento a 4 °C durante un máximo de 8 horas antes de su adición a las diferentes aplicaciones posteriores. Esta adición debe realizarse lo antes posible. Después de utilizarlo, el resto del sobrenadante se puede almacenar a -20 °C, reduciendo al mínimo los ciclos de congelación/descongelación en caso de repetición del análisis (hasta en 2 ocasiones). Si el tratamiento de las muestras y el ensayo de amplificación no se pueden realizar el mismo día, el sobrenadante obtenido debe almacenarse a -20 °C hasta que se utilice (durante una semana como máximo).

## 8. Advertencias y precauciones

- El producto está concebido para su uso por personal de laboratorio clínico cualificado y formado que haya recibido instrucciones y formación específicas en técnicas de extracción de ácidos nucleicos, PCR en tiempo real y procedimientos de diagnóstico *in vitro*, incluida la formación sobre el sistema de extracción de ácidos nucleicos y el equipo de PCR en tiempo real (termociclador).
- No se recomienda usar el kit después de la fecha de caducidad.
- No utilizar el kit si la etiqueta que hace de precinto de la caja exterior está rota.
- No utilizar los reactivos si la caja de protección externa o los sobres que protegen los tubos están abiertos o dañados en el momento que se reciben.
- No utilizar el Extraction Control si el material desecante que se incluye en cada sobre no está o está dañado. No retirar el material desecante del sobre que contiene los reactivos una vez abierta.
- No mezclar reactivos de diferentes sobres y/o kits y/o lotes y /o de proveedores distintos.
- Diseñar un flujo de trabajo unidireccional. No reutilizar los reactivos y no volver a introducir el volumen de líquido restante en la botella original de reactivo una vez utilizado.
- Evitar siempre la contaminación microbiana y por ribonucleasa (RNasa)/desoxirribonucleasa (DNasa) de los reactivos. Se recomienda el uso de puntas de pipeta estériles desechables libres de RNasa/DNasa resistentes a aerosoles o de desplazamiento positivo. Utilizar una pipeta nueva para cada muestra. Cambiarse de guantes antes de manipular los reactivos.

Si se realizan otros procedimientos de extracción en la misma zona general del laboratorio, se deben adoptar las precauciones necesarias para garantizar la ausencia de contaminación de VIASURE DNA/RNA Pathogens Extraction Kit y de cualquier otro reactivo o instrumento necesario para los análisis.

- No reutilizar los elementos desechables.
- Almacenar los materiales positivos usados separados de los reactivos del kit.
- Utilizar tubos con tapón de rosca y evitar las posibles salpicaduras o contaminación cruzada de las muestras durante la preparación.
- Evitar la posible contaminación cruzada de los reactivos con los ácidos nucleicos extraídos, los productos de PCR y el control positivo. Para prevenir la contaminación de los reactivos, se recomienda el uso de puntas con filtro.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Usar ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber, fumar ni maquillarse en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos.
- Las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas y/o con peligro biológico, así como los reactivos y materiales que han estado en contacto con las muestras y deben ser gestionadas según la legislación sobre residuos sanitarios nacional. Tomar las precauciones necesarias durante la recogida, transporte, almacenamiento, manipulación y eliminación de muestras.



- Las muestras y los reactivos deben manipularse en una cabina de seguridad biológica. Utilizar un equipo de protección individual (EPI) conforme con la normativa actual para manipular muestras potencialmente infecciosas. Eliminar los residuos de conformidad con la normativa local, estatal y federal.
- Todos los reactivos deben manipularse con cuidado, reduciendo al mínimo el tiempo de exposición a los reactivos abiertos, sobre todo a los reconstituidos con etanol absoluto. Consultar los peligros y precauciones asociados a la manipulación del etanol en las hojas de datos de seguridad de los materiales.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.
- Al trabajar con VIASURE DNA/RNA Pathogens Extraction Kit, utilizar prendas de protección adecuadas (p. ej., bata de laboratorio, guantes desechables y gafas de protección).
- La fiabilidad de los resultados depende de la recogida, almacenamiento, transporte y procesamiento adecuados de las muestras. Se recomienda el uso de hisopos de fibra sintética con vástagos de plástico para la recogida de muestras. No se recomienda el uso de hisopos de alginato de calcio o de madera, ya que pueden contener sustancias que inhiban la prueba de PCR. Comprobar que el cabezal del hisopo esté completamente sumergido en el tubo de recogida de muestras y, si es necesario, presionar el hisopo contra la pared del tubo para exprimir el líquido.
- Utilizar probetas graduadas para llenar las botellas con isopropanol o etanol.
- Si posteriormente se va a realizar un análisis de qPCR, consultar cada kit de qPCR o el manual de referencia del equipo de PCR en tiempo real para conocer otras advertencias, precauciones y procedimientos.
- Los residuos generados con VIASURE DNA/RNA Pathogens Extraction Kit no se han sometido a pruebas de detección de material infeccioso residual. La contaminación del residuo líquido con material infeccioso residual es muy improbable debido al fuerte tratamiento desnaturalizante con Lysis Buffer y Proteinase K, pero no se puede descartar por completo. Por tanto, los residuos líquidos deben considerarse infecciosos y manipularse y eliminarse de conformidad con la normativa local en materia de seguridad.
- El Lysis Buffer contiene una sal caotrópica. No es compatible con desinfectantes que contengan lejía. Consultar los peligros y precauciones asociados a la manipulación del Lysis Buffer en las hojas de datos de seguridad de los materiales facilitadas con el dispositivo.
- Comprobar que no se observa precipitación en los reactivos suministrados. Los componentes Lysis Buffer y Wash 1 Buffer contienen sales de guanidina que pueden precipitar. Si se observa precipitación visible en el fondo de la botella, resuspender mediante calentamiento y agitación suaves hasta su disolución completa.
- Si la Proteinase K presenta una coloración amarillenta, esto no afecta a la funcionalidad del kit.
- Comprobar que las microesferas se hayan resuspendido por completo. Agitar enérgicamente el vial de almacenamiento en un vortex.
- Comprobar que todos los tubos, placas o cartuchos se hayan colocado debidamente de acuerdo con la disposición indicada y que encajan correctamente en los adaptadores específicos del sistema de extracción automática.
- Antes de dispensar VIASURE DNA/RNA Pathogens Extraction Kit en los consumibles de la plataforma, abrir con cuidado cada pocillo, evitando el vertido de los reactivos, y reconstituir los pocillos señalados según se indica en el apartado sobre el procedimiento.

## 9. Procedimiento del test

### 9.1. Recogida y transporte de las muestras

VIASURE DNA/RNA Pathogens Extraction Kit es adecuado para varias muestras clínicas humanas potencialmente infecciosas: muestras respiratorias y genitales obtenidas con hisopo, saliva, esputo, orina y heces. El almacenamiento de la muestra es esencial para obtener unos rendimientos reproducibles y elevados. Los rendimientos pueden variar de una muestra a otra dependiendo de factores como el estado de salud y la edad del donante, el tipo de muestra, la fecha de recogida y las condiciones de transporte y almacenamiento.

Como recomendación general, las muestras deben recogerse lo antes posible, dependiendo del patógeno, durante la fase aguda de la enfermedad o en cualquier momento de la evolución clínica, y antes de iniciar el tratamiento antibiótico, si es posible. Las muestras deben recogerse en un recipiente estéril, evitando tocar los tejidos adyacentes y las secreciones de órganos que no sean de interés. Todas las muestras deben etiquetarse con el nombre y el número de identificación de la persona de la que se ha obtenido la muestra, la procedencia de la muestra y la fecha y hora de la recogida. Tras la recogida, las muestras deben introducirse en una bolsa para material biológico peligroso y transportarse al laboratorio lo antes posible.

La recogida varía en función del tipo de muestra. Se aconseja seguir las recomendaciones de McPherson R.A., Pincus M.R., *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, 23.<sup>a</sup> edición. Elsevier Health Sciences; 2017.

De acuerdo con la literatura científica, las condiciones de transporte, almacenamiento y estabilidad dependen del tipo de matriz de muestra y del patógeno que se intenta detectar. Se recomienda utilizar muestras en fresco para la prueba. Las muestras de orina, secreciones respiratorias y heces deben refrigerarse, mientras que las de líquido cefalorraquídeo (LCR), sangre y de otros tipos deben mantenerse a temperatura ambiente. Si no se puede evitar una demora (<2 horas hasta que puedan enviarse), la regla general es enviarlas a -20 °C o, de forma ideal, a -70 °C o -80 °C.

Lo ideal es abrir todos los recipientes de muestras en una cabina de seguridad biológica. Se deberán utilizar las barreras adecuadas para prevenir la exposición de la piel y las mucosas a la muestra. Siempre deben usarse guantes y bata de laboratorio para manipular muestras clínicas. Cuando exista riesgo de salpicaduras o de formación de gotículas, deberán usarse mascarilla, gafas protectoras (o bien trabajar detrás de una pantalla de plástico) y batas o delantales impermeables. Lavarse las manos una vez concluido el proceso.

Las muestras enviadas para análisis molecular deben almacenarse en condiciones controladas para evitar la degradación de los ácidos nucleicos durante el almacenamiento. Evitar los ciclos de congelación y descongelación. Algunos patógenos procedentes de muestras congeladas y posteriormente descongeladas podrían degradarse y dar lugar a resultados falsos negativos.

Dependiendo de la muestra clínica y del patógeno, pueden necesitarse distintos pretratamientos de la muestra. Deberán seguirse las directrices del protocolo de laboratorio adecuado en cada caso. Véase la guía de los CDC (Guías para la recogida de muestras. Página web <https://www.cdc.gov/urdo/downloads/SpecCollectionGuidelines.pdf> y las Directrices provisionales.

Para la recogida, manipulación y análisis de muestras clínicas para COVID-19, consultar: Página web <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html>) y la guía de la IDSA (Miller, J. M.,

Binnicker, M. J., Campbell, S., ... y Pritt, B. S. (2018). A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94).

Se recomienda trabajar con muestras clínicas inactivadas. VIASURE DNA/RNA Pathogens Extraction Kit es compatible con medios de transporte inactivadores, como los medios con sales de guanidina.

## 9.2. Pretratamiento de las muestras

Dependiendo de la muestra clínica y del patógeno, pueden necesitarse distintos pretratamientos de la muestra. Es importante evitar sustancias u objetos que puedan interferir en el pipeteado de las muestras durante el proceso automático, por lo que se deben retirar los tapones o los hisopos antes de introducir las muestras en las gradillas para muestras, y las muestras sólidas o muy viscosas deben pretratarse.

- Heces: mezclar enérgicamente 100 mg con 900 µl de agua destilada y centrifugar durante 90 segundos a 1000 g. Recuperar el sobrenadante con el presunto patógeno para la extracción.
- Orina: centrifugar 10 ml a 5200 g durante 15 min, retirar el sobrenadante y resuspender el sedimento en 1 ml de TE 10X Ph.
- Las muestras viscosas como las de saliva, esputo o lavado broncoalveolar pueden precisar pretratamiento con 20 mg/ml de acetilcisteína. Añadir el volumen necesario para que la muestra sea lo bastante líquida como para poder aspirarla con la pipeta. Si es necesario, mezclar y calentar la muestra durante el pretratamiento.

El resto de las muestras se pueden introducir directamente en la plataforma.

## 9.3. Adición del tampón

Antes de comenzar con la extracción y purificación de ácidos nucleicos, en algunos reactivos es necesario añadir determinado volumen de otros reactivos (no incluidos en el kit). En la tabla siguiente se indica qué reactivo debe añadirse y el volumen necesario:

Reactivo/Material	Reactivo para la resuspensión	Volumen
Wash 1 Buffer*	Etanol absoluto	63 ml
Wash 2 Buffer*	Etanol absoluto	72 ml

Tabla 3. Reactivos y volúmenes que deben resuspenderse en el Wash 1 Buffer y el Wash 2 Buffer.

*\*Nota: Para facilitar el proceso, se ha incluido una marca en la etiqueta de cada reactivo para indicar cuándo se han añadido los reactivos.*

Además, se recomienda escribir la fecha de resuspensión y otra información necesaria en el espacio designado a tal fin de los cartuchos específicos del sistema de extracción automática que se han utilizado, una vez resuspendidos, con un rotulador permanente.

Utilizar probetas graduadas para llenar las botellas con etanol.

El Lysis Buffer contiene sales de guanidina que podrían precipitar. Si se observa precipitación visible en el fondo de la botella, resuspender mediante calentamiento y agitación suaves.

## 9.4. Extraction Control liofilizado

El uso del Extraction Control (EC) solo será necesario para los productos VIASURE Real Time PCR Detection Kits que no incluyan un control interno en la mezcla de reacción liofilizada. Consultar las instrucciones de uso de cada producto VIASURE para comprobar esta información. Para estos productos VIASURE Real Time PCR Detection Kits, utilice el Extraction Control (EC) proporcionado en VIASURE DNA/RNA Pathogens Extraction Kit.

Se recomienda abrir y manipular el Extraction Control (EC) en la zona del laboratorio previa a la PCR, lejos del área de amplificación mediante PCR. Reconstituir el Extraction Control liofilizado (vial verde) añadiendo 550 µl del Water RNase/DNase Free (vial blanco) suministrado y agitar bien en un vortex.

Una vez resuspendido el Extraction Control, almacenarlo a -20 °C y reducir al mínimo los ciclos de congelación y descongelación (hasta 3 ciclos).

Añadir 5 µl del EC rehidratado a cada pocillo precargado con Lysis Buffer para controlar el proceso de extracción y/o descartar la inhibición de la actividad de la polimerasa.

## 9.5. Procedimiento de extracción

A continuación, se proporcionan instrucciones sobre los pasos necesarios para procesar muestras. El procedimiento de extracción específico que debe seguirse con la plataforma automática KingFisher® Flex se indica a continuación. (Nota: Si se utiliza VIASURE DNA/RNA Pathogens Extraction Kit con otro sistema de extracción automática diferente del mencionado en estas instrucciones de uso, el usuario deberá validar el procedimiento).

### 1. Carga de los reactivos en placas de 96 pocillos profundos

Cargar todas las placas con los siguientes volúmenes y reactivos en los pocillos correspondientes, dependiendo del número de muestras que se vaya a analizar.

- Placa 1: Lysis Buffer, 265 µl.
- Placa 2: Wash 1 Buffer, 500 µl.
- Placa 3: Wash 2 Buffer, 500 µl.
- Placa 4: Elution Buffer, 100 µl.

### 2. Inactivación de las muestras

Añadir 200 µl de muestra a la placa precargada con Lysis Buffer, asegurándose de mezclar bien la muestra con el Lysis Buffer, e incubar a temperatura ambiente durante 15 min. Si es necesario para controlar todo el flujo de trabajo de diagnóstico molecular, añadir 5 µl de Extraction Control rehidratado antes de la incubación.

### 3. Magnetic Beads y Proteinase K

Añadir a cada muestra 15 µl de Proteinase K y 15 µl de Magnetic Beads.

Se recomienda agitar las Magnetic Beads en un vortex al menos 2 minutos hasta su resuspensión completa.

#### 4. Configuración de la placa en el instrumento.

Configurar el protocolo del instrumento de acuerdo con la tabla siguiente, en la que se describe la configuración completa del proceso de extracción:

Etapa	Procedimiento	Configuración
<b>Recolección (Pick Up)</b>	<b>Placa peine 96 puntas</b>	
<b>Unión (Binding)</b>	<b>Placa de muestra</b>	
Inicio de la etapa	Pre-recogida de partículas magnéticas	No
Agitación/Incubación	Liberación magnética	
	Tiempo de agitado, velocidad	5 min, Rápido
	Temperatura de incubación	65°C
	Pre-calentamiento	Si
Fin de la etapa	Post-mix	No
	Repeticiones para recogida de partículas (Collect count)	5
	Tiempo para recogida de partículas magnéticas	0 seg
<b>Lavado 1 (Wash 1)</b>	<b>Placa Wash 1</b>	
Inicio de la etapa	Pre-recogida de partículas magnéticas	No
Agitación/Incubación	Tiempo de liberación magnética, velocidad	20 seg, Agitado en el fondo
	Tiempo de primer agitado, velocidad	10 seg, Agitado en el fondo
	Tiempo de segundo agitado, velocidad	10 seg, Rápido
	Número de secuencias de agitación (Loop count)	3
Fin de la etapa	Incubación durante agitado	No
	Post-mix	No
	Repeticiones para recogida de partículas (Collect count)	4
	Tiempo para recogida de partículas magnéticas	1 seg
<b>Lavado 2 (Wash 2)</b>	<b>Placa Wash 2</b>	
Inicio de la etapa	Pre-recogida de partículas magnéticas	No
Agitación/Incubación	Tiempo de liberación magnética, velocidad	20 seg, Rápido
	Tiempo de primer agitado, velocidad	10 seg, Agitado en el fondo
	Tiempo de segundo agitado, velocidad	10 seg, Rápido
	Número de secuencias de agitación (Loop count)	2
Fin de la etapa	Incubación durante agitado	No
	Post-mix	No
	Repeticiones para recogida de partículas (Collect count)	4
	Tiempo para recogida de partículas magnéticas	1 seg
<b>Secado (Dry)</b>	<b>Placa Wash 2</b>	
	Tiempo de secado	2 min
	Posición de la punta	Fuera del pocillo/tubo
<b>Elución (Elution)</b>	<b>Placa Elution</b>	
Inicio de la etapa	Pre-recogida	No
Agitación/Incubación	Liberación magnética	Si
	Tiempo de primer agitado, velocidad	15 seg, Agitado en el fondo

Fin de la etapa	Tiempo de segundo agitado, velocidad Número de secuencias de agitación ( <i>Loop count</i> ) Temperatura de incubación Pre-calentamiento Post-mix Repeticiones para recogida de partículas ( <i>Collect count</i> ) Tiempo para recogida de partículas magnéticas	45 seg, Media 6 70 °C Si No 5 0 seg
<b>Recogida de las partículas (<i>Collection beads</i>)</b>	<b>Placa <i>Elution</i></b>	
Inicio de la etapa	Pre-recogida	No
Agitación/Incubación	Liberación magnética	No
	Tiempo de agitado, velocidad	1 min 30 seg, Baja
	Incubación durante agitado	No
Fin de la etapa	Post-mix	No
	Recogida de partículas magnéticas	No
<b>Finalización (<i>Leave</i>)</b>	<b>Placa <i>Tip comb</i></b>	

Table 4. Configuración completa del proceso de extracción a seguir dentro de las plataformas automáticas KingFisher® Flex.

Comprobar que todas las placas estén cargadas en la misma dirección, con el pocillo A1 en la parte superior derecha. A continuación, llenar la plataforma con las placas siguiendo este orden:

- 1°. Peine de puntas.
- 2°. Placa de Elución.
- 3°. Placa del Wash 2 Buffer.
- 4°. Placa del Wash 1 Buffer.
- 5°. Placa del Lysis Buffer con la muestra inactivada.

Una vez cargadas las placas, hacer clic en «Start» (Iniciar) y el procesamiento se completará en 28 minutos.

### Recuperación de ácidos nucleicos purificados

Las muestras eluidas se pueden utilizar directamente o almacenarse a 4 °C si la qPCR se realiza inmediatamente después de la extracción. Para el almacenamiento a largo plazo, conservarlas a -20 °C o a -80 °C, reduciendo al mínimo los ciclos de congelación-descongelación. Consultar el apartado «Condiciones de transporte y almacenamiento» para obtener más información. Una vez finalizada la configuración de la extracción y de la PCR, transferir la placa cargada al termociclador para la amplificación de los ácidos nucleicos, siguiendo las indicaciones del fabricante.

## 5. Descontaminación

Descontaminar debidamente las superficies internas de la plataforma con disolventes desinfectantes adecuados y desechar los consumibles de plástico usados.

Para obtener más detalles, consultar el manual del usuario de KingFisher™ Flex (ThermoScientific).

## 9.6 PCR en tiempo real

Los ácidos nucleicos obtenidos con VIASURE DNA/RNA Pathogens Extraction Kit son compatibles con cualquier kit para qPCR o RT-qPCR comercializado, aunque solo se ha validado con VIASURE Real Time PCR Detection Kits.

Se deben seguir las instrucciones del fabricante de VIASURE Real Time PCR Detection Kits (consultar <https://www.certest.es/es/viasure/>). Los controles positivos y negativos incluidos en el paso de extracción no deben sustituir a los controles positivos y negativos proporcionados con los kits de qPCR.

Se recomienda usar un termociclador VIASURE V-Lab96 Cycler (CerTest Biotec S.L) y el software de apoyo/decisión VIASURE V-Smart (CerTest Biotec S.L) para analizar e interpretar los resultados.

## 10. Interpretación de los resultados

Para interpretar correctamente los resultados de los controles y las muestras clínicas, consultar las instrucciones del fabricante de las diferentes aplicaciones posteriores.

Si la aplicación posterior elegida es un ensayo de qPCR, se recomienda usar el software de apoyo/decisión VIASURE V-Smart (CerTest Biotec S.L) para analizar e interpretar los resultados.

## 11. Limitaciones del procedimiento

- La eficiencia de las características de rendimiento de VIASURE DNA/RNA Pathogens Extraction Kit para KingFisher™ Flex (ThermoScientific) depende de los métodos de recogida, transporte, almacenamiento y/o manipulación de las muestras y de la eficiencia del diagrama de flujo utilizado en cada laboratorio para el ensayo de qPCR y el termociclador. Si se desea utilizar otros procedimientos completos distintos de los indicados en estas instrucciones de uso, el usuario final deberá validarlos en su totalidad.
- Para obtener un rendimiento y una cantidad adecuados, la recogida, el almacenamiento y el pretratamiento de las muestras deben llevarse a cabo de acuerdo con las recomendaciones específicas de las guías oficiales para laboratorios.
- Este sistema de procesamiento de muestras es compatible con medios de transporte que contengan tiocianato de guanidina u otras sales de guanidina. Si se desea utilizar otros medios de transporte distintos de los indicados en estas instrucciones, el usuario deberá validarlos.
- Si los materiales consumibles utilizados difieren de los recomendados para este formato, el usuario deberá validarlos.
- VIASURE DNA/RNA Pathogens Extraction Kit puede automatizarse en la plataforma automática KingFisher™ Flex (ThermoScientific). Es preciso leer detenidamente este manual de instrucciones y el manual del usuario del KingFisher™ Flex antes de su uso. Si el proceso de automatización se lleva a cabo en una plataforma diferente de manipulación con partículas magnéticas utilizando otros consumibles, el usuario deberá validarlo.
- Una vez finalizada la extracción y para garantizar la viabilidad de los ácidos nucleicos, almacenar refrigerado hasta su uso, o a -20/-80 °C para el almacenamiento a largo plazo. Consultar el apartado «Condiciones de transporte y almacenamiento» para obtener más información.

## 12. Control de calidad

Los valores esperados de VIASURE DNA/RNA Pathogens Extraction Kit dependen del procedimiento diagnóstico (extracción y ensayo de qPCR), por lo que cada procedimiento completo debe ser validado por el usuario final.

Se recomienda usar VIASURE DNA/RNA Pathogens Extraction Kit junto con los controles adecuados para supervisar todo el proceso para diferentes aplicaciones posteriores. Para controlar todo el proceso, desde el procesamiento de las muestras hasta el análisis, aplicar los controles siguientes: control positivo (no proporcionado pero recomendado), control negativo (no proporcionado pero recomendado) y Extraction Control (proporcionado con el kit).

## 13. Características de rendimiento

La eficiencia de la reacción de PCR no se ve alterada con este método de extracción.

El rendimiento clínico de VIASURE DNA/RNA Pathogens Extraction Kit fue evaluado utilizando los VIASURE Real Time PCR Detection Kits con 750 muestras clínicas (del tracto respiratorio (343 muestras): hisopos orofaríngeos/nasofaríngeos, esputo, lavado broncoalveolar (LBA), y aspirado bronquial; del tracto genital (248 muestras), hisopo vaginal y especímenes vagino-rectales; y del tracto gastrointestinal (159 muestras): heces de pacientes con sospecha de infección del tracto respiratorio, infección del tracto genital o por infección gastrointestinal.

El panel de patógenos respiratorios evaluado fue SARS-CoV-2, Influenza A, RSV, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* y *Pneumocystis jirovecii*; patógenos que causan infección del tracto genital: Human Papillomavirus y *Streptococcus B*; y patógenos gastrointestinales: *Salmonella* sp., *Campylobacter* sp., *Clostridium difficile*, *Cryptosporidium* sp., *Giardia lamblia*, Rotavirus, Norovirus GII, y Astrovirus.

VIASURE DNA/RNA Pathogens Extraction Kit fue comparado con MagMAX™ Viral/Pathogen II (MVP II) Nucleic Acid Isolation Kit para KingFisher™ Flex Purification System (Thermo Scientific™). Los tests qPCR de VIASURE utilizados fueron los siguientes: VIASURE SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit, VIASURE Flu A, Flu B & RSV Real Time PCR Detection Kit, VIASURE *H. influenzae*, *S. pneumoniae* & *M. catarrhalis* Real Time PCR Detection Kit, VIASURE *Pneumocystis jirovecii* Real Time PCR Detection Kit, VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit, VIASURE *Streptococcus B* Real Time PCR Detection Kit, VIASURE *Salmonella*, *Campylobacter* & *Shigella/EIEC* Real Time PCR Detection Kit, VIASURE *Cryptosporidium*, *Giardia* & *E. histolytica* Real Time PCR Detection Kit, VIASURE Rotavirus Real Time PCR Detection Kit, VIASURE Norovirus GII Real Time PCR Detection Kit, VIASURE Astrovirus Real Time PCR Detection Kit y VIASURE *Clostridium difficile* toxins A+B Real Time PCR Detection Kit.

Los resultados obtenidos durante la evaluación del rendimiento muestran una alta concordancia utilizando VIASURE DNA/RNA Pathogens Extraction Kit en combinación con VIASURE Real Time PCR Detection Kits y VIASURE V-Lab96 Cycler.



## 14. Solución de problemas

Problemas/Síntomas/Mensajes de Error/Observaciones	Posibles Causas y Sugerencias
Rendimiento escaso o sensibilidad baja	<p>Degradación del microorganismo durante el transporte/almacenamiento y/o procesamiento.</p>
	<p>Carga incorrecta de los reactivos en la plataforma. Se recomienda etiquetar las placas de 96 pocillos profundos para evitar confusiones. Las placas precargadas con reactivos deben introducirse localizando el primer pocillo (A1) en la esquina superior derecha de las posiciones rotatorias del módulo, y en el orden correcto (seguir el manual del usuario de la plataforma).</p>
	<p>Lisis incompleta de la muestra</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Pretratamiento insuficiente de la muestra. Las muestras de esputo y heces deben pretratarse para que sean lo suficientemente líquidas como para pipetearlas.</li> <li>- Omisión de la adición o adición de un volumen insuficiente de Lysis Buffer, Proteinase K y/o muestra.</li> <li>- Un calentamiento insuficiente durante el paso de incubación podría reducir la eficiencia de la lisis y provocar una inactivación insuficiente de las nucleasas.</li> </ul>
	<p>Adsorción incompleta de los ácidos nucleicos a las microesferas</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Agitación insuficiente para la resuspensión completa de las Magnetic Beads antes de añadirlas a la placa.</li> <li>- Degradación de las Magnetic Beads debido a un almacenamiento incorrecto. No mezclar las Magnetic Beads sobrantes de distintos kits y almacenarlas en las condiciones recomendadas.</li> </ul> <p>El lavado no es adecuado</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Si no se usa un volumen suficiente de etanol para resuspender el Wash 1 Buffer y/o el Wash 2 Buffer, se podría producir la desorción de los ácidos nucleicos de las Magnetic Beads o el arrastre de sustancias inhibitoras a las aplicaciones posteriores. Añadir la cantidad recomendada de etanol a cada depósito y, tras la rehidratación, almacenar en las condiciones recomendadas con anterioridad.</li> </ul> <p>Elución</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Degradación de los ácidos nucleicos debido a la contaminación de los consumibles. Los viales o placas de elución deben ser estériles y estar libres de RNAsas.</li> <li>- Un almacenamiento incorrecto de los ácidos nucleicos purificados podría ocasionar su degradación.</li> </ul>











	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Contaminación del ácido nucleico eluido con etanol antes del análisis. Evitar descontaminar la plataforma cerca de viales o pocillos abiertos que contengan ácidos nucleicos.</li> </ul>
Funcionamiento incorrecto de la plataforma automática	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Comprobar que el material de laboratorio se ha colocado en la posición indicada antes de comenzar un procesamiento de extracción.</li> <li>- Parámetros incorrectos de calentamiento y/o agitación. Realizar las revisiones periódicas de mantenimiento de la plataforma. No se recomienda usar productos de limpieza abrasivos, ya que podría dañar la pintura de la cubierta. Para la limpieza, utilizar un paño suave o un pañuelo de papel.</li> <li>- El procesamiento puede detenerse por mal ajuste de la placa peine de 96 puntas. En primer lugar, Intentar doblar manualmente el peine de puntas a lo largo y a lo ancho para nivelarlo y facilitar su posterior ajuste en la plataforma.</li> </ul>
Degradación del reactivo	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Almacenamiento incorrecto de los reactivos del Extraction Kit antes de abrirlos.</li> <li>- Almacenamiento incorrecto tras la rehidratación de los reactivos.</li> </ul>
Resultados falsos positivos en el ensayo de qPCR	<p>Contaminación cruzada</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Durante la carga de las muestras, para evitar mezclar los tapones de las muestras, se recomienda etiquetar los tapones y mantenerlos separados unos de otros.</li> <li>- Durante la adición de Proteinase K o Magnetic Beads a la mezcla de Lysis Buffer y muestra. Cambiar la punta de la pipeta entre las muestras.</li> <li>- Contaminación cruzada con el qPCR VIASURE Positive Controls (si se utiliza un qPCR VIASURE Positive Control).</li> <li>- Contaminación debida a productos o muestras de qPCR de un procesamiento previo. Es muy recomendable realizar correctamente el protocolo de final del día y la limpieza con etanol para eliminar las fuentes de riesgo microbiológico y contaminación.</li> <li>- Contaminación con microorganismos ubicuos. Se recomienda descontaminar la superficie de la plataforma con etanol después de cada procesamiento. Es muy recomendable realizar correctamente el protocolo de final del día y la limpieza con etanol para eliminar las fuentes de riesgo microbiológico y contaminación.</li> </ul>
Falso negativo	<p>Análisis de muestras con una concentración microbiana inferior al límite de detección.</p> <p>Resultados falsos negativos debido a pérdida de sensibilidad.</p> <p>Programación incorrecta del procesamiento de la extracción por el usuario</p>
Variación de los valores de fluorescencia en el ensayo de qPCR	<p>Podrían variar debido a numerosos factores, como: equipo de PCR, procedimiento de tratamiento, tipo de muestra y tratamiento previo de la muestra, entre otros.</p>

Tabla 5. Solución de problemas.

## Bibliography/Bibliografía

1. Ali, N., Rampazzo, R. de C. P., Costa, A. D. T., & Krieger, M. A. (2017). Current Nucleic Acid Extraction Methods and Their Implications to Point-of-Care Diagnostics. *BioMed Research International*, 2017, 9306564. <https://doi.org/10.1155/2017/9306564>
2. Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., & Patel, H. R. H. (2005). Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 5(2), 209–219. <https://doi.org/10.1586/14737159.5.2.209>
3. Berensmeier, S. (2006). Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73(3), 495–504. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0675-0>
4. Espy, M. J., Uhl, J. R., Sloan, L. M., Buckwalter, S. P., Jones, M. F., Vetter, E. A., Yao, J. D. C., Wengenack, N. L., Rosenblatt, J. E., Cockerill, F. R. 3rd, & Smith, T. F. (2006). Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(1), 165–256. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.1.165-256.2006>
5. for Europe, W. H. O. R. O., of Red Cross, I. F., & Societies, R. C. (2001). *Infections and infectious diseases : a manual for nurses and midwives in the WHO European Region* (p. EUR/01/5019329). Copenhagen : WHO Regional Office for Europe.
6. Thatcher, S. A. (2015). DNA/RNA preparation for molecular detection. *Clinical Chemistry*, 61(1), 89–99. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.221374>
7. Vila, J., Gómez, M. D., Salavert, M., & Bosch, J. (2017). [Methods of rapid diagnosis in clinical microbiology: Clinical needs]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 35(1), 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2016.11.004>.

## Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico *in vitro*

	<i>In vitro</i> diagnostic device  Producto para diagnóstico <i>in vitro</i>		Keep dry  Almacenar en lugar seco		Use by  Fecha de caducida d		Manufacturer  Fabricante		Batch code  Número de lote
	Consult instructions for use  Consultar las instrucciones de uso		Temperature limitation  Limitación de temperatura		Contains sufficient for <n> test  Contiene <n> test		Unique Device Identification  Identificación única de dispositivo		Catalogue number  Número de referencia

## Trademarks

Modification rights reserved. All rights reserved. © CerTest Biotec, S.L.

All other trademarks that may appear in this package insert are the property of their respective owners.

Control de Cambios / Change Control		
<b>Versión / Version nº</b>	<b>Cambios / Changes</b>	<b>Fecha / Date</b>
00	Versión Original / Original Version	23/03/2022

Table 6. Tabla de Control de Cambios / Control change table.

Revision: 23<sup>rd</sup> March 2022







# VIASURE



**CerTest Biotec, S.L.**

Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J, Nº1  
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)

Tel. (+34) 976 520 354

Fax (+34) 976 106 268

certest@certest.es | viasure@certest.es

[www.certest.es](http://www.certest.es)

*One step ahead*



F-566 rev01

