

INACTIV AR

Producto para la inactivación, transporte y preparación directa de Ácidos Nucleicos a partir de muestras biológicas

Para diagnóstico de Uso "In Vitro"

Cantidad suficiente para procesar 200 muestras biológicas

FUNDAMENTO DEL METODO

La inactivación de una muestra biológica contempla a cualquier patógeno que esté presente en la misma y que pueda ser una fuente de infección para quienes manipulan el material. De hecho, la inactivación puede ser fácilmente realizada en el caso de hisopados (tracto respiratorio y saliva) ya que sólo requiere poner el hisopo en un tubo con una Solución de guanidinio (GS 1X) en presencia de β -Mercaptoetanol, e incubar ese tubo en agua hirviendo o en un baño térmico a 98 °C por 8 minutos. La inactivación de la muestra por calor en Solución GS con β -Mercaptoetanol facilita la extracción de los ácidos nucleicos en solución, haciéndolos listos para su transporte y detección.

El protocolo de inactivación en GS inactiva al 100% de las partículas del SARS-CoV-2 que puedan estar presentes en la muestra y también a más del 99.9% de los virus envueltos o desnudos, y varios otros patógenos que la muestra pueda contener. De esta forma, la muestra inactivada puede ser transportada y utilizada luego para la detección de patógenos y controles humanos internos.

La resina Chelex actúa como quelante de inhibidores propios de la Solución GS y de la muestra biológica haciéndola apta para la detección de ácidos nucleicos en las reacciones moleculares. El uso del producto INACTIV AR simplifica la inactivación, transporte y preparación de Ácidos Nucleicos permitiendo el estudio de expresión génica y detección de genomas virales en establecimientos con nivel de bioseguridad menor a II y equipamiento reducido. Más aún, permite hacer uso de diferentes estrategias para la detección del genoma del SARS-CoV-2 como RT-qPCR y LAMP. Al facilitar el procesamiento y reducir el tiempo requerido de manipulación de muestras, permite aumentar los tests y reducir los tiempos de diagnóstico.

REACTIVOS Y MATERIALES PROVISTOS

Solución GS 2X: Dos frascos conteniendo cada uno 50 ml de Solución 2M de Guanidinio hidrocloreto con un agente surfactante en buffer Tris HCl y conservador. Listo para usar como 2X o diluir al medio para 1X.

Suspensión de Chelex: Dos frascos conteniendo cada uno 15 ml de Suspensión de Resina Chelex al 17% P/V en buffer Tris HCl con conservador. Agitar antes de usar para una perfecta distribución de la resina quelante.

Ampolla de β -Mercaptoetanol: Una ampolla conteniendo 1 ml de β -Mercaptoetanol. Tóxico por inhalación, por ingestión y en contacto con la piel.

1 Frasco vacío para acondicionar el β -Mercaptoetanol una vez abierta la ampolla.

1 Instructivo.

REACTIVOS Y MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS CON EL PRODUCTO

- Agua destilada o desionizada.
- Tubo a rosca o tubo falcon de 15 ml o tubo con tapón de goma seguro. No usar de tubos de poliestireno y/o tubos sin cierre a rosca, ya que la elevada temperatura daña esos materiales y genera que se acumule mucha presión.
- Tubos tipo Eppendorf (de centrifugación) estériles (libres de nucleasas)
- Micropipetas de 5ml a 500ml
- Baño termostatzado a 98 °C o baño de agua hirviendo.
- Materiales de bioseguridad.
- Vortex.
- Cronómetro.

ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO

1. El producto debe ser conservado entre 2 y 30°C y usarse antes de la fecha de vencimiento declarada en los rótulos. No congelar.
2. El producto debe ser llevado a temperatura ambiente antes de utilizar.
3. Todos los otros reactivos son estables entre 2 y 30°C siempre que se hayan manipulado cuidadosamente para evitar su contaminación.
4. Las preparaciones de las Soluciones GS 1X y 2X con β -Mercaptoetanol no son estables por lo que deben usarse inmediatamente o antes de las 72 horas de preparadas.
5. Una vez inactivada la muestra, el genoma viral es estable al menos una semana a temperatura ambiente para su utilización y transporte.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Todos los reactivos contenidos en el producto son sólo para diagnóstico de uso "in vitro".
2. Coloque todos los reactivos a temperatura ambiente al menos 1 hora antes de usar.

3. No utilice el producto o los reactivos que lo componen después de la fecha del vencimiento declarada en los rótulos. El producto tiene que ser conservado entre 2 y 30°C. No congelar.
4. Evite cualquier contaminación de los reactivos al sacarlos de sus recipientes. Nosotros recomendamos utilizar pipetas automáticas con puntas descartables.
5. No mezcle reactivos de lotes diferentes. No intercambie la tapa entre los diferentes reactivos componentes del producto.
6. Muestras y materiales potencialmente infecciosos tienen que ser manejados con cuidado siguiendo las normas de bioseguridad vigentes acordes con la patología.
7. Todos los objetos en contacto directo con las muestras y los residuos del ensayo deben tratarse como potencialmente infecciosos. Los procedimientos más efectivos para la inactivación son el tratamiento con autoclave a 121°C durante 30 minutos o con Hipoclorito de Sodio a una concentración final de 2.5% durante 24 horas.
8. El 2-Mercaptoetanol es Tóxico por inhalación, por ingestión y en contacto con la piel. Irrita la piel. Riesgo de lesiones oculares graves. Tiene olor característico desagradable por lo que es necesario manipularlo con protección respiratoria o bajo sistema de extracción de aire.
9. Las preparaciones de las Soluciones GS 1X y 2X con β -Mercaptoetanol no son estables por lo que deben usarse inmediatamente o antes de las 72 horas de preparadas (del agregado del β -Mercaptoetanol).
10. Evitar cualquier contacto de la piel y mucosa con todos los reactivos. En caso de contacto con los ojos, lavar inmediata y abundantemente con agua. Tras contacto con la piel, lavar con abundante agua. Siempre use para su protección guantes, lentes, guardapolvos, etc.
11. El uso de este método rápido de preparación de muestra genera un corrimiento hacia un Ct más alto (Ciclos de cuantificación) en las RT-qPCRs que puede traducirse en una menor sensibilidad dependiendo del amplicón. Sin embargo, la muestra inactivada es plausible de ser utilizada para aislar ARNs por otros métodos (columnas, perlas magnéticas) de requerir mayor sensibilidad.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Solución GS 2X con β -Mercaptoetanol: Inmediatamente antes de usar la Solución GS 2X, adicionarle 500 μ l de β -Mercaptoetanol a 49.5 ml de esta solución. Preparar la cantidad necesaria para los procesamientos de muestras que desee realizar.

Solución GS 1X: Para la obtención de Solución GS 1X diluir la Solución GS 2X al medio con Agua Destilada o Desionizada antes de usar. Homogeneizar bien. La Solución GS 1X es estable a temperatura ambiente hasta la fecha de vencimiento del producto.

Solución GS 1X con β -Mercaptoetanol: Inmediatamente antes usar la Solución GS 1X, adicionarle 500 μ l de β -Mercaptoetanol a 99.5 ml de esta solución. Preparar la cantidad necesaria para los procesamientos de muestras que desee realizar.

Debe utilizar las Soluciones GS 1X y 2X preparada con β -Mercaptoetanol inmediatamente o antes de las 72 horas, es decir, que el agregado de β -Mercaptoetanol sea lo más cercano posible a su uso. (Ver Advertencias y Precauciones).

Suspensión de Chelex: Agitar antes de usar para una perfecta distribución de la resina quelante.

OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Puede utilizar muestras biológicas provenientes de todo tipo de hisopados directos, hisopados en solución fisiológica/medio de transporte viral o muestras de saliva. No generan interferencias los hisopos de nylon y dacrón. No utilizar hisopos de algodón o madera ya que generan interferencias en las reacciones de detección del genoma viral. No utilizar medios de transporte que contengan inactivantes (guanidinio). Los medios de transportes virales universales y la solución fisiológica funcionan adecuadamente.

Si utiliza saliva, lo recomendable es la primera de la mañana sin higiene bucal, caso contrario obtener saliva con una espera de dos horas desde la última ingesta de alimentos o bebidas, sin higiene bucal. En todos los casos debe recogerla en recipiente estéril.

Otras muestras biológicas pueden ser aptas para usar como sangre, materia fecal, líquido cefalorraquídeo, semen, etc. siempre que sea recogida en recipiente estéril.

La manipulación de una muestra biológica previa a su inactivación debe realizarse bajo un protocolo con nivel de bioseguridad (II), correspondiente al manejo de muestras infecciosas.

Una vez inactivada la muestra, el genoma viral es estable una semana a temperatura ambiente para su utilización y transporte por al menos 1 semana.

La solución GS 1X con β -Mercaptoetanol es plausible de ser utilizada como medio de transporte universal alternativo, siempre que la inactivación por calor se haga de manera inmediata y se realice su transporte con posterioridad. Adicionalmente, la solución GS 1X con β -Mercaptoetanol como medio de transporte puede ser utilizada siguiendo los protocolos de extracción de ácidos nucleicos comúnmente disponibles (perlas magnéticas, columnas, silica coloidal).

PROCEDIMIENTO

Se divide en 2 partes, (I) la Inactivación y transporte de Muestras y (II) la Preparación Directa de Ácidos Nucleicos.

I. Inactivación y transporte de Muestras.

A) A partir de un hisopado directo inmediatamente después de obtenido:

1. Se coloca el hisopo en un tubo con cierre seguro (Tubo a rosca o tubo falcon de 15 ml o tubo con tapón de goma seguro) con 1 ml de solución GS 1X con β -Mercaptoetanol (Ver Preparación de los Reactivos).
2. Inactivar **inmediatamente** incubando el tubo en un baño de agua hirviendo, o en un baño termostatzado a 98 °C durante 8 minutos.

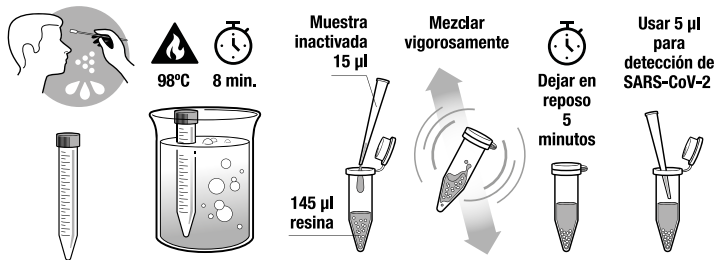
B) A partir de un hisopado en solución fisiológica/medio de transporte viral o una muestra de saliva:

1. En un tubo a rosca o tubo falcon de 15 ml o tubo con tapón de goma seguro, mezclar la muestra (hisopado en solución fisiológica/medio de transporte viral o saliva) con solución GS 2X con β -Mercaptoetanol (Ver Preparación de los Reactivos) en relación 1:1. Se pueden usar 200 μ l de muestra y 200 μ l de GS 2X con β -Mercaptoetanol. Agitar vigorosamente o vortexear, para lograr una perfecta homogeneización.
2. Inactivar **inmediatamente** incubando el tubo en un baño de agua hirviendo, o en un baño termostatzado a 98 °C durante 8 minutos.

II. Preparación Directa de Ácidos Nucleicos.

1. Agitar el frasco con Suspensión de Chelex para una perfecta distribución de la resina quelante.
2. Dispensar 145 μ l de Suspensión de Chelex en tubos eppendorf (de centrifugación) estériles (libres de nucleasas).
3. Verificar que la resina siempre quede perfectamente homogénea antes de dispensar en los tubos que sea necesario. Si la resina comienza a decantar repetir el paso 1 hasta lograr la homogeneización completa.
4. Agregar 15 μ l de muestra inactivada en el tubo con los 145 μ l de Suspensión de Chelex.
5. Mezclar vigorosamente por inversión, agitación o vortexeado, y dejar en reposo por 5 minutos a temperatura ambiente para que se produzca el intercambio iónico y quelado de moléculas inhibitorias.
6. Utilizar 5 μ l del sobrenadante para los estudios de la expresión génica como por ejemplo para la detección del genoma del SARS-CoV-2 o métodos isotérmicos.

Esquema del Procedimiento (Partes I y II). Ej.: Para la detección de SARS-CoV-2 con una muestra que puede ser de hisopado nasofaríngeo, de fauces, nasal o simplemente saliva. Para hisopados directos la solución a utilizar debe ser la GS 1X con β -Mercaptoetanol (protocolo I-A). Para hisopados en medio de transporte o saliva la solución a utilizar debe ser la GS 2X con β -Mercaptoetanol (protocolo I-B).



Muestra
en GS

Inactivación y
Transporte

Preparación

Muestra lista
para usar

DESEMPEÑO

Inactivación viral y transporte

En Instituciones de Referencia de Argentina, se evaluó la aparición de efecto citopático (ECP) con células Vero en monocapa incluyéndose controles de células normales y controles con células infectadas con SARS-CoV-2.

En los resultados No se observó aparición de efecto citopático (ECP) en ninguno de los pocillos inoculados con los sobrenadantes de extracción de ARN ni tampoco en los pocillos del segundo pasaje en comparación con los controles positivos para virus no inactivados. En las improntas preparadas con las células de los cultivos no se observó fluorescencia específica para SARS-CoV-2.

La ausencia de ECP en los dos pasajes en cultivos celulares y la no detección de fluorescencia

específica para SARS-CoV-2 en las células de los cultivos indicaría que el tratamiento con Solución GS y Suspensión de Chelex sería capaz de inactivar cantidades de virus similares a las que están presentes en las muestras clínicas del tracto respiratorio de pacientes con COVID-19. Una vez inactivada la muestra, no se observa una pérdida significativa de ARN de la misma en el transcurso de una semana tiempo en que resulta apta para su transporte.

Análisis de concordancia con el panel de muestras positivas y negativas

En Instituciones de Referencia de Argentina se procedió a realizar de manera paralela la extracción de ARN de muestras clínicas utilizando la Solución GS y Suspensión de Chelex con método de referencia validado en protocolos internacionales de diagnóstico de SARS-CoV-2.

Los especímenes clínicos ensayados fueron 174 muestras de Hisopados Nasofaríngeos de la Provincia de Buenos Aires, Argentina. Los extractos de ARN generados por ambas metodologías fueron sometidos al ensayo de RT-PCR en tiempo real para la detección del gen E de SARS-CoV-2 según el ensayo de referencia para la OMS.

Se determinó la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y se calculó el índice Kappa.

El % de positividad obtenido por ambos métodos fue el mismo: 42.69%. El % de resultados concordantes: 91.82%. El valor del índice Kappa obtenido fue 0.833 es considerado muy bueno y estaría de acuerdo con la concordancia clínica observada. Los valores de sensibilidad y de especificidad obtenidos fueron 90.41% y 92.86% respectivamente. El valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo fueron 90.41% y 92.86% respectivamente.

Se analizaron 70 muestras (50 positivas y 20 negativas) utilizando ARN extraído y purificado con perlas magnéticas (ARN puro) por el INBIRS con su método automatizado y ARN preparado con la presente metodología (GS), como sustrato de las reacciones de RT-qPCR de un producto comercial aprobado por las Autoridades Sanitarias de Argentina. Se obtuvo concordancia completa entre los resultados con ambos ARN excepto por dos muestras positivas que resultaron negativas según el corte en Ct 36 que sugiere el fabricante del producto y usa el INBIRS.

CONCLUSIONES

Frente a la necesidad de llevar a cabo testeos masivos para detectar de manera dinámica casos con infección activa en la población, en especial en casos de pandemia, INACTIV AR constituye una alternativa de bajo costo que no requiere equipamientos de alta complejidad para la etapa de extracción de ARN de SARS-CoV-2 y otros materiales genéticos.

REFERENCIAS

- 1) *“Desarrollo de un protocolo completo de inactivación de muestras y preparación de ARN total para la detección de SARS-CoV-2 por diferentes métodos”*. Grupos de trabajo involucrados: Argentina: IFIBYNE: Valeria Buggiano, Lucas Servi, Manuel Muñoz, Micaela Godoy Herz, Federico Fuchs, Juan C. Muñoz, José Stigliano, Ignacio Schor, Marcos Palavecino, Nicolás Nieto Moreno, Laureano Bragado, José Clemente, Manuel de la Mata, Anabella Srebrow. INBIRS: Gonzalo Cabrerizo, Federico Remes-Lenicov. IQUIBICEN: Cybele García UNSAM: Diego Comerci. ANLIS-Malbrán: Elsa Baumeister, Claudia Perandones. Suiza: ETH-Zurich: Fabian Rudolf. Coordinador: Ezequiel Petrillo Investigador Responsable: Alberto Kornblihtt.
- 2) *“Verificación del funcionamiento del protocolo de inactivación y preparación directa de ARN con la Solución GS y una resina quelante”*. Prof. magist. Elsa Baumeister, Jefa Servicio Virosis Respiratorias, Lab. Nac. de Ref. de enfermedades respiratorias virales, Min. Sal. Centro Nacional de Influenza de OPS/OMS. Lab. Nac. de Ref. Sarampión y rubéola Min. Sal. y OPS/OMS. Departamento Virología. INEI-ANLIS “Carlos G. Malbrán”.

LABORATORIO LEMOS S.R.L.

Director Técnico: Jorge O. Carradori. Bioquím. y Farm.

Santiago del Estero 1162.

C1075AAX. C.A.B.A. Argentina

Telefax: (5411) 4304-2204/2374

E-mail: info@lab-lemos.com.ar

www.lab-lemos.com.ar

Autorizado por A.N.M.A.T. PM-1545-7

USO PROFESIONAL-VENTA EXCLUSIVA A LABORATORIOS DE ANÁLISIS CLÍNICOS.

Industria Argentina.