

PRINCIPIOS BÁSICOS DE LA RECEPCIÓN DE MUESTRAS E INACTIVACIÓN DEL SARS-COV-2

Durante el proceso de recepción de la muestra, el personal profesional entrenado del laboratorio de secuenciación de ADN GenCore debe asegurar que cada muestra que ingresa esté relacionada a la documentación apropiada, tenga una identificación clara e inequívoca, y haya sido mantenida en refrigeración a 4°C, o por lo menos que haya mantenido la cadena de frío entre 2°-8°C por las primeras 24h después de la toma de la muestra. En el caso de las muestras para detección de SARS CoV-2 almacenadas a 4°C no puedan ser procesadas en una ventana de tiempo de 48h, el Ministerio de Salud y Protección Social recomienda congelar las muestras a 70°C hasta el momento que se puedan procesar (1). Sin embargo, nuestro laboratorio recomienda que las muestras sean congeladas idealmente a -80°C si las muestras deben esperar hasta 72 horas antes de ser procesadas (2).

Al entrar al laboratorio las muestras son desempacadas del triple embalaje y desinfectadas con hipoclorito al 0.5% antes de ser ingresadas en una campana de seguridad biológica (BSC) de clase II, donde una porción del medio (500uL) es trasladada a un tubo tapa rosca que contiene PBS para el análisis, mientras que el resto del volumen del espécimen -la muestra primaria- será almacenada a 4°C o -20°C hasta obtener los resultados. Sin embargo, las muestras en las que se detecte el SARS-CoV-2, debe ser conservada a -80°C hasta la disposición del Instituto Nacional de Salud o de la Secretaría Distrital de Salud (2).

Dependiendo del tipo de espécimen recolectado (sangre, plasma, aspirados, células o tejidos) y de las propiedades de la macromolécula que se va utilizar para la detección del SARS-CoV-2 (ADN, ARN o proteína), se debe escoger el método más apropiado para inactivar el virus. Ningún método o reactivo funciona para todas las aplicaciones, así que es importante validar cual es el mejor método para cada caso. Case et al, resume en la siguiente tabla (3) los “estándares de oro” para la inactivación del SARS-CoV-2:

Methods for inactivation of infectious SARS-CoV-2.

Method	Specimen type(s)	Specific reagent(s)/method(s) used	Incubation time
Trizol*	Tissue homogenate Cells Biological fluids	Per manufacturer instructions	
Paraformaldehyde*	Cells Biological fluids	4% final concentration	10 min
Formalin*	Tissues	10% at a ratio of 1:10 (tissue:formalin)	7 days
Triton-X-100	Serum Tissue culture media** Cell homogenate***	1% triton-X (final conc.) (Millipore-Sigma cat #11332481001)	20 min
Triton-X-100	Lung homogenate		60 min
MagMAX	Serum Tissue culture media**	MagMAX viral RNA kit (ABI cat # AM1939)	5 min
MagMAX	Tissue homogenate Cell homogenate***	MagMAX mirVana kit (ABI cat # A27828)	5 min
Heat	Urine Tissue culture media	50 °C for 5 min followed by 95 °C for 5 min	10 min
Paraformaldehyde	Lung homogenate	1% (final concentration)	60 min

*Gold standard methods.

**Note: tissue culture media is less complex than serum and in some cases is inferred from data showing 100% inactivation in serum.

***Note: cells from tissue culture are less complex than tissues from an infected animal, and this data is inferred from data showing 100% inactivation in homogenized lung tissue.

Tabla 1.

Métodos para inactivación del SARS CoV-2 (3).

Teniendo en cuenta que el medio de transporte viral donde se recolecta la muestra nasofaríngea contiene células epiteliales de las vías respiratorias, macromoléculas del sistema inmunológico -como las citoquinas-, microorganismos comunes de la flora respiratoria, como bacterias, en el caso de personas infectadas con virus respiratorios, es necesario inactivar el virus, sin degradar los ácidos nucleicos y sin causar agregados de proteínas. Aunque experimentos de inactivación termal del SARS-CoV realizados en el Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas de Estados Unidos en el 2004 demostraron que se requieren por lo menos 30 minutos para inactivar este coronavirus a 75°C. (5), acorde a los estándares de oro para la inactivación del SARS CoV-2 recopilados por el Case et al (3), es posible inactivar virus de especímenes que contengan células en medio de cultivo exponiendo las muestras a 50°C por 5 minutos, seguido por un shock térmico a 95°C por 5min. Por ende, nuestro laboratorio inactiva el SARS CoV-2 de la muestra a analizar con seguido por un shock térmico a 95°C por 10min (2).

Para información sobre la inactivación del SARS-CoV-2 en superficies se recomienda la revisión de estudios realizados con coronavirus, como el SARS CoV-1, el MERS CoV (Middle East Respiratory Syndrome) y coronavirus endémicos (HCoV) por investigadores del Instituto de Medicina Ambiental y de Higiene de Alemania: Kampf G., Todt D., Pfaender S., Steinmann E., Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents. *Journal of Hospital Infection*. 104; 246-251, (2020)

REFERENCIAS

1. Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia. Lineamientos para la gestión de muestras durante la pandemia del SARS-CoV-2 en Colombia (2020)
2. León C.M., et al. Protocolo de Recepción, radicación, conservación y disposición de muestras para la detección de SARS-COV2 (COVID19) en el Centro de Secuenciación de ADN GenCore de la Universidad de los Andes. 2020 – agregar link del protocolo en la sección de Análisis de Muestra de la página de Ciencia Abierta.
3. Case J.B., Bailey A.L., Kim A.S., Chen R.E., Diamond M.S., Growth, detection, quantification, and inactivation of SARS-CoV-2. *Virology*. 548: 39–48 (2020)
4. Darnell M.E.R., Subbarao K., Feinstone S.F. Taylor D., Inactivation of the coronavirus that induces severe acute respiratory syndrome, SARS-CoV. *J Virol Methods*. 121(1): 85–91. (2004)