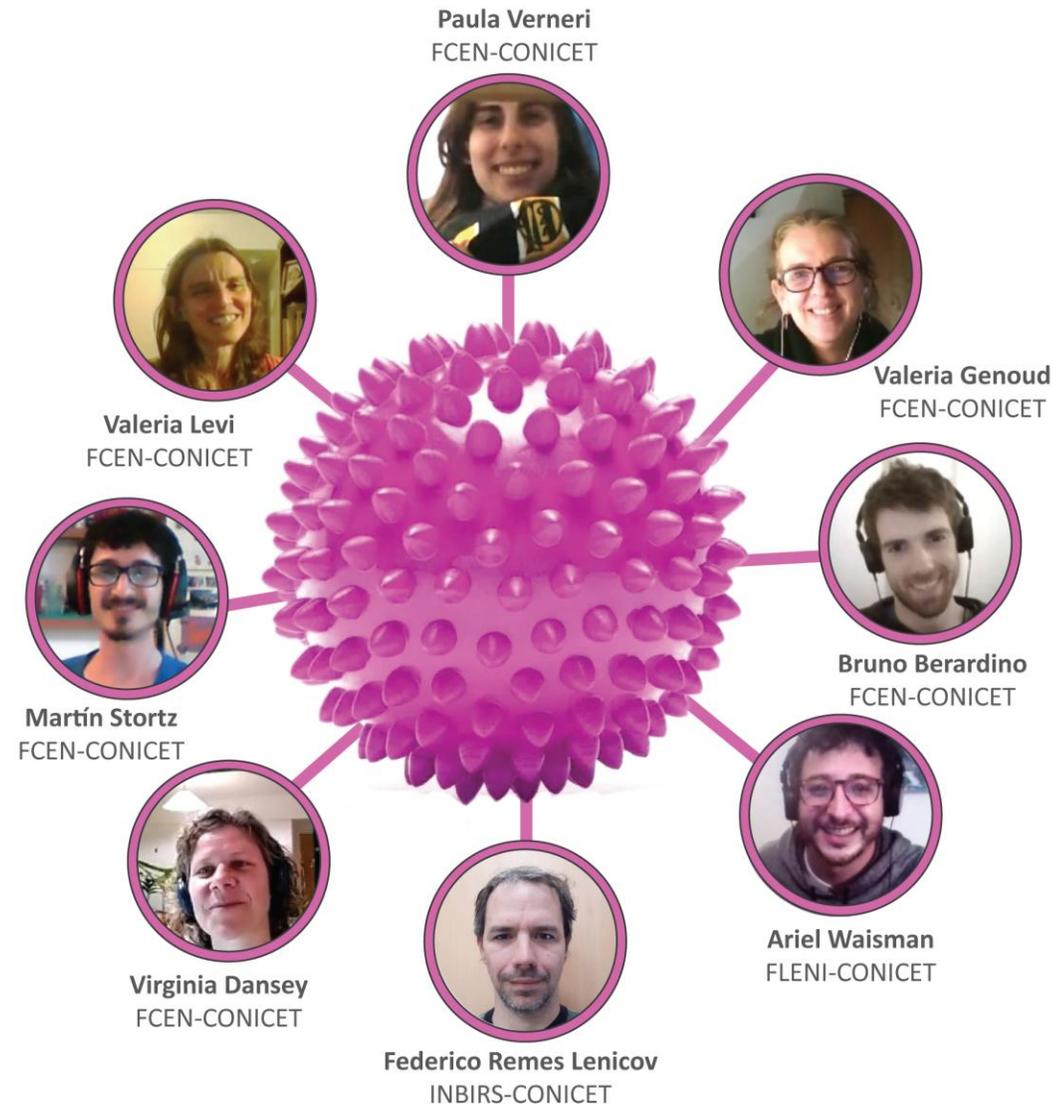


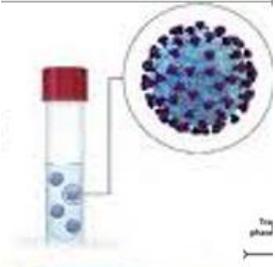
FlashPrep[®]: Detección de SARS-CoV-2 por métodos moleculares sin extracción de RNA



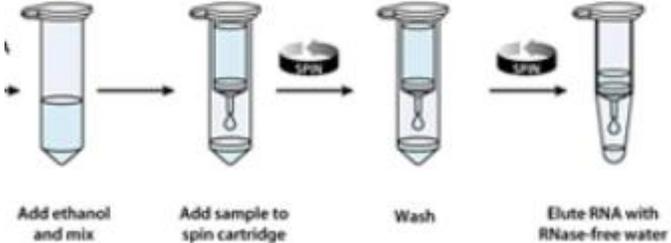
Determinación de SARS-CoV-2: el método “standard de oro”



Hisopado nasofaríngeo



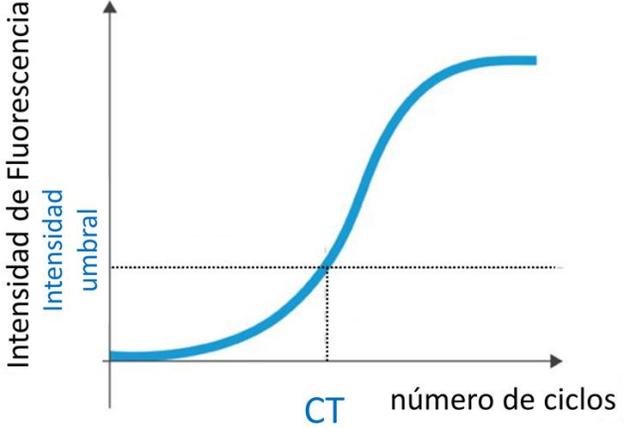
Hisopo en medio de transporte



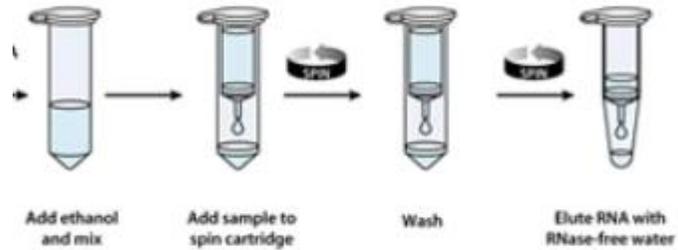
Extracción de RNA



RT-qPCR



El “cuello de botella”: la extracción



Extracción de RNA

Kit de extracción: 6-10 dólares (x muestra)

- Cada operario realiza la extracción de 24 muestras en simultáneo (1.5 h de trabajo ininterrumpido y altamente exigente físicamente)
- Todo el trabajo de purificación es realizado en cabinas de bioseguridad con un operario por cabina (uso continuo de centrífuga y gran cantidad de tips para pipetas).



94 muestras requieren ~ 6 hs de trabajo

Hay alternativas?

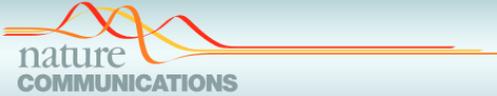
Desarrollar un método que reemplace a la extracción del ARN

- Sencillo
- Económico
- Con insumos nacionales

Hay alternativas? Inactivación térmica y proteinasa-K (PK)



Björn Reinius
(Karolinska Institutet)



ARTICLE Check for updates

<https://doi.org/10.1038/s41467-020-18611-5> OPEN

Massive and rapid COVID-19 testing is feasible by extraction-free SARS-CoV-2 RT-PCR

Ioanna Smyrlaki^{1,5}, Martin Ekman^{2,5}, Antonio Lentini¹, Nuno Rufino de Sousa³, Natali Papanicolaou¹, Martin Vondracek², Johan Aarum², Hamzah Safari², Shaman Muradrasoli⁴, Antonio Gigliotti Rothfuchs³, Jan Albert^{2,3}, Björn Högberg¹ & Björn Reinius^{1✉}

- 5 min a 95- 98 °C
- Kit de detección muy difícil de implementar en laboratorios de diagnóstico

Preprints sugiriendo utilizar proteinasa K para prevenir la degradación del ARN (estadística pobre, resultados muy variados)

Hay proveedores locales de PK? Calidad?

INICIO EMPRESA I+D PRODUCTOS SERVICIOS [CONTACTO](#)

Kit Proteinasa K



USO EN INVESTIGACIÓN *IN VITRO*

Para digerir proteínas en amplio rango de condiciones de reacción

PRESENTACIÓN

El kit (K1300) **HIGHWAY** contiene:

- 1 vial con 100 mg de Proteinasa K liofilizada (E1402)
- 5 viales con 1 ml cada uno de Buffer Proteinasa K (B0221)

DESCRIPCIÓN

La Proteinasa K recombinante (producida en *Pichia Pastoris*) (E1402) proveniente del hongo *Titirachium album* es una serin proteasa con amplia especificidad de sustrato, incluso en presencia de detergentes. Contiene una actividad específica de 40 U/mg proteína. Se define 1 U de enzima como la actividad generada por péptidos y aminoácidos Folin-positivos equivalentes a 1 μmol de tirosina por minuto a pH 7.5 a 37°C. La concentración de trabajo recomendada es de 50-100 $\mu\text{g/ml}$ para digestión proteica e inactivación enzimática y de 2 mg/ml para tratamiento de tejidos. Se recomienda preparar una solución stock de 20 mg/ml con el Buffer Proteinasa K (B0221) especialmente formulado por INBIO HIGHWAY. Su actividad óptima se encuentra en los 50-55°C. Es estable en un amplio rango de pH: 4.0-12.5, siendo óptimo dentro de pH: 7.0 a 8.0. La inactivación enzimática se produce por calentamiento a 95°C por 10 minutos.

Foto 1 / 1

[CONSULTAR](#)

BUENAS PRACTICAS DE FABRICACIÓN ANMAT

1. Contacto a través de la Oficina de Vinculación de la FCEN y CONICET con la empresa (Convenio específico)
2. Performance de la PK y optimización del buffer (reactivo Flashprep[®])

Protocolo de procesamiento de muestras

Muestra (hisopado en solución fisiológica o saliva)



- 1) Agregar 10 μ l de reactivo FlashPrep[®]
- 2) Adicionar 90 μ l de muestra

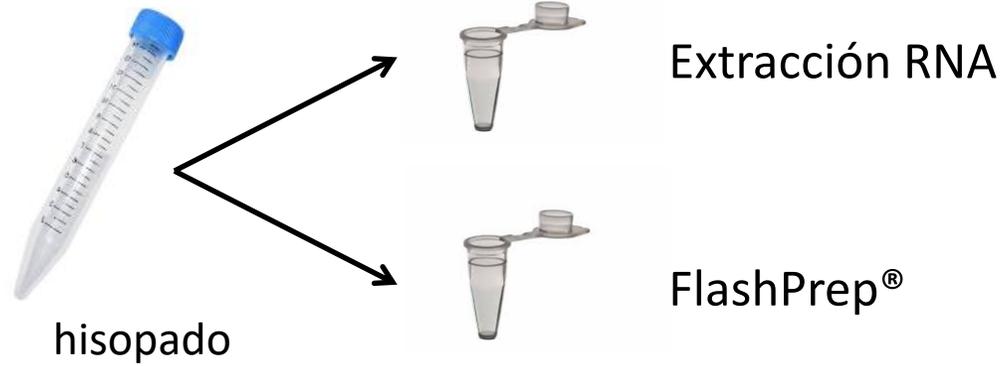


- 3) Incubar 15min a 55°C y 5min a 98°C
- 4) Tomar 8 μ l para la reacción de RT-qPCR



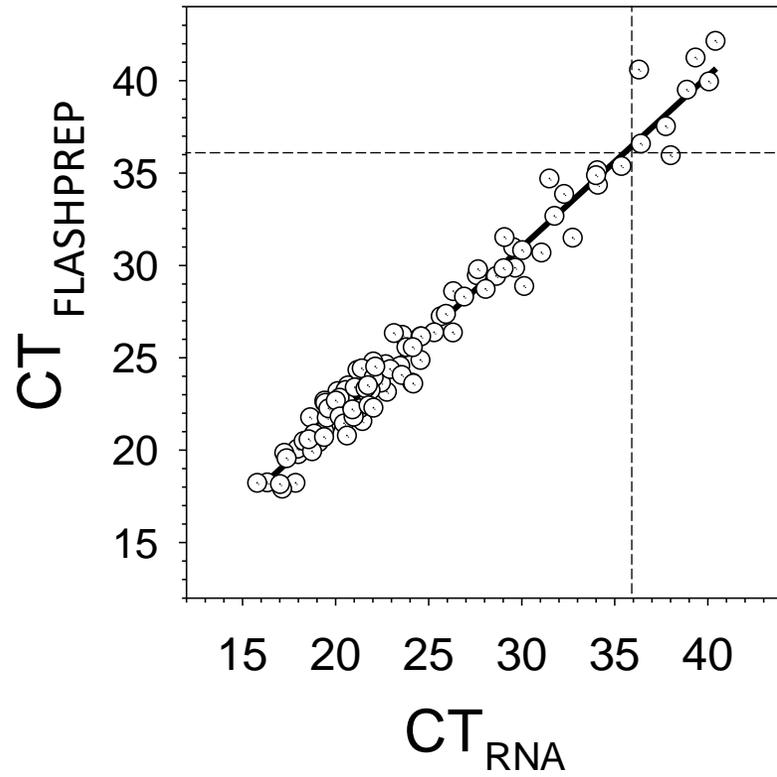
Validaciones finales (FlashPrep vs. Extracción de RNA)

- Protocolo de análisis simultáneo (kit de detección Discovery).

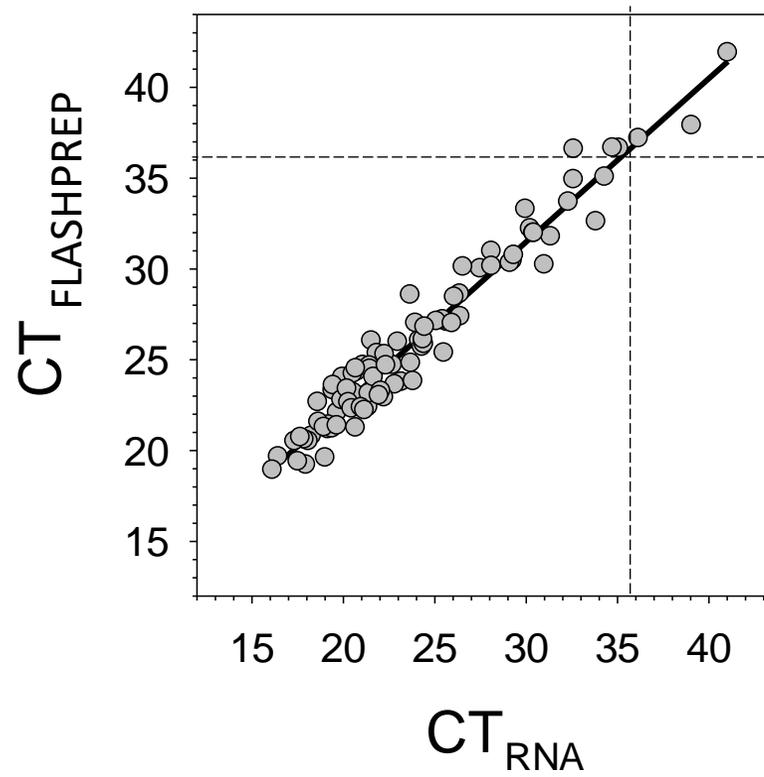


Validaciones finales FlashPrep

Gen N



Gen Orf1ab



Validaciones finales (FlashPrep vs. Extracción de RNA)

Verdaderos NEG	106
Verdaderos POS	106
Falsos NEG	1
Falsos POS	1*

Sensibilidad: $99 \pm 1 \%$

Especificidad: $99 \pm 1 \%$

Exactitud: 0,990

Autorizado por ANMAT

Agradecimiento especial al Hospital San Juan de Dios

Conclusiones generales y aspectos relevantes

	Extracción de RNA	FlashPrep
tiempo requerido para procesar 94 muestras	6 horas	~ 30 min
costo (por ensayo)	5-10 dólares	-1 dólar

Flashprep permite detectar SARS-CoV-2 **sin el paso de extracción y sin pérdidas de sensibilidad o especificidad.**

FlashPrep® (Inbio-Highway)

FlashPrep®
ARN SARS CoV-2 Highway
(buffer a base de proteinasa K)
*tecnología co-desarrollada por
CONICET y Exactas-UBA*

AUTORIZADO POR
ANMAT

Inactiva el virus

Liberación rápida del ARN a partir de hisopado
(adición de buffer + 20min incubación)

No requiere equipamiento costoso

Precio muy accesible

Se aplica directamente en la RT qPCR

El producto se transporta a temperatura ambiente

REF: KD0320-1000

INBIO HIGHWAY

FlashPrep® ARN SARS CoV-2 Highway
10 ml, 1000 extracciones
Inactivación viral y liberación del ARN de SARS CoV-2 a partir de hisopados nasofaríngeos / orofaríngeos
Producto para Diagnóstico de Uso in Vitro

Uso Profesional-Venta exclusiva a hospitales de análisis clínicos
Producto autorizado en el contexto de la emergencia sanitaria por COVID-19

INBIO HIGHWAY

1. PK liofilizada (fácil de transportar)
2. Frasco con el buffer (no requiere preparaciones extras)

Durante el 2021

- Robustez del protocolo en condiciones de campo
- Autorización ANMAT para uso con muestras de saliva
- Asesoramiento a usuarios/as
- Otros kits usados en Argentina (Neokit, por ej.)



Uso de FlashPrep en la detección del virus dengue por RT-qPCR (colaboración con MA Morales y C Fabbri, Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas "Dr. Julio I. Maiztegui")

ImpaCT.AR - Desafío N°62

Compartir en
redes sociales



El programa ImpaCT.AR tiene el propósito de promover proyectos de investigación y desarrollo que brinden apoyo a organismos públicos en la búsqueda de soluciones a desafíos de interés público.

Nombre del organismo público destinatario

Red Provincial de Laboratorios de Salud de Misiones (REPLASMI), dependiente de la Dirección de Bioquímica, Subsecretaría de Apoyo y Logística del Ministerio de Salud Pública de la Provincia de Misiones.

Denominación del desafío de interés público (problema)

Detección del virus dengue en muestras de suero humano por RT-qPCR sin extracción de RNA.



FINALIZADO

Fecha límite para la presentación de planes de trabajo: 12/8/2021

Agradecimientos

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS EN RETROVIRUS Y SIDA
ex Centro Nacional de Referencia para el Sida

Jorge Geffner



Björn Reinius

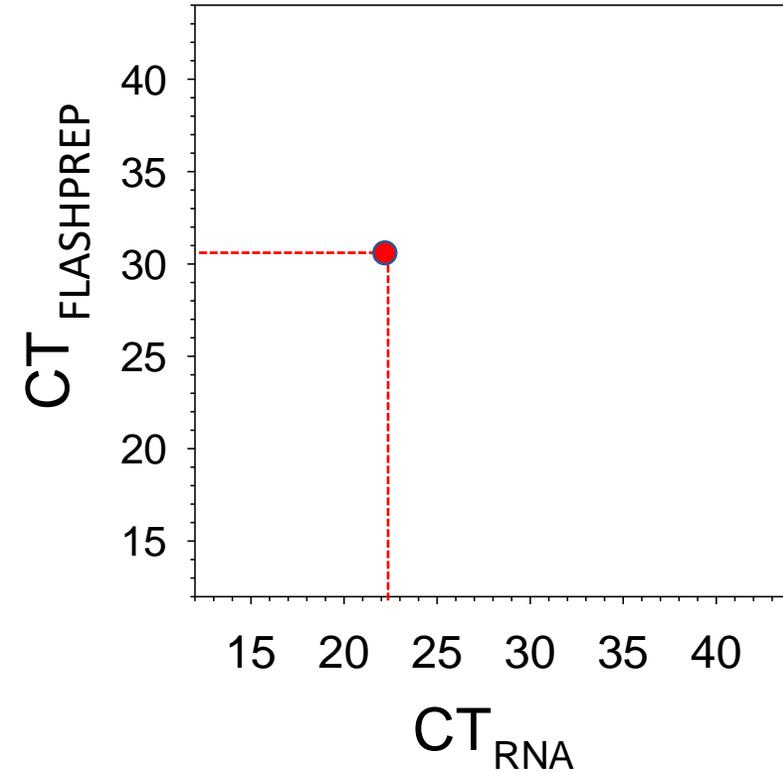
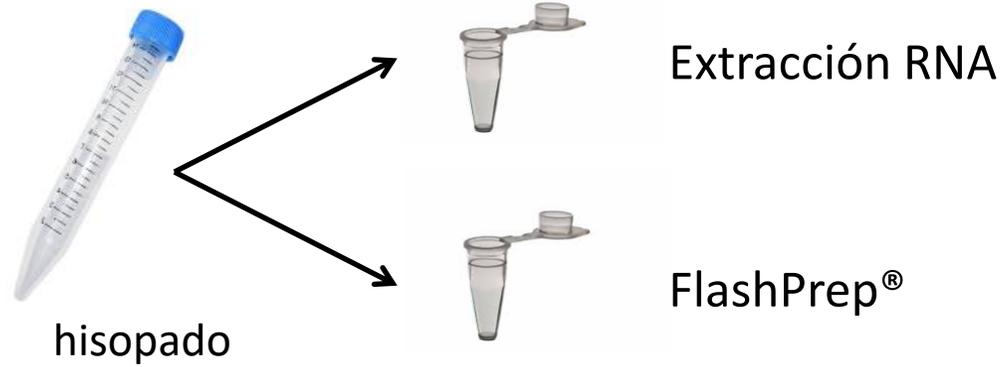


Ministerio de
Ciencia, Tecnología
e Innovación Productiva

Presidencia de la Nación

Validaciones finales

- Protocolo de análisis simultáneo (kit Discovery).

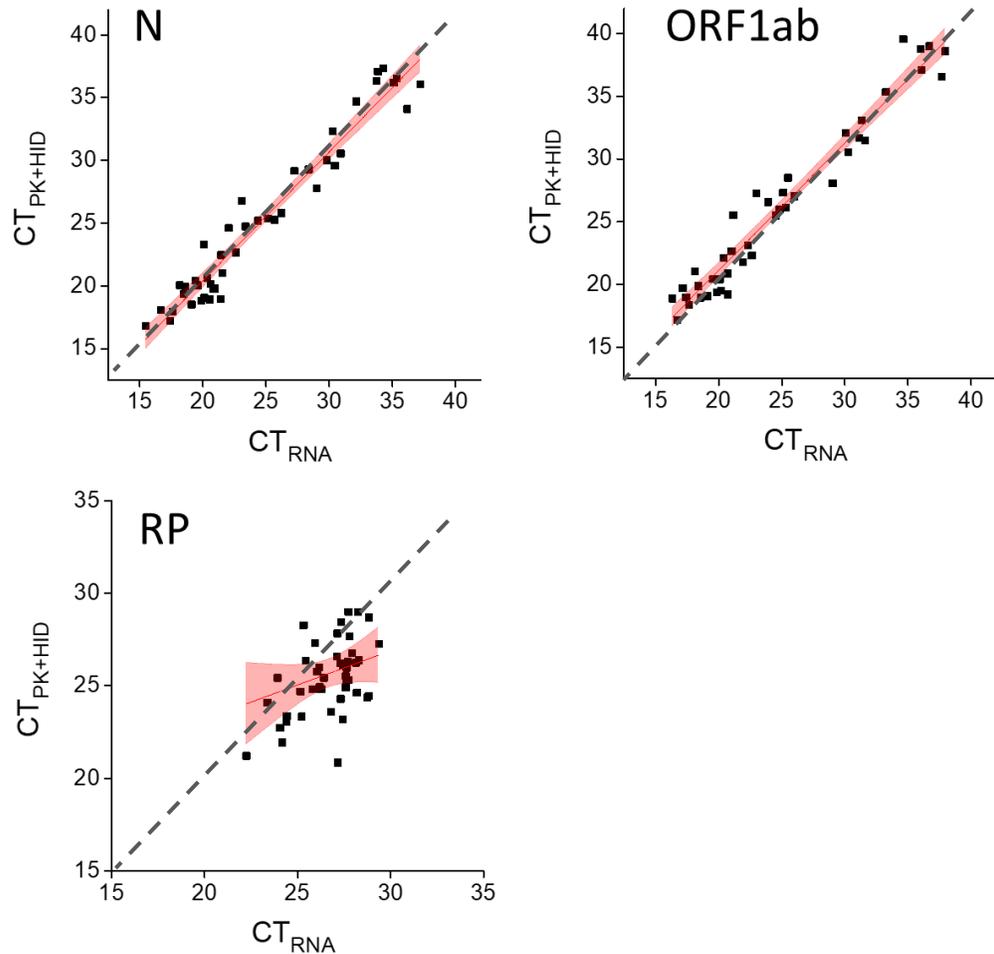


➤ **mayor carga viral** en la muestra → **menor CT**

Detección de N y ORF1ab

- Kit multiplex Discovery (DISCOVERY SARS-CoV-2 RT-PCR Detection Kit)
- Muestras en solución fisiológica (48 muestras positivas y 3 negativas)

a



Para los genes virales, los valores de Ct obtenidos por el método PK+HID correlacionan con los de las muestras de RNA.

pendiente = 1.02 ± 0.04 ; ordenada = 0.1 ± 0.9 (N)

pendiente = 1.02 ± 0.04 ; ordenada = 0.8 ± 0.9 (ORF1ab)

Validaciones: Kit multiplex Genefinder (ensayos “asincrónicos”)

Validación INBIRS (94 muestras)

Sensibilidad	0.92 ± 0.05
Especificidad	0.96 ± 0.04
Exactitud	0.95

Validación Hospital San Juan de Dios (57 muestras)

Sensibilidad	0.94 ± 0.06
Especificidad	1
Exactitud	0.98

Sensibilidad:

Especificidad:

Exactitud:

Los falsos negativos corresponden a hisopados con baja carga viral.

Hay alternativas? Mucha más generosidad y un buen equipo



Jorge Geffner



Federico Remes Lenicov



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS EN RETROVIRUS Y SIDA
ex Centro Nacional de Referencia para el SIDA



Voluntario/as en INBIRS



Paula Verner



Bruno Berardino



Ariel Waisman