



GHID DE PROCEDURI DE RECOLTARE, TRANSPORT SI ARHIVARE A PROBELOR BIOLOGICE IN VEDEREA ANALIZEI GENOMULUI VIRAL.

Probele ce urmează să fie secvențiate sunt de tip ARN viral, iar puritatea și cantitatea optimă ale acestuia ajută la obținerea unui randament optim în ceea ce privește secvențierea, asigurând o calitate extrem de bună a secvențelor obținute. Variabilele care influențează calitatea și cantitatea de ARN sunt următoarele:

- natura probei
- modalitatea de recoltare
- modalitatea de transportare a probei
- modalitatea de arhivare
- tipul de prelucrare precum izolarea ARN-ului,

Toate acestea sunt coroborate cu competențele personalului care execută procedurile.

1. Recoltarea probelor pentru secvențierea genomului SARS-Cov-2

1.1. Scop

Recoltarea probelor biologice în vederea secvențierii este un pas extrem de important și este necesară respectarea normelor de securitate biologică.

1.2. Responsabilități

Recoltarea se realizează de către personalul avizat și instruit în prealabil cu respectarea recomandărilor ghidului „Infection prevention and control during health care when novel coronavirus (nCoV) infection is suspected”.

1.2.1. Echipament de protecție

Personalul medical are obligația de a utiliza toate mijloacele de protecție puse la dispoziție de către laborator. Echipamentul de protecție adecvat (Nivel III) este alcătuit din:

- bonetă chirurgicală de unică folosință
- mască medicală de protecție- N95/N99/FFP2/FFP3
- uniformă de lucru
- uniformă medicală de protecție de unică folosință (halat cu mâneci lungi/combinezon)
- mănuși din latex de unică folosință
- vizieră
- botoși de unică folosință

1.3. Specimenul recoltat

Specimenul recoltat trebuie ales astfel încât să conțină o încărcătură virală cât mai mare și o cantitate cât mai mică de contaminanți (de natură bacteriană sau umană). Astfel, cele mai potrivite probe biologice sunt cele provenite din tractul respirator, precum sputa, exudatul nazo/oro-faringian sau fluidul obținut prin lavaj bronșic. Datorită ușurinței procedurii de recoltare, cât și a cantității și a calității materialului prelevat, cel mai adesea se recoltează probe de exudat nazo/oro-faringian, diminuându-se și disconfortul pacientului.

1.4. Materiale utilizate

În prelevarea probelor de exudat nazo/oro-faringian se folosesc ecuvioane (bețișoare ce conțin la un capăt un tampon de material sintetic-Dacron sau poliester), de diferite dimensiuni, cu tije de plastic, care sunt sterile și de unică folosință. După recoltare, acestea sunt imersate în recoltoarele ce conțin un mediu special de transport, menit să asigure o bună preservare a materialului viral care va fi extras. În cazul LDBM, recoltoarele și ecuvioanele utilizate sunt modelul MF, furnizate de Shenzen Dakewe Bio-engineering Co. și conțin mediu de transport pentru virusuri, Chlamydia și *alte*. Alte exemple de recoltoare sunt Disposable Virus Collection Tube and Transportation, Preservation Media (Novatek, LLC), Viral Transport Media (Precision Medical Devices, Inc.) și altele.

1.5. Metoda de recoltare

1.5.1. Instruirea pacientului

Pacientul este instruit în prealabil cu privire la procedura de recoltare. Este interzis mâncatul, băutul, fumatul sau orice procedură de igienă orală înaintea recoltării. Aceasta se realizează în cazul LDBM între orele 08:00-09:00, personalul medical fiind responsabil de completarea datelor de identificare a participantului la studiu și a consimțământului, în conformitate cu standardele în vigoare în ce privește participarea la studii clinice. Neconcordanțele apărute în etichetarea probelor vor duce la excluderea lor din studiu.

1.5.2. Recoltarea exudatului nazo/oro-faringian

Pacientul este îndrumat să facă cu gâtul în ușoară extensie, iar în momentul recoltării să respire pe gură. Se introduce tamponul printr-o nară de-a lungul planșeului nazal până ce atinge peretele posterior al nazofaringelui, rotind ușor ecuvionul pentru a-l încărca. Pentru a asigura o cantitate suficientă de material biologic, se repetă operațiunea și din cealaltă nară. Pentru exudatul orofaringian se introduce tamponul, evitând atingerea limbii, a obrazilor și a palatului și se recoltează de pe peretele posterior al faringelui și amigdale.

O importanță deosebită o are încăperea în care se realizează recoltarea. Aceasta trebuie să fie una separată de cea de prelucrare a probelor biologice, minimizându-se astfel posibilitatea de contaminare. Se impune sterilizarea acesteia cu radiație UVC și dezinfectarea frecventă a suprafețelor de lucru, pentru a se asigura un mediu de lucru steril, lipsit de contaminanți.

2. Transport

Transportul probelor se realizează în condiții speciale, care să asigure atât integritatea probelor, cât și o temperatură optimă de păstrare a materialului viral. Se utilizează geți frigorifice sau cutii de polistiren, în interiorul cărora se găsesc pinguini sau gheață carbonică. Probele care nu au fost transportate corespunzător vor fi refuzate, datorită labilității ARN-ului viral. Personalul care transportă probele trebuie să fie autorizat datorită riscului biologic pe care îl prezintă probele (probe de tip infecțios) și necesită o instruire riguroasă.

3. Arhivare

Conservarea ARN-ului viral este extrem de importantă pentru obținerea unor date corecte în urma secvențierii. Câteva exemple de bună practică sunt evitarea ciclurilor de congelare/decongelare a ARN-ului extras, minimizarea timpului dintre recoltarea, prelucrarea și secvențierea probelor.

3.1. Probe native

Probele native impun depozitarea în recipientele de recoltare în frigider la temperatura de 4°C. Acestea vor fi stocate timp de 24 de ore de la momentul recoltării, pentru a servi drept probă de rezervă, în cazul în care apar erori în etapele de extracție sau amplificare și este necesară repetarea acestora. După 24 de ore, probele sunt aruncate în cutii speciale destinate deșeurilor biologice cu potențial infecțios,

3.2. Probe ARN

ARN-ul stocat la 4°C pentru mai mult de câteva zile (2-3 zile) nu va fi viabil pentru secvențierea, deoarece ARN-ul se va denatura. Temperatura de -20°C menține ARN-ul viral viabil timp de (5-14 zile). Temperatura la care este cel mai bine preservat este de -80°C, putând fi menținut pentru mai multe luni. O altă modalitate de depozitare îndelungată (mai mulți ani) o reprezintă imersarea probelor în tancuri de azot lichid, ce asigură o temperatură de -180°C.

Multe protocoale de secvențiere includ pași care îmbunătățesc capacitatea de stocare a eșantioanelor, incluzând revers-transcrierea ARN-ului în ADN complementar, sau generarea de ampliconi în urma amplificării PCR. Ampliconii pot fi stocați pentru mai multe luni la temperatura de 4°C, nefiind afectată calitatea secvențierii.

GHID DE PROCEDURI STANDARDIZATE DE IZOLARE, PURIFICARE SI CARACTERIZARE A ARN VIRAL IN VEDEREA ANALIZEI DE SECVENȚIERE.

1. Controale interne

Buna practică impune utilizarea controalelor în cadrul experimentelor, pentru a asigura corectitudinea procedurilor efectuate și pentru a elimina eventualele rezultate fals pozitive și negative.

1.1. Controale Pozitive +

Probele de control pozitive sunt reprezentate de secvențe deja cunoscute și ajută la validarea rezultatelor obținute din analiza probelor de interes. Acestea nu necesită prelucrarea în pașii aferenți secvențierii.

1.2. Controale Negative -

Probele de control negative, cum ar fi apa ultrapură, trebuie să fie întotdeauna incluse în orice secvențiere care conține mai multe probe analizate. Ele trebuie utilizate încă din cel mai incipient stadiu posibil și necesită lucrare în aceeași manieră precum probele de interes. În acest fel, orice contaminare survenită în timpul secvențierii propriu zise din laborator, fie erorile apărute în timpul prelucrării bioinformatică sunt excluse.

2. Izolare, Purificare (Extracție)

Izolarea și purificarea ARN-ului viral sunt etape cruciale în obținerea unor secvențe cât mai bune. Riscul contaminării este foarte ridicat, prin urmare mediul de lucru trebuie să fie cât mai steril. Manipularea probelor se realizează doar în nișă. Acestea sunt vortexate în reprealabil, pentru a se asigura desprinderea specimenului recoltat de pe tampoanele sterile. Mai apoi, sunt prelucrate conform protocolului de extracție detaliat mai jos, utilizându-se extractorul automat Maxwell RSC48 de la Promega, aparat utilizat în cadrul LDBM.

Protocol extracție Maxwell

1. Într-un tub Eppendorf de 1,5 mL se pipetează 20 μ L IEC (internal extraction control), 30 de μ L de Proteinază K și 300 μ L Lysis Buffer.
2. Se vortexează tuburile cu probele recoltate pentru 10 secunde.
3. Se adaugă 300 μ L probă peste amestecul de liză.
4. Se închid tuburile și se vortexează timp de 10 secunde.
5. Se incubează la 56°C pentru 10 minute.
6. Se schimbă mănușile!!!!
7. Se pornește aparatul Maxwell RSC48 apăsând butonul din partea stângă jos aflat în spatele aparatului.
8. Se pornește tableta apăsând lung pe butonul aflat pe partea stângă a marginii superioare a tabletei.

9. Pe ecran vor fi afișate 3 iconițe, se selectează iconita „Maxwell RSC”.
10. Se selectează opțiunea „Start” și programul „Viral Total Nucleic Acid”.
11. În bara de sus se introduce codul de bare al kit-ului utilizat.
12. Se apasă butonul „Proceed”.
13. Aparatul își deschide ușa și tray-ul cu suportul metalic vine în exterior.
14. Se montează cartușele corespunzător (până fac click) pe suportul metalic al aparatului.
15. Se dezlipește folia protectoare de pe fiecare cartuș.
16. Se introduc plungerile în fiecare cartuș în poziția 8.
17. Se plasează câte un tub de eluție pentru fiecare cartuș din suport.
18. Se adaugă 50 μ L de Nuclease Free Water în fiecare tub de eluție.
19. Se pipetează amestecul de liză în godeul 1 (cel mai voluminos) al fiecărui cartuș.
20. Se plasează suportul metalic încărcat cu cartușele pe platforma aparatului și se apasă butonul „Start”.

3. Caracterizare ADN/ARN viral

Caracterizarea și cuantificarea materialului genetic viral extras este o etapă necesară, deoarece ne asigură calitatea materialului extras și ne indică existența unei cantități suficiente de probă pentru a efectua secvențierea. Există două tehnologii larg utilizate pentru caracterizarea și cuantificarea materialului genetic, ce utilizează metoda spectrofotometrică (Nanodrop) și metoda fluorimetrică (Qubit).

Metoda spectrofotometrică (Nanodrop)	Metoda fluorimetrică (Qubit)
Cuantificarea și evaluarea purității ADN, ARN, proteinelor	Cuantificarea ADN, ARN, proteinelor
Volum minim de probă: 0,5 μ L	Volum minim de probă: 1 μ L
Nu necesită kit special pentru determinări (rapid față de Qubit)	Necesită kituri speciale pentru determinări (ADN mono-/bicatenar, ARN, proteine)
Pragul inferior de detecție pentru ADN ~40ng/ μ L	Pragul inferior de detecție pentru ADN ~10pg/ μ L
Permite identificarea etanolului, fenolului în probă (contaminanți)	Nu permite identificarea contaminanților (solvenți organici)
Determinarea este nespecifică pentru ADN monocatenar, bicatenar, ARN, nucleotide (dNTP, NTP)	Determinarea este specifică pentru ADN mono-/bicatenar, ARN, proteine, în funcție de kitul utilizat

În cadrul LDBM se va utiliza metoda fluorometrică, cu ajutorul aparatului Qubit 2.0. Acesta este ușor de folosit, compact, iar datele sunt încărcate pe un USB.

Nanodrop

Metoda spectrofotometrică Nanodrop are ca scop determinarea concentrației și purității acizilor nucleici din probe. Maximul de absorbție al acizilor nucleici se situează la lungimea de undă de 260 nm. Proteinele au două maxime de absorbție în domeniul UV: la 230 nm, datorat absorbției legăturilor peptidice și 280 nm, datorat absorbției aminoacizilor aromatici (Trp, Tyr și Phe). Deși proteinele prezintă o mică absorbție la 260 nm, atât proteinele, cât și acizii nucleici absorb puternic la 280 nm. Astfel, dacă o probă conține acizi nucleici și proteine, va apărea o suprapunere spectrală la 280 nm, datorată prezenței acizilor nucleici și proteinelor în soluție. Astfel, Raportul 260/230 este un indicator al contaminării cu săruri și trebuie să fie peste 2,0.

Raportul 260/280 indică de obicei un eșantion contaminat cu proteine, cu un reactiv precum fenolul sau erori de măsurare. Acesta trebuie să fie între 1,8 și 2,0 - ideal 2,0 pentru ARN pur. Un raport redus A_{260} / A_{280} poate fi cauzat de:

- Fenolul rezidual sau alt reactiv asociat cu protocolul de extracție
- O concentrație foarte mică ($> 10 \text{ ng} / \mu\text{L}$) de acid nucleic

Alți factori care pot influența raportul sunt modificarea pH-ului soluției și eficiența aparatului utilizat în măsurarea absorbanței la lungimile de undă menționate. Concentrația de acid nucleic este măsurată în ng/ul.

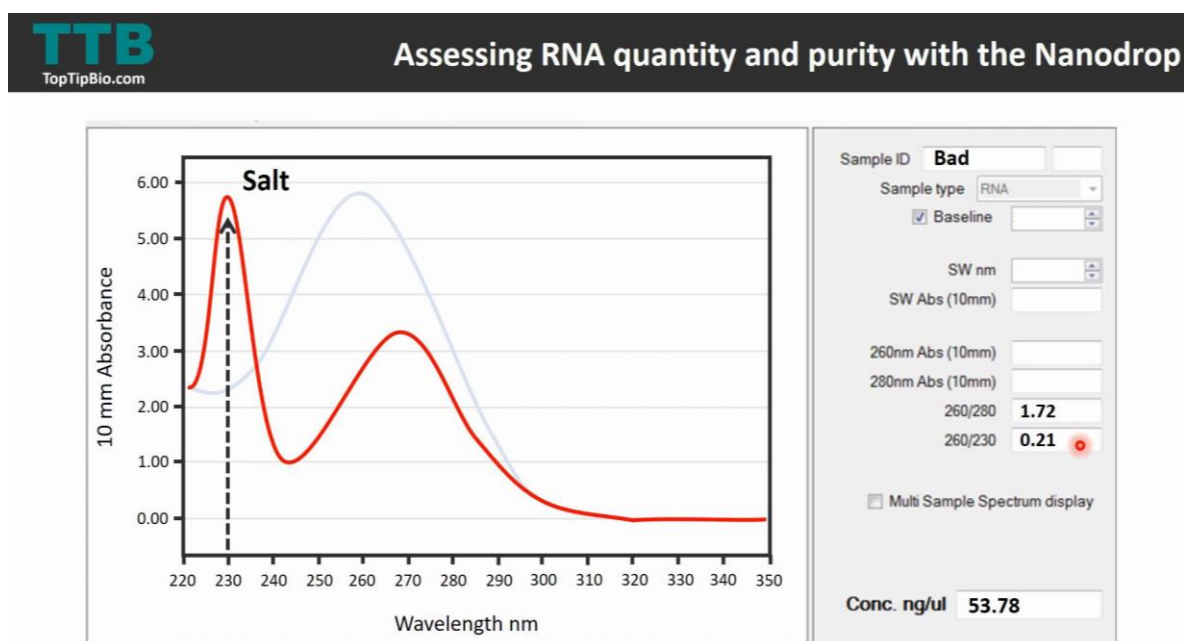


Fig. 1. Cuantificarea ARN-ului - Nanodrop

Qubit

Fluorimetrul Qubit 2.0 este un fluorimetru ideal pentru cuantificarea ADN-ului, ARN-ului și proteinelor și are la bază metode fluorimetrice extrem de sensibile și precise. Acesta utilizează coloranți selectivi pentru ADN, ARN și proteine, minimizând efectele eventualelor contaminanților din proba analizată care ar putea afecta cuantificarea. Cuantificarea acizilor nucleici prin această metodă este mult mai precisă decât spectroscopia UV-VIS deoarece coloranții utilizați sunt se leagă specific de biomoleculele studiate. Pentru cuantificare se vor utiliza următoarele kituri, cu intervalele de concentrații specifice:

- Qubit dsDNA HS Assay Kit (Conc. probă: 10 pg/μL to 100 ng/μL)
- Qubit RNA BR Assay Kit (Conc. probă: 1 ng/μL to 1 μg/μL)
- Qubit RNA HS Assay Kit (Conc. probă: 250 pg/μL și 100 ng/μL)



Protocol Qubit

1. Se pregătesc două tuburi ce vor conține standardele și câte un tub pentru fiecare probă.
2. Se prepară Qubit Working Solution prin diluarea Qubit-reagent în Qubit-buffer în raport de 1:200. Se pregătesc 200 μL de Working Solution pentru fiecare standard și probă.
3. Reactivii se pipetează conform tabelului de mai jos:

	Standard	Probe
Volum Working Solution	190 μL	180-199 μL



Volum Standard	10 μ L	-
Volum Probă	-	1-20 μ L
Total volum/tub	200 μ L	200 μ L

Mențiuni!

Se vor utiliza tuburi de PCR de 0.5 mL, transparente și subțiri, precum Qubit assay tubes sau Axygen PCR-05-C tubes.

4. Se vortexează toate tuburile 2-3 secunde.
5. Se incubează la temperatura camerei 2 minute.
6. Se introduc tuburile pe rând în aparat și se fac măsurătorile.