



SUBDEPARTAMENTO
GENETICA MOLECULAR

Extracción No Automatizada de ácidos nucleicos desde muestras nasofaríngeas sospechosas de COVID-19

1. Objetivo

Extraer ácidos nucleicos, mediante método manual de precipitación con PEG/NaCl, desde muestras clínicas con sospecha COVID-19 de hisopados o aspirados nasal y/o oro-faríngeos para su posterior uso en diagnóstico

2. Fundamento

El siguiente método de extracción fue validado utilizando 104 muestras de hisopado nasofaríngeo, previamente confirmadas mediante rRT-PCR: 94 positivas para SARS-CoV-2 (con diferentes valores de Ct) y 10 negativas para SARS-CoV-2.

Estas muestras fueron sometidas a extracción de ácidos nucleicos mediante 2 métodos: método automatizado NucliSENS easyMag® (BioMérieux) y el método manual de precipitación con PEG/NaCl presentado en este documento.

Para todas las muestras se amplificaron (en duplicado) los fragmentos Orf1ab, N y S (TaqMan 2019-nCoV Assay kit v1, ThermoFisher) y el gen control interno RNasa P (RNP).

Cabe mencionar que las 104 muestras seleccionadas venían contenidas en diferentes medios: UTM-RT transport media (n=35), solución PBS 1x (n=46), medio Hanks (n=13) y DNA/RNA Shield (n=10).

En la Tabla 1 se muestran los valores de Ct obtenidos con ambos métodos de extracción:

	<i>Método Automatizado easyMAG®</i>			<i>Método Manual PEG/NaCl</i>		
	Orf1ab	N	S	Orf1ab	N	S
Mínimo	17.31	13.23	12.79	16.26	14.55	14.51
Máximo	39.12	36.96	38.06	38.33	36.50	34.44
Promedio	28.37	25.12	26.14	29.63	27.74	26.40
Desv. estándar	5.90	5.80	5.64	5.66	4.90	3.78

Tabla 1 – Valores de Ct obtenidos en 94 muestras positivas para SARS-CoV-2, cuyos ácidos nucleicos fueron extraídos mediante método automatizado y método de precipitación manual.

El gen RNP, utilizado como control interno de extracción, amplificó en todas las muestras (positivas y negativas), indicando que el método de extracción es apto.

Por otro lado, las 10 muestras negativas mantuvieron su resultado y no se vieron alteradas por el método de extracción manual.



SUBDEPARTAMENTO
GENETICA MOLECULAR

Extracción No Automatizada de ácidos nucleicos desde muestras nasofaríngeas sospechosas de COVID-19

A continuación, en la Figura 1, se observa la comparación de los Ct obtenidos para cada gen al utilizar ambos métodos:

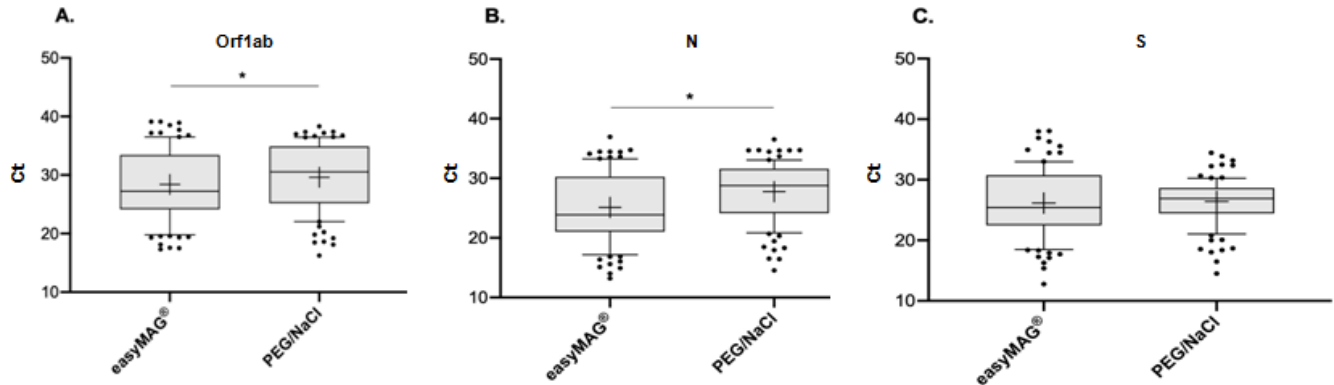


Figura 1 – Comparación de valores de Ct promedio obtenidos al extraer ácidos nucleicos con método automatizado easyMag® y método manual de precipitación PEG/NaCl. A. gen Orf1ab, B. gen N, C. gen S (* $p < 0.0001$). Los valores promedio se indican con el signo “+” dentro de cada caja.

En la Figura 2, se observa la comparación entre los genes Orf1ab, N y S dentro de cada método de extracción:

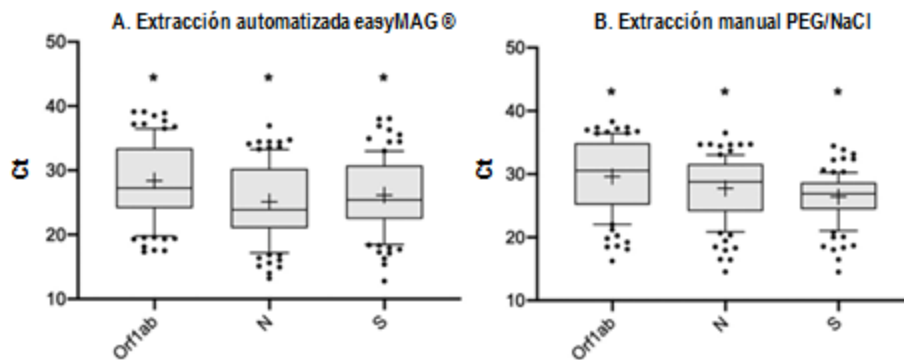


Figura 2 – Comparación de valores de Ct promedio obtenidos para los genes Orf1ab, N y S dentro de cada método de extracción automatizada y manual (* $p < 0.0001$). Los valores promedio se indican con el signo “+” dentro de cada caja.



SUBDEPARTAMENTO
GENETICA MOLECULAR

Extracción No Automatizada de ácidos nucleicos desde muestras nasofaríngeas sospechosas de COVID-19

Con estos datos es posible concluir que:

- ✓ El método manual de extracción PEG/NaCl permite obtener, mediante rRT-PCR, valores equivalentes a aquellos obtenidos utilizando el método de extracción automatizado (sin diferencias estadísticamente significativas).
- ✓ El método manual de extracción PEG/NaCl permite detectar el virus SARS-CoV-2 en muestras con valores de Ct cercanos al límite de detección de la técnica de rRT-PCR (muestras con Ct >39 fueron detectadas con ambos métodos igualmente).
- ✓ El método manual de extracción PEG/NaCl permite detectar SARS-CoV-2 en muestras contenidas en diferentes medios (UTM-RT, PBS, Hanks, DNA/RNA Shield), a diferencia de otros métodos manuales propuestos, donde se observa inhibición de la reacción de rRT-PCR por causa del medio en que está contenida la muestra.

3.2 Descripción de actividades

3. Materiales, insumos y equipos

- Chelex-100 (C7901, Sigma o similar)
- PEG 8000 40% solución (P1458, Sigma o similar)
- NaCl 5M, grado biología molecular (AM9760G, Ambion o similar)
- Agua grado biología molecular, libre de nucleasas
- Tubos de 1,5 mL (DNase, RNase *free*)
- Tubos de 50 mL graduados (DNase, RNase *free*)
- Baño seco para tubos de 1,5 mL
- Etanol al 70%
- Gasa o papel absorbente
- Mascarillas
- Manguillas desechables
- Pecheras desechables
- Micropipetas P200, P1000
- Puntas con filtro 200 µL, 1000 µL
- Gabinete de bioseguridad
- Centrífuga con rotor para tubos de 1,5 mL

3.2.1 Preparación de soluciones

- a. Preparación solución Chelex 20% P/V
 - Dentro de un tubo de 50 mL, pesar 6 g de la resina Chelex
 - Completar con agua libre de nucleasas hasta 30 mL
- b. Preparación solución PEG 20% / NaCl 2,5 M
 - En un tubo de 50 mL, agregar 25 mL de PEG 8000 y 25 mL de NaCl 5M
 - Hacer vórtex para homogeneizar



SUBDEPARTAMENTO
GENETICA MOLECULAR

Extracción No Automatizada de ácidos nucleicos desde muestras nasofaríngeas sospechosas de COVID-19

3.2.2 Preparación de material

Desde esta etapa en adelante, trabajar en gabinete de bioseguridad (puntos 3.1.2 y 3.1.3 completos)

- a. Preparación tubos con Chelex-100 y PEG 20% / NaCl 2,5M
 - Hacer vórtex al tubo con la solución de Chelex 20% P/V para resuspender
 - Utilizando una micropipeta P200, agregar 100 μ L de la solución de Chelex 20% P/V a un tubo de 1,5 mL. Preparar el número de tubos correspondientes al número de muestras a procesar (no trabajar más tubos que la capacidad del rotor de la centrífuga a utilizar). Incluir un tubo extra para control de extracción.
 - Una vez que el Chelex haya decantado al fondo del tubo (1 minuto aprox), retirar el sobrenadante con micropipeta.
 - Añadir 200 μ L de la solución de PEG 20% / NaCl 2,5 M sobre el chelex.
 - Rotular cada tubo con el número de identificación de la muestra. Rotular un tubo como CE (control de extracción), el cual debe ser trabajado al igual que una muestra, para controlar contaminaciones por manipulación durante el proceso.

3.2.3 Procesamiento de las muestras

- b. Carga de muestras

Para la manipulación de tubos con muestras, trabajar siempre en gabinete de bioseguridad.

 - Hacer vórtex por 5 segundos al tubo que contiene la muestra de hisopado.
 - Utilizando una micropipeta P200, tomar 200 μ L desde el tubo con muestra de hisopado y transferir al tubo de 1,5 mL correspondiente a esa muestra (ya rotulado).
 - Si va a cargar más de una muestra, debe limpiar el vástago de la micropipeta con una gasa o papel absorbente empapado en etanol al 70% entre cada muestra.
- c. Inactivación de muestras

Ya que el tubo se encuentra cerrado, esta etapa se puede trabajar fuera del gabinete de bioseguridad.

 - Poner el tubo con muestra en un baño seco previamente ajustado a 70 °C e incubar a 70 °C por 30 minutos.
 - Luego, centrifugar a 13.000 g por 10 minutos.
- d. Concentración de ácidos nucleicos

Para la manipulación de tubos con muestras, trabajar siempre en gabinete de bioseguridad. Cuando el tubo se encuentre cerrado, se puede trabajar fuera del gabinete.

 - Utilizando una micropipeta P200, descartar el sobrenadante de cada tubo.
 - A cada tubo, añadir 600 μ L de etanol al 70%.
 - Centrifugar a 13.500 g por 5 minutos para precipitar los ácidos nucleicos.
 - Inmediatamente después de la centrifugación, descartar el sobrenadante utilizando una micropipeta, cuidando no tocar el fondo del tubo.
 - Dejar secar los tubos en una gradilla durante 2 minutos.
 - Utilizando una micropipeta P200, agregar 50 μ L agua libre de nucleasas, pero sin resuspender (para evitar que se tape la punta con el Chelex).
 - Utilizando una micropipeta P1000, resuspender el precipitado.

Las muestras ya se encuentran aptas para ser utilizadas inmediatamente para diagnóstico mediante rRT-PCR.
Las muestras deben almacenarse a - 70 °C o, en su defecto, a - 20 °C.



SUBDEPARTAMENTO
GENETICA MOLECULAR

Extracción No Automatizada de ácidos nucleicos desde muestras nasofaríngeas sospechosas de COVID-19

4 Anexos

Ulloa S, Bravo C, Parra B, Ramírez E, Acevedo A, Fasce R and Fernández J. A simple method for SARS-CoV-2 detection by rRT-PCR without the use of a commercial RNA extraction kit. *Journal of Virological Methods* 285 (2020) 113960.

<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.113960>