



Extracción de RNA de muestras sospechosas de COVID-19 empleando el kit QIAamp Viral RNA.

Creado: Jun 16, 2021; **Ultima modificación:** Jun 16, 2021 **Versión:** 1.0

La detección y diagnóstico de SARS-CoV-2 depende de la extracción de RNA viral de alta calidad a partir de muestras de hisopado nasofaríngeo (las cuales típicamente contienen altas cargas virales) seguido de la amplificación de ácidos nucleicos virales a través de la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-qPCR) ¹. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha emitido guías de laboratorio destinadas a disminuir el riesgo que el procesamiento de muestras respiratorias de pacientes sospechosos de COVID-19 como parte de sus actividades de diagnóstico o investigación ². Los métodos de extracción de ácidos nucleicos virales (al igual que aquellos empleados para la extracción de otras especies de RNA o DNA) normalmente hacen uso de buffers de lisis celular durante los pasos iniciales del procedimiento, mismo que vuelve efectivamente no-infecciosas a las muestras (paso de inactivación). Todos los pasos de manipulación de muestras sospechosas de COVID-19 deberá realizarse dentro de un gabinete de seguridad biológica clase II tipo A2 certificado y dentro de una área de laboratorio físicamente delimitada, de uso exclusiva para este propósito y capaz de ser sellada (encintada) para propósitos de descontaminación hasta haber realizado la inactivación de las muestras, en área BSL2 con disciplina BSL3 ³. El trabajo con muestras inactivadas puede entonces proceder en áreas BSL2 con disciplina BSL2. El kit de QIAamp Viral RNA (Qiagen Cat número 52906 ⁴) permite la extracción rápida y fácil de RNA viral para su uso en aplicaciones de amplificación de ácidos nucleicos.

Es sumamente importante asegurar que el personal de laboratorio se apege de manera estricta a las prácticas de bioseguridad apropiadas para el trabajo con SARS-CoV-2. Toda manipulación de muestras clínicas de pacientes que llenen la definición de caso sospechoso de COVID-19 al igual que cualquier ensayo de detección de la presencia de SARS-COV-2 deberá ser realizado en laboratorios BSL2 e idealmente por personal entrenado en los aspectos de bioseguridad y métodos moleculares correspondientes a la disciplina BSL3.

Todos los pasos del protocolo de extracción de RNA viral QIAamp deberán realizarse lo más rápido posible y a una temperatura ambiente entre 15 y 25°C. **¡La temperatura del área de Biología Celular deberá programarse a 22°C para este propósito!**

Consideraciones de bioseguridad y equipo de protección personal (EPP)

El procesamiento inicial de las muestras (antes de su inactivación) deberá realizarse en gabinete de seguridad biológica (GSB) clase II tipo A2 certificado.

La descontaminación de superficies, fluidos, plásticos y utensilios deberá hacer uso de desinfectantes con actividad demostrada contra virus envueltos (por ejemplo, hipoclorito de sodio, alcohol, iodo-povidona, cloroxilenol, clorhexidina, cloruro benzalconio).

El trabajo diagnóstico o de investigación no-propagativo, incluyendo PCR, secuenciación y ensayos por amplificación de ácidos nucleicos (NAAT), con especímenes obtenidos de individuos sospechosos de





COVID-19 deberá conducirse de acuerdo con prácticas, procedimientos y disciplina BSL2 en laboratorios acondicionados con infraestructura BSL2. El trabajo diagnóstico o de investigación propagativo (cultivos virales o ensayos de neutralización) con especímenes obtenidos de individuos sospechosos de COVID-19 deberá conducirse de acuerdo con prácticas, procedimientos y disciplina BSL3 en laboratorios acondicionados con infraestructura BSL3.

El personal de laboratorio deberá emplear EPP apropiado para **precauciones de dispersión por salpicaduras** durante la recolección de muestras clínicas de pacientes sospechosos de COVID-19 (como el hisopado nasofaríngeo). Los requerimientos mínimos de EPP para dichas precauciones contra salpicaduras incluyen un **cubrebocas**, **protección ocular** (goggles o careta facial), **guantes** desechables y una **bata de cierre trasero**.

El personal de laboratorio deberá emplear EPP apropiado para **precauciones de dispersión por aerosoles** durante procedimientos con el riesgo de generar aerosoles como el lavado/aspirado nasofaríngeo, recolección de esputo, aspirado traqueal, lavado bronco-alveolar y punción de líquido pleural a partir de pacientes sospechosos de COVID-19. Los requisitos mínimos de este tipo de EPP incluyen **guantes**, **batas/overoles de mangas largas**, protección **muco cutánea** (goggles, careta facial, respirador o PAPRs) y por lo menos **respiradores** N-95 NIOSH aprobados con prueba de ajuste documentada.

Ante cualquier imprevisto o duda respecto a bioseguridad, el personal de laboratorio se deberá apegar a las guías interinas de la CDC más recientes para el trabajo con agentes patógenos del grupo de riesgo 3, especialmente al recolectar muestras de hisopado nasofaríngeo (u otras muestras respiratorias) a partir de pacientes sospechosos de COVID-19 o al muestrear a la población abierta en el caso de muestreo comunitario.

Procedimiento

1. El kit QIAmp Viral RNA se almacena en el área de RT-PCR del Laboratorio de Genómica Viral y Humana.
2. Las muestras de pacientes sospechosos de COVID-19 se deben procesar dentro del área de Biología Celular del Laboratorio de Genómica Viral y Humana.
3. **Mezcle en vortex** durante 30 segundos los tubos cónicos de 15 mL que transportan el hisopo de cada paciente y 1 a 2 mL de medio de transporte viral (VTM).
4. **Transfiera todo el volumen** hacia un microtubo de 1.5 mL previamente etiquetado con el ID de la muestra para su almacenamiento permanente a -80°C (Ultracongelador BSL2 #2 del laboratorio principal).
5. Antes de almacenar la muestra, **transfiera 140 µL** de VTM hacia un microtubo de 1.5 mL previamente etiquetado con el ID de la muestra (en caso de que se vaya a procesar de manera





individual) o **20 µL de la muestra** hacia un microtubo de 1.5 ml previamente etiquetado con el número de pool al que pertenezca la muestra (en caso de que la muestra vaya a ser procesada como parte de un pool de 7 muestras).

NOTA: El volumen final de los pools de muestra deberá ser de 140 µL sin importar el número de muestras (solamente se recomiendan pools de entre 4 y 18 especímenes para la detección de SARS-CoV-2).

6. Prepare suficiente solución de buffer AVL + RNA-acarreador para el número de muestras/pools por procesar. Añada 5.6 µL de **RNA-acarreador** (almacenado en el congelador -20°C del laboratorio principal dentro de una caja de cartón etiquetada como “CMV oligo” ubicada en el panel de la puerta) a 560 µL de **buffer AVL** (almacenado dentro de la caja del kit QIAamp ubicado en el refrigerador del área de RT-PCR del Laboratorio de Genómica Viral y Humana).
7. **Agregue 560 µL de la mezcla buffer AVL + RNA-acarreador** a cada microtubo conteniendo los 140 µL de muestra/pool y mezcle en vortex durante 15 segundos.
8. **Incube** a temperatura ambiente durante 10 minutos, centrifugue a 6000 g durante 30 segundos.
9. **Agregue 560 µL de etanol 96-100%** grado molecular al microtubo y mezcle en vortex durante 15 segundos. Centrifugue a 6000 g durante 30 segundos.
10. **Transfiera 630 µL** de este volumen final a una columna QIAamp, coloque dicha columna en un microtubo de elución (aportado con el kit) y centrifugue a 6000 g durante 1 minuto.
11. **Descarte** el eluyente y el microtubo de elución, transfiera columna a un nuevo microtubo de elución y **agregue otros 630 µL** de la mezcla de muestra con etanol generada en el paso 9 y centrifugue a 6000 g durante 1 minuto.
12. **Descarte** el eluyente y el microtubo de elución. Agregue **500 µL del buffer AW1** (aportado con el kit) y centrifugue a 6000 g durante 1 minuto.
13. **Descarte** el eluyente y el microtubo de elución. Agregue **500 µL del buffer AW2** (aportado con el kit) y centrifugue a **16300 g durante 3 minuto**.
14. **Descarte** el eluyente, pero **mantenga el mismo microtubo de elución**. Vuelva a centrifugar a **16300 g durante 1 minuto**.





15. **Descarte** el eluyente y el microtubo de elución. Transfiera la columna hacia un nuevo microtubo de 1.5 mL pre-etiquetado con el ID de la muestra, agregue **60 µL de buffer AVE** (aportado con el kit) e **incube** a temperatura ambiente por 1 minuto.
16. Centrifugue columna dentro de microtubo de 1.5 mL a **6000 g durante 1 minuto**.
17. Utilice el RNA viral extraído inmediatamente o almacene a -80°C (Ultracongelador BSL2 #2 del laboratorio principal) hasta su uso futuro.

Notas

1. Los buffers AVL y AW1 contienen sales de guanidina, las cuales pueden formar compuestos altamente reactivos al combinarse con hipoclorito de sodio. En caso de derrames, limpie con agua y detergente y posteriormente con hipoclorito de sodio 1% (v/v).
2. El RNA viral puede ser purificado a partir de plasma (tratado con cualquier anticoagulante excepto heparina), suero y otros fluidos corporales libres de células. Las muestras pueden ser frescas como congeladas. Si las muestras han de congelarse, mantenga el número de descongelaciones a un solo ciclo de descongelamiento ya que cada ciclo disminuye los títulos virales y compromete la detección de RNA viral. Adicionalmente, las muestras sometidas a múltiples ciclos de descongelamiento acumulan crioprecipitados que pueden inactivar las membranas de las columnas QIAamp.
3. Todos los pasos del protocolo de extracción de RNA viral QIAamp deberán realizarse lo más rápido posible y a una temperatura ambiente entre 15 y 25°C. **¡La temperatura del área de Biología Celular deberá programarse a 22°C para este propósito!**
4. El kit de extracción de RNA viral QIAamp es capaz de aislar moléculas de RNA mayores a 200 nucleótidos, la recuperación de moléculas de menor tamaño es menos eficiente y no recomendables.
5. Las muestras de hisopados nasofaríngeo son el espécimen biológico estándar para uso en el kit QIAamp Viral RNA. Otros especímenes biológicos pudieran ser compatibles con el kit. Por favor refiérase a la pagina del producto del manufacturado para recibir información actualizada sobre el tipo de materiales compatibles probados por QIAGEN⁴.





Bibliografía

1. Esbin, M. N. *et al.* Overcoming the bottleneck to widespread testing: A rapid review of nucleic acid testing approaches for COVID-19 detection. *RNA* vol. 26 771–783 (2020).
2. *Laboratory biosafety guidance related to coronavirus disease (COVID-19): Interim guidance, 28 January 2021.* <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-WPE-GIH-2021.1> (2021).
3. Pastorino, B. *et al.* Evaluation of chemical protocols for inactivating SARS-CoV-2 infectious samples. *Viruses* **12**, (2020).
4. QIAamp Viral RNA Kits. <https://www.qiagen.com/us/products/diagnostics-and-clinical-research/sample-processing/qiaamp-viral-rna-kits/>.

Historial de revisiones

- 1.0 Documento original.

