

## **Reutilizar, un acto poco trabajado en biología molecular.**

### **Aprendizaje de la pandemia por SARS-CoV-2**

**Rubén D. Duré**

[rdario.dure@gmail.com](mailto:rdario.dure@gmail.com)

Laboratorio Curie SRL

Universidad Católica Nuestra Sra. de Asunción

Asunción-Paraguay

**Sandra B. González**

[sanygonz@hotmail.com](mailto:sanygonz@hotmail.com)

Laboratorio Curie SRL

Asunción-Paraguay

**Ruth N. Zarate**

[ruthpy74@yahoo.es](mailto:ruthpy74@yahoo.es)

Laboratorio Curie SRL

Asunción-Paraguay

**Andrea L. Fernández**

[andrealujanff1006@gmail.com](mailto:andrealujanff1006@gmail.com)

Universidad Católica Nuestra Sra. de Asunción

Asunción-Paraguay

**Yessica L. García**

[yesicagarcia\\_14@hotmail.com](mailto:yesicagarcia_14@hotmail.com)

Universidad Católica Nuestra Sra. de Asunción

Asunción-Paraguay

**María T. Martínez de Filartiga**

[lcurie@tigo.com.py](mailto:lcurie@tigo.com.py)

Laboratorio Curie SRL

Asunción-Paraguay

#### **RESUMEN**

El primer paso para iniciar el análisis molecular de muestras biológicas es la extracción de los ácidos nucleicos. El método de elección más empleado es el de la cromatografía en columnas de sílica debido al alto grado de pureza que se consigue, sumado a la rapidez/simplicidad de la técnica. Por otra parte, es un método costoso que genera residuos plásticos por ser de un solo uso. Considerando esto, planteamos una estrategia para reutilizar las columnas proponiendo un método de inactivación de las columnas previamente utilizadas, y su activación con el propósito de regenerar la matriz de sílica;

a este proceso lo denominamos regeneración de columnas. Hemos conseguido demostrar que la reutilización de las columnas regeneradas es eficaz al no detectarse material amplificable por RT-qPCR tras usar como muestra agua eluida a través de la misma.

El beneficio del método desarrollado se resume en la utilidad y ahorro que se le puede dar a los reactivos y materiales fungibles de laboratorio para realizar tanto diagnósticos clínicos como para investigación en países que se ven limitados en recursos y adquisición de kits para diagnóstico.

**Palabras clave:** columnas de purificación RNA regeneradas; RT-qPCR; SARS-CoV-2; covid-19.

## **Reuse, an act little worked in Molecular Biology. Acquisition of knowledge from the SARS-CoV-2 pandemic**

### **ABSTRACT**

The first step to start the molecular analysis of biological samples is the extraction of nucleic acids. The most widely used method of choice is silica column chromatography due to the high degree of purity achieved, added to the speed/simplicity of the technique. On the other hand, it is an expensive method that generates plastic waste because it is single-use. Considering this, we present a strategy to reuse the columns proposing a method of inactivation of the previously used columns, and their activation with the purpose of regenerating the silica matrix; we call this process column regeneration. We have managed to demonstrate that the reuse of the regenerated columns is effective as no material amplifiable by RT-qPCR is detected after using water eluted through it as a sample.

The benefit of the developed method is summarized in the usefulness and savings that can be given to reagents and consumable laboratory materials to carry out both clinical diagnoses and for research in countries that are limited in resources and acquisition of diagnostic kits.

**Keywords:** regenerated RNA-purification column, RT-qPCR, SARS-CoV-2, covid-19.

Artículo recibido: 05 febrero 2022

Aceptado para publicación: 28 febrero 2022

Correspondencia: [rdario.dure@gmail.com](mailto:rdario.dure@gmail.com)

Conflictos de Interés: Ninguna que declarar

## **1. INTRODUCCIÓN**

En los primeros meses del 2020 se ha declarado pandemia debido a la aparición y rápida propagación del virus SARS-CoV-2 causante del COVID-19 (OMS, WHO, 2020). Los ensayos de diagnósticos han seguido el esquema de cribado según las recomendaciones de la OMS y demostraron ser efectivas para el monitoreo de la propagación del virus. No obstante, los sistemas de atención médica, los hospitales y laboratorios de diagnósticos fueron rápidamente comprometidos, intensificándose en las llamadas olas de contagios. Esta situación ha tenido su impacto en los sistemas de salud y en varias facetas de la sociedad; económica, educacional y social. Como es de esperarse, el impacto fue mucho mayor en aquellos países en vía de desarrollo como el Paraguay, donde estos aspectos ya se encontraban vulnerables incluso en ausencia de la pandemia.

Desde el inicio de la pandemia se han realizado esfuerzos para desarrollar estrategias innovadoras de cribado, detección y diagnósticos de casos COVID-19 (Biswal, Ranjan, Singh Dahiya<sup>1</sup>, Mallick, & Mohapatra, 2021) (Falzone, Gattuso, Tsatsakis, Spandidos, & Libra, 2021) (Grant, Turner, Shin, Nastouli, & Levett, 2020) (Alafeef, Moitra, Dighe, & Pan, 2021) (Mote, y otros, 2021). La metodología estándar para la confirmación de la infección es mediante la técnica de RT-qPCR (OMS, WHO, 2020). Esta técnica requiere de la extracción del material genético (RNA) de la muestra biológica tomada del paciente, la cual consiste en un hisopado nasofaríngeo u orofaríngeo, inmerso generalmente en un medio de transporte viral. Las extracciones son realizadas por lo habitual mediante kits comerciales, donde los componentes del mismo pueden ser utilizados para una extracción manual o con equipos automatizados. Los kits más comunes y ciertamente más económicos son los basados en cromatografía en columnas de sílica, en donde, posterior a la lisis de la muestra, estas son tratadas con un agente de unión del RNA a la membrana de sílica de la columna para ser momentáneamente retenidos o adsorbidos por la matriz de sílica. Seguidamente son realizados unos lavados sucesivos con la finalidad de eliminar las impurezas no deseadas. Como último paso es necesaria la desorción del RNA de la membrana de sílica, lo cual se logra con la incubación de un agente de elución sobre la membrana de sílica.

La disponibilidad de kits de extracción de RNA se ha convertido en una seria limitación para el diagnóstico debido a la escasez impulsada por la demanda mundial, con mayor impacto en países con menor poder adquisitivo, y esto es particularmente más complicado

en un país que carece de la infraestructura para producir localmente kits de extracción de ácidos nucleicos.

Además del alto costo de los kits comerciales, estos son limitados a un solo uso según la recomendación del fabricante. Por otro lado, estos kits generan desechos plásticos que tienen un impacto negativo para el ambiente. Teniendo en cuenta estos factores, varios grupos de trabajo han planteado estrategias para el reciclado de estas columnas, proponiendo protocolos que permitan eliminar remanentes de ácido nucleico en las membranas de sílica, de tal manera a poder ser reutilizada en un siguiente proceso de extracción. Inclusive existen kits comerciales diseñados para este fin, aunque la relación costo/beneficio para la utilización de éstos debe ser analizada antes de optar por esta opción (Biswal, Ranjan, Singh Dahiya<sup>1</sup>, Mallick, & Mohapatra, 2021) (Nicosia, Tagliavia, & Costa, 2010) (Heinz Esser, Marx, & Lisowsky, 2005) (Shi, Lewis, & Panthee, 2018) (Zhou, et al., 2018).

Con el objetivo de proveer una alternativa de extracción de ácidos nucleicos adquiriendo solo el buffer de lisis comercial y reutilizando las columnas de sílica, se evaluaron el uso de etanol absoluto como buffer de unión y etanol diluido como buffer de lavado y un protocolo de regeneración de dichas columnas de sílica para obtener RNA de alta calidad, con reactivos y equipos comunes de un laboratorio.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **A. Prueba de componentes de extracción del RNA**

#### **Muestras**

Fueron seleccionadas muestras de hisopados nasofaríngeos previamente testeados en el laboratorio Curie S.R.L con resultados positivos para SARS-CoV-2 (sin considerar el valor del Ct). Para todas las evaluaciones se utilizaron *pool* de estas muestras positivas.

#### **Extracción de RNA**

Se utilizaron dos kits comerciales para la evaluación de componentes alternativos para la extracción de RNA basados en columnas de sílica: Qiagen (QIAamp DSP Virus spin kit, ref: 61704) y GeneAll (Ribospin vRD ref: 302-103). Se evaluaron los siguientes componentes: buffer de unión y buffer de lavados.

Se siguió el protocolo de cada kit considerando el siguiente esquema:

Cinco extracciones por grupo ensayado.

Ensayos	Componentes				Número de extracciones
	Buffer de lisis	Buffer de unión	Buffer de lavado	Buffer de elución	
<b>Grupo 1</b>	Qiagen Buffer AL	Etanol 100%	W1 W2	Agua DNase free	5
<b>Grupo 2</b>	Qiagen Buffer AL	Etanol 100%	Etanol 70 %	Agua DNase free	5
<b>Grupo 3</b>	Ribospin Buffer VL	RB1	RBW RNW	Agua DNase free	5
<b>Grupo 4</b>	Ribospin Buffer VL	Etanol 100%	Etanol 70 %	Agua DNase free	5

En los grupos 1 y 3 se siguió el protocolo establecido por cada fabricante.

Para los grupos 2 y 4 se ensayaron los componentes propuestos.

### Amplificaciones por RT-qPCR

Las amplificaciones de PCR fueron realizadas en el equipo Rotor-Gene Q de la marca Qiagen. El kit de detección utilizado es de la marca Seegene AllPlex SARS-CoV-2; basada en la amplificación de secuencias de los genes E (envelope), N (nucleocapside), RdRp (RNA dependent RNA polimerase) y S (Spike), además los elementos adicionados para la detección de la secuencia del gen RNAsa P humano utilizado como control endógeno. El programa utilizado fue el siguiente: 50 °C por 20 minutos, 95 °C por 15 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 10 seg y 60 °C por 40 segundos. Con fines prácticos, los análisis de los resultados fueron basados solo en las amplificaciones del gen N y del gen RNAsa P humano. La línea umbral fue establecida al 10 % de la escala de la curva de amplificación en todos los casos.

### B. Regeneración de columnas

#### Elección de muestras

Fueron seleccionadas muestras de hisopados nasofaríngeos previamente testeados en el Laboratorio Curie S.R.L con resultados positivos para SARS-CoV-2. Para todas las evaluaciones se utilizaron *pool* de estas muestras positivas, con valor de Ct inferior a 20. Esto con el fin de obtener una alta concentración de RNA que asegure la saturación

de las columnas, de manera que, en los pasos posteriores la eliminación de RNA en las mismas sea verificable tras el tratamiento al que iban a ser sometidas.

### **Extracción de RNA**

Esta parte del estudio fue realizado únicamente con el kit Ribospin vRD, siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Esto debido a que era el kit que teníamos disponible en ese momento. Un total de 20 extracciones fueron realizadas, a partir de un *pool* de muestras con las características descritas previamente, siendo así 20 las columnas a ser tratadas.

### **Regeneración de las columnas de sílica previa inactivación del RNA residual del SARS -CoV-2 .**

#### ***Protocolo de inactivación de columnas utilizadas:***

- a) Sumergir las columnas en solución de HCl al 2 M y sonicación por 1 hora
- b) Incubación *overnight*
- c) Enjuagar con agua ultrapura esterilizada
- d) Agregar las columnas a tubos de colección
- e) Adicionar 500 uL de agua ultra pura libre de DNAsas y centrifugar a 14.000 rpm por 1 minuto para eliminar restos de HCl. Repetir este paso 3 veces.
- f) Adicionar 500 uL de etanol absoluto a cada columna y centrifugar a 14.000 rpm por 1 minuto
- g) Secar las columnas por centrifugación a máxima velocidad por tres minutos.

Para evaluar la eficacia del protocolo en la inactivación, se colocó un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL a la columna de sílica tratada, se adicionó 50 µL ddH<sub>2</sub>O libre de DNAsas a las columnas e incubó por 1 minuto. Posteriormente fueron centrifugadas a 12.500 rpm por 1 minuto. El eluido obtenido se procesó RT-qPCR como si fuese una muestra.

Para la reutilización de las columnas de sílica inactivadas, en una nueva extracción de RNA, deben ser reactivadas. Para ello se agrega 500 µL de etanol puro, se centrifuga a 14.000 rpm por 1 minuto. Finalmente, se descarta el eluido y se centrifuga por 3 minutos a 14.000 rpm.

### **Eficiencia de la extracción de RNA viral entre columnas regeneradas y columnas nuevas.**

Para evaluar la eficiencia de la extracción de RNA viral a partir de columnas regeneradas

(CR), se realizaron extracciones de RNA por triplicado a partir del *pool* de muestras positivas utilizando 3 columnas del grupo de CR y 3 columnas nuevas (CN). Los RNA extraídos fueron sometidos a una corrida de RT-qPCR específica para SARS-CoV-2, por duplicado.

Al mismo tiempo, con el objetivo de verificar que la efectividad de las columnas no se ve afectada con un segundo tratamiento de inactivación, fueron escogidas otras 3 columnas regeneradas (CR), para luego ser sometidas a un segundo proceso de inactivación. Estas columnas resultantes (CR2) fueron utilizadas para una nueva extracción de RNA del *pool* de muestras. Para evaluar si hubo diferencias significativas entre cada grupo, los valores de Ct fueron sometidos al test de Fisher.

### **Test de Inhibición**

Los procedimientos de extracción de ácido nucleico deben eliminar o reducir considerablemente la cantidad de sustancias inhibidoras que pueden afectar la PCR futura. Para asegurar la extracción, utilizando columnas regeneradas, hay que asegurarse de haber eliminado completamente estos inhibidores. Para ello, se llevó a cabo el método de (Hougs L, 2017) para la evaluación de ausencia de inhibidores.

La calidad del ácido nucleico (ausencia relativa de inhibidores de PCR) puede demostrarse analizando dos réplicas de PCR utilizando cuatro puntos de una dilución en serie de cuatro veces (1:4, 1:16, 1:64 y 1:256) de cada réplica de extracción de ácido nucleico (corridas de inhibición) utilizando el sistema de referencia específico del taxón. El extracto de ácido nucleico se lleva primero a un nivel correspondiente a la concentración de ácido nucleico más alta que se pretende utilizar en el método de PCR posterior, la llamada muestra "sin diluir" (concentración de ácido nucleico de trabajo). A partir de esta primera muestra se prepara una serie de diluciones al cuádruple (de 1:4 al 1:256). Para evaluar la presencia de inhibidores, los valores de Cq de las cuatro muestras diluidas en serie se representan frente al logaritmo del factor de dilución y se calcula una ecuación mediante regresión lineal. El valor Cq de la muestra "sin diluir" extrapolada de la regresión lineal se compara con el Cq medido a partir de la misma muestra. Para aceptar como óptimos los extractos de ácido nucleico se deben cumplir tres condiciones: la pendiente de la línea de regresión debe estar entre -3.6 y -3.1; el coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>) debe ser igual o superior a 0.98; y la diferencia entre el Cq medido y el valor de Cq extrapolado ( $\Delta Cq$ ), inferior a 0.5.



### **C. Evaluación en conjunto de componentes alternativos de la extracción y columnas regeneradas**

#### **Selección y dilución de una muestra**

Tomando como referencia el Ct del gen N, se procedió a la dilución seriada de una muestra con valor de Ct inicial de 15 hasta un valor de 32 (cercano al límite de detección). La dilución fue realizada desde  $1 \times 10^{-1}$  hasta  $1 \times 10^{-5}$  utilizando, como diluyente, el mismo medio de transporte viral. Con este ensayo se ha evaluado la eficacia tanto de las columnas regeneradas así como también de la utilización de etanol absoluto como agente de unión de membrana y etanol al 70% como buffer de lavado.

Para evaluar la eficacia en conjunto, tanto de las columnas regeneradas, así como también de la utilización de etanol absoluto como agente de unión a la membrana y, etanol al 70 % como buffer de lavado., Para evaluar la eficacia en conjunto, tanto de las columnas regeneradas, así como la utilización de etanol absoluto como agente de unión a la membrana y etanol al 70 % como buffer de lavado, se procedió a la preparación de una muestra con valor de Ct para el gen N cercano al límite de detección (35) mediante la dilución seriada de misma (Ct=16, gen N). Las diluciones fueron realizadas con las siguientes proporciones: 1/10, 1/100, 1/100, utilizando el mismo medio de transporte viral como diluyente.

#### **Extracción de RNA**

De la muestra diluída fueron realizadas 10 extracciones siguiendo el protocolo alternativo y utilizando 10 columnas inactivadas y regeneradas. Como control positivo del proceso, se realizó una extracción con el kit Ribospin según descrito por el fabricante utilizando columnas nuevas. Como control negativo del proceso de inactivación se utilizó el eluído de una de las columnas tratadas.

### **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **Parte A. Componentes de extracción de RNA ensayados**

En las siguientes gráficas se presentan las curvas de amplificación para el gen N y gen RNAsa P con sus valores de Ct promedio y desviaciones correspondientes para cada grupo ensayado. Como se puede observar, las amplificaciones del gen N para los grupos 1, 2, 3 y 4 arrojaron valores de Ct promedio de 21.62 ( $\sigma = 0.5$ ), 24.63 ( $\sigma = 0.49$ ), 21.38 ( $\sigma = 0.19$ ) y 22.01 ( $\sigma = 0.2$ ) respectivamente. Las amplificaciones del gen RNAsa P para

el grupo 1, 2, 3 y 4 arrojaron un valor de Ct promedio de 24.52 ( $\sigma = 0.19$ ), 25.24 ( $\sigma = 0.49$ ), 25.42 ( $\sigma = 0.19$ ) y 26.17 ( $\sigma = 0.14$ ) respectivamente.

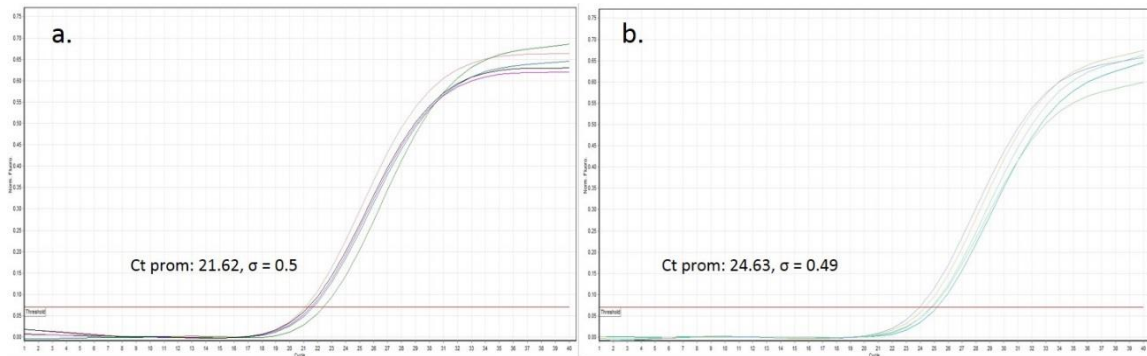


Gráfico 1. Curvas de amplificación del Gen N utilizando el kit de Qiagen. (a) Grupo 1. (b) Grupo 2

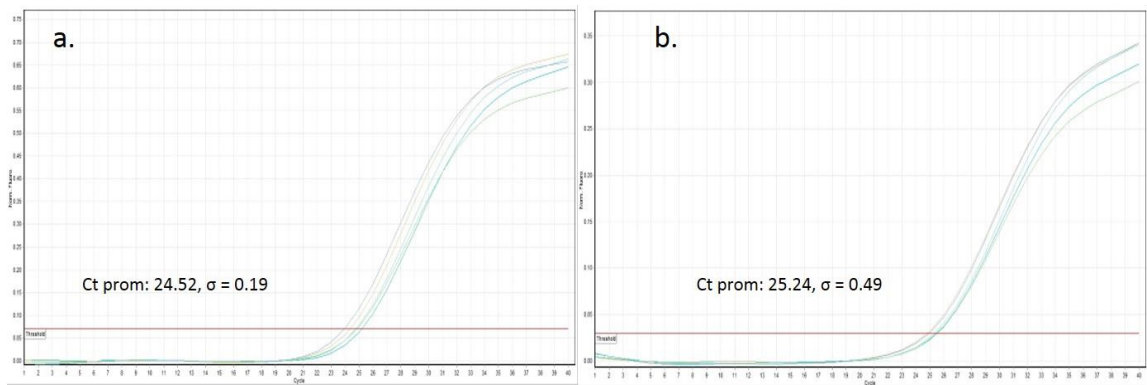


Gráfico 2. Curvas de amplificación del Gen RNAsa P utilizando el kit de Qiagen. (a) Grupo 1. (b) Grupo 2

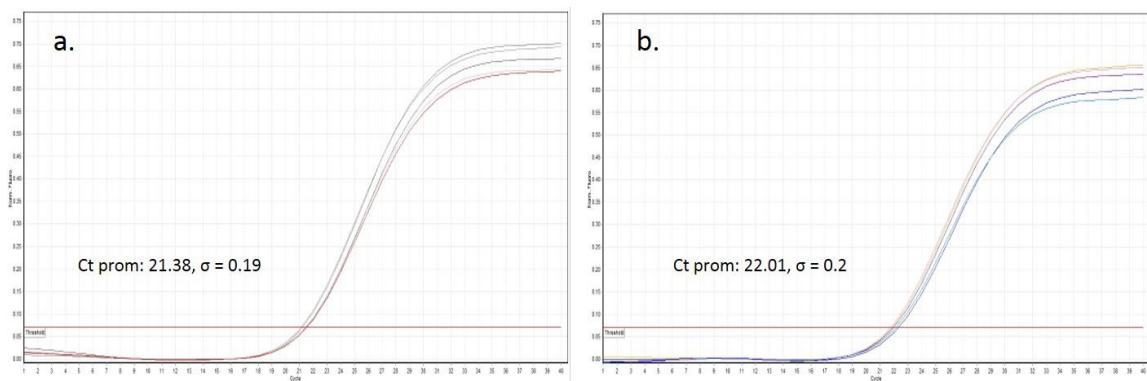


Gráfico 3. Curvas de amplificación del Gen N utilizando el kit de Ribospin. (a) Grupo 3. (b) Grupo 4

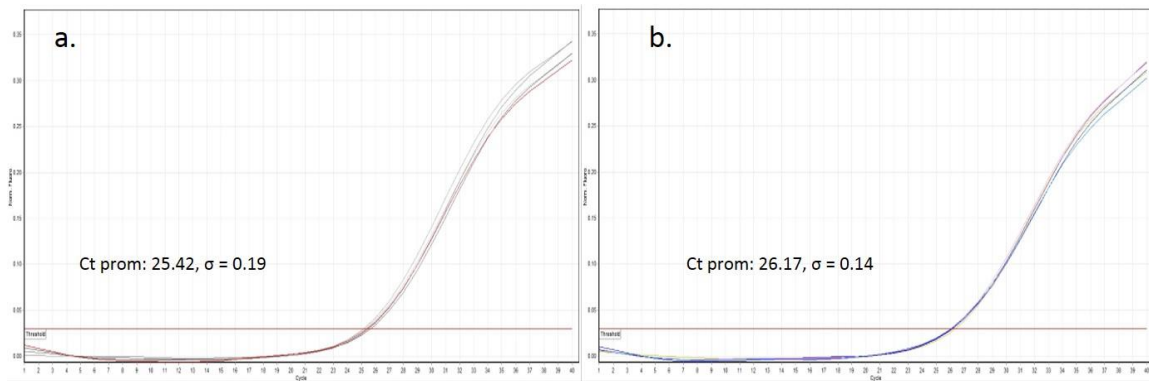


Gráfico 4. Curvas de amplificación del Gen RNAsa P utilizando el kit de Ribospin. (a) Grupo 3. (b) Grupo 4

En el gráfico 5a. se representan las curvas de amplificación, el valor de Ct promedio y la desviación estándar de la secuencia correspondiente al gen N del RNA extraído del *pool* de muestras con valores de Ct menor a 20, usando columnas de sílica nuevas del kit de Ribospin. Comparando con el gráfico de amplificación del eluido de las columnas regeneradas, donde sólo se observa la amplificación del control positivo del kit, 5b.

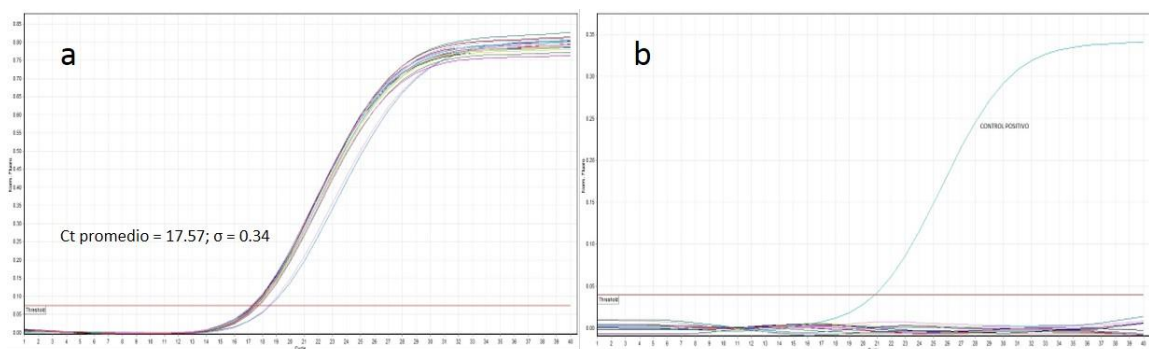


Gráfico 5. Curvas de amplificación del Gen N (a) utilizando del pool de muestras con columnas nuevas. (b) utilizando el eluido luego de regenerar las columnas.

## Parte B.

### *Eficiencia de extracción de RNA viral entre columnas regeneradas y columnas nuevas.*

Los gráficos 6 y 7 comparan las curvas para el gen N y el gen RNAsa P, respectivamente, junto con los valores de Ct promedio obtenidos para cada grupo ensayado. De acuerdo al test de Fisher, se pudo observar diferencias significativas ( $p=0,05$ ) entre los valores de Ct del grupo CN (Ct prom: 18.10,  $\sigma = 0.46$ ) comparando con los del grupo de CR (Ct prom: 18.01,  $\sigma = 0.18$ ) y para CR2 (Ct prom: 17.89,  $\sigma = 0.07$ ), no habiendo diferencias significativas entre los grupos CR y CR2.

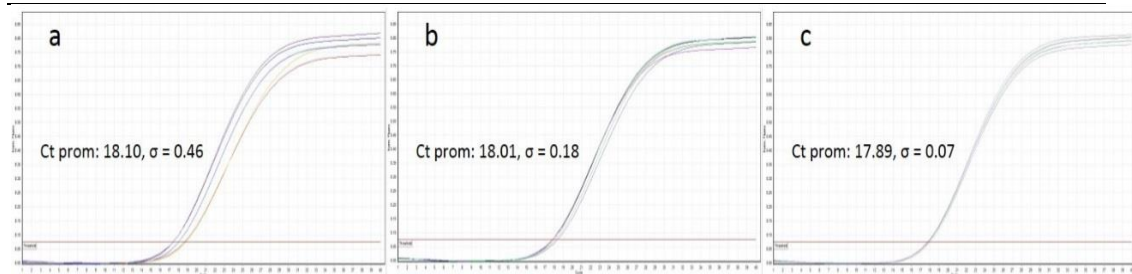
A pesar de esta diferencia significativa con el estadístico evaluado, la diferencia entre los Ct promedio de los tres grupos es menor a 1 Ct, criterio utilizado en PCR, lo que permite decir que en realidad no existe diferencia entre los grupos ensayados. La diferencia

observada con el estadístico de Fisher puede atribuirse a la homogeneización de las condiciones matriciales de las columnas (CR y CR2) al ser tratadas con el protocolo de inactivación respecto a una CN.

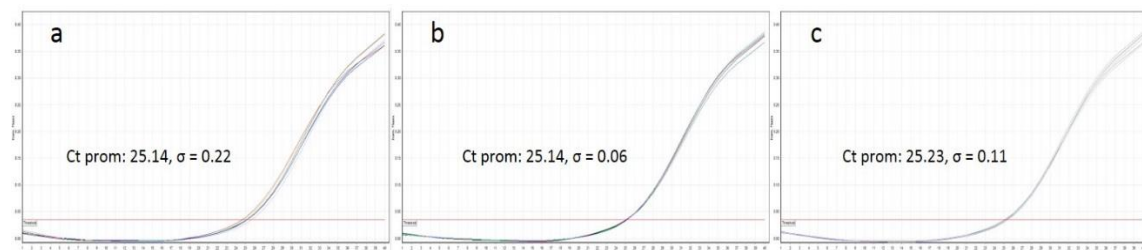
Los valores de los Ct de cada ensayo realizado se reflejan en la tabla suplementaria 1.

**Tabla suplementaria 1.**

Columna1	Ct N CR	Ct N CN	Ct N CR2	Ct RdRp CR	Ct RdRp CN	Ct RdRp CR2
	18.39	18.72	17.83	25.21	24.66	25.12
	18.16	18.86	18.08	25.04	24.96	25.03
	17.8	17.44	17.87	25.09	25.21	25.3
	17.82	17.46	17.85	25.1	25.16	25.28
	17.92	18.05	17.8	25.18	25.67	25.44
	17.94	18.06	17.91	25.22	25.15	25.2
Ct promedio	18.01	18.10	17.89	25.14	25.14	25.23
$\sigma$	0.18	0.46	0.07	0.06	0.22	0.11



**Gráfico 6.** Curvas de amplificación del Gen N del pool de muestras extraídas con (a) con columnas nuevas; (b) columnas tratadas con el protocolo de regeneración; y (c) columnas tratadas con un segundo proceso de regeneración



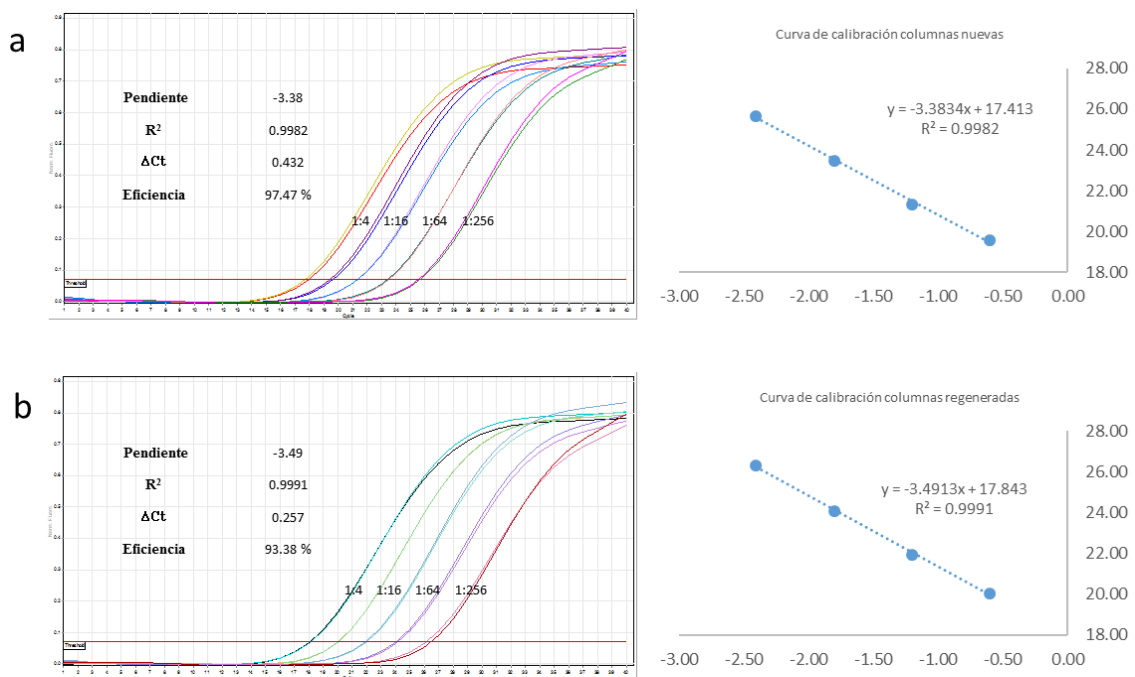
**Gráfico 7.** Curvas de amplificación del Gen RNAsa P del pool de muestras extraídas con (a) con columnas nuevas; (b) columnas tratadas con el protocolo de regeneración; y (c) columnas tratadas con un segundo proceso de regeneración

## Test de Inhibición

Siguiendo el método de (Hougs L, 2017) para la evaluación de ausencia de inhibidores en las CR, hemos obtenido los siguientes resultados.

Primeramente, se determinaron los valores del *pool* de muestra extraída en una columna nueva, para tomarlos como referencia. Como se puede observar en el gráfico 8, se obtuvo unos valores de pendiente de -3,3834 así como una  $R^2 = 0,9982$ , eficiencia del 97,49% y la diferencia entre el Ct teórico con el obtenido en el ensayo es 0,432. Los resultados obtenidos demuestran que todos los parámetros analizados se encuentran dentro de los criterios de aceptación.

En las CR, la pendiente fue de -3,4913, una  $R^2 = 0,9991$ , eficiencia del 93,38% y la diferencia entre el Ct teórico y el obtenido fue de 0,257, éstos parámetros se encuentran dentro del rango de aceptación según los criterios establecidos, por lo que se puede concluir que las columnas no se ven afectadas en la eficiencia de la extracción ni el proceso general de extracción.



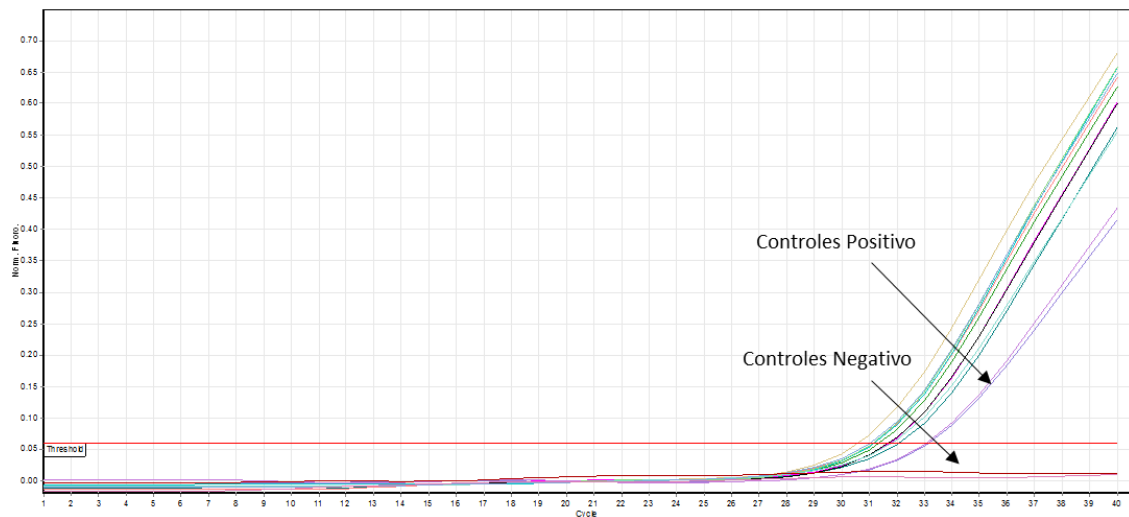
**Gráfico 8. Test de inhibición. (a)** Curvas de amplificación para el gen N de muestra extraída con columna nueva y curva de calibración **(b)** Curvas de amplificación para el gen N de muestra extraída con columna tratada y curva de calibración

La totalidad de las extracciones dieron valores de Ct similares al control positivo, en un rango de 31 y 33. Se puede observar la no amplificación del control negativo, el cual correspondía a la elución de una de las columnas luego del tratamiento de inactivación.

## Parte C.

### *Evaluación en conjunto de componentes alternativos de la extracción y columnas regeneradas*

Como se puede observar en el gráfico 9, todas las extracciones de la muestra diluída amplificaron para el gen N en un rango de Ct de 31 a 33.



**Gráfico 9.** Curvas de amplificación del Gen N de la muestra diluída extraída con columnas tratadas, utilizando etanol absoluto como buffer de unión y etanol al 70 % como buffer de lavado. Todas amplifican con valores de Ct comprendidos entre 31 y 33.

## DISCUSIÓN

La rápida propagación del virus y su alta tasa de transmisibilidad ha forzado a la comunidad científica a nivel mundial a buscar métodos alternativos de tamizaje a modo de poder mantener activo el servicio de diagnóstico y brindar atención oportuna a los casos positivos, sin descuidar la búsqueda activa de contactos asintomáticos que también son importantes focos de diseminación del virus.

Entre las alternativas de detección propuestas están las variantes de los métodos de inactivación por calor a diversas temperaturas (Woldesemayat, y otros, 2022), pero el inconveniente en común es la baja sensibilidad a que llegan estos métodos, dificultando la detección de casos positivos con Ct superiores a 30 (Genoud, y otros, 2021) . Sin embargo, (Claas, y otros, 2021) Claas y colaboradores, propusieron el uso de un buffer de acondicionamiento de muestras que permite la directa realización de la PCR sin pasar por la extracción de RNA. Según este estudio, la variación de Ct es ínfima, pero el costo del buffer a nivel local es elevado incluso considerando que se evitaría la extracción del RNA. En este sentido, la propuesta se hace inviable para países donde la inversión en



salud es ínfima, y obligan a seguir buscando alternativas que no afecten la calidad del servicio y que sean económicamente sustentables. Otros investigadores (Walker AS, 2021) (Vogels, y otros, 2020) (Sampaio Osório & Correia-Neves, 2021) demostraron que es imprescindible contar con técnicas basadas en PCR altamente sensibles que tengan la capacidad de detectar un amplio rango de cargas virales, ya que la misma es muy fluctuante a medida que progresa la pandemia.

Los métodos de extracción de ácidos nucleicos basados en matriz de sílice son considerados uno de los métodos más utilizados en biología molecular por la alta pureza del material obtenido. Si bien cada columna de extracción fabricada posee diferencias técnicas, son comparables desde el punto de vista químico (poseen el mismo componente), por lo cual, el protocolo propuesto es el mismo para ambos kits comerciales ensayados en nuestro trabajo. Incluso, considerando que la lisis celular era diferente en cada kit, en ninguno de ellos este proceso fue modificado. Al comparar los valores promedio de Ct obtenidos tanto para el gen N como para la RNAsa P de las muestras extraídas con el kit de Ribospin y Qiagen, los valores no presentan diferencia significativa. Al comparar los valores de Ct promedio obtenidos para estos genes con los obtenidos con el método propuesto, se observa una diferencia con el kit de Qiagen para el gen N, no así para el gen RNAsa P. La posible causa de esta diferencia puede deberse al espesor de la columna de sílica, que implica mayor densidad de grupos aniónicos en la misma, con lo cual no utilizar un buffer de lavado que contenga sales caotrópicas conlleva a una disminución en la recuperación de los ácidos nucleicos. En tanto que, comparando los resultados obtenidos con el kit de Ribospin, estos no presentan diferencias significativas. La elección de uno u otro método de extracción afectan poco la calidad de RNA, cuando la finalidad de este es la utilización en pruebas de detección por RT-qPCR. No obstante, debería realizarse más pruebas como las fluorométricas que permitan cuantificar el RNA y evaluar en paralelo la calidad e integridad del mismo a fin de estimar su utilidad en otras aplicaciones.

En cuanto a la regeneración de columnas, el método está basado en la publicación de Siddappa et al. (Siddappa, Avinash, Venkatramanan, & Ranga, 2007), con modificaciones citadas anteriormente. La efectividad del método para la eliminación de todo RNA remanente quedó demostrada al no observarse curvas de amplificación de los eluidos post-activación (gráfico 5B) la técnica se considera válida para este fin porque al

utilizar RT-qPCR basado en sondas Taqman es bastante sensible y útil para detectar RNA en mínimas concentraciones.

El resultado de las comparaciones de las amplificaciones obtenidas a partir de muestras extraídas con CR, CR2 y CN, permiten observar diferencia estadísticamente significativa entre las columnas nuevas y las reutilizadas. Sin embargo, teniendo en cuenta los criterios utilizados en análisis de datos de qPCR (diferencia entre los Ct promedio de los grupos es  $< 1$  Ct y desviación estándar  $< a 1$ ), esto permite decir que no existen diferencias entre los tres grupos evaluados (Rao, Manissero, Steele, & Pareja, 2020). Por otra parte, la diferencia estadística observada con el test de Fisher entre las CN y CR+CR2, puede atribuirse a otros factores, como ser la homogeneización de las condiciones matriciales de las columnas (CR y CR2) al ser tratadas con el protocolo de inactivación, que aseguran un proceso uniforme y por ende matrices de sílica más similares entre sí, con lo cual disminuye las variaciones entre ensayos.

Los resultados obtenidos en la evaluación de ausencias de inhibidores demostraron que todos los parámetros analizados se encuentran dentro del rango de aceptación, por lo que se puede decir que la eliminación de inhibidores, utilizando columnas tratadas, es tan eficiente que al aparecer proporciona cualidades similares a las columnas nuevas.

El método de extracción desarrollado y propuesto en este estudio consiste en la utilización de columnas regeneradas junto con el buffer de lisis del kit de Ribospin, alcohol absoluto como buffer de unión y, alcohol al 70 % como buffer de lavado. Además, con este método propuesto los resultados obtenidos respecto al kit comercial no variaron al evaluar una muestra diluida cerca del límite de detección.

Lo propuesto en nuestro trabajo es un modelo simplificado y reproducible sobre todo en situaciones adversas como fueron los meses críticos del inicio de la pandemia. Al mismo tiempo, somos conscientes de que se deben realizar ensayos a mayor escala para comprobar la reproducibilidad de los resultados y sus posibles aplicaciones en otras áreas de biología molecular.

El beneficio del método desarrollado se resume en la utilidad y ahorro que se le puede dar a los reactivos y materiales fungibles de laboratorio para realizar tanto diagnósticos clínicos como para investigación en países que se ven limitados en recursos y adquisición de kits para diagnóstico.



#### 4. CONSIDERACIONES FINALES

NO CORRESPONDE

#### 5. LISTA DE REFERENCIAS

- Zhou, Y., Zhang, , Y., He, W., Wang, J., Peng, F., Huang, L., . . . Deng, W. (2018). Rapid Regeneration and Reuse of Silica Columns from PCR Purification and Gel Extraction Kits. *Scientific Reports*, 1-11.
- Alafeef, M., Moitra, P., Dighe, K., & Pan, D. (2021). RNA-extraction-free nano-amplified colorimetric test for point-of-care clinical diagnosis of COVID-19. *Nature Protocols*, 3141–3162.
- Biswal, J. K., Ranjan, R., Singh Dahiya<sup>1</sup>, S., Mallick, S., & Mohapatra, J. K. (2021). Regenerated silica-based RNA purification columns to address. *Molecular Biology Reports*, 48, 6871–6877.
- Claas, E., Smit, P., Van Bussel, M., Verbakel, H., Taouil, M., Verweij, J., & Thijsen, S. (2021). A two minute liquid based sample preparation for rapid SARS-CoV2 real-time PCR screening: A multicentre evaluation. *Journal of Clinical Virology*, 135, 104-105. doi:10.1016/j.jcv.2020.104720
- Falzone, L., Gattuso, G., Tsatsakis, A., Spandidos, D. A., & Libra, M. (2021). Current and innovative methods for the diagnosis of COVID-19 infection (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 1-20.
- Genoud, V., Stortz, M., Waisman, A., Berardino, B. G., Veneri, P., Dansey, V., . . . Valeria, L. (26 de Febrero de 2021). Extraction-free protocol combining proteinase K and heat inactivation for detection of SARS-CoV-2 by RT-qPCR. *PLOS ONE*. doi:doi.org/10.1371/journal.pone.0247792
- Grant, P. R., Turner, M. A., Shin, G. Y., Nastouli, E., & Levett, L. J. (2020). Extraction-free COVID-19 (SARS-CoV-2) diagnosis by RT-PCR to increase capacity for national testing programmes during a pandemic. *bioRxiv*, 1-6.
- Heinz Esser, K., Marx, W., & Lisowsky, T. (2005). Nucleic acid-free matrix: Regeneration of DNA binding columns. *Biotechniques*, 270 - 271.
- Hougs L, G. F. (2017). *Verification of analytical methods for GMO testing implementing interlaboratory validated methods*. European Union: JRC Science Hub. doi:10.2760/64114

- Mote, R., Laxmikant, S., Bansi, S., Tiwari, M., Singh, H., Srivastava, J., . . . Subramanyam, D. (2021). A cost-effective and efficient approach for generating and assembling reagents for conducting real-time PCR. *Journal of Biosciences*, 1-16.
- Nicosia, A., Tagliavia, M., & Costa, S. (2010). Regeneration of total RNA purification silica-based columns. *Biomedical Chromatografic*, 1263-1264. doi:10.1002/bmc.1418
- OMS. (11 de Marzo de 2020). WHO. Obtenido de <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>
- OMS. (2017 de Enero de 2020). WHO. Obtenido de <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/330861/9789240001237-spa.pdf>
- Rao, S. N., Manissero, D., Steele, V. R., & Pareja, J. (28 de Julio de 2020). A Systematic Review of the Clinical Utility of Cycle Threshold Values in the Context of COVID-19. *Infectious Diseases and Therapy volume*, 573-586. doi:doi.org/10.1007/s40121-020-00324-3
- Sampaio Osório, N., & Correia-Neves, M. (2021). Implication of SARS-CoV-2 evolution in the sensitivity of RT-qPCR diagnostic assays. *The Lancet Infectious Diseases*, 166-167.
- Shi, R., Lewis, R., & Panthee, D. (7 de Diciembre de 2018). Filter paper-based spin column method for cost-efficient DNA or RNA purification. *PLoS ONE*, 1 - 14. doi:10.1371
- Siddappa, N. B., Avinash, A., Venkatramanan, M., & Ranga, U. (2007). Regeneration of commercial nucleic acid extraction columns without the risk of carryover contamination. *Biotechniques*, 186-188. doi:10.2144/000112327
- Vogels, C. B., Brito, A. F., Wyllie, A. L., Fauver, J. R., Kalinich, C. C., Petrone, M. E., & Casanovas-Massana, A. (2020). Analytical sensitivity and efficiency comparisons of SARS-CoV-2 RT-qPCR primer-probe sets. *Nature Microbiology*, 1299-1305.

- Walker AS, P. E. (12 de julio de 2021). *COVID-19 Infection Survey team. Ct threshold values, a proxy for viral load in community SARS-CoV-2 cases, demonstrate wide variation across populations and over time.* doi:10.7554/eLife.64683
- Woldesemayat, B., Gebremicael, G., Zealiyas, A., Sisay, Y., Adane 2, M. Y., Gadissa, G., . . . Desta, K. (2022). Effect of heat inactivation for the detection of severe acute respiratory syndrome-corona virus-2 (SARS-CoV-2) with reverse transcription real time polymerase chain reaction (rRT-PCR): evidence from Ethiopian study. *BMC Infectious diseases.* doi:10.1186/s12879-022-07134-7