



# PROTOCOLO PARA LA DETECCIÓN DE SARS-COV-2 MEDIANTE PRECIPITACIÓN DE ARN Y RT-Q-PCR

# **PROTOCOLO DE TRABAJO**

## **I. Recogida de muestra**

1. La recogida de muestra se realizará con dos torundas con las que se realizarán un frotis nasofaríngeo y un frotis faríngeo, respectivamente.
2. Ambas torundas se introducirán en el tubo colector donde habrá 2 mL de medio de cultivo DMEM, UTM o equivalente.
3. Tras cerrar el tubo este se limpiará externamente con una solución de lejía al 10%.

## **II. Inactivación de la muestra (Tiempo aprox. 15-30 min)**

1. La inactivación de la muestra se llevará a cabo en el interior de la cabina de BS2 situada en el laboratorio con presión negativa o BS3.
2. Antes de introducir el tubo con la/s torundas se volverá a limpiar exteriormente con la solución de lejía 10%.
3. Se agitarán las torundas en el medio cultivo para asegurar la transferencia de la muestra de la torunda al medio.
  4. Una vez en el interior de la cabina se tomará un volumen de 325 µl de muestra que se pasaran a un tubo de 1.5 ml que contenga el mismo volumen de tampón de lisis (buffer (*COBAS omni lysis buffer*, Ref. 06997538190 o *Viral Lysis Buffer*, NZYTech, Ref. MB40801). Volumen final 650 µl.
5. Finalmente se limpiarán de nuevo los tubos con lejía al 10% antes de sacarlos de la cabina.

**Nota:** Para determinar si las muestras pueden ser inactivadas en el punto de recogida, lo que evitaría el triple embalaje de las muestras para su transporte, hemos analizado la opción de preparar el vial de transporte con una mezcla 1:1 del medio de cultivo y el buffer de lisis. Nuestros resultados sugieren que esta opción es viable y preferible.

## **III. Precipitación de RNA (Tiempo aprox. 1h)**

1. Esterilizar la campana de BS2 20 min con luz UV.
2. Centrifugar a 12.000 g durante 10 min a 4°C.
3. Recuperar 600 µl de sobrenadante y transferirlo a un tubo de 1.5 ml que contenga 600 µl de isopropanol con 4µl de glycoblu (Stock: 15mg/ml; Uso: 50µg/ml; Invitrogen #AM9515) frío (mantenido a -20°C).

4. Mezclar por inversión e incubar 10 min en hielo.
5. Centrifugar a 12.000 g durante 10 min a 4°C.
6. Descartar el sobrenadante.
7. Añadir 500 µl de etanol 75% frío (mantenido a -20°C).
8. Centrifugar a 12.000 g durante 5 min a 4°C.
9. Eliminar el etanol y dejar secar el pellet al aire 5-10 min.
10. Resuspender el pellet en 40µl de H<sub>2</sub>O de calidad biología molecular (libre de DNAsas y RNAsas, no tratada con DEPC), calentar a 60°C durante 5 min.
11. Pasar a una placa de 96 pocillos (nomenclatura placa: “fecha-inicialesoperador-PlacaNo”: 090420-DM-P1) poner un adhesivo para taparla y guardar a -80C si no se va a usar inmediatamente. Si se va a proceder directamente al montaje de la Q-PCR, mantener en hielo.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	#1	#9	#17	#25	#33	#41	#49	#57				
B	#2	#10	#18	#26	#34	#42	#50	#58				
C	#3	#11	#19	#27	#35	#43	#51	#59				
D	#4	#12	#20	#28	#36	#44	#52	#60				
E	#5	#13	#21	#29	#37	#45	#53					
F	#6	#14	#22	#30	#38	#46	#54					
G	#7	#15	#23	#31	#39	#47	#55					
H	#8	#16	#24	#32	#40	#48	#56					

#### **IV. Realización de la RT-Q-PCR por TaqMan en placas de 384 pocillos (Tiempo aprox. 3h)**

1. Se utilizará el Master mix para Q-PCR one-step de NZYTech Speedy One-step RT-qPCR Probe Master Mix (2x, NZYTech #MB40503) y las Sondas TaqMan CDC 2019-nCoV RUO Kit (solo las sondas N1, N2 y RNaseP, CDC #225397445).
2. El volumen final de la reacción será de 10µl (8µl mix TaqMan + 2µl muestra RNA) para placas de 384 pocillos. El mix TaqMan se realizará de la siguiente manera (volúmenes por pocillo):
  - 5µl NZY master mix (2x)
  - 0.75 µl sonda
  - 2.25 µl H<sub>2</sub>O libre de DNAsas y RNAsas, no tratada con DEPC

(Nota: En caso de realizar la detección en el termociclador Life Technologies QS5 (Applied) o cualquier otro que requiera ROX, se la añadirán 0.2 uL por pocillo que se descontaran del agua (esto se aplicaría a los cálculos del punto 4).)

3. Además de las muestras a diagnosticar que se testarán en duplicado, se incorporarán los siguientes controles:

- NTC: *Non template* control - TaqMan mix + 2 µl H<sub>2</sub>O (libre de DNAsas y RNAsas, no tratada con DEPC)
- Control negativo (RNA de HeLa o RNA de cualquier cultivo celular humano, no infectado)
- Control positivo: TaqMan mix + 2 µl de 2019-CoV Plásmido Control de CDC (200.000 copias/µl; CDC #225397446).

Diluciones:  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  (4.000 – 40 – 4 copias por pocillo, respectivamente) para ver el límite de sensibilidad de las sondas para cada gen. Las diluciones se realizarán con H<sub>2</sub>O libre de DNAsas y RNAsas, no tratada con DEPC.

4. Diseño y preparación de la placa

- Esterilizar la campana de BS2, 20 min con luz UV
- Para una placa de 60 muestras por duplicado + controles se prepararán tres mezclas, una para cada sonda (N1, N2 y RNaseP) con los siguientes volúmenes:
  - 800 µl TaqMan Mix
  - 120 µl sondas
  - 360 µl H<sub>2</sub>O libre de DNAsas y RNAsas, no tratada con DEPC
- Si se va a pipetear con la multicanal, se pasan las mezclas a tiras de tubos de 8 (160 µl por tubo).
- Se añadirán 8 µl de la mezcla por pocillo.

- Posteriormente, se pipetearán 2µl de la muestra o control por duplicado en los pocillos correspondientes, se tapaná la placa con una tapa adhesiva (óptica compatible con el sistema de Q-PCR) y se centrifugará de nuevo.

	N1								N2								RNaseP							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	#1	#9	#17	#25	#33	#41	#49	#57	#1	#9	#17	#25	#33	#41	#49	#57	#1	#9	#17	#25	#33	#41	#49	#57
B	#1	#9	#17	#25	#33	#41	#49	#57	#1	#9	#17	#25	#33	#41	#49	#57	#1	#9	#17	#25	#33	#41	#49	#57
C	#2	#10	#18	#26	#34	#42	#50	#58	#2	#10	#18	#26	#34	#42	#50	#58	#2	#10	#18	#26	#34	#42	#50	#58
D	#2	#10	#18	#26	#34	#42	#50	#58	#2	#10	#18	#26	#34	#42	#50	#58	#2	#10	#18	#26	#34	#42	#50	#58
E	#3	#11	#19	#27	#35	#43	#51	#59	#3	#11	#19	#27	#35	#43	#51	#59	#3	#11	#19	#27	#35	#43	#51	#59
F	#3	#11	#19	#27	#35	#43	#51	#59	#3	#11	#19	#27	#35	#43	#51	#59	#3	#11	#19	#27	#35	#43	#51	#59
G	#4	#12	#20	#28	#36	#44	#52	#60	#4	#12	#20	#28	#36	#44	#52	#60	#4	#12	#20	#28	#36	#44	#52	#60
H	#4	#12	#20	#28	#36	#44	#52	#60	#4	#12	#20	#28	#36	#44	#52	#60	#4	#12	#20	#28	#36	#44	#52	#60
I	#5	#13	#21	#29	#37	#45	#53	H2O	#5	#13	#21	#29	#37	#45	#53	H2O	#5	#13	#21	#29	#37	#45	#53	H2O
J	#5	#13	#21	#29	#37	#45	#53	H2O	#5	#13	#21	#29	#37	#45	#53	H2O	#5	#13	#21	#29	#37	#45	#53	H2O
K	#6	#14	#22	#30	#38	#46	#54	EXP-5	#6	#14	#22	#30	#38	#46	#54	EXP-5	#6	#14	#22	#30	#38	#46	#54	EXP-5
L	#6	#14	#22	#30	#38	#46	#54	EXP-5	#6	#14	#22	#30	#38	#46	#54	EXP-5	#6	#14	#22	#30	#38	#46	#54	EXP-5
M	#7	#15	#23	#31	#39	#47	#55	EXP-4	#7	#15	#23	#31	#39	#47	#55	EXP-4	#7	#15	#23	#31	#39	#47	#55	EXP-4
N	#7	#15	#23	#31	#39	#47	#55	EXP-4	#7	#15	#23	#31	#39	#47	#55	EXP-4	#7	#15	#23	#31	#39	#47	#55	EXP-4
O	#8	#16	#24	#32	#40	#48	#56	EXP-2	#8	#16	#24	#32	#40	#48	#56	EXP-2	#8	#16	#24	#32	#40	#48	#56	HeLa
P	#8	#16	#24	#32	#40	#48	#56	EXP-2	#8	#16	#24	#32	#40	#48	#56	EXP-2	#8	#16	#24	#32	#40	#48	#56	HeLa

5. Se utilizará el siguiente programa de amplificación en un termociclador BioRad CFX384touch, utilizando el modo de *threshold* automático\*:

Ciclos	Temperatura	Tiempo	Reacción
1	50°C	20 min	Retrotranscripción
1	95°C	3 min	Activación polimerasa
40	95°C	5 sec	Desnaturalización
	55°C	50 sec	hibridación + extensión

(Nota: 55°C es la temperatura recomendada por el CDC para permitir la hibridación en caso de discordancias; <https://www.fda.gov/media/134922/download>)

\* Aunque se ponga el modo de *threshold* y *baseline* automático, se revisarán las curvas antes de exportar los resultados por si existiera mucho *background* que pudiera distorsionar los resultados. Se modificará en caso de que fuera necesario.

#### 6. Exportación de los resultados:

- Siempre enviar los datos de la placa entera, aunque haya pocillos vacíos

- Enviar al grupo de análisis por email los siguientes archivos:

1. El propio del software (\*.pcrd)
2. Tabla con valores Ct (Excel y csv)

### **V. Análisis de los resultados (criterios)**

Este protocolo resume los criterios para interpretar los resultados de los controles y las muestras clínicas incluidas en el experimento de diagnóstico de COVID-19. Este criterio se ha adoptado durante la Fase 1 y se ha modificado de acuerdo con el protocolo publicado por el CDC.

**Muestras:** 60 muestras extraídas con el protocolo de precipitación por isopropanol.

**Sondas:** N1, N2, RNaseP

#### **Controles:**

- *NTC:* H<sub>2</sub>O (libre de DNAsas y RNAsas, no tratada con DEPC)

-*Control Negativo:* HeLa RNA (o RNA de cualquier cultivo celular humano, no infectado)

-*Control Positivo:* 2019-CoV Plásmido Control del CDC (200.000 copias/μl). Diluciones: 10<sup>-2</sup> (en torno a las 1.000 que recomienda el CDC), 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup> (diluciones cerca del nuestro límite de detección (4.000 – 40 - 4 copias)

#### **Control de Calidad:**

-NTC (H<sub>2</sub>O) debe ser negativo para los 3 ensayos

-Todas las muestras clínicas y los controles negativos deben amplificar RNaseP a Ct <35

-El control positivo debe amplificar para los ensayos N1 y N2 para todas las diluciones (10<sup>-2</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>).

### **INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:**

-Se utilizará como control para validar la integridad de la muestra el gen RNPase

-En caso de que RNPase salga a más de 35 ciclos (o indeterminada) **rehacer con SYBR.**

-Se considerarán **positivas** aquellas muestras que siendo positivas para RNPase (menos de 35 ciclos) tienen más de 4 copias en N1, en N2 o en ambos.,

-Se consideran **negativas** aquellas muestras con más de 40 ciclos para ambos N1 y N2 (y RNPase con menos de 35 ciclos).

-Se consideran **dudosas** aquellas muestras con menos de 4 copias para ambos N1 y N2 (pero menos de 40 ciclos). Igualmente se considerarán **dudosas**, aquellas muestras en las que las réplicas técnicas sean incongruentes (una réplica con más de 4 copias, y la otra negativa ( $Ct > 40$ )). En este caso, y si tras la revisión de las curvas de amplificación no fuera posible descartar un artefacto técnico, se procesarán las muestras con el método SYBR descrito en el apartado VI.

## **VI. Validación de muestras dudosas por RT-Q-PCR por SYBR (Tiempo aprox. 3h)**

Los casos dudosos se repetirán con SYBR Green, y el juego de cebadores del artículo de Won *et al* 2020.

1. Se utilizará el Master Mix para NZYSpeedy One-step RT-qPCR Green Kit (NZYTech #MB34602) y los cebadores de Won *et al* 2020 (N1, S1, RdRP y RPP30):

Especie	Gen diana	Nombre cebador	Cebador Forward (5'-3')	Cebador Reverse (5'-3')
SARS-CoV-2	RdRP	SARS-CoV-2_IBS_RdRP1	CATGTGTGGCGTTCACTAT	TGCATTAACATTGGCCGTGA
	S	SARS-CoV-2_IBS_S1	CTACATGCACCAGCAACTGT	CACCTGTGCCTGTAAACCA
	N	SARS-CoV-2_IBS_N1	CAATGCTGCAATCGTGCTAC	GTTGCGACTACGTGATGAGG
Humano	RPP30	IBS_RPP30	CTATTAATGTGGCGATTGACCGA	TGAGGGCACTGGAAATTGTAT

2. El volumen final de la reacción será de 10µl (8µl mix SYBR Green+ 2µl muestra RNA) para placas de 384 pocillos. La mezcla se realizará de la siguiente manera (volúmenes por pocillo):

- 5 µL SYBR Green Master Mix (2x)
- 1 µl mix cebadores directo y reverso (5µM)
- 0.4 µl NZYRT mix
- 1.6 µl de H<sub>2</sub>O libre de DNAsas y RNAsas, no tratada con DEPC

En el caso de que el termociclador necesite ROX se añadirán 0.2 µL de ROX por reacción que se descontará del agua que pasaría a ser 1.4 µl.

- Se añadirán 8 µl de la mezcla por pocillo.
- Posteriormente, se pipetearán 2µl de la muestra o control por duplicado en los pocillos correspondientes, se tapaná la placa con una tapa adhesiva (óptica compatible con el sistema de Q-PCR) y se centrifugará de nuevo.

Nota: en caso de utilizar placas de 96, se realizará la reacción en un volumen final de 15 µl de la siguiente manera (volúmenes por pocillo):

7.5 µL SYBR Green Master Mix (2x)

1.5 µl mix cebadores directo y reverso (5µM)

0.6 µl NZYRT mix

3.4 µl de H<sub>2</sub>O libre de DNAsas y RNAsas, no tratada con DEPC

3. Se utilizará el siguiente programa de amplificación Life Technologies QS5 (Applied), utilizando el modo de *threshold* automático:

Ciclos	Temperatura	Tiempo	Reacción
1	50°C	20 min	Retrotranscripción
1	95°C	3 min	Activación polimerasa
40	95°C	5 sec	Desnaturalización
	60°C	50 sec	Hibridación + extensión

4. Además de las muestras a diagnosticar que se testarán en duplicado, se incorporarán los siguientes controles:

NTC: *Non template control* - SYBR mix + 2 µl H<sub>2</sub>O (libre de DNAsas y RNAsas, no tratada con DEPC)

- Control negativo (RNA de HeLa o RNA de cualquier cultivo celular humano, no infectado)

Control positivo: 2019-CoV Plásmido Control de CDC (200.000 copias/µl). Diluciones: 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup> (4.000–400- 40 - 4 copias) para ver el límite de sensibilidad de los cebadores para cada gen. Las diluciones se realizarán con H<sub>2</sub>O libre de DNAsas y RNAsas, no tratada con DEPC.

5. Exportación de los resultados:

- Siempre enviar los datos de la placa entera, aunque haya pocillos vacíos

- Enviar al grupo de análisis por email los siguientes archivos:

1. El propio del software (\*.pcrd)

2. Tabla con valores Ct (Excel y csv)

### **INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:**

-Se analizarán los genes virales N, S y RdpP.

-Se utilizará como control para validar la integridad de la muestra el gen humano RPP30.

-Se considerarán **positivas** aquellas muestras en las que amplifiquen al menos dos de los tres genes virales y el gen RPP30 amplifique con menos de 35 ciclos.

-Se consideran **negativas** aquellas muestras en las que no amplifique ninguno de los tres genes (Ct>40) y el gen RPP30 amplifique con menos de 35 ciclos.

-Se considerarán **indeterminadas** aquellas que no pasen los criterios para ser definidas como negativas o positivas. Se recomendará **la toma de una segunda muestra** al cabo de unos pocos días.

-En caso de que RPP30 amplifique con más de 35 ciclos (o no amplifique; Ct>40) se **REPETIRÁ la** toma de la muestra, ya que se considera de calidad insuficiente para el análisis

- NOTA: De manera simultánea al análisis de Cts, se analizarán las curvas de temperatura de *desnaturalización (melting curves)* para determinar si hay un solo producto de amplificación o si existen amplificaciones inespecíficas. Se tendrá en cuenta a la hora de determinar positividad e indeterminación.