



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Lia Ayumi Umezawa

**Avaliação da carga viral do SARS-CoV-2 em swab
nasofaríngeo conservado em etanol 70%**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para a obtenção do título de Mestre(a) em Pesquisa e Desenvolvimento (Biotecnologia Médica).

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Rejane Maria Tommasini Grotto

**Botucatu
2022**

Lia Ayumi Umezawa

Avaliação da carga viral do SARS-CoV-2 em
swab nasofaríngeo conservado em etanol 70%

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para a obtenção do título de
Mestre(a) em Pesquisa e Desenvolvimento
(Biotecnologia Médica).

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Rejane Maria
Tommasini Grotto

Botucatu
2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Umezawa, Lia Ayumi.

Avaliação da carga viral do SARS-CoV-2 em swab
nasofaríngeo conservado em etanol 70% / Lia Ayumi Umezawa.
- Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de
Botucatu

Orientador: Rejane Maria Tommasini Grotto
Capes: 90400003

1. COVID-19. 2. SARS-CoV-2. 3. Carga viral. 4. Teste
para COVID-19. 5. Etanol.

Palavras-chave: COVID-19; Carga Viral; Etanol 70%;
SARS-CoV-2; Swab nasofaríngeo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à Deus, por ouvir as minhas orações e permitir que eu chegasse até aqui.

Agradeço aos meus pais, à minha irmã e meus avós pelo apoio incondicional, pela torcida em todas as etapas da minha vida profissional. Por acreditarem na minha capacidade, mesmo quando nem eu mesmo acreditava.

Agradeço à minha orientadora Rejane Maria Tommasini Grotto pelos ensinamentos e paciência, aos funcionários da rotina da Biologia Molecular (Maércio, Regina e Gabriela), do LBA, da pesquisa (Fabiana, Leonardo e Flávia) e todos que diretamente ou indiretamente me ajudaram nas etapas de construção desse trabalho e torceram por mim.

Não foi fácil chegar até aqui, uma pandemia que nos tirou o lazer, o convívio social, nos trouxe medo e insegurança do futuro. Pensei em desistir, mas a terapia e amigos próximos não permitiram que eu desistisse, mesmo em meio ao caos emocional.

“Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada. Apenas dê o primeiro passo.”

Martin Luther King

RESUMO

O SARS-CoV-2 (Síndrome Respiratória Aguda Severa Coronavírus 2), agente etiológico da COVID-19 (Doença Coronavírus 2019), é um vírus de grande relevância em saúde pública devido aos impactos ocasionados no mundo durante a pandemia, com danos sanitários, sociais e econômicos. A detecção de seu RNA por RT-qPCR em amostras de swab nasofaríngeo conservadas em solução fisiológica é considerada o padrão ouro para o diagnóstico da doença e, se tornou de grande importância no manejo da pandemia e no controle da disseminação do vírus. Durante a pandemia um dos grandes problemas enfrentados por muitos serviços de saúde foi o armazenamento das amostras, as quais precisavam ser mantidas de 2 a 8°C até o processamento das mesmas, o que deveria ocorrer em no máximo 72 horas devido à degradação do RNA. Se o material não fosse processado nesse período o mesmo deveria ser armazenado a -80°C para preservação do RNA, o que cria um outro problema de gestão pois a maioria dos serviços não dispõe de tal equipamento. Opções conhecidas para conservar o material viral são o etanol 70%, o TRIzol™ e o Beta-mercaptoetanol adicionados à solução fisiológica na qual o material biológico é coletado. Neste cenário, a finalidade do presente estudo foi avaliar comparativamente a carga viral do SARS-CoV-2 em Swab nasofaríngeo conservado em etanol 70% e em solução fisiológica em diferentes temperaturas de armazenamento e intervalos de tempo a fim de fornecer subsídios aos gestores de sistemas de saúde para tomada de decisões estratégicas no contexto de transporte e armazenamento de amostras. Secreção naso e orofaríngeas foram submetidas à diferentes condições de temperatura e, diferentes soluções preservantes de RNA. Seguiu-se a extração de RNA viral automatizada utilizando metodologia baseada em beads magnéticas. A Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-qPCR) foi realizada utilizando o kit Gene Finder™ 2019-nCoV Assay. Os resultados mostraram que o armazenamento das

amostras ao longo de 12 dias em solução fisiológica à temperatura ambiente não causou nenhum impacto na quantificação viral, mas prejudicou a eficiência na amplificação do controle interno. Isso não foi observado quando o armazenamento foi realizado em 2 a 8°C ou pela adição de etanol 70% na amostra. Os resultados mostraram também que o TRIzol™ e o Beta-mercaptoetanol atuaram de forma a proteger as partículas virais em decorrência de congelamento e descongelamento sucessivos. Sabendo que o transporte e o armazenamento das amostras podem influenciar na detecção do SARS-CoV-2, podemos concluir que os resultados encontrados poderão contribuir na otimização desta logística em locais onde estes aspectos são comprometidos por diversos motivos.

Palavras-chave: COVID-19; SARS-CoV-2; Carga Viral; Swab nasofaríngeo; Etanol 70%; Solução Fisiológica.

ABSTRACT

SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2), the etiological agent of COVID-19 (Coronavirus Disease 2019), is a virus of great importance in public health due to the impacts caused in the world during the pandemic, with health damage, social and economic. The detection of its RNA by RT-qPCR in nasopharyngeal swab samples preserved in saline solution is considered the gold standard for the diagnosis of the disease and has become of great importance in the management of the pandemic and in the control of the spread of the virus. During the pandemic, one of the major problems faced by many health services was the storage of samples, which had to be kept at 2 to 8°C until processing, which should take place within a maximum of 72 hours due to RNA degradation. If the material was not processed during this period, it would have to be stored at -80°C for RNA preservation, which creates another management problem as most services do not have such equipment. Known options for conserving viral material are 70% ethanol, TRIzol™ and Beta-mercaptoethanol added to the saline solution in which the biological material is collected. In this scenario, the purpose of the present study was to comparatively evaluate the viral load of SARS-CoV-2 in nasopharyngeal swab conserved in 70% ethanol and in saline solution at different storage temperatures and time intervals in order to provide subsidies to managers of delivery systems. health for making strategic decisions in the context of transport and storage of samples. Naso and oropharyngeal secretions were subjected to different temperature conditions and different RNA preservative solutions. Automated viral RNA extraction using a methodology based on magnetic beads followed. Real-time Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) was performed using the Gene Finder™ 2019-nCoV Assay kit. The results showed that the storage of the samples over 12 days in saline solution at room temperature did not have any impact on viral quantification, but it impaired the efficiency in the amplification of the internal control. This was not observed when storage was

performed at 2 to 8°C or by adding 70% ethanol to the sample. The results also showed that TRIzol™ and Beta-mercaptoethanol acted to protect viral particles from successive freezing and thawing. Knowing that the transport and storage of samples can influence the detection of SARS-CoV-2, we can conclude that the results found may contribute to the optimization of this logistics in places where these aspects are compromised for several reasons.

Keywords: COVID-19; SARS-CoV-2; Viral load; Nasopharyngeal Swab; 70% Ethanol; Physiological solution.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura do SARS-CoV-2.....	15
Figura 2: Esquema representativo do genoma do SARS-CoV-2.....	17
Figura 3: Esquema representativo da replicação do SARS-CoV-2	18
Figura 4: Esquema ilustrativo do experimento realizado com etanol 70% e solução fisiológica	24
Figura 5: Esquema ilustrativo do experimento realizado com TRIzol™ e Beta-mercaptoetanol.	27
Figura 6: Curva que correlaciona CT e quantificação do RNA do SARS-CoV-2 (Log) para amostras de concentrações conhecidas extraídas utilizando o protocolo in house com solidphase reversible immobilization - SPRI.....	29
Figura 7: Curva que correlaciona CT e quantificação do RNA do SARS-CoV-2 (Log) para amostras de concentrações conhecidas extraídas utilizando o protocolo automatizado com o EXTRACTA KIT FAST – DNA e RNA Viral MVXA-P096 FAST.....	30
Figura 8: Curva que correlaciona CT e quantificação do RNA do SARS-CoV-2 (Log) para amostras de concentrações conhecidas extraídas utilizando o protocolo Beta-Mercaptoetanol e TRIzol™ seguido da extração baseado em sílica utilizando o kit Bio Gene Extração de DNA	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Representação dos tubos do experimento com TRIzol™ e Beta-Mercaptoetanol.....	26
Tabela 2: Carga viral para amostras armazenadas em salina fisiológica por até 12 dias em temperatura ambiente em diferentes intervalos de CT. ...	31
Tabela 3: Carga viral para amostras conservadas em salina, com CT menor que 20, armazenadas por até 12 dias em temperatura ambiente e de geladeira (2-8°C).....	32
Tabela 4: Carga viral para amostras conservadas em salina, com CT entre 20 e 30, armazenadas por até 12 dias em temperatura ambiente e de geladeira (2-8°C).....	32
Tabela 5: Carga viral para amostras conservadas em salina, com CT maior que 30, armazenadas por até 12 dias em temperatura ambiente e de geladeira (2-8°C).....	32
Tabela 6: Carga viral para amostras conservadas em etanol, com CT menor que 20, armazenadas por até 12 dias em temperatura ambiente e de geladeira (2-8°C).....	33
Tabela 7: Carga viral para amostras conservadas em etanol, com CT entre 20 e 30, armazenadas por até 12 dias em temperatura ambiente e de geladeira (2-8°C).....	34
Tabela 8: Carga viral para amostras conservadas em etanol, com CT maior que 30, armazenadas por até 12 dias em temperatura ambiente e de geladeira (2-8°C).....	34
Tabela 9: Carga viral para amostras conservadas em salina, armazenadas por até 12 dias em temperatura ambiente em diferentes intervalos de CT, para método de extração “ <i>In house</i> ”	35
Tabela 10: Carga viral para amostras conservadas em salina, com CT menor que 20, armazenadas por até 12 dias em temperatura ambiente para métodos de extração Loccus e “ <i>In house</i> ”	36
Tabela 11: Carga viral para amostras conservadas em salina, com CT entre	

20-30, armazenadas por até 12 dias em temperatura ambiente para métodos de extração Loccus e “ <i>In house</i> ”	36
Tabela 12: Carga viral para amostras conservadas em salina, com CT maior que 30, armazenadas por até 12 dias em temperatura ambiente para métodos de extração Loccus e “ <i>In house</i> ”	36
Tabela 13: CTs do controle interno para amostras conservadas em salina e etanol, em temperatura ambiente ou de geladeira, para CTs do gene E (viral) menor que 20, armazenadas por até 12 dias. Método de extração comercial	38
Tabela 14: CTs do controle interno para amostras conservadas em salina e etanol, em temperatura ambiente ou de geladeira, para CTs do gene E (viral) entre 20-30, armazenadas por até 12 dias. Método de extração comercial	38
Tabela 15: CTs do controle interno para amostras conservadas em salina e etanol, em temperatura ambiente ou de geladeira, para CTs do gene E (viral) maior que 30, armazenadas por até 12 dias. Método de extração comercial	39
Tabela 16: Carga viral do SARS-CoV-2 obtida após descongelamento das amostras por até 4 vezes, conservadas em solução salina 0,9% e em trizol e beta-mercaptoetanol	40

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

+ssRNA	RNA de polaridade positiva
ACE2	Enzima Conversora de Angiotensina 2
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CLIA	Quimioluminescência
COVID-19	Doença Coronavírus 2019
CT	Cycle Threshold
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
E	Envelope
ECLIA	Eletroquimioluminescência
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
M	Membrana
N	Nucleocapsídeo
NB2	Nível de Biossegurança 2
Nsp	Proteína não estrutural
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORFs	Quadro de leitura aberta
PBS	Phosphate Buffered Saline
PP1a	Poliproteína 1a
PP1ab	Poliproteína 1ab
RdRp	RNA polimerase dependente de RNA
RER	Retículo Endoplasmático Rugoso
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAm	RNA mensageiro
RT-LAMP	Amplificação isotérmica de regiões genômicas do vírus mediada por loop com transcriptase reversa
RT-qPCR	PCR em tempo real quantitativa
S	Superfície
S1	Subunidade 1

S2	Subunidade 2
SARS-CoV-2	Síndrome Respiratória Aguda Severa Coronavírus 2
SPRI	Solidphase Reversible Immobilization
TM2	Domínio transmembranar 2
TMPRSS2	Serino Protease Transmembrana tipo 2
TRS	Sequências Regulatórias Transcricionais
UTR	Região não traduzida

SUMÁRIO

1. Introdução.....	14
2. Objetivos.....	22
3. Materiais e Métodos	23
3.1 Preparação das alíquotas de SARS-CoV-2	23
3.2 Extração do RNA viral do SARS-CoV-2.....	23
3.3 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-qPCR) .	24
3.4 Preparação das alíquotas de SARS-CoV-2	25
3.5 Extração do RNA viral do SARS-CoV-2.....	26
3.6 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-qPCR) .	26
3.7 Curva-padrão.....	27
4. Análise estatística.....	28
5. Resultados e Discussões.....	29
6. Conclusões	42
7. Referências.....	44

1. Introdução

A Doença Coronavírus 2019 (COVID-19) se tornou um desafio não só para os órgãos sanitários, mas também para laboratórios de diagnóstico molecular no sentido do estabelecimento de estratégias de conservação e processamento de amostras num momento em que existia uma carência de produtos no mercado nacional. Originada em Wuhan, na província de Hubei, China, a COVID-19 se tornou de grande importância em nível mundial por conduzir a casos quadros graves de pneumonia (1). A etiologia foi atribuída a um novo coronavírus, um vírus de RNA de polaridade positiva que pertence à família *Coronaviridae*, gênero *Betacoronavirus*, o SARS-CoV-2 (Síndrome Respiratória Aguda Severa Coronavírus 2) (2).

Devido à alta transmissibilidade, o SARS-CoV-2, disseminou-se rapidamente para todos os continentes, atingindo mais de 200 países em poucos meses. Em 11 de Março de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) anunciou que o surto iniciado na China, havia se tornado uma pandemia (3).

Até o dia 26 de fevereiro de 2022 foram confirmados 434.247.399 casos de Covid-19 no mundo, sendo que o maior número de casos tinha sido registrado nos Estados Unidos (78.931.739), seguido pela Índia (42.916.117) e pelo Brasil com 28.744.050 casos. Foram confirmados 5.944.313 óbitos em todo o mundo. Os Estados Unidos foi o país com maior número de óbitos (948.215), seguido do Brasil (648.913), Índia (513.724), Rússia (343.178) e México (318.014) (4).

Estudos sugerem que eventos de recombinação entre os coronavírus deram origem ao SARS-CoV-2, linhagem que circula em morcegos há décadas (5).

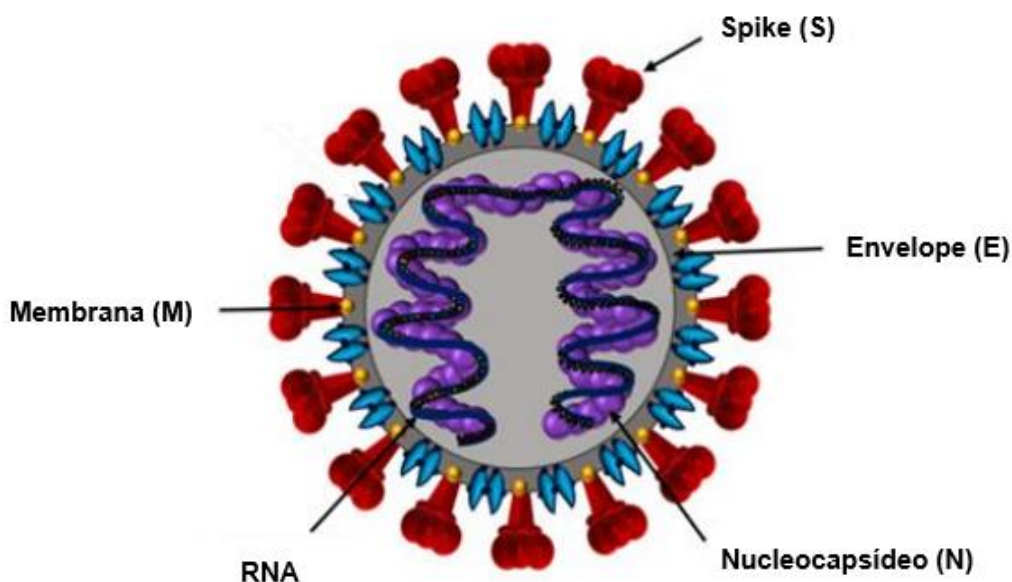
A estrutura da partícula viral (figura 1) é composta pelas proteínas *Spike* (S), Envelope (E), Nucleocapsídeo (N), Membrana (M) e pelo material genético do vírus, o RNA (Ácido Ribonucleico) (6).

A proteína do nucleocapsídeo (N) forma o capsídeo que é envolto

por um envelope que está associado às proteínas estruturais: membrana (M), *spike* (S) e do envelope (E) (7).

Entre as proteínas estruturais, a proteína S possui papel chave na infecção, pois se liga ao receptor ACE2 (Enzima Conversora de Angiotensina 2) da célula hospedeira e inicia o processo de infecção. A proteína S possui duas subunidades, a S1 e a S2, subunidade S1 é responsável pela ligação ao receptor celular e a subunidade S2 pela entrada viral (8,9). A proteína M é essencial para formação de novos vírions, incorporando componentes virais essenciais e direcionando o empacotamento viral. A proteína E participa da montagem viral e forma um canal iônico na membrana (10).

Figura 1: Estrutura do SARS-CoV-2, evidenciando o RNA viral (roxo escuro), as proteínas do envelope (azul), de membrana (amarelo), do nucleocapsídeo (lilás) e de superfície (vermelho).



Fonte: Adaptado de PEREIRA; TOMÉ DA CRUZ; SOUSA LIMA, 2021

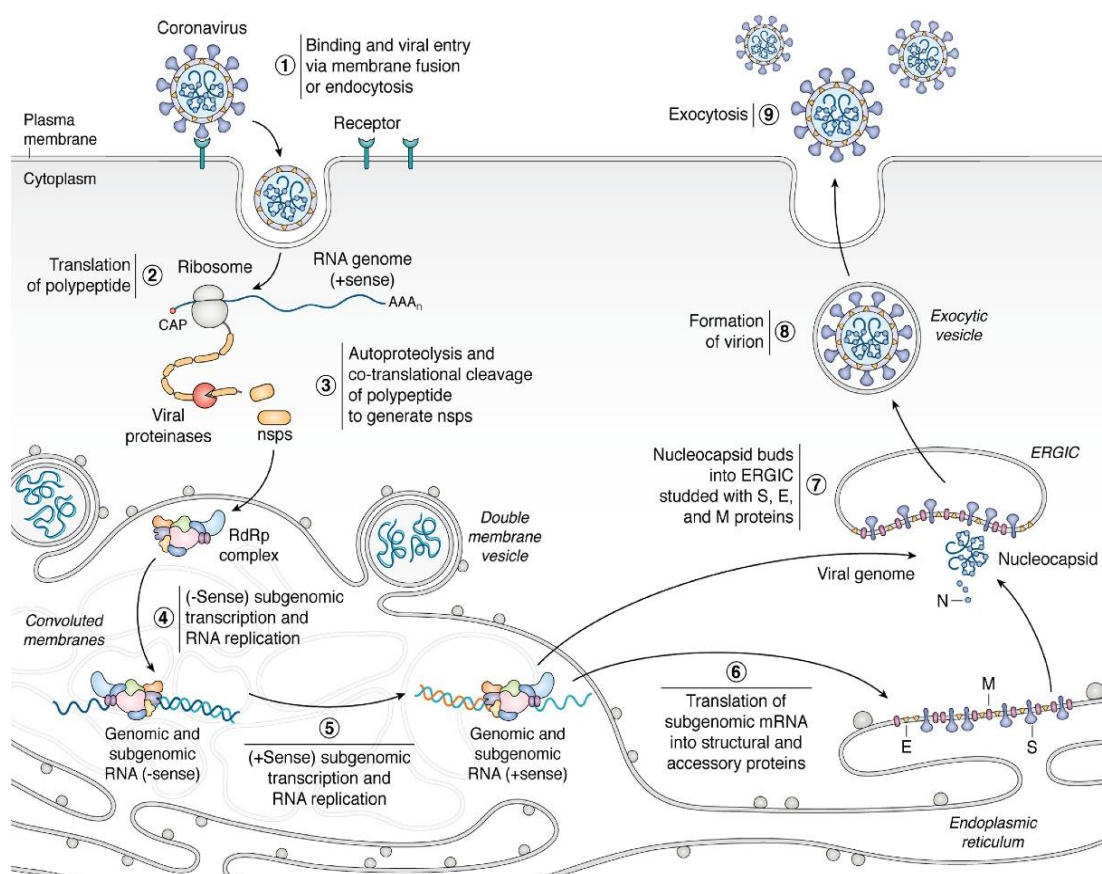
O genoma do SARS-CoV-2 (figura 2) é um RNA fita simples de polaridade positiva (+ssRNA), de aproximadamente 29,9 kb (11) e codifica

quatro proteínas estruturais (figura 2): S (*Spike*), E (Envelope), M (Membrana) e N (Nucleocapsídeo) e dezesseis proteínas não estruturais (Nsp 1-16). As proteínas não estruturais atuam em diferentes processos do ciclo viral, por exemplo, a Nsp1 inibe a tradução da proteína líder do hospedeiro e atua na mediação do processamento e a replicação do RNA. Já a Nsp2 modula a via de sinalização de sobrevivência da célula hospedeira. A Nsp3 funciona como uma protease que separa a poliproteína traduzida em suas proteínas distintas. A Nsp4 contém domínio transmembranar 2 (TM2) e modifica as membranas do Retículo Endoplasmático. Nsp5 participa do processo de poliproteína durante a replicação. Nsp6 desempenha um papel na indução inicial de autofagossomos do retículo endoplasmático do hospedeiro. Nsp7 é RNA polimerase dependente de RNA. Nsp8 é RNA polimerase multimérica, replicase. Nsp9 funciona como uma proteína de ligação ao ssRNA. A Nsp10 é crítica para a metilação cap de mRNAs virais. Nsp11 permanece de função desconhecida. Nsp12 contém a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), que é responsável pela replicação e transcrição do RNA do coronavírus. O Nsp13 liga-se ao ATP e o domínio de ligação do zinco e participa do processo de replicação e transcrição. Nsp14 é um domínio de exoribonuclease de revisão. Nsp15 tem atividade de endoribonuclease dependente de Mn (2+). Nsp16 é uma metiltransferase 2'-O-ribose (12).

Para infectar as células epiteliais brônquicas, pneumócitos e células do trato respiratório superior, a glicoproteína *spike* do SARS-CoV-2 se liga ao receptor celular Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ACE2) e à enzima Serino Protease Transmembrana tipo 2 (TMPRSS2) da superfície da célula-alvo, clivando e ativando a proteína *spike*, que permite a entrada na célula hospedeira por endocitose ou fusão direta do envelope viral (figura 3) (13). Há também uma porta de entrada alternativa, o receptor de neuropilina-1 no sistema nervosa (14–16).

com o nucleocapsídeo vai ser encapsulado no Golgi, originando, assim, novas partículas virais (vírions) que serão exocitadas para o citoplasma (10,13,17).

Figura 3: Esquema representativo da replicação do SARS-CoV-2, evidenciando ligação e entrada do vírus por endocitose ou fusão de membranas (1), tradução do RNA de polaridade positiva (2), clivagem da poliproteína gerada e produção das proteínas não estruturais (3), formação do RNA subgenômico de polaridade negativa, transcrição e replicação do RNA (4), formação do RNA subgenômico de polaridade positiva, replicação e transcrição (5), tradução do RNA subgenômico de polaridade positiva e síntese das proteínas estruturais (6), formação do nucleocapsídeo (7), formação do virion, liberação dos vírions por exocitose (8)



Fonte: HARTENIAN et al., 2020.

Quando se considera os quadros clínicos as infecções por SARS-

CoV-2 podem variar de assintomático, a sintomas leves, moderados, graves ou críticos, podendo evoluir para óbito (18). Os sintomas podem ser febre, tosse, coriza, cansaço, dor de garganta, dor de cabeça, falta de ar, diarreia, vômitos, perda do paladar e/ou olfato (19,20). Sintomas inespecíficos também foram relatados (21).

O SARS-CoV-2 tem se adaptado bem ao hospedeiro, encontrando várias formas de escapar da resposta imune através de mutações ao longo das replicações. No decorrer da pandemia, algumas variantes foram consideradas de preocupação pela OMS por terem alta capacidade de transmissão ou virulência, redução na neutralização por anticorpos adquiridos por infecção natural ou vacinação, capacidade de evitar a detecção ou diminuição da eficácia terapêutica ou da vacinação, apresentando um impacto em saúde pública. As variantes que são consideradas de preocupação são: a Alfa (B.1.1.7) descoberta no Reino Unido, a Beta (B.1.351) na África do Sul, a Gamma (P.1) no Brasil, a Delta (B.1.617.2) na Índia, e, a Omicron (B.1.1.529) na África do Sul (22).

No presente momento, várias vacinas estão sendo aplicadas massivamente em todo o mundo e, como consequência quedas significativas no número de mortes, casos graves e sintomáticos estão sendo observados (23).

No contexto de diagnóstico do SARS-CoV-2, o vírus pode ser encontrado em diferentes tipos de amostras, como urina, sangue (baixa sensibilidade), aspirado brônquico, secreção anal, na secreção nasal e orofaríngea e na saliva. Apesar de ser encontrado na urina não causa sintomas no trato urinário (24,25).

Atualmente para o diagnóstico laboratorial são utilizadas diferentes técnicas: (a) baseadas na detecção do RNA do SARS-CoV-2 como a RT-qPCR (amplificação de regiões genômicas virais precedida de transcrição reversa), a RT-LAMP (amplificação isotérmica de regiões genômicas do vírus mediada por loop com transcriptase reversa), as quais são consideradas padrão ouro; (b) baseadas na detecção de anticorpos

formados contra proteínas virais, as quais detectam anticorpos IgM, IgA e/ou IgG, podendo diagnosticar doença ativa ou pregressa por metodologia de ensaio imunoenzimático (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* – ELISA) revelado por Quimioluminescência (CLIA) ou Eletroquimioluminescência (ECLIA); (c) baseadas em imunocromatografia de fluxo lateral que constituem os testes rápidos que detectam antígenos na fase aguda (26).

Com a alta transmissibilidade do SARS-CoV-2 e a necessidade de detecção do vírus na fase de replicação ou infecciosa, está indicado realizar o teste diagnóstico para a detecção do vírus sempre que houver casos suspeitos.

Durante a pandemia a demanda por testes diagnósticos que detectassem o RNA viral por RT-qPCR se elevou acima da capacidade laboratorial existente no país naquele momento. A grande limitação consiste na necessidade de laboratórios de nível de segurança NB2 com toda infraestrutura física e de equipamentos necessários à execução do exame instalados e certificados além de recursos humanos especializados na área de Biologia Molecular Diagnóstica capazes de executar e interpretar os resultados individualmente.

Embora ao longo da pandemia tenha ocorrido uma elevação gradativa do número de laboratórios capazes de executar o exame, esse número sempre se manteve inferior à necessidade real existente. A isso soma-se o fato de que o vírus atingiu todas as regiões do país, muitas das quais afastadas dos grandes centros de diagnóstico.

Assim, criou-se a necessidade de armazenar e transportar a amostra para laboratórios credenciados e habilitados na realização dos ensaios moleculares para detecção do vírus. Para realização da RT-qPCR é necessário que a amostra seja conservada a 2-8°C e processada em 72h após a coleta. Essas recomendações do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) e da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) criaram um problema logístico principalmente considerando a extensão do

território nacional que fazia com que o transporte nestas condições em tão pouco tempo fosse extremamente difícil (27). A isso soma-se o fato que muitos centros de coleta de amostras não dispõem de refrigerador para conservação da amostra até o momento da coleta (28).

Considerando todas essas dificuldades enfrentadas para viabilizar o diagnóstico do SARS-CoV-2, a utilização de outro meio para conservação do material genético do vírus torna-se fundamental na viabilização do diagnóstico de SARS-CoV-2.

Alguns poucos estudos avaliaram a ação de preservantes de RNA com o objetivo de resolução dessas questões. Um estudo avaliou a capacidade do DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), PBS (Phosphate Buffered Saline), solução salina (NaCl) 0,9% e etanol absoluto como forma de preservar o RNA viral pelo período de 72 horas e concluiu que o etanol absoluto foi o que melhor preservou o vírus, mantendo os níveis de RNA viral por mais de 72 horas (29). Um outro estudo demonstrou que o RNA humano e o SARS-CoV-2 foram preservados em etanol 95% mesmo na presença de RNaseA, uma enzima que degrada RNA (30).

No entanto, o estudo de GARNETT *et al.* 2020 utilizou vírus oriundo de cultura celular, condição muito distante da situação fisiológica real de um vírus em uma amostra biológica oriunda do paciente infectado e MINICH *et al.* 2020, por sua vez, não avaliaram a capacidade do etanol para preservar a amostra em temperatura ambiente, o que seria extremamente relevante considerando que a maioria dos centros de coleta indis põe de refrigeradores ou câmaras frias para preservar a amostra até o momento do transporte.

Considerando a carência de estudos que tragam informações sobre a preservação da amostra na condição fisiológica real a proposta deste estudo foi avaliar a capacidade do etanol para preservar amostras de secreção naso e orofaríngea coletadas por *swab* de pacientes por diferentes intervalos de tempo, armazenadas a temperatura ambiente.

2. Objetivos

- ✓ Avaliar comparativamente a carga viral do SARS-CoV-2 em secreção nasofaríngea conservada em etanol 70% e em solução fisiológica em diferentes intervalos de tempo.
- ✓ Avaliar se a adição de TRIzol™ e Beta-mercaptoetanol amenizam os impactos de congelamento e descongelamento da amostra na quantificação viral.
- ✓ Comparar a eficiência para quantificação do RNA viral utilizando métodos de extração por kit comercial e desenvolvido “*in house*” no Laboratório de Biologia Molecular do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu.

3. Materiais e Métodos

3.1 Preparação das alíquotas de SARS-CoV-2

Foram selecionadas amostras de secreção nasofaríngea que passaram pelo comitê de ética com dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e apresentavam RNA do SARS-CoV-2 detectadas por RT-qPCR armazenadas no repositório de amostras de Rotinas Diagnósticas em Infecções Virais do Laboratório de Biologia Molecular do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. As amostras foram divididas em três grupos: Grupo 1 (G1) amostras que apresentavam *Cycle Threshold* (CT) abaixo de 20 (carga viral alta); Grupo 2 (G2) amostras que apresentaram CT entre 20 e 30 (carga viral media) e; Grupo 3 (G3) amostras que apresentavam CT acima de 30 (carga viral baixa). Esta divisão buscava contemplar grupo de amostras com carga viral alta, media e baixa inferida pelo CT.

Foi então realizado um *pool* (mistura de amostras) com aquelas amostras pertencentes ao grupo 1 (*Pool 1*), um segundo pool constituído por amostras do grupo 2 (*Pool 2*) e um terceiro pool formado pelas amostras do grupo 3 (*Pool 3*). Depois de constituídos os *pools* os mesmos foram quantificados para o RNA do SARS-CoV-2 por RT-qPCR para garantir que os CTs se mantinham depois da constituição dos *pools*.

Cada *pool* foi subdividido e testado em três condições: (a) usando etanol 70% como conservante; (b) usando salina fisiológica 0,9% mantido a temperatura de 2 a 8°C e; (c) usando salina fisiológica 0,9% mantido a temperatura ambiente de 25°C. Cada amostra em cada condição a que foi submetida foi avaliada depois de 0 horas, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 dias.

Todas as amostras foram preparadas em triplicata.

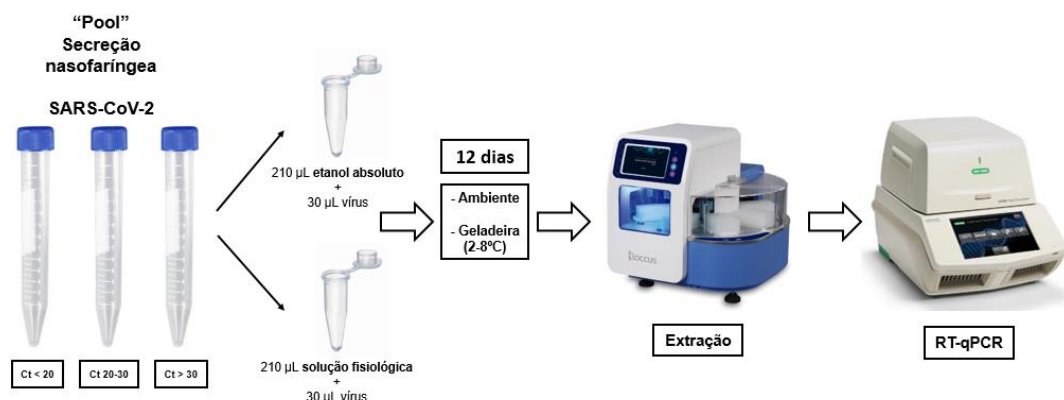
3.2 Extração do RNA viral do SARS-CoV-2

Todas as alíquotas foram submetidas a dois procedimentos extrativos: (1) extração de RNA foi realizada com o kit de extração por *beads* magnéticas EXTRACTA KIT FAST – DNA e RNA Viral MVXA-P096 FAST (Loccus do Brasil, LTDA, SP, Brasil) seguindo as especificações do fabricante, e, (2) extração “*In house*” baseada em *solidphase reversible immobilization* (SPRI), ambas semiautomatizadas utilizando o equipamento Extracta 96 Loccus (Loccus do Brasil, LTDA, SP, Brasil).

3.3 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-qPCR)

A RT-qPCR foi realizada utilizando o kit diagnóstico GeneFinder™ COVID-19 Fast RealAmp (Instituto Butantã, SP, Brasil), conforme especificações do fabricante. A reação de qPCR foi realizada no equipamento CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (BioRad, USA) utilizando configurações padrões recomendados pelo fabricante. Para obtenção dos valores de CT foi utilizado *threshold* em 50 para o controle interno e, 30.000 para os genes virais (E, N, RdRp). O gene considerado para a análise dos dados foi o gene E (envelope). E os valores de CT obtidos foram convertidos em cópias/mL.

Figura 4: Esquema ilustrativo do experimento realizado com etanol 70% e solução fisiológica



Fonte: Elaborado pelo(a) autor(a)

Diante dos resultados obtidos optou-se por testar soluções preservantes de RNA, realizando-se experimento com TRIzol™ e Beta-mercaptoetanol.

3.4 Preparação das alíquotas de SARS-CoV-2

Para este experimento o *Pool 3*, constituído de amostras com CT maior que 30 foi alíquotado em nove tubos, sendo (a) Tubo 1: alíquota do *pool 3* e conservação em temperatura de 2 a 8°C; (b) Tubo 2, 3, 4 e 5: alíquota do *pool 3*, adicionado Beta-Mercaptoetanol e TRIzol™ e congelamento à -80°C; (c) Tubo 6, 7, 8 e 9: alíquota do *pool 3*, sem adição de Beta-mercaptoetanol e TRIzol™ e congelamento à -80°C. O tubo 1 funcionou como controle do experimento, o tubo 2 foi congelado-descongelado uma única vez para depois ser processado, o tubo 3 foi congelado-descongelado duas vezes para depois ser processado, o tubo 4 foi congelado-descongelado três vezes antes de ser processado, o tubo 5 foi congelado-descongelado quatro vezes antes de ser processado. O tubo 6 foi congelado-descongelado uma única vez para depois ser processado, o tubo 7 foi congelado-descongelado duas vezes para depois ser processado, o tubo 8 foi congelado-descongelado três vezes antes de ser processado, o tubo 9 foi congelado-descongelado quatro vezes antes de ser processado (tabela 1). Todas as amostras foram preparadas em triplicata.

Tabela 1: Representação dos tubos do experimento com TRIzol™ e Beta-Mercaptoetanol e suas respectivas formas de armazenamento e o número de vezes em que houve congelamentos e descongelamentos

Tubo	Armazenamento	Número de Congelamento/ descongelamento
1	Controle (Salina/2-8°C)	-
2	Beta-Mercaptoetanol/-80°C	1X
3	Beta-Mercaptoetanol/-80°C	2X
4	Beta-Mercaptoetanol/-80°C	3X
5	Beta-Mercaptoetanol/-80°C	4X
6	Salina/2-8°C	1X
7	Salina/2-8°C	2X
8	Salina/2-8°C	3X
9	Salina/2-8°C	4X

3.5 Extração do RNA viral do SARS-CoV-2

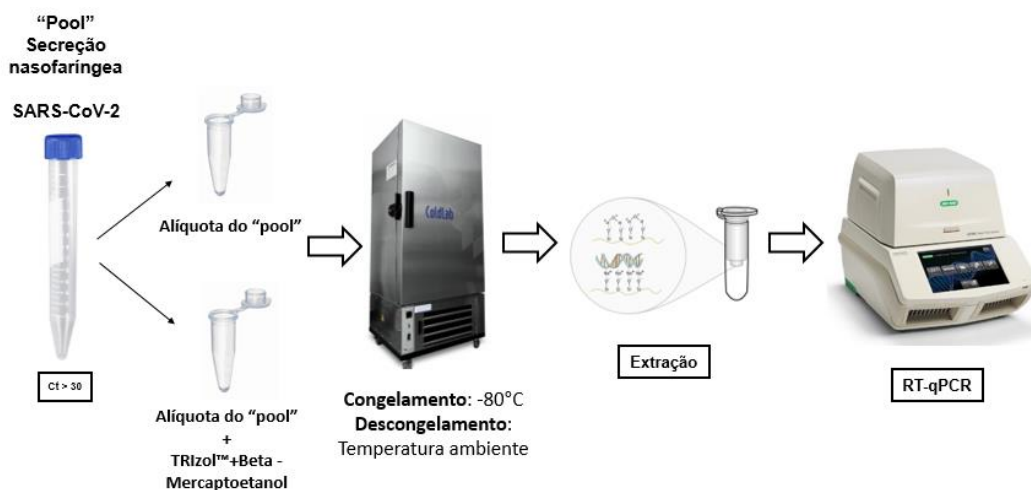
As alíquotas de SARS-CoV-2 depois de passarem por diferentes condições foram submetidas a extração de RNA realizando um passo inicial com TRIzol™ e clorofórmio para obtenção do sobrenadante, seguido do processo de extração baseado em sílica utilizando o kit Bio Gene Extração de DNA/RNA Viral (Bioclin, MG, Brasil), seguindo o protocolo do fabricante.

3.6 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-qPCR)

A RT-qPCR foi realizada utilizando o kit diagnóstico GeneFinder™ COVID-19 Fast RealAmp (OSANG Healthcare Co., Ltd, Korea) fornecido pelo Instituto Butantan, SP, Brasil, conforme especificações do fabricante. A reação de qPCR foi realizada no equipamento CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (BioRad, USA) utilizando configurações padrões recomendados pelo fabricante. Para obtenção dos valores de CT foi utilizado *threshold* em 50 para o controle interno e, 300 para os genes virais (E, N,

RdRp). O gene considerado para a análise dos dados foi o gene E (envelope), e os valores de CT obtidos foram convertidos em cópias/mL.

Figura 5: Esquema ilustrativo do experimento realizado com TRIzol™ e Beta-mercaptoetanol.



Fonte: Elaborado pelo(a) autor(a).

3.7 Curva-padrão

Os valores de CT foram convertidos para número de cópias/mL, a partir de uma amostra com valor do número de cópias conhecido por PCR digital fornecido pela Universidade de São Paulo (USP). Para a construção da curva-padrão, foram realizadas diluições seriadas e subsequente obtenção dos valores de CT no equipamento de PCR em tempo real Biorad CFX96. A relação entre CT e concentração viral foi estabelecida com base no volume de amostra usada inicialmente (200 µL para extração “*In house*” e 100 µL para extração comercial - Loccus), ou seja, os valores obtidos foram cópias para cada 200 µL de amostra para extração “*In house*” e cópias para cada 100 µL de amostra para a extração Loccus. Ao final, para os valores convertidos em cópias/mL, foi aplicado um fator de correção: para 200 µL foi multiplicado por 5 e para 100 µL multiplicado por 10.

4. Análise estatística

Os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão ou mediana e a homogeneidade das amostras testada para escolha de análise de variância paramétrica ou não paramétrica seguida do pós-teste específico usando o programa SigmaPlot 11.0. Diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05$.

5. Resultados e Discussões

As figuras 6, 7 e 8 demonstram curvas construídas para conversão do *Cycle Threshold* (CT) em número de cópias/mL utilizando diluições seriadas a partir de amostras de concentrações conhecidas. A figura 6 utilizou amostra extraída com protocolo *in house* (baseado em *solidphase reversible immobilization* - SPRI), a figura 7 utilizando extração automatizada (EXTRACTA KIT FAST – DNA e RNA Viral MVXA-P096 FAST) e a figura 8 utilizando o protocolo com Beta-Mercaptoetanol e TRIzol™. Os pontos gerados que correlacionam CT e número de cópias foram utilizados para a obtenção de uma reta, deduzir a equação da reta e o valor do R^2 que representa o quão próximo os valores de CT estão da linha de regressão ajustada.

A eficiência da reação de amplificação de acordo com a equação $E=10^{(-1/\text{slope})} - 1$, para o protocolo de extração *in house* (figura 6) foi de 0,91, para o protocolo EXTRACTA KIT FAST (figura 7) foi de 0,96, para o protocolo com Beta-Mercaptoetanol e TRIzol™ (figura 8) foi de 0,85.

Figura 6: Curva que correlaciona CT e quantificação do RNA do SARS-CoV-2 (Log) para amostras de concentrações conhecidas extraídas utilizando o protocolo *in house* com *solidphase reversible immobilization* - SPRI

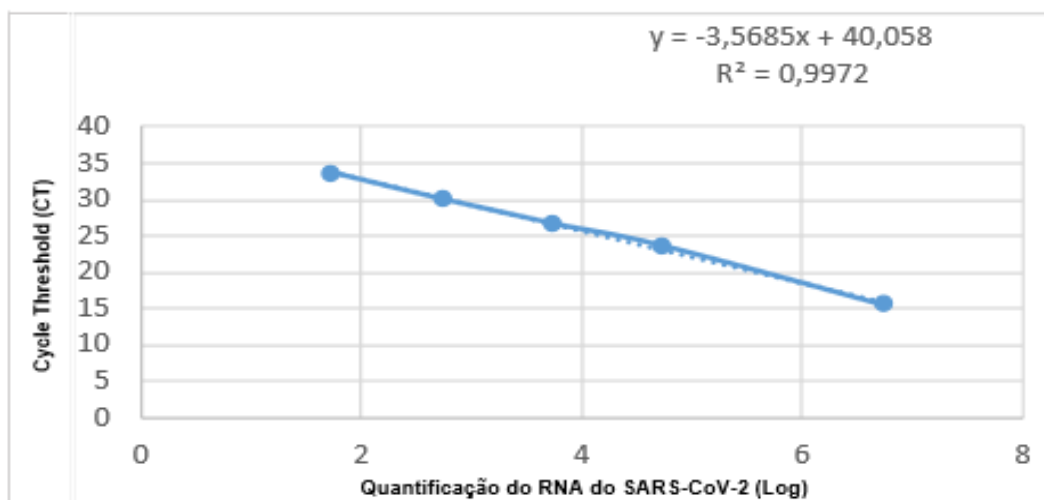


Figura 7: Curva que correlaciona CT e quantificação do RNA do SARS-CoV-2 (Log) para amostras de concentrações conhecidas extraídas utilizando o protocolo automatizado com o EXTRACTA KIT FAST – DNA e RNA Viral MVXA-P096 FAST

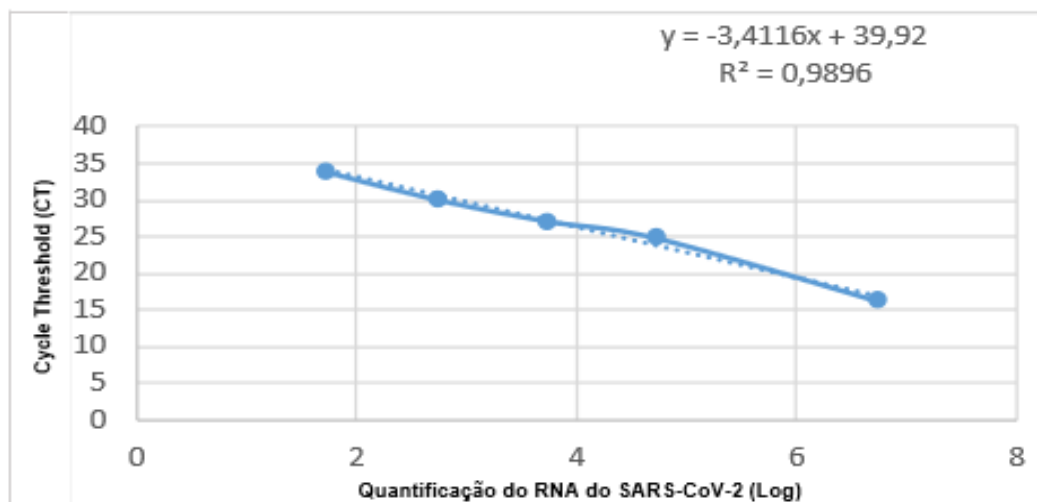
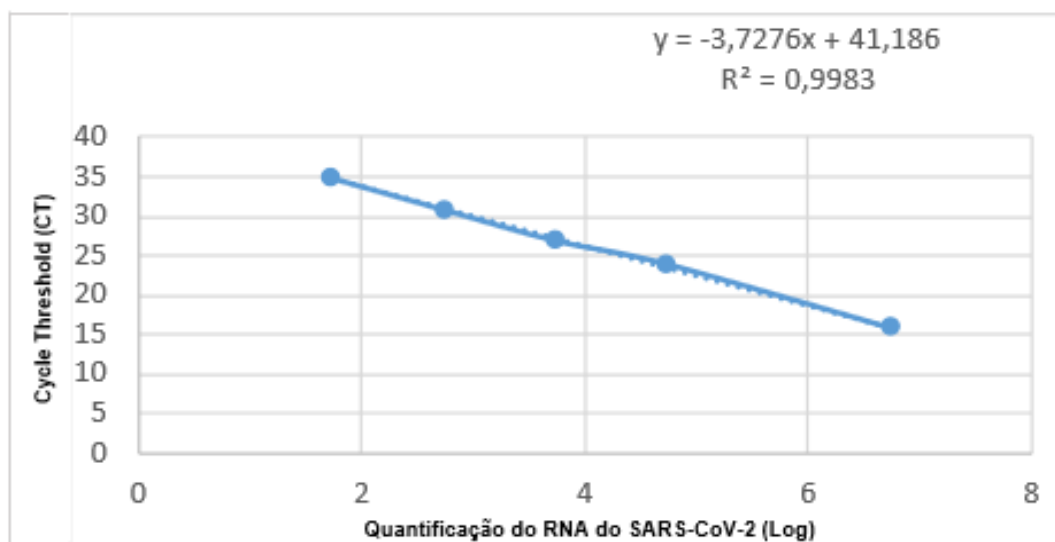


Figura 8: Curva que correlaciona CT e quantificação do RNA do SARS-CoV-2 (Log) para amostras de concentrações conhecidas extraídas utilizando o protocolo Beta-Mercaptoetanol e TRIzol™ seguido da extração baseado em sílica utilizando o kit Bio Gene Extração de DNA



Todas as análises realizadas utilizaram como parâmetro estas curvas de calibração obtidas a partir de amostras biológicas em condição fisiológica real, o que tornam mais fidedignas as análises realizadas.

A tabela 1 mostra a carga viral de amostras armazenadas somente em solução fisiológica, ao longo de 12 dias em temperatura ambiente com CTs para gene E viral em intervalos específicos (<20, 20-30 e >30), com extração do material genético automatizada realizada pelo EXTRACTA KIT FAST – DNA e RNA Viral MVXA-P096 FAST utilizando o equipamento Extracta 96 Locus (Locus do Brasil, LTDA, SP, Brasil).

Tabela 2. Carga viral para amostras armazenadas em salina fisiológica por até 12 dias em temperatura ambiente em diferentes intervalos de CT.

CT	Controle	2d	4d	6d	8d	10d	12d
<20	2581799±30287	2619222±140090	2215931±397499	2491558±227251	2250369±183875	2281241±363390	2142977±194506
20-30	365319±29280	293322±45631	403421±34057	274135±25901	375945±59555	279153±86570	289032±22000
>30	1720±399	2085±596	1775±186	2127±265	1685±480	1599±313	1733±250

Três replicatas; Valores são média de carga viral em cópias/mL ± desvio padrão. Não há diferença estatística com relação aos controles. Controles: amostras armazenadas em salina fisiológica a 2-8°C. **CT= cycle threshold.**

Estes resultados mostram que, pelo período de tempo avaliado neste estudo (12 dias), não houve diferença significativa na quantificação do RNA do SARS-CoV-2 quando comparado ao controle (amostras conservadas segundo protocolo oficial para armazenamento de amostras destinadas ao diagnóstico de SARS-CoV-2).

Diante desses resultados pode-se sugerir que as amostras destinadas ao diagnóstico de SARS-CoV-2 podem ser mantidas à temperatura ambiente sem prejuízo na detecção da carga viral, independentemente da concentração de partículas virais na amostra, inclusive nos limites inferiores de detecção.

Uma avaliação para verificar se a temperatura apresentava alguma influência na conservação também foi realizada e os resultados estão apresentados nas tabelas 2, 3 e 4. Esta análise também foi realizada com base em intervalos de CTs para o gene viral E. As comparações foram entre os grupos “ambiente” à 25°C e “geladeira” à 2 a 8°C, decorrido o mesmo intervalo de tempo (12 dias).

Tabela 3. Carga viral para amostras conservadas em salina, com CT menor que 20, armazenadas por até 12 dias em temperatura ambiente e de geladeira (2-8°C).

Temperatura	Controle	2d	4d	6d	8d	10d	12d
Ambiente		2619222± 140090	2215931± 397499	2491558± 227251	2250369± 183875	2281241± 363390	2142977± 194506
	2581799± 30287						
Geladeira		2236343± 525686	2011873± 722043	2851466± 97189	2984470± 380136	2419783± 649992	2146649± 488081

Três replicatas; Valores são média de carga viral em cópias/mL ± desvio padrão. Não há diferença estatística entre os grupos. Controle: amostras armazenadas em salina fisiológica a 2-8°C. **CT= cycle threshold.**

Tabela 4. Carga viral para amostras conservadas em salina, com CT entre 20 e 30, armazenadas por até 12 dias em temperatura ambiente e de geladeira (2-8°C).

Temperatura	Controle	2d	4d	6d	8d	10d	12d
Ambiente		293322± 45631	403421± 34057	274135± 25901	375945± 59555	279153± 86570	289032± 22000
	365319± 29280						
Geladeira		367861± 31544	367153± 13729	307508± 29959	321409± 71455	316929± 35191	345119± 70970

Três replicatas; Valores são média de carga viral em cópias/mL ± desvio padrão. Não há diferença estatística entre os grupos. Controle: amostras armazenadas em salina fisiológica a 2-8°C. **CT= cycle threshold.**

Tabela 5. Carga viral para amostras conservadas em salina, com CT maior que 30, armazenadas por até 12 dias em temperatura ambiente e de geladeira (2-8°C).

Temperatura	Controle	2d	4d	6d	8d	10d	12d
Ambiente		2085± 596	1775± 186	2127± 265	1685± 480	1599± 313	1733± 250
	1720± 399						
Geladeira		2805± 531	1932± 284	2028± 162	2373± 733	1512± 395	2318± 350

Três replicatas; Valores são média de carga viral em cópias/mL ± desvio padrão. Não há diferença estatística entre os grupos. Controle: amostras armazenadas em salina fisiológica a 2-8°C. **CT= cycle threshold.**

Estes achados mostraram que a temperatura de armazenamento por um período de até 12 dias não teve impacto na preservação da amostra destinada à detecção do SARS-CoV-2 com relação à quantificação de partículas virais inclusive nos limites inferiores de detecção. Estes resultados permitem sugerir que pode ser uma opção do serviço armazenar as amostras à temperatura ambiente ou em geladeira até o momento do processamento.

Durante a pandemia, os obstáculos como a necessidade de aquisição de câmaras frias para conservação das amostras no local de coleta até o momento do processamento, transporte à baixa temperatura

(necessidade de gelo reciclável ou outras formas de refrigeração), o que poderia dificultar a testagem sugeriram a possibilidade de armazenamento de amostras para detecção de SARS-CoV-2 em temperatura ambiente o que poderia solucionar alguns obstáculos observados nos serviços de saúde.

A decisão sobre o melhor emprego de recursos, considerando todos os aspectos relacionados ao diagnóstico do SARS-CoV-2, cabe ao gestor de saúde local e, diante dos resultados aqui apresentados pode-se fornecer informações relevantes para a tomada de decisões estratégicas no contexto do sistema único de saúde local, regional e nacional.

Por outro lado, os resultados mostram que o material genético viral se mantém estável na amostra mesmo a temperatura ambiente. Embora a viabilidade desses vírus de produzir nova infecção durante esse período não tenha sido avaliada, a necessidade de grande rigor nos critérios de biossegurança durante o armazenamento e transporte destas amostras é reforçada.

Com o intuito de verificar se o etanol apresenta algum impacto na preservação da amostra para fins de diagnóstico, foi realizado o experimento com adição de etanol 70% conforme descrito na seção material e métodos e, os resultados foram avaliados sobre a carga viral obtida em intervalos de CTs para gene E, ao longo de 12 dias em temperatura ambiente e de geladeira (Tabelas 5, 6 e 7).

Tabela 6. Carga viral para amostras conservadas em etanol, com CT menor que 20, armazenadas por até 12 dias em temperatura ambiente e de geladeira (2-8°C).

Temperatura	Controle	2d	4d	6d	8d	10d	12d
Ambiente	2581799± 30287	1424933± 156890	1695931± 282263	1519064± 253347	2145872± 520122	1511714± 48574	1663444± 408373
		1547625± 279249	1396563± 267237	1573486± 480366	1647489± 498404	1768875± 312792	1940607± 919811
Geladeira							

Três replicatas; Valores são média de carga viral em cópias/mL ± desvio padrão. Não há diferença estatística com relação ao controle. Controle: amostras armazenadas em salina fisiológica a 2-8°C. CT= cycle threshold.

Tabela 7. Carga viral para amostras conservadas em etanol, com CT entre 20 e 30, armazenadas por até 12 dias em temperatura ambiente e de geladeira (2-8°C).

Temperatura	Controle	2d	4d	6d	8d	10d	12d
Ambiente	365319± 29280	197394±	256611±	204866±	223969±	146495±	185242±
		10557*	36769*	32184*	13775*	71391*	89590*
Geladeira		266811±	277870±	257904±	195102±	237782±	259491±
		61343*	14004*	62686*	7687*	7479*	20956*

Três replicatas; Valores são média de carga viral em cópias/mL ± desvio padrão. Controle: amostras armazenadas em salina fisiológica a 2-8°C. *representa diferença significativa com relação ao controle ($P = <0,001$). **CT**= cycle threshold.

Tabela 8. Carga viral para amostras conservadas em etanol, com CT maior que 30, armazenadas por até 12 dias em temperatura ambiente e de geladeira (2-8°C).

Temperatura	Controle	2d	4d	6d	8d	10d	12d
Ambiente	1720±399	1408±227	779±128	1056±35	1502±303	1100±491	1717±335
Geladeira		1497±458	1048±354	1526±331	1355±359	1106±355	1442±542

Três replicatas; Valores são média de carga viral em cópias/mL ± desvio padrão. Não há diferença estatística com relação ao controle. Controle: amostras armazenadas em salina fisiológica a 2-8°C. **CT**= cycle threshold.

Os dados encontrados mostram que o etanol prejudica a quantificação viral para amostras com CT do gene E entre 20 e 30, levando à uma subquantificação, mas não afetando o diagnóstico, uma vez que o exame utilizado é qualitativo (presença ou ausência do RNA do SARS-CoV-2 na amostra). Os resultados observados nas tabelas 5 e 7 mostram que os limites inferior e superior de detecção não foram afetados, sugerindo que o etanol pode ser utilizado para conservação da amostra desde que os resultados sejam apresentados de forma qualitativa. A investigação dos mecanismos envolvidos nesta subquantificação do SARS-CoV-2 gerada pelo etanol 70% para CTs entre 20 e 30 pode ser realizada com experimentos envolvendo exposição do vírus ao etanol em diferentes concentrações e avaliação subsequente de parâmetros virais e do hospedeiro, o que não foi objeto de estudo no presente trabalho.

Um estudo demonstrou a inativação do SARS-CoV-2 por etanol a partir de uma concentração de 30%, mudando apenas o tempo de espera para inativação com eficiência (31) e além disso, um outro estudo mostrou que o etanol 70% não tem efeito no genoma do SARS-CoV-2 (32), não acarretando problemas para o diagnóstico molecular.

Resultados discordantes aos aqui obtidos já foram reportados, um

estudo mostrou que o uso de etanol absoluto ao longo de 72 horas em temperatura ambiente acarretou uma melhor recuperação viral provavelmente devido aos efeitos desnaturantes deste álcool sobre o vírus (29). O outro estudo mostrou, ainda, que para o diagnóstico molecular, o material genético do vírus influenza é preservado durante seis meses em temperatura ambiente quando adicionado à amostra etanol absoluto (33). No entanto, nenhum destes estudos utilizaram método de extração baseado em *beads* magnéticas, o que pode justificar os resultados discordantes dos aqui observados, sendo possível que o etanol usado como conservante possa estar influenciando de alguma forma no processo de extração para amostras com carga viral em concentrações específicas.

Os resultados obtidos, considerando o contexto de diagnóstico do SARS-CoV-2, sugerem que em casos de necessidade, principalmente em locais onde os centros de diagnóstico são afastados dos pontos de coleta, o uso do etanol pode ser considerado para preservar o material viral.

O armazenamento do SARS-CoV-2 em solução fisiológica por até 12 dias em temperatura ambiente em diferentes intervalos de CTs para o gene viral, no método de extração “*In house*” também foi verificado (Tabela 8), e assim como para o método de extração comercial, não houve diferenças estatísticas com relação aos controles. Isso mostra que, para este método de extração, as amostras também podem ser mantidas à temperatura ambiente por até 12 dias sem prejuízo na carga viral, independentemente da concentração de partículas virais na amostra, inclusive nos limites de detecção.

Tabela 9. Carga viral para amostras conservadas em salina, armazenadas por até 12 dias em temperatura ambiente em diferentes intervalos de CT, para método de extração “*in house*”.

CT	Controle	2d	4d	6d	8d	10d	12d
<20	875015± 27606	1247117± 358874	941251± 20904	1006137± 20982	763587± 318099	980613± 156602	567652± 147912
20-30	135844± 5259	145573± 7219	138912± 8794	117449± 23779	119782± 31148	130432± 12200	101838± 19342
>30	926±46	1055±152	1198±139	946± 46	1014±338	1118± 39	808±73

Três replicatas; Valores são média de carga viral em cópias/mL ± desvio padrão. Não há diferença estatística com relação aos controles. Controle: amostras armazenadas em

salina fisiológica a 2-8°C. **CT**= cycle threshold.

Adicionalmente, foi feita uma comparação com relação a métodos de extração “*in house*” e comercial (Loccus) e os resultados estão demonstrados nas tabelas 9, 10 e 11.

Tabela 10. Carga viral para amostras conservadas em salina, com CT menor que 20, armazenadas por até 12 dias em temperatura ambiente para métodos de extração Loccus e “*in house*”.

Extração	Controle	2d	4d	6d	8d	10d	12d
Loccus	2581799±	2619222±	2215931±	2491558±	2250369±	2281241±	2142977±
	30287	140090	397499	227251	183875	363390	194506
	(21,46)	(21,44)	(21,70)	(21,51)	(21,66)	(21,65)	(21,74)
<i>In house</i>	875015±	1247117±	941251±	1006137±	763587±	980613±	567652±
	27606*	358874*	20904*	20982*	318099*	156602*	147912*
	(21,32)	(21,04)	(21,21)	(21,14)	(21,23)	(21,12)	(22,00)

Três replicatas; Valores são média de carga viral em cópias/mL ± desvio padrão. Entre parênteses está o valor da média ou mediana do CT. *representa diferença estatística entre os métodos de extração para um mesmo grupo (tempo de armazenamento). Controle: amostras armazenadas em salina fisiológica a 2-8°C. **CT**= cycle threshold.

Tabela 11. Carga viral para amostras conservadas em salina, com CT entre 20-30, armazenadas por até 12 dias em temperatura ambiente para métodos de extração Loccus e “*in house*”.

Extração	Controle	2d	4d	6d	8d	10d	12d
Loccus	365319±	293322±	403421±	274135±	375945±	279153±	289032±
	29280	45631	34057	25901	59555	86570	22000
	(24,36)	(24,69)	(24,21)	(24,78)	(24,32)	(24,81)	(24,70)
<i>In house</i>	135844±	145573±	138912±	117449±	119782±	130432±	101838±
	5259*	7219*	8794*	23779*	31148*	12200	19342*
	(24,23)	(24,12)	(24,19)	(24,47)	(24,46)	(24,29)	(24,69)

Três replicatas; Valores são média de carga viral em cópias/mL ± desvio padrão. Entre parênteses está o valor da média do CT. *representa diferença estatística entre os métodos de extração para um mesmo grupo (tempo de armazenamento). Controle: amostras armazenadas em salina fisiológica a 2-8°C. **CT**= cycle threshold.

Tabela 12. Carga viral para amostras conservadas em salina, com CT maior que 30, armazenadas por até 12 dias em temperatura ambiente para métodos de extração Loccus e “*in house*”.

Extração	Controle	2d	4d	6d	8d	10d	12d
Loccus	1720±399	2085±596	1775±186	2127±265	1685±480	1599±313	1733±250
	(32,32)	(32,04)	(32,25)	(31,98)	(32,37)	(32,42)	(32,29)
<i>In house</i>	926±46	1055±152	1198±139*	946±46*	1014±338	1118±39	808±73*
	(31,93)	(31,85)	(31,49)	(31,91)	(31,85)	(31,64)	(32,10)

Três replicatas; Valores são média de carga viral em cópias/mL ± desvio padrão. Entre parênteses está o valor da média ou mediana do CT. *representa diferença estatística entre os métodos de extração para um mesmo grupo (tempo de armazenamento). **CT**= cycle threshold.

Amostras armazenadas em salina fisiológica e, conservadas à temperatura ambiente que tiveram a extração de RNA realizada pelo kit comercial quando comparada a extração “*in house*” mostraram diferenças significativas na quantificação do RNA do SARS-CoV-2 em todos os tempos avaliados (tabelas 9, 10 e 11). Estes resultados se reproduziram para todas as faixas de carga viral avaliadas.

Uma provável explicação para o fato pode residir na diferença de beads disponíveis para ligação do RNA em cada método. O kit comercial não especifica em sua bula os seus componentes, mas, sabe-se que estes kits devem garantir o melhor desempenho possível, o que explica sua melhor performance. A metodologia “*In house*” empregada neste trabalho foi desenvolvida no Laboratório de Biologia Molecular do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP com base nos princípios moleculares para extração de ácidos nucleicos: romper as membranas celulares ou envoltórios virais, linearizar proteínas, inibir as nucleases e manter o pH da reação (protocolo sob sigilo de registro).

Os resultados aqui obtidos mostram que para protocolo qualitativo o método “*in house*” pode ser utilizado garantindo os mesmos resultados obtidos quando se usa o kit comercial. A utilização de metodologias “*in house*” trazem uma redução no custo do exame, embora para seu desenvolvimento e utilização seja necessário investimento em recursos humanos especializados.

Para além da necessidade de preservação do material genético viral, contribuindo para um diagnóstico adequado, é importante também a quantificação do material genético humano, utilizado como um controle interno. De acordo com as especificações do kit de amplificação GeneFinder™ COVID-19 Fast RealAmp, o CT do controle interno é válido quando o valor é igual ou abaixo de 35. O controle interno é um RNA humano que necessariamente deve ser detectado, pois representa a presença de células do indivíduo. A detecção do controle interno garante que os procedimentos pré-analíticos como coleta, transporte e conservação

do material a ser analisado foram realizados de forma adequada. As tabelas 12, 13 e 14 mostram os CTs do controle interno para amostras conservadas tanto em salina quanto em etanol em temperaturas ambiente e de geladeira, quando intervalos específicos de CTs para o gene E viral foram estabelecidos.

Tabela 13. CTs do controle interno para amostras conservadas em salina e etanol, em temperatura ambiente ou de geladeira, para CTs do gene E (viral) menor que 20, armazenadas por até 12 dias. Método de extração comercial.

Conservante/ Temperatura	Controle	2d	4d	6d	8d	10d	12d
Salina/ Ambiente	31,73± 0,18	32,89± 0,13	34,93± 0,36*	36,69± 0,05*	38,55± 0,21*	39,37± 0,97*	40,60± 1,24*
Etanol/ Ambiente	31,57± 0,21	31,71± 0,23	31,25± 0,05	31,05± 0,32	31,10± 0,32	31,14± 0,44	31,72± 0,3
Salina/ Geladeira	31,73± 0,18	32,03± 0,54	32,60± 0,32*	31,88± 0,09	32,19± 0,21	32,76± 0,18*	33,64± 0,12*
Etanol/ Geladeira	31,69	31,62	32,06	31,55	31,58	31,64	31,70

Três replicatas; Valores são médias ± desvio padrão ou medianas do CT do controle interno. *representa diferença estatística com relação ao controle. **CT**= cycle threshold.

Tabela 14. CTs do controle interno para amostras conservadas em salina e etanol, em temperatura ambiente ou de geladeira, para CTs do gene E (viral) entre 20-30, armazenadas por até 12 dias. Método de extração comercial.

Conservante/ Temperatura	Controle	2d	4d	6d	8d	10d	12d
Salina/ Ambiente	32,76± 0,38	33,56± 0,31	34,56± 0,16*	35,63± 0,19*	35,97± 0,33*	36,89± 0,78*	36,99± 0,08*
Etanol/ Ambiente	32,42± 0,14	32,88± 0,26	32,61± 0,36	32,80± 0,40	32,52± 0,43	34,00± 1,01	33,24± 0,58
Salina/ Geladeira	32,76± 0,38	33,03± 0,04	32,99± 0,27	33,31± 0,09	33,49± 0,33	33,90± 0,40*	34,22± 0,29*
Etanol/ Geladeira	32,42± 0,14	32,86± 0,08*	32,55± 0,11	32,78± 0,10	33,28± 0,18*	32,96± 0,29*	32,87± 0,28*

Três replicatas; Valores são médias ± desvio padrão do CT do controle interno. *representa diferença estatística com relação ao controle. **CT**= cycle threshold.

Tabela 15. CTs do controle interno para amostras conservadas em salina e etanol, em temperatura ambiente ou de geladeira, para CTs do gene E (viral) maior que 30, armazenadas por até 12 dias. Método de extração comercial.

Conservante/ Temperatura	Controle	2d	4d	6d	8d	10d	12d
Salina/ Ambiente	32,55± 0,18	33,54± 0,33	34,78± 0,39*	35,91± 0,38*	36,47± 0,63*	37,26± 0,21*	40,03± 1,43*
Etanol/ Ambiente	32,62± 0,37	32,16± 0,17	33,16± 0,34	32,27± 0,24	32,05± 0,29	32,76± 0,83	32,34± 0,28
Salina/ Geladeira	32,55± 0,18	32,25± 0,19	33,03± 0,32	33,08± 0,10	33,17± 0,56	33,80± 0,24*	33,56± 0,30*
Etanol/ Geladeira	32,62± 0,37	32,33± 0,36	32,51± 0,52	32,13± 0,05	32,36± 0,24	32,61± 0,08	32,40± 0,73

Três replicatas; Valores são médias ± desvio padrão do CT do controle interno.

*representa diferença estatística com relação ao controle. **CT**= cycle threshold.

Após dois dias, o armazenamento da amostra conservada em salina à temperatura ambiente leva a uma redução na detecção do controle interno para quantificação por PCR em tempo real através do kit GeneFinder™ COVID-19 Fast RealAmp, pelo fato do material genético humano estar sendo degradado por condições ambientais. Para as mesmas amostras conservadas em salina, o armazenamento em geladeira pode ser feito por até 8 dias, sem prejudicar a análise do controle interno. A adição de etanol para armazenamento tanto em temperatura ambiente, quanto em temperatura de geladeira, preserva a amostra por 12 dias ou até mais, quanto o intuito é a análise do controle interno. Diante destes resultados para utilização destes métodos de preservação da amostra novo limiar de CT para o controle interno deve ser definido.

Considerando todos os resultados obtidos por este estudo a preservação da amostra em salina fisiológica à temperatura ambiente pode ser uma estratégia de escolha para o diagnóstico do SARS-CoV-2, definindo-se um novo limiar de CT para o controle interno. Um estudo avaliou nos períodos de 8, 16 e 24 horas amostras de secreção coletada usando swab nasofaríngeo e orofaríngeo de SARS-CoV-2 nas temperaturas de 30°C e 37°C e após esse período foi demonstrado que houve pouca degradação do RNA viral (34), corroborando nossos resultados. Estes resultados podem trazer impactos importantes no

diagnóstico de SARS-CoV-2, uma vez que o protocolo atual do ministério da saúde exige acondicionamento em temperatura de 2 a 8°C até o processamento.

Um outro ponto importante é que em locais onde os sistemas de transporte e armazenamento são precários, os resultados deste estudo asseguram a qualidade da amostra e oferecem uma alternativa ao protocolo atualmente utilizado.

O protocolo do Ministério da Saúde recomenda o congelamento das amostras caso o processamento destas não ocorra em 72 horas. A tabela 15 mostra os resultados da quantificação da carga viral de SARS-CoV-2 em amostras congeladas e descongeladas sucessivamente e também o resultado do uso do TRIzol™ e Beta-mercaptoetanol no mesmo processo.

Tabela 16: Carga viral do SARS-CoV-2 obtida após descongelamento das amostras por até 4 vezes, conservadas em solução salina 0,9% e em trizol e beta-mercaptoetanol.

Controle	Salina	Trizol + Beta	Descongelamento
6752±673 (29,58)	3579±238* (30,54)	5510±870* (29,86)	1X
	3349±174* (30,65)	5625±1212 (29,84)	2X
	2688±454* (31,02)	6465±476 (29,59)	3X
	2316±215* (31,25)	6855±310 (29,49)	4X

Três replicatas; Valores são média de carga viral em cópias/mL ± desvio padrão. Entre parênteses, valores da média de CTs. Controle: amostra armazenada em salina fisiológica a 2 a 8°C *representa diferença significativa com relação ao controle (P = <0,001). CT= cycle threshold.

Estes resultados mostram que o congelamento da amostra leva à perdas na quantificação quando comparado ao processamento da amostra fresca e isso se intensifica a medida que este congelamento ocorre sucessivas vezes. Uma explicação para este fenômeno é que o congelamento rompe a membrana das células e dos vírus, liberando as endonucleases (RNases), que degradam o material genético a ser quantificado (35,36). A adição de TRIzol™ e Beta-mercaptoetanol se mostrou eficaz na preservação da amostra, reduzindo as diferenças

significativas com relação a quantificação quando estas são congeladas, pois estes reagentes têm a capacidade de manter a integridade do RNA por inibir a atividade de RNAses.

Como mostrado neste estudo, a conduta de congelamento não se configura como melhor opção para o armazenamento da amostra por um período mais longo, principalmente quando há a necessidade de se fazer uma análise quantitativa, havendo outras opções mais adequadas como somente o armazenamento em temperatura de geladeira ou ainda a adição de etanol 70%.

Para a rotina diagnóstica quantitativa, onde a carga viral é de extrema importância para o manejo/monitoramento do paciente, congelamentos sucessivos de amostras em solução fisiológica prejudicam uma quantificação mais fidedigna. Por outro lado, para uma análise qualitativa (presença ou ausência do vírus), o congelamento pode ser realizado, ainda que, com os nossos resultados o congelamento das amostras tem se mostrado uma opção menos adequada do que o armazenamento da amostra no frasco de coleta original à temperatura ambiente.

6. Conclusões

- ✓ A opção mais adequada para a detecção do RNA do SARS-CoV-2 é realizar a conservação em salina fisiológica em temperatura ambiente.
- ✓ A adição de TRIzol™ e Beta-mercaptoetanol amenizam os impactos na quantificação viral acarretados pelo congelamento e descongelamento da amostra, podendo ser utilizado quando se fizer necessário ciclos de congelamento-descongelamento de amostras.
- ✓ O método “*in house*” desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu se mostrou equivalente ao comercial para análises qualitativas.

Em termos gerais, este estudo pode levar a modificações importantes nas condutas de transporte e armazenamento de amostras de secreção naso-orofaríngea para o diagnóstico de SARS-CoV-2 por meio de PCR em tempo real, contribuindo para a otimização desta logística em locais onde estes aspectos são comprometidos por diversos motivos.

	HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA		43
			CÓDIGO PADRÃO Nº: LBM001
			LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR ROTINAS DIAGNÓSTICAS
NOTA TÉCNICA			COVID-19

NOTA TÉCNICA

Laboratório de Biologia Molecular

Nº01
31/03/22

Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu

ASSUNTO: ACONDIONAMENTO E TRANSPORTE DE AMOSTRAS PARA O
DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO DE SARS-CoV-2

1-AMOSTRA: Secreção Naso e Orofaríngea.

2-Volume: em dois mL de salina fisiológica 0,9% acondicionar os três swabs de rayon utilizados para coleta da secreção, sendo dois nasais e um da orofaringe.

3-Acondicionamento e Transporte: Acondicionar os tubos de coleta em uma caixa de transporte de paredes rígidas e identificada como material de risco biológico à temperatura de 25°C e, transportar ao laboratório executor em até cinco dias.

Elaboração: Lia Ayumi Umezawa

Laboratório de Biologia Molecular do HCFMB

Revisão: Rejane Maria Tommasini Grotto

Laboratório de Biotecnologia Aplicada

Núcleo de Pesquisa – HCFMB

7. Referências

1. Lu H, Stratton CW, Tang YW. Outbreak of pneumonia of unknown etiology in Wuhan, China: The mystery and the miracle. *Journal of Medical Virology*. 2020.
2. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*. 2020;
3. Cucinotta D, Vanelli M. WHO declares COVID-19 a pandemic. *Acta Biomedica*. 2020.
4. Saúde MDA. Boletim epidemiológico especial. 2022;
5. Boni MF, Lemey P, Jiang X, Lam TT-Y, Perry BW, Castoe TA, et al. Evolutionary origins of the SARS-CoV-2 sarbecovirus lineage responsible for the COVID-19 pandemic. *Nat Microbiol* [Internet]. 2020;5(11):1408–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32724171>
6. Pereira A, Tomé da Cruz KA, Sousa Lima P. PRINCIPAIS ASPECTOS DO NOVO CORONAVÍRUS SARS-CoV-2: UMA AMPLA REVISÃO. *Arq do Mudi* [Internet]. 2021 Apr 16;25(1):73–90. Available from: <https://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ArqMudi/article/view/55455>
7. Wang M-Y, Zhao R, Gao L-J, Gao X-F, Wang D-P, Cao J-M. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2020;10:587269. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33324574>
8. Hussain A, Kaler J, Tabrez E, Tabrez S, Tabrez SSM. Novel COVID-19: A Comprehensive Review of Transmission, Manifestation, and Pathogenesis. *Cureus*. 2020;
9. Lima LNGC, Sousa MS de, Lima KVB. As descobertas genômicas do SARS-CoV-2 e suas implicações na pandemia de COVID-19 TT - The genomic discoveries of SARS-CoV-2 and their implications for the COVID-19 pandemic. *J Heal Biol Sci*. 2020;
10. Hartenian E, Nandakumar D, Lari A, Ly M, Tucker JM, Glaunsinger BA. The molecular virology of coronaviruses. *J Biol Chem* [Internet]. 2020;295(37):12910–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32661197>

11. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*. 2020;
12. Naqvi AAT, Fatima K, Mohammad T, Fatima U, Singh IK, Singh A, et al. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. 2020.
13. V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2021;19(3):155–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33116300>
14. Cantuti-Castelvetri L, Ojha R, Pedro LD, Djannatian M, Franz J, Kuivanen S, et al. Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity. *Science* [Internet]. 2020;370(6518):856–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33082293>
15. Daly JL, Simonetti B, Klein K, Chen K-E, Williamson MK, Antón-Plágaro C, et al. Neuropilin-1 is a host factor for SARS-CoV-2 infection. *Science* [Internet]. 2020;370(6518):861–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33082294>
16. Mayi BS, Leibowitz JA, Woods AT, Ammon KA, Liu AE, Raja A. The role of Neuropilin-1 in COVID-19. *PLoS Pathog* [Internet]. 2021;17(1):e1009153. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33395426>
17. Romano M, Ruggiero A, Squeglia F, Maga G, Berisio R. A Structural View of SARS-CoV-2 RNA Replication Machinery: RNA Synthesis, Proofreading and Final Capping. *Cells* [Internet]. 2020;9(5). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32443810>
18. Wang Y, Wang Y, Chen Y, Qin Q. Unique epidemiological and clinical features of the emerging 2019 novel coronavirus pneumonia (COVID-19) implicate special control measures. *Journal of Medical Virology*. 2020.
19. Gu J, Han B, Wang J. COVID-19: Gastrointestinal Manifestations and Potential Fecal–Oral Transmission. *Gastroenterology*. 2020.
20. Lai CC, Shih TP, Ko WC, Tang HJ, Hsueh PR. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): The epidemic and the challenges.

International Journal of Antimicrobial Agents. 2020.

21. BRASIL. Protocolo de Manejo Clínico da Covid-19 na Atenção Especializada. Ministério da Saúde. 2020. 48 p.
22. Aleem A, Akbar Samad AB, Slenker AK. Emerging Variants of SARS-CoV-2 And Novel Therapeutics Against Coronavirus (COVID-19) [Internet]. StatPearls. 2022. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34033342>
23. Liu Q, Qin C, Liu M, Liu J. Effectiveness and safety of SARS-CoV-2 vaccine in real-world studies: a systematic review and meta-analysis. Infect Dis poverty [Internet]. 2021 Nov 14;10(1):132. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34776011>
24. Peng L, Liu J, Xu W, Luo Q, Chen D, Lei Z, et al. SARS-CoV-2 can be detected in urine, blood, anal swabs, and oropharyngeal swabs specimens. J Med Virol. 2020;
25. Chen L, Zhao J, Peng J, Li X, Deng X, Geng Z, et al. Detection of SARS-CoV-2 in saliva and characterization of oral symptoms in COVID-19 patients. Cell Prolif. 2020;
26. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica: Emergência de Saúde Pública de Importância Nacional pela COVID-19 [Internet]. Vol. 1. 2022. 1–131 p. Available from: www.saude.gov.br
27. Centers for Disease Control and Prevention. Interim Guidelines for Collecting and Handling of Clinical Specimens for COVID-19 Testing [Internet]. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html>
28. Summer S, Schmidt R, Herdina AN, Krickl I, Madner J, Greiner G, et al. Detection of SARS-CoV-2 by real-time PCR under challenging pre-analytical conditions reveals independence of swab media and cooling chain. Sci Rep [Internet]. 2021;11(1):13592. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34193912>
29. Garnett L, Bello A, Tran KN, Audet J, Leung A, Schiffman Z, et al. Comparison analysis of different swabs and transport mediums suitable for SARS-CoV-2 testing following shortages. J Virol Methods. 2020;
30. Minich JJ, Ali F, Marotz C, Belda-Ferre P, Chiang L, Shaffer JP, et al. Feasibility of using alternative swabs and storage solutions for

paired SARS-CoV-2 detection and microbiome analysis in the hospital environment. medRxiv. 2020.

31. Xiling G, Yin C, Ling W, Xiaosong W, Jingjing F, Fang L, et al. In vitro inactivation of SARS-CoV-2 by commonly used disinfection products and methods. *Sci Rep* [Internet]. 2021;11(1):2418. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33510320>
32. Takeda Y, Jamsransuren D, Makita Y, Kaneko A, Matsuda S, Ogawa H, et al. Inactivation Activities of Ozonated Water, Slightly Acidic Electrolyzed Water and Ethanol against SARS-CoV-2. *Molecules* [Internet]. 2021 Sep 8;26(18). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34576934>
33. Krafft AE, Russell KL, Hawksworth AW, McCall S, Irvine M, Daum LT, et al. Evaluation of PCR testing of ethanol-fixed nasal swab specimens as an augmented surveillance strategy for influenza virus and adenovirus identification. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2005 Apr;43(4):1768–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15814997>
34. Marchionatti A, Rodrigues FVF, Damasceno APK, ... Parâmetros para transporte e armazenamento de amostras para detecção de SARS-CoV-2 por RT-PCR. *Rev da AMRIGS* [Internet]. 2021;65(1):52–7. Available from: <https://www.amrigs.org.br/assets/images/upload/pdf/jornal/1625675724.pdf#page=54>
35. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* [Internet]. 1987 Apr;162(1):156–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2440339>
36. Mommaerts K, Sanchez I, Betsou F, Mathieson W. Replacing β -mercaptoethanol in RNA extractions. *Anal Biochem* [Internet]. 2015 Jun 15;479:51–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25841674>