

#### ANEXO 4.

##### PROCESAMIENTO MUESTRA DE ORINA Y SUERO PARA LA DETECCIÓN DEL BIOMARCADOR sRNA DE *Mycobacterium tuberculosis*

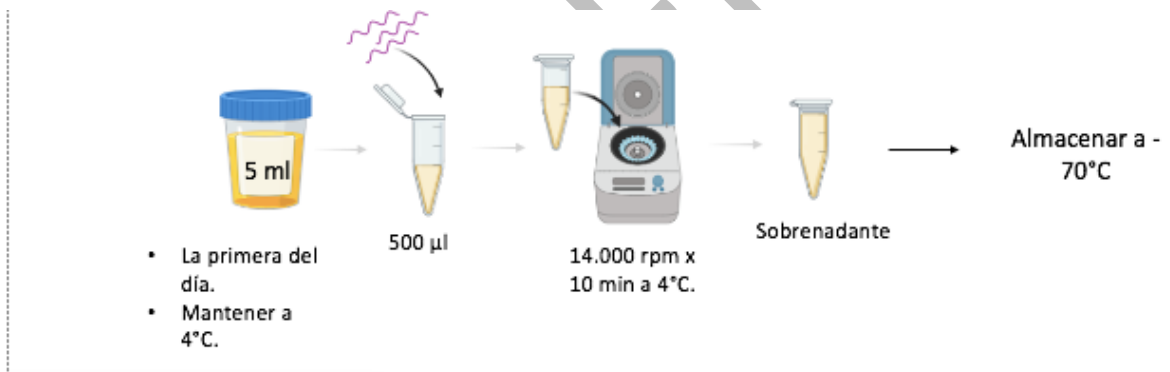
##### Protocolo para detección del sRNA de MTB circulante en fluidos biológicos: Suero, orina, líquido cefalorraquídeo

Se establecieron dos métodos que permiten una buena recuperación de RNAs pequeños de muestras biológicas de orina y suero.

El primero de ellos, involucra un Kit desarrollado por Zymo Research que tiene como fundamento el empleo de dos columnas, la primera remueve los RNAs largos y la segunda, concentra los RNAs pequeños.

El segundo, es un metodo in house, que estamos todavía implementando en CorpoGen que utiliza perlas magnéticas para purificar los RNAs pequeños.

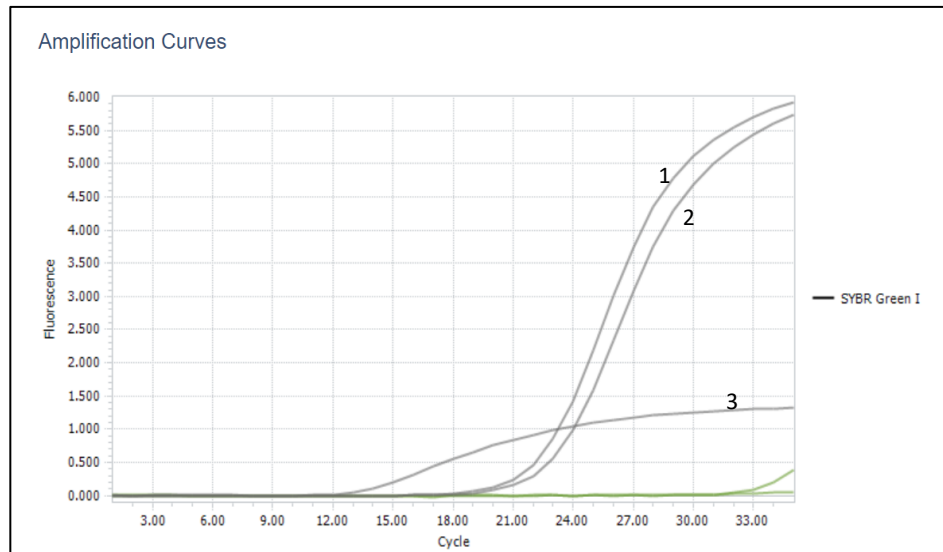
Para estos ensayos se emplearon muestras biológicas (orina y suero) que fueron contaminadas con una concentración conocida del RNA total, expresado en el plásmido pBADIII-sRNA, según el esquema adjunto.



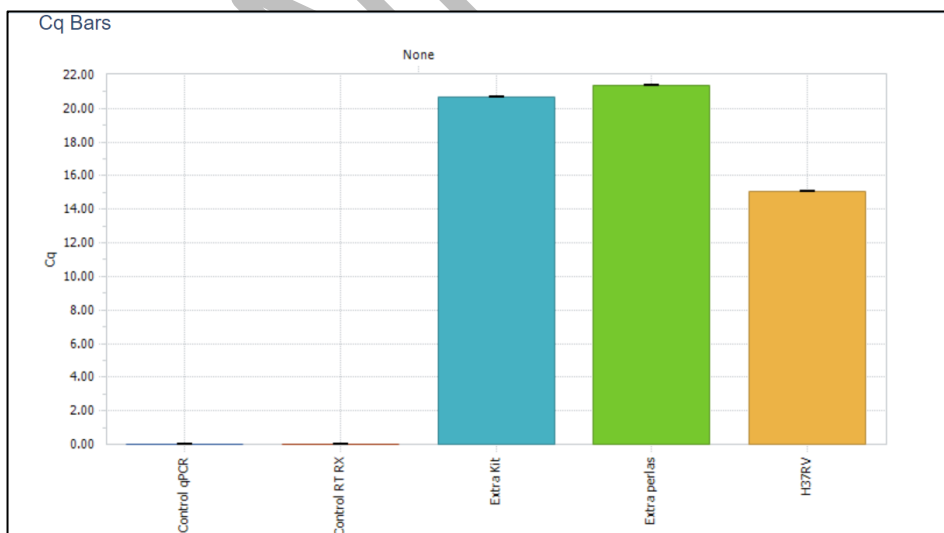
Las muestras fueron inoculadas con una concentración final de 1,6 ng/ml del RNA total (1,6 pg/µl). Se dividieron en dos alícuotas de 500 µl cada una para ser extraídas con los dos métodos, se centrifugaron a 14.000 rpm por 10 minutos, y el sobrenadante se empleó para la extracción.

1. Se empleó el kit Quick-cfRNA™ Serum & Plasma Kit (ZYMO, el cual consiste en: Digestión de proteínas, precipitación del RNA, unión del RNA a la columna, lavados y finalmente elución, siguiendo las recomendaciones del fabricante.
2. La extracción de RNA por medio del método *In house* se hizo también partiendo del mismo volumen de muestra inoculada con el transcrito. Para ello, se agregaron 50 µl de Buffer de lisis (1X) (CorpoGen) a 450 µl de sobrenadante de la muestra biológica, luego se incubó a 95°C por 10 min, se centrifugó a 12.000 rpm/ 3 min y se tomó el sobrenadante. La extracción se realizó con perlas magnéticas y finalmente se eluyó en 20 µl de H<sub>2</sub>O DEPC. Una vez extraído el ARN de cada una de las muestras por ambos métodos de extracción, se prosiguió

con la detección del biomarcador mediante la técnica RT- qPCR, de acuerdo a las condiciones previamente estandarizadas.



Curva de amplificación (número de ciclos frente a fluorescencia -  $\Delta RN$ ) del RNA total extraído. En la grafica de barras se muestran los resultados de: (1) Control negativo de la qPCR; (2) Control de Transcriptasa Reversa; (3) El Quick-cfRNA™ Serum & Plasma Kit (ZYMO); (4) I método *In house* con perlas magnéticas; (5) control positivo correspondiente a la cepa H37RV de *M.tuberculosis*. Se muestran los resultados con la muestra de orina.



All Data				
Color	Position	Sample Name	Gene Name	Cq
	C10	H37RV	None	15.08
	D3	Extra perlas	None	21.39
	E3	Extra Kit	None	20.71
	F10	Control RT RX	None	
	G7	Control qPCR	None	

Protocolo para la detección del biomarcador sRNA de MTB en muestras que contengan el bacilo vivo: esputo, jugo gástrico, lavado bronqueoalveolar, líquido pleural

En muestras biológicas en donde MTB este presente, el protocolo establecido es el siguiente.

-El esputo decontaminado mediante NALC-NaOH es almacenado a -4°C hasta procedimiento de inducción de los biomarcadores

-Aproximadamente 16 horas antes de realizar la inducción, el esputo se colocan a temperatura ambiente sin agitación

-1 ml del esputo decontaminado es removido y centrifugado a 3.500 rpm por 15 minutos

-El sobrenadante es removido completamente, teniendo en cuenta de no arrastrar el pellet

-La muestra se resuspende muy bien en 100 µl de la mezcla del inductor en el buffer desarrollado por CorpoGen

-La inducción se deja transcurrir por 4 horas a temperatura ambiente

-Transcurrido este tiempo, la muestra se centrifuga a 13.000 rpm por 5 minutos y 50 µl son empleados para la detección del biomarcador mediante qRT-PCR