

Detección de SARS-CoV-2 por LAMP colorimétrico

jueves, 28 de julio de 2022 10:45 (15 actas)

En el método LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) se amplifican secuencias específicas de ADN en condiciones isotérmicas, empleando una ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de hebra y cebadores para la región de interés. Combinada con transcripción reversa la técnica permite amplificar secuencias de ARN (RT-LAMP). Desde el 2000 se ha utilizado para diagnóstico de diversos patógenos en muestras clínicas: en 2004 para detectar SARS-CoV y desde 2019 se aplica al diagnóstico de SARS-CoV-2. El objetivo de este trabajo fue optimizar un método diagnóstico de SARS-CoV-2 por RT-LAMP que complemente a la RT-qPCR y pueda trasladarse a contextos que requieran un diagnóstico rápido y donde el equipamiento y/o recursos humanos necesarios para RT-qPCR no estén disponibles. Como resultado, se puso a punto un ensayo de amplificación de fragmentos de los genes E, N y ORF1a de SARS-CoV-2; y RNAsaP y actina humanos como control, con detección colorimétrica utilizando rojo fenol (colorante sensible a cambios de pH producto de la amplificación). El límite de detección analítico usando ARN transcripto in vitro es de 100 moléculas de cada uno de los genes. Utilizando un panel de muestras positivas y negativas para SARS-CoV-2 se determinó que el límite de detección en muestras clínicas equivale a un Ct = 33 por RT-qPCR, y no hubo ningún falso positivo. El análisis in silico de los cebadores reveló que no hibridarían con otros genomas virales (causantes de enfermedades respiratorias), siendo entonces la especificidad teórica del 100%. Como en el diagnóstico por RT-qPCR, la muestra empleada es ARN purificado de muestras de hisopado nasofaríngeo u orofaríngeo. Estudios preliminares indican que eliminar la extracción de material genético previo a RT-LAMP disminuye la sensibilidad y que los resultados son heterogéneos usando saliva como muestra alternativa. El uso de esta técnica ha sido transferido con éxito a varios hospitales del país.

Palabras clave

LAMP, diagnóstico, amplificación isotérmica, RT-qPCR

Características de la colaboración

Este trabajo se generó a partir de autor/es y coautor/es clave que comenzaron a colaborar a consecuencia de la pandemia

Interinstitucionalidad

Si

Interdisciplina

Si

Autores primarios: ROMANELLI, Laura (Laboratorio de Biología de Gusanos, Unidad mixta Facultad de Química-IPMon.); BONILLA CHAO, Mariana (Laboratorio de Biología Redox de Tripanosomátidos, IPMon. - Laboratorios de Enzimología y Físicoquímica Biológica, Facultad de Ciencias.); PÓRFIDO, Jorge (Laboratorio de Biología de Gusanos, Unidad mixta Facultad de Química-IPMon.); COMAS, Rosina (Laboratorio de Biología de Gusanos, Unidad mixta Facultad de Química-IPMon.); FAJARDO, Álvaro (Laboratorio de Evolución Experimental de Virus, Facultad de Ciencias-IPMon.); MORENO, Pilar (Laboratorio de Evolución Experimental de Virus, Facultad de Ciencias-IPMon.); SALINAS, Gustavo (Laboratorio de Biología de Gusanos, Unidad mixta Facultad de Química-IPMon.)

Presentador: BONILLA CHAO, Mariana (Laboratorio de Biología Redox de Tripanosomátidos, IPMon. - Laboratorios de Enzimología y Físicoquímica Biológica, Facultad de Ciencias.)

Clasificación de la sesión: Eje 6_5 Innovación y desarrollo: APLICACIONES DE BIOLOGÍA. Mesa de discusión

Clasificación de pistas: .