



Validação de protocolos colorimétricos de LAMP no diagnóstico de Covid-19 na região do Alto Paranaíba, Minas Gerais

PEREIRA, S. S. N.¹; KAVALCO, K. F.¹; PASA, R.¹; SILVA, N. V. R.¹; MENEGÍDIO, F. B.².

1 - Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Viçosa, *campus* Rio Paranaíba, Laboratório de Diagnósticos Moleculares, samyra.pereira@ufv.br, kavalco@ufv.br, rpassa@ufv.br, natalia.verissimo@ufv.br.

2 - Externo, fmenegidio@gmail.com.

Trabalho de Pesquisa

Palavras-chave: coronavírus; diagnósticos moleculares; SARS-CoV-2;

Introdução

A maior oferta de testes à população é uma das melhores alternativas para um governo organizar a estratégia de combate à COVID-19, como a definição de períodos e intensidade da quarentena, reduzindo os impactos negativos na economia e diminuindo a taxa de transmissão do vírus (Marcel et al., 2020). LAMP, ou amplificação baseada em loop, é uma técnica que tem sido utilizada em diversas áreas da ciência, porém ainda pouco explorada para diagnóstico do novo coronavírus (SARS-CoV-2), a despeito de seu baixo custo e facilidade de aplicação. O diagnóstico por LAMP é relativamente simples, rápido e demanda equipamentos baratos, uma vez que seu resultado pode ser visualizado a olho nu, e portanto, tem potencial de popularizar-se entre os testes moleculares para detecção viral.

Objetivo

Validar um protocolo LAMP para diagnóstico de SARS-CoV-2.

Material e Métodos

Utilizamos 20 amostras que haviam sido testadas no Laboratório de Diagnósticos Moleculares da UFV para o SARS-CoV-2 por RT-PCR através do kit Allplex™ 2019-nCov Assay (Seegene), com resultados variando entre “detectado e não detectado”. As réplicas dos testes incluíram três condições iniciais com relação às amostras utilizadas: (1) alíquotas que não passaram por extração do RNA, (2) RNA oriundo de extração automatizada e (3) RNA oriundo de extração rápida manual.

Para o RNA proveniente da extração automatizada, testamos a concentração de 3uL na reação. Para as demais testamos as concentrações de 5uL e 10uL. Nas reações de LAMP utilizamos o kit WarmStart LAMP colorimétrico de acordo com as instruções do fabricante (Zhang et al., 2020) e dois conjuntos de primers (LAMB e YU), sendo cada conjunto composto por seis primers. Logo, cada uma das 20 amostras foi testada separadamente para cada conjunto de primers e diferentes condições, gerando um volume total de 200 testes. Os resultados das reações de LAMP foram observados visualmente pela alteração da cor do meio, de rosa para amarelo, quando positivos. Ao fim dos testes, os resultados de LAMP foram comparados aos de RT-PCR para verificar a precisão dessa técnica.

Bibliografia

Marcel, S. et al. (2020) COVID-19 epidemic in Switzerland: on the importance of testing, contact tracing and isolation. *Swiss Med Wkly* 150:w20225
Zhang, Y. et al. (2020) Rapid Molecular Detection of SARS-CoV-2 (COVID-19) Virus RNA Using Colorimetric LAMP. *Medrxiv* <https://doi.org/10.1101/2020.02.26.20028373>

Conjunto do primer	Sequências dos primers utilizados na reação de LAMP (5' -> 3')	
	LAMB	Yu
FIP	AGA GCA GCA GAA GTG GCA CAG GTG ATT GTG AAG AAG AAG AG	AGG TGA GGG TTT TCT ACA TCA CTA TAT TGG AAC AAG CAA AIT CTA TGG
BIP	TCA ACC TGA AGA AGA GCA AGA ACT GAT TGT CCT CAC TGC C	ATG GGT TGG GAT TAT CCT AAA TGT GTG CGA GCA AGA ACA AGT G
F3	TCC AGA TGA GGA TGA AGA AGA	CCA CTA GAG GAG CTA CTG TA
B3	AGT CTG AAC AAC TGG TGT AAG	TGA CAA GCT ACA ACA CGT
LF	CTC ATA TTG AGT TGA TGG CTC A	CAG TTT TTA ACA TGT TGT GCC AAC C
LB	ACA AAC TGT TGG TCA ACA AGA C	-
LB 4	-	TAG AGC CAT GCC TAA CAT GCT

Tabela demonstrando a sequência de cada primer dentro dos conjuntos (LAMB e YU).



Figura demonstrando reações de LAMP feitas com 3uL RNA oriundo de extração automatizada. Como indicado na imagem, cada amostra foi replicada com cada conjunto de primers, seguindo o padrão representado por 1,2 e 3.

Resultados e Discussão

Tanto nos testes de LAMP feitos com alíquotas das amostras que não passaram por extração, quanto com RNA proveniente de extração rápida não houve modificação de coloração do meio, indicando RNA insuficiente ou a presença de impurezas que impediram a reação. Nos testes feitos com o RNA da extração automatizada foi possível observar os resultados mesmo aplicando-se somente 3uL de RNA, sendo estes compatíveis com os obtidos por RT-PCR em 90% dos casos, uma vez que uma amostra teve diagnóstico negativo por LAMP, quando foi positivo por RT-PCR, e outra foi inconclusivo, quando foi negativo na RT-PCR. A divergência no diagnóstico que deveria ser positivo pode ter ocorrido pela presença de cópias insuficientes do RNA viral para a detecção.

Conclusões

Verificamos boa sensibilidade e fidelidade do teste e sua aplicabilidade no diagnóstico de SARS-CoV-2, a depender da qualidade do RNA usado na reação e da quantidade de cópias do RNA viral presentes na amostra, ou ainda do aprimoramento do método. Este seria um método vantajoso em virtude da diminuição do tempo e recursos gastos para o diagnóstico molecular da COVID-19, possibilitando maior oferta de testes à população.

Apoio Financeiro