



Pruebas moleculares diagnósticas de SARS-COV-2: fundamentos

>>> Desde el comienzo de la pandemia hasta la actualidad existen 134 kits aprobados por el ANMAT para el diagnóstico molecular para SARS-CoV-2, de los cuales el 48% son pruebas moleculares con detección de genes codificados por el RNA viral y los restantes son test serológicos. En la siguiente revisión se analizan las técnicas de biología molecular utilizadas y sus fundamentos.

>>> AUTORES

Ayesa, María Florencia (1,3) ; Gómez Nidia Noemí (2) y Varas Silvia Mabel (3)

1-Alumna 5to año carrera Licenciatura en Bioquímica, FQByF. Universidad Nacional de San Luis (UNSL).

E-mail: ayesa.florencia@gmail.com

2-. Laboratorio de Morfofisiología, Facultad de Química Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional de San Luis (UNSL). IMIBIO-SL (CONICET).

E-mail: gomez.nidia@gmail.com

3- Área de Química Biológica. Curso: Técnicas moleculares aplicadas al diagnóstico bioquímico. Facultad de Química Bioquímica y Farmacia. Uni-

versidad Nacional de San Luis (UNSL).

E-mail: silvia.varas@gmail.com

>>> RESUMEN

Introducción: en cuestión de semanas estuvieron disponibles pruebas de diagnóstico molecular para SARS-CoV-2 aplicando técnicas usadas en investigación básica.

Metodología: La revisión de la literatura se realizó a través de búsquedas en la Base de Datos Cochrane y PubMed-MEDLINE, **LitCovid**, **CDC** y páginas oficiales del ANMAT hasta el 8 de agosto de 2020.

Resultados: hay 134 kits aprobados por el ANMAT de los cuales el 48% son pruebas moleculares con detección de genes codificados por el RNA viral y

Tecnología escalable que acompaña su crecimiento

Módulo WEB, parte de la familia de NextLAB, que permite gestionar amigablemente a Pacientes, Doctores y Laboratorios derivantes



- Consulta de Resultados on line
- Ingresar órdenes en entorno Web
- Solicitar análisis a pie de cama



Detalle del módulo WEB.
Concentra la información del laboratorio en un solo sitio de internet.

p-WEB Brinda la posibilidad para que el paciente, desde cualquier lugar, acceda a sus resultados/ descargar/ imprimir, ingresando un usuario y clave de acceso.

i-WEB Módulo que permite la solicitud a pie de cama de nuevos análisis.

d-WEB Permite administrar la carga, el seguimiento y el resultado, siendo la mejor herramienta para los laboratorios derivantes.



SOFTWARE INTELIGENTE

NextLAB BY Genetics S.A

Av. del Libertador 8630 6to Piso"1"

C1429EIB Núñez Buenos Aires

T. (+5411)52 63 02 75 Rot

F. (+5411)52 63 02 75 Ext 100

info@nextlab.com.ar

los restantes son test serológicos. Se analizaron los fundamentos de las técnicas moleculares que están siendo usadas.

Conclusiones: Existen una serie de técnicas de amplificación isotérmica que son usadas en los test de diagnóstico asociados a ensayos de CRISP-Cas y/o a ensayos de difusión lateral.

Palabras claves: Amplificación Isotérmica, RT-LAMP, ensayo de difusión lateral, CRISP-Cas

>>> INTRODUCCIÓN

La pandemia de COVID-19, causada por el virus SARS-CoV-2 produjo a nivel mundial 17.918.582 casos confirmados de COVID-19 (9.630.598 pertenecen a las Américas), con 686.703 muertes, datos aportados por la OMS al 3 de agosto de 2020 (1).

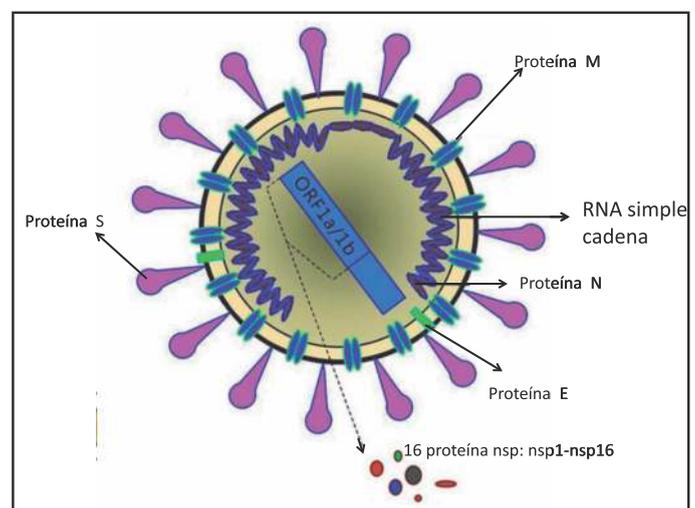
En nuestro país el total de casos confirmados es de 201.919 (49,2% mujeres y 50,8% hombres) con 3813 muertes (2). En Argentina, desde el 17-3-2020, se han unido institutos científicos, universidades y empresas para desarrollar y producir kits diagnósticos de fabricación nacional, que sumado a docenas de kits extranjeros constituyen una respuesta rápida para el diagnóstico del COVID-19. El acceso a las pruebas de diagnóstico permite: detección de pacientes con enfermedad activa, detección de portadores asintomáticos, control de la propagación y contagio a personas de riesgo, seguimiento y encapsulamiento de brotes. Los enfoques de las pruebas actuales se dividen en dos categorías: detección del ácido nucleico viral o pruebas serológicas. Las pruebas de ácido nucleico sondan directamente el ARN de los virus extraídos de la garganta o del conducto nasal de un paciente, mientras que las pruebas serológicas detectan anticuerpos presentes en el suero del paciente. Durante los primeros días de infección, los títulos virales de los pacientes son altos y un solo hisopo nasofaríngeo puede albergar cerca de 1 millón de partículas virales de SARS-CoV-2. Sin embargo, la producción de anticuerpos IgG e IgM del paciente, denominada seroconversión, generalmente ocurren 5 a 10 días después del inicio de los síntomas. Por lo tanto, las pruebas de ácido nucleico ofrecen la detección más temprana y más

sensible de la presencia de SARS-CoV-2. La prueba de RT-PCR iniciada por los CDC (Centers for Disease Control and Prevention) se ha considerado el "estándar de oro" para el diagnóstico clínico, pero requiere reactivos, equipos y personal especializados (3), con lo cual han surgido otras técnicas para su diagnóstico (4). Por lo antes expuesto el objetivo de este trabajo es analizar los fundamentos de las pruebas de detección de ácidos nucleicos para esta enfermedad volcados en los kits utilizados en los laboratorios de análisis clínicos.

Estructura del virus

El SARS-CoV-2 es un coronavirus de ARN monocatenario (ssRNA) positivo envuelto. Este virus tiene una longitud de aproximadamente 30.000 nucleótidos. El genoma codifica 27 proteínas, incluida una ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp). Dos tercios de ARN viral, ubicados principalmente en el primer marco de lectura abierto (ORF 1 a/b) codifican para 16 proteínas no estructuradas (NSP) (Fig. N°1). La parte restante del genoma del virus codifica para cuatro proteínas estructurales esenciales: la glucoproteína espiga (S, de spike), la proteína pequeña de la envoltura (E), la proteína de la matriz (M) y la proteína de la nucleocápside (N) y también este virus presenta varias proteínas accesorias (Fig. 1) (5). Se sabe, cual es el número de copias de cada una de estas proteínas presentes / virión: S (100), E (20), M (2000) y N (1000) (6).

>> Figura N°1: Esquema de la estructura SA-RS-CoV-2



Ensayos moleculares para la detección de ácidos nucleicos virales

Desde que la secuencia genética completa del virus SARS-CoV-2 se cargó en la plataforma GISAID (Global Initiative on Sharing All Influenza Data) (7), la disponibilidad de la secuencia completa del virus permitió el diseño de cebadores y sondas necesarias para el desarrollo de pruebas específicas de SARS-CoV-2. Algunas de las cuales detallaremos a continuación.

1- RT-PCR en tiempo real (Retrotranscripción seguida de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa).

El proceso de diseño de una prueba de ácido nucleico para SARS-CoV-2 implicó dos pasos principales: (i) elección de la región a amplificar y diseño del cebador y (ii) optimización y prueba del ensayo. Corman y col. (8) analizaron varias secuencias del genoma viral relacionadas con el SARS y

descubrieron tres regiones que tenían secuencias conservadas: el gen *RdRP*, el gen *E* y el gen *N*. Los genes *RdRP* y *E* tenían una alta sensibilidad analítica para la detección (límite técnico de detección de 3,6 y 3,9 copias por reacción), mientras que el gen *N* presentaba una sensibilidad analítica más baja (8,3 copias por reacción).

Las etapas para las pruebas de RT-PCR, como el aprobado por los CDC y la OMS (9) incluyen tres pasos principales: recolección y transporte de muestras, lisis y purificación del ARN y amplificación. Por lo general, se recolecta la muestra con hisopo nasofaríngeo-orofaríngeo y se las transfiere a un vial conteniendo unos pocos mililitros de medio de transporte viral. De esta forma se transporta al laboratorio para su análisis. Luego, el ARN viral se purifica a partir de una fracción de la muestra usando kits de purificación de ARN basados en columnas o perlas magnéticas.

El ARN purificado eluído se amplifica

Análisis multidisciplinarios de alta complejidad.

Clínico humano
Bromatológico
Veterinario
Agronómico
Bioanalítica
Industrial y Medio Ambiente

De Bahía Blanca para todo el país.

IACA
LABORATORIOS
www.iaca.com.ar

utilizando una mezcla maestra de un solo paso que contiene RT y ADN polimerasa, con tres cebadores dirigidos a regiones específicas del genoma viral, Fig.2. Los cebadores dirigidos a un gen humano, como *RNaseP*, también se incluyen como un control positivo para los pasos del hisopado, extracción de RNA y amplificación. Los productos amplificados se pueden detectar utilizando sonda TaqMan o colorantes que se intercalan con el ADN y se establece un ciclo umbral de amplificación para distinguir los resultados positivos de los negativos. El resultado de una prueba generalmente se considera positivo si se observa amplificación para dos o más target virales, mientras que se considera negativo si se observa amplificación para el ARN control, pero no para ninguno de los target virales.

Las pruebas de diagnóstico molecular que utilizan la tecnología RT-PCR en tiempo real avalada por la OMS, van dirigidas a amplificar y detectar diferentes regiones genómicas de SARS-CoV-2. En general, los laboratorios de referencia en nuestro país están determinando los genes E, RdRP y RNaseP por esta metodología.

La RT-PCR se ha llevado a cabo tradicionalmente como un procedimiento de uno o dos pasos. La RT-PCR en tiempo real, cuando usa el procedimiento de un paso, utiliza un solo tubo que contiene los cebadores necesarios para ejecutar toda la reacción de RT-PCR y es, generalmente, el enfoque preferido para la detección de SARS-CoV-2; por ser rápido de configurar e implica un manejo limitado de la muestra, disminuyendo las posibilidades de errores de pipeteo y contaminación cruzada entre la RT y los pasos de PCR. Existen a la fecha, 65 kits basados en ácidos nucleicos aprobados en la ANMAT, para detectar el SARS-CoV-2, en donde el método más utilizado es la RT-PCR, usando muestras respiratorias (10).

El progreso en los ensayos de RT-PCR para la detección de SARS-CoV-2 se ha mejorado en forma expeditiva. Los ensayos iniciales tenían algunas limitaciones como lo que ocurría con la tasa de detección positiva, la misma era baja y rondaba en alrededor del 30 a 60%, lo que sugería una alta tasa de falsos negativos (11). Se especularon sobre varios factores que podían dar lugar a

esta alta tasa de falsos negativos, como: errores en el muestreo, selección inapropiada de muestras clínicas, variaciones individuales en la carga viral, entre otras, (12).

2- Amplificación Isotérmica de ácidos nucleicos

La amplificación isotérmica de los ácidos nucleicos es una alternativa que permite la amplificación a una temperatura constante y elimina la necesidad de un termociclador. Por lo tanto, se han desarrollado varios métodos basados en este principio. Estas técnicas incluyen: amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), amplificación de la recombinasa polimerasa (RPA), amplificación dependiente de helicasa (HDA), amplificación mediada por transcripción (TMA), entre otras (13).

2.1- Amplificación de la recombinasa polimerasa (RPA): En RPA, la amplificación isotérmica de fragmentos de ADN específicos se logra mediante la unión de cebadores oligonucleotídicos complementarios al ADN molde y la extensión por una ADN polimerasa (14). La fusión o melting de la cadena no es necesaria porque RPA emplea complejos primer-recombinasa ideados para escanear ADN bicatenario y facilitar la unión a la cadena en sitios complementarios. Las estructuras resultantes se estabilizan mediante proteínas de unión al ADN simple cadena que interactúan con la hebra desplazada, evitando así la expulsión del cebador por migración a la cadena ramificada. El desmontaje de la recombinasa deja el extremo 3' del oligonucleótido accesible para el acceso de la Bsu-ADN polimerasa del *Bacillus subtilis* y se produce la extensión del cebador. La amplificación exponencial se logra mediante la repetición cíclica de este proceso, figura N°3. La clave de RPA es el establecimiento de un entorno de reacción dinámico en donde hay un equilibrio entre el montaje y el desmontaje del complejo primers-recombinasa. La recombinasa que se ha usado es T4 UvsX (del fago T4) que se une cooperativamente a los primers en presencia de ATP. El complejo de nucleoproteína resultante hidroliza ATP favoreciendo el desmontaje espontáneo de la recombinasa. Esto conduce a su reemplazo por una proteína de unión al ADN monocatenario (T4 gp32), necesaria para la reacción.



PORQUE UN DIAGNÓSTICO PRECISO NECESITA RESULTADOS CONFIABLES.

Nuestro laboratorio integral está al servicio del profesional, brindando resultados confiables y asesoramiento en su interpretación, facilitando información precisa para colaborar en el diagnóstico, seguimiento y prevención de las enfermedades.

Nuestro compromiso: brindar un servicio personalizado a través de un equipo de especialistas, cumplir con los más exigentes estándares de calidad, y garantizar confiabilidad y exactitud en los resultados.

/ Biología Molecular / Hematología y Hemostasia / Microbiología / Endocrinología
/ Citometría de Flujo / Inmunoserología / Química Clínica / Virología



Consultar alcance en
www.oaa.org.ar



RIQAS



PLANTA DE LABORATORIO
Av. Scalabrini Ortiz 676

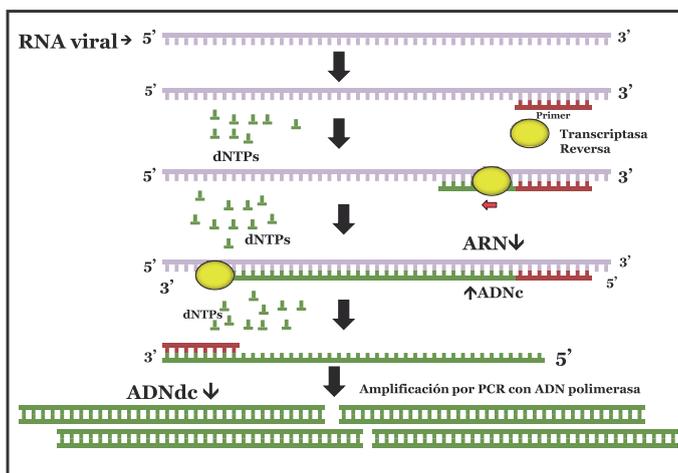
DPTO. COMERCIAL
4858-7061 al 63
laboratorio@stamboulian.com.ar

2206-6000

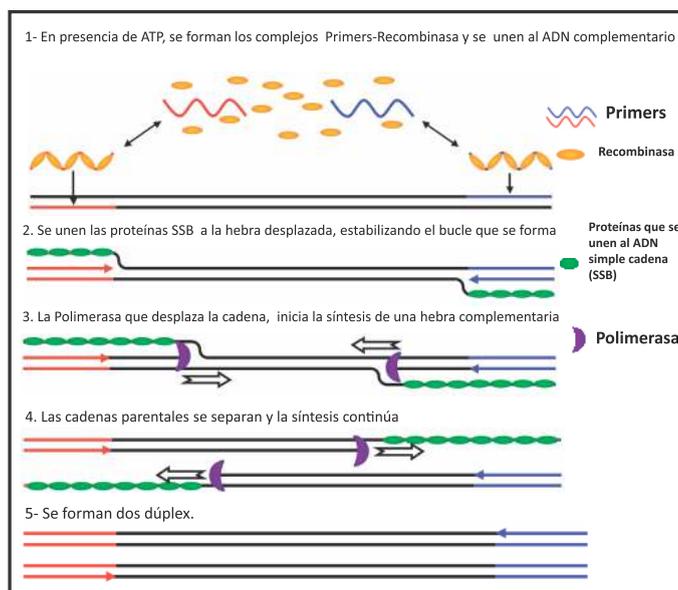
WWW.STAMBOULIAN.COM.AR

STAMBOULIAN
SERVICIOS DE SALUD

>> Figura N°2: La prueba estándar de oro: RT-PCR. La mayoría de las pruebas que se están implementando contra COVID-19 se basan en la reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción (RT-PCR). La RT-PCR crea una copia de ADNc de un segmento específico del ARN viral, que se convierte en ADN doble cadena que se amplifica exponencialmente.



>> Figura N°3: Las proteínas recombinantes forman filamentos de recombinación con cebadores y los insertan en sitios complementarios en la doble hélice del ADN mediante la creación de un bucle de desplazamiento o bucle D. Las proteínas de unión a ADN monocatenario (SSB) estabilizan la apertura de la estructura de doble hélice y el bucle D. El desmontaje de la recombinasa permite el acceso a la polimerasa de desplazamiento de hebra para extender el extremo 3' de los cebadores a lo largo de la secuencia objetivo. Cuando esta secuencia se repite para cebadores opuestos, la amplificación exponencial se produce sin la necesidad de la desnaturalización

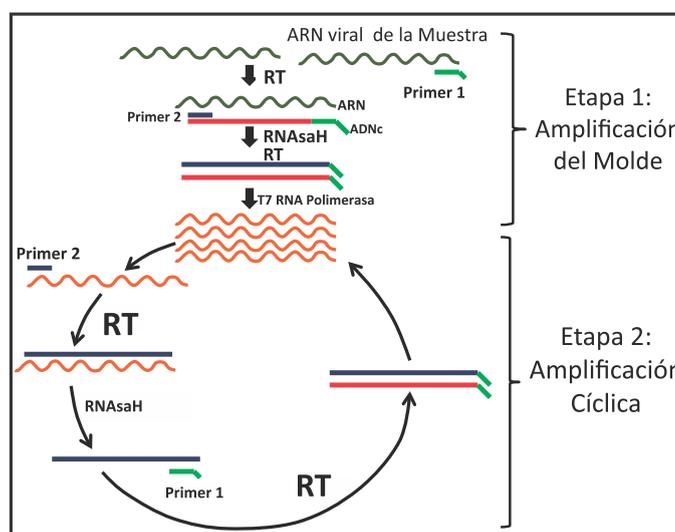


Algunos grupos han demostrado una alta sensibilidad y especificidad de la amplificación del target combinando RPA y LAMP en un protocolo

de amplificación de 2 etapas, denominado RAMP. Los cebadores LAMP externos pueden usarse para la amplificación de RPA y luego combinarse con los cebadores LAMP adicionales para una amplificación adicional en un solo tubo o dispositivo (15).

2.2- Amplificación mediada por transcripción (TMA): es una técnica de tubo único y es más eficiente que la RT-PCR. Esta prueba de diagnóstico molecular es utilizada en el sistema Panther Fusión de Hologic que permite un procesamiento inmediato y totalmente automatizado de muestras, incluida la extracción de ARN, la amplificación de secuencias target y detección en tiempo real de la presencia del virus (16). El sistema automatiza los pasos complejos involucrados en el diagnóstico molecular lo que acelera el diagnóstico y reduce las posibilidades de error en comparación con la configuración de un laboratorio que tenga muchos procesos manuales; esto lleva a que mejore el flujo de trabajo y lo que es más importante, el riesgo de contaminación del personal y del propio laboratorio. Utiliza una retrotranscriptasa reversa (actividad ADN polimerasa y nucleasa) y la T7 RNA polimerasa, se observan dos fases, figura N°4.

>> Figura N°4: Después de la síntesis del ADN copia, de cadena sencilla, que incluye el promotor T7, se genera un ADN bicatenario con un cebador adicional (primer 2) que posteriormente se transcribe en amplicones de ARN por la T7ARN polimerasa. Estos nuevos amplicones de ARN luego vuelven a entrar en el proceso de TMA permitiendo que este proceso de amplificación exponencial genere miles de millones de amplicones de ARN.



En la PRIMERA FASE, el Primer 1 de secuencia complementaria al RNA viral, incorpora en las hebras sintetizadas la secuencia de reconocimiento del promotor T7 de la RNA polimerasa. La RT sintetiza una hebra de ADNc, dando lugar a un híbrido RNA: DNA. Luego por su actividad de nucleasa mediada por la RNAsa H degrada el RNA. Luego se une el Primer 2 al ADN antisentido (-). Por acción de la RT copia el ADN da una ADN doble cadena. Posee el promotor T7 que será reconocido por T7 RNA polimerasa. Que dará lugar a cientos de copias de RNA antisentido. EN LA FASE 2 se repite el ciclo generando gran cantidad de copias de RNA antisentido (10^8 - 10^{10}). Esta prueba se puede realizar detectando un segmento (gen) o varios (formato multiplex) y el producto final se puede detectar por punto final o en tiempo real.

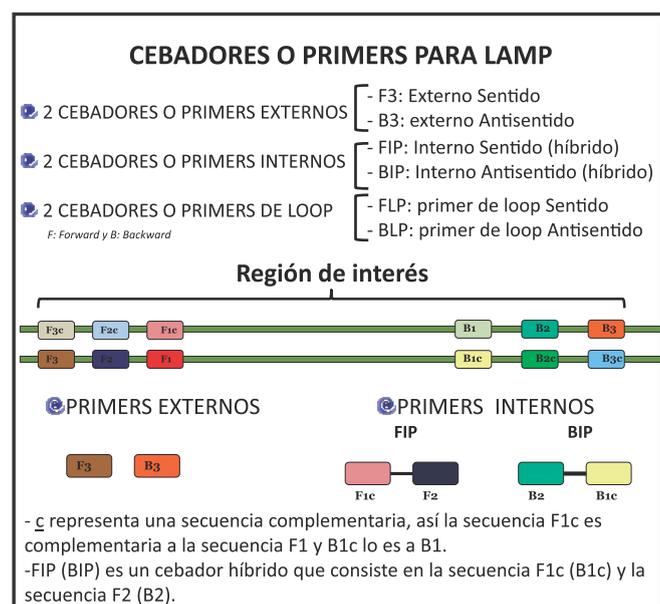
2.3- Retrotranscripción seguida de reacción de amplificación isotérmica mediada por bucle (RT-LAMP): Varios laboratorios y empresas han desarrollado y probado clínicamente pruebas de RT-LAMP para SARS-CoV-2, (3, 17). La reacción de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), ya sea a partir de ADN o RT-LAMP usando RNA es una técnica de amplificación rápida de una secuencia target de un ácido nucleico utilizando oligos o cebadores específicos, (figura N°5) y dos enzimas: una RT y una ADN polimerasa con capacidad de desplazamiento de cadena, como la Bst pol. En las pruebas de diagnóstico de LAMP el producto amplificado se detecta por turbidez (detectando un subproducto de la reacción), por color (adición de un colorante sensible al cambio del pH) o por fluorescencia (adición de un marcador fluorescente).

Proceso de Amplificación: La amplificación de los ADN se realiza a través de repeticiones de reacciones de elongación que ocurren a través de las regiones de asa que se forman en la estructura original para la amplificación de LAMP. En la primera etapa de la reacción se utilizan los *cebadores* internos (FIP y BIP) y externos (F3 y B3)

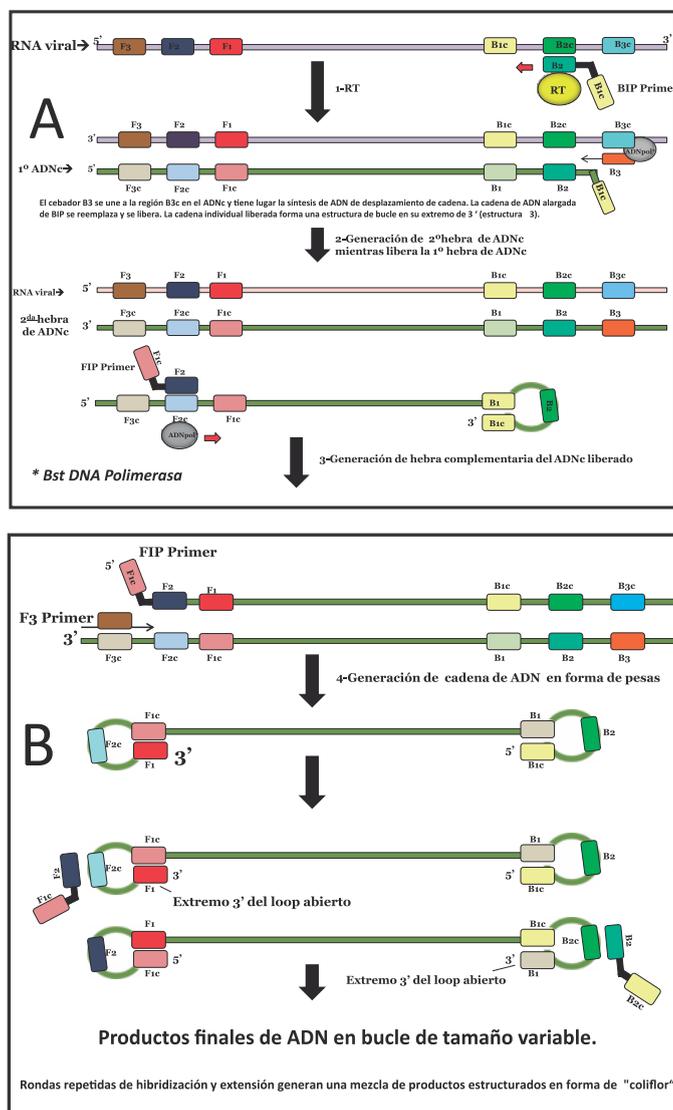
Cada uno de los *cebadores* internos tiene una secuencia complementaria a una de las cadenas de amplificación de la región terminal 3' idénticos a la región interna de la misma cadena en

el extremo 5'-terminal (figura 6A). La reacción de LAMP comienza cuando la secuencia F2 del primer FIP se alinea y se une a la secuencia blanco, la secuencia F1c del primer no es una secuencia complementaria y queda sin hibridar, entonces, la DNA polimerasa Bst sintetiza una primera cadena. En el espacio que quedó entre la secuencia blanco y F1c, la Bst desplaza la cadena y el primer F3 se alinea en su secuencia complementaria y a partir de aquí se sintetiza una nueva cadena, liberando la primera cadena sintetizada. En el extremo 3' de la cadena recién liberada, el primer BIP sigue el mismo proceso que FIP, la secuencia B2 del primer BIP alinea en la primera cadena liberada, la polimerasa sintetiza la cadena y B3 se alinea e inicia la copia de la cadena, liberando una segunda cadena, que contiene las regiones antisentido en los extremos, por lo que se alinean entre ellos formando la estructura que posee los bucles o asas en ambos extremos (forma de pesas) (figura 6B). De esta forma, los *primers* continúan alineándose con las regiones complementarias con reacciones de elongación que se repiten secuencialmente por la actividad de desplazamiento de cadena a una temperatura constante, formando diferentes estructuras de manera azarosa (figura 7), (18).

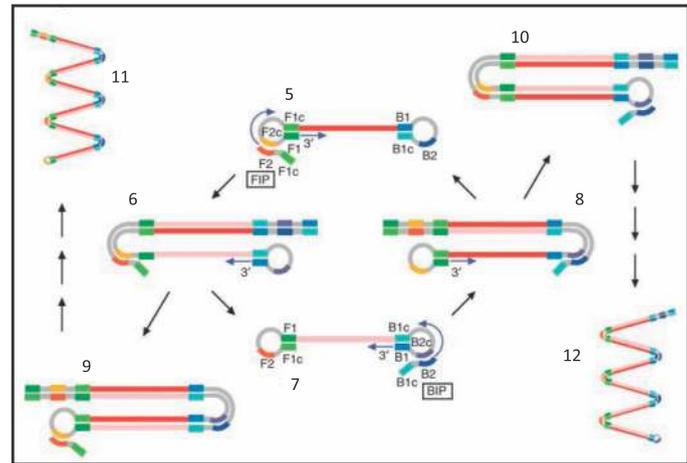
>> **Figura N°5:** LAMP utiliza tres pares de cebadores: dos cebadores internos, dos cebadores externos y dos cebadores de bucle. Los cebadores interno y externo se unen con el target y su extensión produce una estructura con forma de pesas, compuesta de dos bucles en cada extremo.



>> **Figura N°6: RT-LAMP:** (A): Paso 1: en el extremo 3' del ARN viral, la transcriptasa inversa y el cebador BIP inician la conversión de ARN a ADNc. Paso 2: En el mismo extremo, la ADN polimerasa y el cebador B3 continúan generando la segunda cadena de ADNc para desplazar y liberar la primera cadena de ADNc. Paso 3: el cebador FIP se une a la cadena de ADNc liberada y la ADN polimerasa genera la cadena complementaria. Paso 4: el cebador F3 se une al extremo 3' y la ADN polimerasa genera una nueva hebra mientras desplaza la vieja hebra. (B): El ciclo LAMP produce estructuras de ADN en bucle o asas en ambos extremos (forma de pesas, estructuras 5 y 7) de varios tamaños



>> **Figura N°7: Productos finales de RT-LAMP.** Se generan distintas estructuras en forma de bucle o loop de distinto tamaño. La estructura 5 da origen 6, 9 y 11 y la estructura 7 da origen a las estructuras 8, 10 y 12,



Proceso de Detección: Se han desarrollado varios ensayos de RT-LAMP para apuntar a diferentes regiones de genes de SARS-CoV-2 (19,20) con fluorescencia (20) o lecturas colorimétricas (19,21). (a) Una estrategia para producir fluorescencia es usar Calceína, un complejo de fluoresceína, (22). La fluorescencia de la Calceína se inhibe inicialmente cuando se une al manganeso. Los pirofosfatos generados a partir de las reacciones de amplificación de ADN secuestran el manganeso y liberan la calceína. La calceína libre puede unirse a los iones de magnesio, aumentando la intensidad de su emisión de fluorescencia. Usando Calceína, Yan et al. (20) desarrollaron un ensayo RT-LAMP para la detección visual de SARS-CoV-2. Identificaron correctamente 58/58 pacientes positivos y 72/72 negativos, confirmados con pruebas de RT-PCR paralelas. Este ensayo de RT-LAMP de los extractos de muestras de ARN de los pacientes solo requirió una incubación de 60 minutos a 63 °C. (b).

Las lecturas colorimétricas para técnicas de amplificación que utilizan polimerización enzimática también se pueden lograr utilizando indicadores de pH. Durante la síntesis de ADN, cada adición de un dNTP (desoxirribonucleósido trifosfato) libera un ión de hidrógeno que disminuye el pH de la solución. La disminución del pH es proporcional a la síntesis del ADN. Para la lectura visual de su RT-LAMP, Baek et al. (21) utilizaron rojo fenol, que cambia el color de rosa (pH 8.8) a amarillo (pH <8.0), para indicar la aparición de amplificación. Después de una amplificación de 30 minutos a 65°C, RT-LAMP logró la detección de 200 copias de ARN de SARS-CoV-2 extraído de muestras de pacientes con COVID-19. El kit Covid 19-Neokit usa una RT-LAMP. La reacción de LAMP da como resultado, grandes cantidades de subpro-

ELITE InGenius

PCR Real Time

Totalmente Automatizado

COVID-19
CORONAVIRUS
-DISPONIBLE-

📍 Patógenos de trasplante

- CMV
- EBV
- BKV
- VZV
- HSV1
- HSV2
- Parvovirus B19
- Adenovirus
- Enterovirus
- JCV
- HHV6
- HHV7
- HHV8
- Toxoplasma gondii
- Hepatitis E (RUO)
- WNV
- Aspergillus

🏠 Infecciones Resistencia a Antibióticos

- MRSA/SA
- S. aureus
- mecA/mecC
- C. difficile
- Toxin A
- Toxin B
- CRE 21
- KPC
- IMP, VIM, NDM
- OXA
- ESBL
- CTX-M-1,15
- CTX-M-9,14
- Colistin Resistance
- mcr1
- mcr2

🗣️ Meningitis

- Viral panel 1
- HSV1
- HSV2
- VZV
- Viral panel 2
- Enterovirus
- Parechovirus
- Adenovirus
- Bacterial panel
- N. meningitidis
- S. pneumoniae
- H. influenzae

👃 Infecciones Respiratorias

- Viral panel
- Flu A
- Flu B
- RSV
- Bacterial panel
- C. pneumoniae
- M. pneumoniae
- Legionella pn.
- MTB + Resistance
- MTB complex
- Rifampicin resistance
- Isoniazid resistance
- COVID-19

💧 Onco-Hematológicas

- Coagulation factors panel
- Factor V
- Factor II
- MTHFR

👩 Enfermedades de transmisión sexual

- MG + Resistance
- M. genitalium
- Macrolide resistance
- STI PLUS Panel
- C. trachomatis
- N. gonorrhoeae
- M. genitalium
- T. vaginalis
- C. trachomatis

👤 Gastro-Intestinal Infection

- Norovirus
- Genotypes I & II
- Viral Panel
- Rotavirus
- Adenovirus
- Astrovirus
- Bacterial panel
- Campylobacter spp.
- Salmonella spp.
- Y. enterocolitica
- Parasitic panel
- G. lamblia
- C. parvum
- E. histolytica


BIODIAGNOSTICO

+54 11 4300 9090 | info@biodiagnostico.com.ar | www.biodiagnostico.com.ar

ducto de iones pirofosfato que reaccionan con los iones Mg^{2+} para formar el producto insoluble pirofosfato de magnesio. Dado que la concentración de iones Mg^{2+} disminuyen a medida que avanza la reacción de LAMP se mide la concentración de iones de Mg^{2+} como medida del progreso de la reacción. Para ello se utiliza azul de hidroxinaftol, en donde una reacción positiva se indica mediante un cambio de color de violeta a azul cielo(23).

Ventajas: LAMP es altamente específico porque usa un mayor número de cebadores.

La reacción es rápida (1-2h) a 60-65 °C con un límite analítico de detección de 75 copias por μ L. El enfoque es simple de operar, fácil de visualizar para la detección, tiene menos señal de fondo y no necesita un termociclador. Los inconvenientes de LAMP son los desafíos de optimizar los cebadores y las condiciones de reacción.

Algunos de los ensayos moleculares disponibles actualmente para detectar SARS-CoV-2 utilizan tecnología RT-LAMP en tiempo real, como la prueba ID NOW COVID-19 de Abbott. Y los kits de producción nacional ELA CHEMSTRIP COVID-19 y COVID-19 NEOKIT con tecnología RT-LAMP asociado a ensayos de flujo lateral.

3-Ensayos basados en Repeticiones Palindrómicas Cortas Intercaladas Regularmente Agrupadas (Cluster regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)

El término CRISPR es el nombre de secuencias repetitivas presentes en el ADN de las bacterias, que funcionan como autovacunas. Contienen el material genético de los virus que han atacado a las bacterias en el pasado, de esta forma les permite reconocer la infección y así defenderse cortando el ADN de los invasores. En caso de una segunda infección CRISPR se transcribe y se procesa a ARN CRISPR (ARNcr), se acopla con Cas y reconoce el transcrito del patógeno y Cas degrada el ARNm. Ciertas enzimas en las familias Cas9, Cas12 y Cas13 pueden programarse para atacar y cortar secuencias de ARN virales. Al diseñar y sintetizar un ARN guía, podemos usar la enzima Cas9 para cortar en un lugar específico de un

genoma. Esta capacidad es significativa ya que abre la posibilidad de la edición directa del genoma, dentro de una célula. Dos tipos de proteínas Cas, Cas12 y Cas13 son particularmente útiles para desarrollar plataformas simples, portátiles y económicas para detectar de manera confiable los ácidos nucleicos a nivel molecular(24).

Las técnicas CRISPR, que utilizan Cas12 y Cas13, se han incorporado a los enfoques de amplificación isotérmica para la detección de SARS-CoV-2, figura n° 8. La secuencia de direccionamiento CRISPR debe incluirse al diseñar cebadores para la amplificación de ARN de SARS-CoV-2. La secuencia de reconocimiento CRISPR está dentro del amplicón amplificado y entre los cebadores. El complejo crRNA-Cas escanea amplicones y se une específicamente a aquellos con la secuencia diana complementaria. Al detectar el target, las proteínas Cas se activan para cortar la cadena de RNA por Cas13 o de DNA por Cas12 (25).

Las zonas de reconocimiento para CRISPR, son segmentos de ácidos nucleicos cortos, monocatenarios marcados doblemente con un fluoróforo y un quencher, que pueden usarse como sustratos (26). La escisión de esta sonda separa el quencher del fluoróforo y permite detectar fluorescencia que se pueden cuantificar en tiempo real o visualizar bajo luz LED. Alternativamente, las sondas marcadas doblemente con biotina y FAM (Fluorescein amidite) se las usa para la detección en tiras reactivas (ensayo de flujo lateral). Las nanopartículas de oro (AuNP) en la tira de flujo lateral están recubiertas con anticuerpos anti-FAM para capturar FAM. En ausencia del target, la sonda marcada permanece intacta y es capturada por estreptavidina en la línea de control, lo que resulta en una acumulación de AuNP que genera una banda roja, indicando una prueba negativa. En presencia del target de ARN del SARS-CoV-2, los amplicones activan la proteína Cas para escindir los indicadores de señal, lo que permite que se libere FAM y los AuNP adjuntos viajan a la línea de prueba, produciendo otra banda roja que indica una prueba positiva. Las sondas marcadas intactas que están en exceso también son capturadas en la línea de control. La detección basada en CRISPR verifica las secuencias de los productos a partir de la amplificación isotérmica y

solo produce señal cuando existen las secuencias correctas, lo que proporciona una mayor especificidad analítica que el uso de fluoróforos no específicos o indicadores de pH. Por otro lado un ensayo que usa solamente Cas12 o Cas13 no es lo suficientemente sensible como para detectar el ARN viral en las muestras. La amplificación isotérmica logra una amplificación exponencial en un corto período de tiempo, lo que supera esta limitación de la tecnología CRISPR en términos de sensibilidad analítica.

Una de las plataformas de diagnóstico CRISPR pioneras, DETECTR, se ha utilizado con LAMP. Broughton y col. (27) publicaron un protocolo usando DETECTR para las pruebas de SARS-CoV-2, utilizaron RT-LAMP para amplificar el ARN de SARS-CoV-2 extraído, lo que condujo a la generación de productos de dsDNA. Los productos de dsDNA se detectaron usando la escisión colateral de reporteros por Cas12 y las tiras de flujo lateral se utilizaron para producir señales de lectura. El

método fue capaz de detectar 10 copias de ARN de SARS-CoV-2 por microlitro de extracto de ARN. La amplificación y detección se puede lograr en 30 minutos, lo cual es particularmente valioso para las pruebas rápidas.

Otra de las plataformas de CRISPR mediada por RPA-Cas13, llamada SHERLOCK se la ha asociado con RPA. Zhang y sus colegas lanzaron un protocolo para la detección de SARS-CoV-2, (28). Después de la extracción de ARN del SARS-CoV-2, utilizaron una RT-RPA para amplificar exponencialmente el ARN del SARS-CoV-2, generando productos de ADNds. Después de la reacción de RPA a 42 °C durante 25 min, se usa una alícuota de la solución de RPA. Como Cas13 detecta target de ARN agregaron un paso para transcribir dsDNA a ARN, (utilizando la ARN polimerasa T7). A través del corte de Cas13 escinde un indicador y los productos se detectan por LFA, así se detectan hasta 10 copias / μ L. La amplificación y detección se puede completar en aproxi-



¡NUEVO!

DESARROLLO ARGENTINO

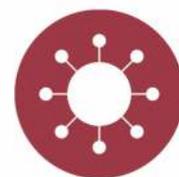
DATOS TÉCNICOS

- Transcripción inversa y PCR en tiempo real en un sólo paso (aprox. 90 min).
- Reactivos: Todos incluidos y listos para usar.
- LOD: 0.670 cp/ μ L.
- Canal de detección: FAM (Verde)
- Formato: 30 y 120 reacciones.
- Código: NP05-30, NP05-120

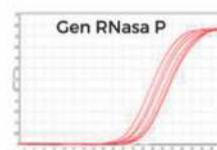
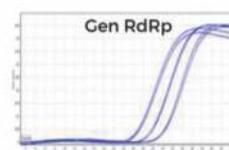
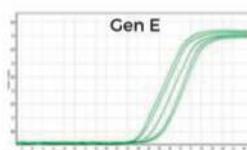
(54-11) 4857.5005 @ VENTAS@BIOCIENTIFICA.COM.AR
WWW.BIOCIENTIFICA.COM.AR ¡SEGUINOS EN LAS REDES!

COVID-19

SCHEP SARS-CoV-2 RT-PCR DUO



- ✓ Prueba de PCR para la detección específica de SARS-CoV-2.
- ✓ Detección rápida y simple mediante transcripción inversa y PCR en tiempo real en un solo paso con cebadores y sondas específicos.
- ✓ Master Mix de cada gen lista para usar.
- ✓ Alta sensibilidad debido a la detección simultánea de dos secuencias diana de SARS-CoV-2.
- ✓ Aprobado por ANMAT.



Biocientífica
Calidad en Reactivos. Excelencia en Biotecnología.

VER MÁS SOBRE
ESTE PRODUCTO:

CLICK
ACÁ



madamente 1 h.

4- Ensayo de flujo lateral (LFA)

Los LFA consisten en cuatro membranas diferentes que están incrustadas lateralmente. Las cuatro membranas son: almohadilla de muestra, almohadilla de liberación de conjugado, membrana de nitrocelulosa y almohadilla absorbente. El producto de la amplificación se aplica sobre la almohadilla de muestra (29).

La almohadilla de liberación del conjugado proporciona una membrana para el asentamiento de sustancias inductoras de color. Las nanopartículas de oro son una de las principales sustancias inductoras de color en los LFA y se conjugan con la macromolécula del detector y el detector de macromolécula es un anticuerpo u oligonucleótido.

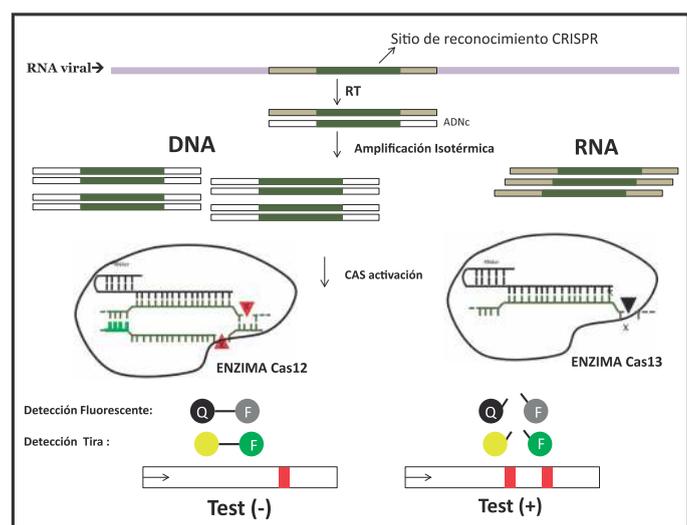
Al aplicar la muestra, las fuerzas capilares transfieren el líquido de la muestra a la almohadilla absorbente a través de la almohadilla de liberación del conjugado y la membrana de nitrocelulosa. La migración lateral del líquido de muestra a la membrana de nitrocelulosa desplaza los conjugados hacia las "moléculas de captura" en las líneas de control y prueba. Las moléculas de captura son especies inmovilizadas en la membrana de nitrocelulosa y están diseñadas para acoplarse a conjugados ante la presencia del target.

Las moléculas de captura en las líneas de control están diseñadas para formar una interacción estable con los conjugados y formar una línea roja sin tener en cuenta la presencia o ausencia del target.

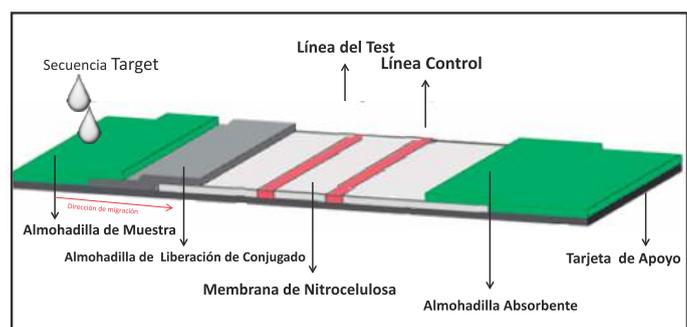
Finalmente, el exceso de conjugado y muestra de líquido son llevados a la almohadilla absorbente por fuerzas capilares, figura N° 9 (30).

>> Figura N°8: Esquema de CRISPR para la detección de SARS-CoV-2. El ARN del SARS-CoV-2 se extrae primero de las muestras de pacientes. El ARN purificado luego se transcribe inversamente a ADNc y se amplifica a través de técnicas isotérmicas, por ejemplo, RT-RPA o RT-LAMP. Los amplificones de ADNc se agregan directamente al siste-

ma CRISPR-Cas12 o se transcriben primero a ssRNA y luego se agregan al sistema CRISPR-Cas13. Cas12 es activado por dsDNA con una secuencia que señala para el corte del ssADN de la sonda marcada. Cas13 reconoce secuencias de ARN que contiene secuencias que señala el corte de sonda de RNA marcadas. El corte de la sonda separa el fluoróforo del quencher y permite su cuantificación. En un ensayo de fluorescencia, la escisión de la sonda marcada en forma doble, genera fluorescencia. En un ensayo de flujo lateral (LFA), conduce a la aparición de una línea en la zona del test.

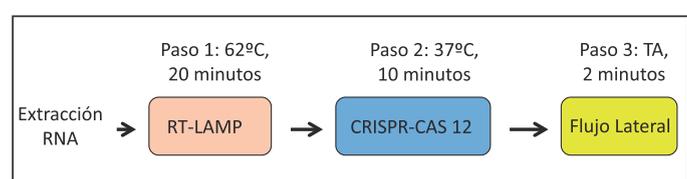


>> Figura N°9: Ensayo de flujo lateral.

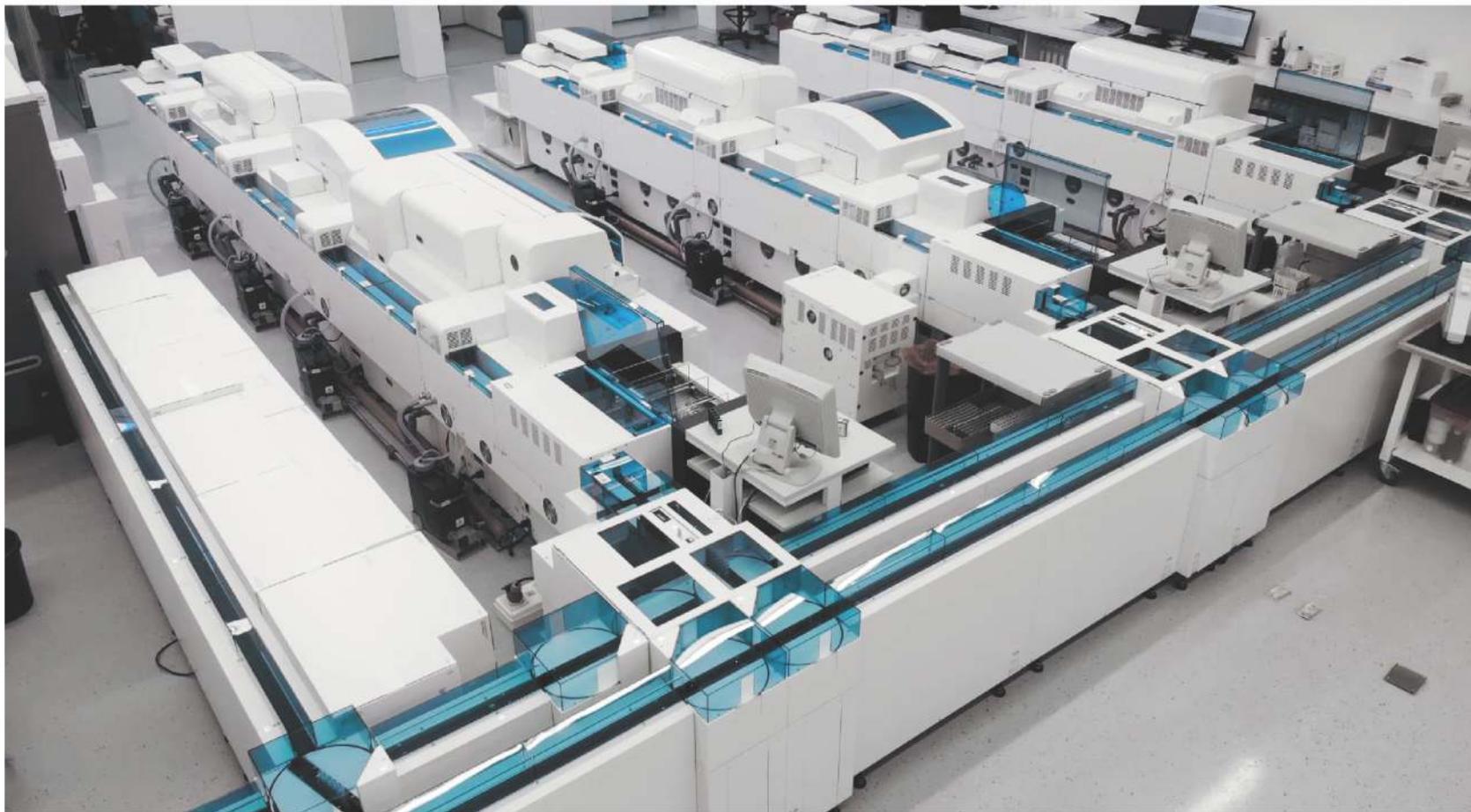


En resumen, por ejemplo, los pasos en un test rápido, sería una combinación de distintas técnicas como las que mostramos en la figura N° 10.

>> Figura N°10: Diagrama de flujo de los pasos involucrados en un test rápido.



MÁS DE 40 AÑOS DE TRAYECTORIA
EXCELENCIA DIAGNÓSTICA AL SERVICIO DE LA SALUD



Un laboratorio de vanguardia internacional en la Argentina.

Tecnología y profesionales con los más altos valores humanos abocados a ofrecer la máxima precisión y calidad diagnóstica para el bienestar de nuestros pacientes.

Labmedicina
ANÁLISIS CLÍNICOS

Acreditado: NORMA - ISO 15189*

Alcances de acreditación en: www.oaa.org.ar

 (+011) 154 092 2001  (+011) 5263 9911  info@labmedicina.com labmedicina.com

>>> CONCLUSIÓN

Como lo discutimos en esta revisión existen métodos de amplificación que son competitivos con la PCR y que se benefician de la simplificación proporcionada por el enfoque isotérmico (31). Los métodos isotérmicos son particularmente adecuados para el desarrollo de una nueva generación de dispositivos de diagnóstico para aplicaciones de medicina de precisión, como también en entornos con recursos limitados. Se observa un gran potencial con el desarrollo de técnicas y dispositivos aplicados a nuevos test de diagnósticos de uso en laboratorios de bioquímica.

Agradecimientos

Los autores agradecen el soporte de Ciencia y Técnica Universidad Nacional de San Luis (UNSL) (PROICO 2-2318).

MFA tiene una beca EVC-CIN (Res. 403/18).

>>> REFERENCIAS

1. <https://covid19.who.int/>
2. <https://www.argentina.gob.ar/coronavirus/informes-diarios>
3. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/virus-requests.html>
4. Linda J. Carter, Linda V. Garner, Jeffrey W. Smoot, Yingzhu Li, Qiongqiong Zhou, Catherine J. Saveson, Janet M. Sasso, Anne C. Gregg, Divya J. Soares, Tiffany R. Beskid, Susan R. Jervey, and Cynthia Liu. Assay Techniques and Test Development for COVID-19 Diagnosis. *ACS Central Science* 2020 6 (5), 591-605. DOI: 10.1021/acscentsci.0c00501
5. Guo, Y.-R. y col. 2020. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak – an update on the status. *Mil. Med. Res.* 7 (1), 11. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7068984/>
6. Bar-On, Y. M.; Flamholz, A.; Phillips, R.; Milo, R. SARS-CoV-2 (COVID-19) by the numbers. *Elife* 2020, 9, e57309. DOI:10.7554/eLife.57309.
7. <https://www.gisaid.org/>
8. Corman Victor M, Landt Olfert, Kaiser Marco, Molenkamp Richard, Meijer Adam, Chu Daniel KW, Bleicker Tobias, Brünink Sebastian, Schneider Julia, Schmidt Marie Luisa, Mulders Daphne GJC, Haagmans Bart L, van der Veer Bas, van den Brink Sharon, Wijsman Lisa, Goderski Gabriel, Romette Jean-Louis, Ellis Joanna, Maria, Peiris Malik, Goossens Herman, Reusken Chantal, Koopmans Marion PG, Drosten Christian. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill.* 2020;25(3):pii=2000045. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>
9. Directrices de Laboratorio para la Detección y Diagnóstico de la Infección con el Nuevo Coronavirus 2019 (2019nCoV). <https://www.paho.org/es/documentos/directrices-laboratorio-para-deteccion-diagnostico-infeccion-con-nuevo-coronavirus-2019>
10. Listado de reactivos autorizados ante la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) para COVID-19: <https://www.argentina.gob.ar/noticias/reactivos-covid-19>.
11. Ai T.; Yang Z.; Hou H.; Zhan C.; Chen C.; Lv W.; Tao Q.; Sun Z.; Xia L. Correlation of chest CT and RT-PCR testing in coronavirus disease 2019 (COVID-19) in China: A Report of 1014 Cases. *Radiology* 2020, 200642 .10.1148/radiol.2020200642.
12. Oh M.-D.; Park W. B.; Choe P. G.; Choi S.-J.; Kim J.-I.; Chae J.; Park S. S.; Kim E.-C.; Oh H. S.; Kim E. J.; Nam E. Y.; Na S. H.; Kim D. K.; Lee S.-M.; Song K.-H.; Bang J. H.; Kim E. S.; Kim H. B.; Park S. W.; Kim N. J. Viral load kinetics of MERS coronavirus infection. *N. Engl. J. Med.* 2016, 375 (13), 1303–1305. 10.1056/NEJMc1511695
13. Pooria Gill & Amir Ghaemi (2008) Nucleic Acid Isothermal Amplification Technologies—A Review, *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 27:3, 224-243, DOI:10.1080/15257770701845204
14. Piepenburg O, Williams CH, Stemple DL, Armes NA (2006) DNA detection using recombination proteins. *PLoS Biol* 4(7): e204. DOI:10.1371/journal.pbio.0040204
15. Stringer, O., Andrews, J., Greetham, H. et al. TwistAmp® Liquid: a versatile amplification method to replace PCR. *Nat Methods* 15, 395 (2018).
16. Gorzalski AJ, Tian H, Laverdure C, Morzunov S, Verma SC, VanHooser S, Pandori MW. High-Throughput Transcription-mediated amplification on the Hologic Panther is a highly sensitive method of detection for SARS-CoV-2. *J Clin Virol.* 2020;129:104501. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104501.
17. Udugama B, Kadhiresan P, Kozlowski HN, Malekjahani A, Osborne M, Li VYC, Chen H, Mubareka S, Gubbay JB, Chan WCW. Diagnosing COVID-19: The Disease and Tools for Detection. *ACS Nano.* 2020;14(4):3822-3835.
18. Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nat Protoc.* 2008;3(5):877-882
19. Yu L.; Wu S.; Hao X.; Dong X.; Mao L.; Pelechano V.; Chen W.-H.; Yin X. Rapid detection of COVID-19 coronavirus using a reverse transcriptional loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) diagnostic platform. *Clin. Chem.* 2020, 10.1093/clinchem/hvaa102.
20. Yan C.; Cui J.; Huang L.; Du B.; Chen L.; Xue G.; Li S.; Zhang W.; Zhao L.; Sun Y.; Yao H.; Li N.; Zhao H.; Feng Y.; Liu S.; Zhang Q.; Liu D.; Yuan J. Rapid and visual detection of 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) by a reverse

transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *Clin. Microbiol. Infect.* 2020, 26 (6), 773–779. 10.1016/j.cmi.2020.04.001.

21. Baek Y. H.; Um J.; Antigua K. J. C.; Park J.-H.; Kim Y.; Oh S.; Kim Y.-I.; Choi W.-S.; Kim S. G.; Jeong J. H.; Chin B. S.; Nicolas H. D. G.; Ahn J.-Y.; Shin K. S.; Choi Y. K.; Park J.-S.; Song M.-S. Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification as a rapid early-detection method for novel SARS-CoV-2. *Emerging Microbes Infect.* 2020, 9 (1), 998–1007. 10.1080/22221751.2020.1756698.

22. Fluorescent Detection Reagent (Eiken). <http://loopamp.eiken.co.jp/e/products/fluore/img/01.pdf> (accessed 2020-05-11)

23. Motoki Goto, Eiichi Honda, Atsuo Ogura, Akio Nomoto, and Ken-Ichi Hanaki Colorimetric detection of loop mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *BioTechniques* 46:167-172. doi 10.2144/000113072.

24. <https://mammoth.bio/diagnostics/>

25. Chen JS, Ma E, Harrington LB, Da Costa M, Tian X, Palefsky JM, Doudna JA (2018) CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science* 360:436–439. <https://doi.org/10.1126/science.aar6245>

26. Guo, L., Sun, X., Wang, X. et al. SARS-CoV-2 detection with CRISPR diagnostics. *Cell Discov* 6, 34 (2020).

27. Broughton, J.P., Deng, X., Yu, G. et al. CRISPR–Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nat Biotechnol* 38, 870–874 (2020).

28. Zhang F.; Abudayyeh O. O.; Gootenberg J. S.. A protocol for detection of COVID-19 using CRISPR diagnostics. 2020, available from [www.broadinstitute.org/files/publications/special/COVID19%20detection%20\(updated\).pdf](http://www.broadinstitute.org/files/publications/special/COVID19%20detection%20(updated).pdf) (accessed 2020-05-11)

29. Katarzyna M. Koczula and Andrea Gallotta: Lateral flow assays. *Essay Biochem.* 2016 Jun 30; 60(1): 111–120.

30. Aktas, G.B., Wichers, J.H., Skouridou, V. et al. Nucleic acid lateral flow assays using a conjugate of a DNA binding protein and carbon nanoparticles. *Microchim Acta* 186, 426 (2019). <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3544-0>

31. Giuffrida MC, Spoto G. Integration of isothermal amplification methods in microfluidic devices: Recent advances. *Biosens Bioelectron.* 2017; 90:174-186. ■



iCHROMA™ II

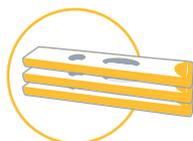


Resultados de anticuerpos anti SARS-CoV-2 en 10 minutos

Sistema portátil de inmunoensayo por fluorescencia (FIA)



Muestra: 10 µl de suero, plasma o sangre total.



Kits de 25 determinaciones.



Lectura automatizada de la reacción.



Resultados cuantitativos para IgM e IgG.