

Guida dettagliata alla rilevazione rapida del virus SARS-CoV-2 in campioni clinici mediante la reazione colorimetrica RT-LAMP.

Lingua: Italiano.

Traduttrici: Dottoressa Cristina Montagna e Dottoressa Anna Maria Militello.

Panoramica della metodologia: Questo protocollo è destinato al rilevamento di SARS-CoV-2 direttamente da campioni clinici (tampone rinofaringeo trasportato in apposito terreno per trasporto virale -VTM) in 30 minuti. L'unica apparecchiatura di reazione richiesta è un blocco termico. Non è richiesto alcun isolamento o purificazione dell' RNA. Il metodo utilizza la trascrizione inversa, l'amplificazione isoterma mediata da loop (LAMP) utilizzando 6 primers sintetizzati su misura (3 set di primers) per amplificare l' RNA virale e l'indicatore colorimetrico per visualizzare il risultato.

Per eseguire questo test, viene creata una miscela composta da 6 primers, dal tampone di lisi, da reagenti di amplificazione e dalla soluzione indicatore di colore.

La master mix viene inserita in una provetta per microcentrifuga. Il campione clinico (ad es. VTM) viene inserito nella provetta per microcentrifuga contenente la master mix, miscelato, e quindi ½ della soluzione viene trasferita in una seconda provetta per microcentrifuga. Entrambe le provette vengono quindi poste in un bagno secco a 63,0 ° C per 30 minuti. Dopo 30 minuti, il campione viene rimosso, incubato in ghiaccio per 1 minuto e visualizzato. Un colore rosso indica un risultato negativo, un colore giallo indica un risultato positivo.

Di seguito è riportata una guida dettagliata del protocollo passo dopo passo. Essa è divisa in tre parti. La prima parte è un elenco dei reagenti e delle attrezzature necessarie. La seconda parte contiene le istruzioni per preparare il buffer di reazione. La terza parte è il protocollo per condurre il test.

Reagenti e materiali

1. Primers per la LAMP (FIP, BIP, LF, LB, F3, B3)
1. Acqua priva di nucleasi (Ambion, AM9937).
2. dUTP 100 mM
3. 0,5µL di UDG e
4. SYTO 9 5 mM (Invitrogen, S34854)
5. 1250µL di 2X Master Mix (DNA e RNA) Colorimetrica LAMP WarmStart® (NEB, M1800L).
6. Buffer TE pH 8,0
7. Tween-20
8. 1% di Proteinasi K Termostabile (NEB, P8111S),
9. 2% di ezDNase (Invitrogen, 11766051),
10. 0,3 ng / µl di DNA genomico umano
11. Provetta per microcentrifuga LoBind da 1,5 ml (Eppendorf, 022431021)
12. Ghiaccio e un contenitore per contenere il ghiaccio.
13. Pipetta di trasferimento per smaltimento sterile (Fisherbrand, 13-711-20)
14. Bagno secco a 63.0°C (Fisherbrand, 14-955-219)

Preparazione:

1. Si prepara una miscela dei primers LAMP con una concentrazione di 25x (CUFC-FIP, CUFC-BIP, CUFC-LF, CUFC-LB, CUFC-F3, CUFC-B3) unendo 40µM dei primers CUFC-FIP e CUFC-BIP, 10µM dei primers CUFC-LF e CUFC-LB e 5µM dei primers CUFC-F3 e CUFC-B3 in acqua priva di nucleasi (Ambion, AM9937).

2. La miscela master colorimetrica RT-LAMP 2X si prepara aggiungendo 3,5µL di dUTP100 mM, 0,5µL di UDG e 0,25µL di SYTO 9 5 mM (Invitrogen, S34854) in 1250µL di 2X Master Mix (DNA e RNA) Colorimetrica LAMP WarmStart® (NEB, M1800L)
3. La miscela di reazione si prepara successivamente mescolando 125 µl della miscela master colorimetrica RT-LAMP 2X, 10 µl della miscela 25X dei primers LAMP, 95 µl di acqua priva di nucleasi per una reazione di 250 µL e ridimensionata in base al numero effettivo di campioni.
4. Il tampone di lisi è composto da 0,1-fold del tampone TE a pH 8,0 con 0,1% di tween-20, 1% di Proteinasi K termolabile (NEB, P8111S), 2% di ezDNasi (Invitrogen, 11766051), 0,3 ng / µl di DNA genomico umano da un maschio normale. Per una reazione, 460 µl di miscela di reazione e 20 µl di tampone di lisi devono essere pre-caricati in una provetta da microcentrifuga LoBind da 1,5 mL pulita (Eppendorf, 022431021) e mantenuti in ghiaccio fino al momento dell'uso.

Esecuzione del Test:

1. Aggiungere 20 µl di campione clinico direttamente in una provetta da microcentrifuga LoBind da 1,5 mL (Eppendorf, 022431021) contenente la miscela di reazione (460 µL) e il tampone di lisi (20 µL)
 - 1b: Metodo alternativo: aggiungere 10 µl di campione clinico direttamente in una provetta da microcentrifuga LoBind da 1,5 ml (Eppendorf, 022431021) contenente la miscela di reazione (230 µL) e il tampone di lisi (10 µL). Ripetere l'operazione per una seconda provetta. Procedere direttamente al passaggio 4.
2. Miscelare utilizzando una pipetta di trasferimento monouso sterile (Fisherbrand, 13-711-20).
3. Aliquotare 250 uL della soluzione di 500 uL in una nuova provetta pulita per microcentrifuga LoBind da 1,5 ml.
4. Collocare entrambe le provette con ~ 250µL ciascuna in un bagno secco a 63,0°C (Fisherbrand, 14-955-219)
5. Incubare le provette per 30 minuti in un bagno secco a 63,0°C.
6. Incubare in ghiaccio per 1 minuto per inibire la reazione.
7. Registrare i risultati colorimetrici.
 - ❖ Rosso Negativo
 - ❖ Giallo = Positivo

Tabella 1. Informazioni sulla sequenza dei primers LAMP per il rilevamento di SARS-Cov-2

Primer	Sequenza
Nome	
CUFC1-F3	TGGATACAACCTAGCTACAGAGAAG
CUFC1-B3	AGCCAAAGACCGTTAAGTGTA
CUFC1-FIP	GTGGTGGTTGGTAAAGAACATCAGACTTGTTGTCATCTCGCAAAGG
CUFC1-BIP	CCTCTATCACCTCAGCTGTTTTGCTGTACCATACAACCCTCAACTT
CUFC1-LF	ACCTGAGTTACTGAAGTCATTGAGA
CUFC1-LB	TGGTTTTAGAAAAATGGCATTCCC