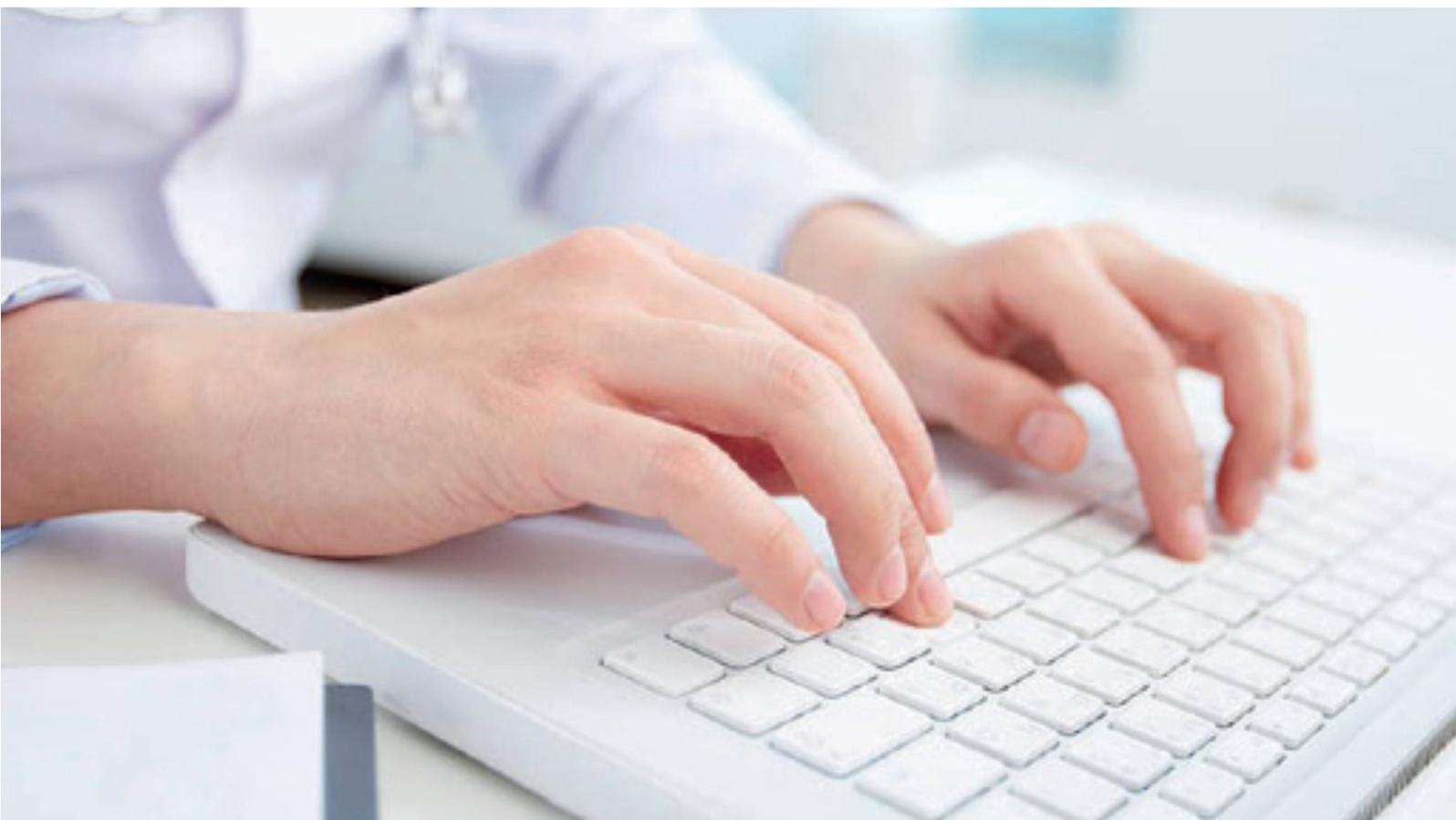


INFORME

**DESARROLLO DE LAMP PARA LA DETECCIÓN
DE MATERIAL GENÉTICO DE SARS-COV-2**



PLANES DE CONTINGENCIA EN HEMATOLOGÍA DURANTE LA PANDEMIA DEL COVID 19

El presente informe fue elaborado por la Dra. Laura Romanelli y el Dr. Gustavo Salinas, y resume los avances al 14 de agosto. El equipo de trabajo está además integrado por: Dr. Jorge Pórfido, Dra. Mariana Bonilla, Dr. Gonzalo Moratorio, Dra. Pilar Moreno, Dr. Alvaro Fajardo y la Bioq. Clín Rosina Comas.

La alta capacidad de diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2 y la respuesta rápida es de crucial importancia en el contexto de la presente emergencia sanitaria. Actualmente el método que se está utilizando, con éxito en Uruguay y en el mundo, es la detección del material genético del virus mediante PCR cuantitativa (OneStep RT-qPCR)(Centers for Disease Control and Prevention, 2020; WHO, 2020). Este método es altamente sensible y específico, pero requiere equipamiento y personal altamente especializado.

Expandir las posibilidades de diagnóstico y aplicarlas en laboratorios con menor equipamiento (y eventualmente fuera del laboratorio) configura una ventaja permitiendo aumentar la prevención y vigilancia de la infección por SARS-CoV-2. Se buscó utilizar para el diagnóstico de SARS-CoV-2 la técnica de LAMP que no requiere equipamiento de PCR, lo cual puede ser útil en zonas rurales, ciudades del interior y puntos estratégicos de control en los que se requiera un diagnóstico rápido.

Se implementó el desarrollo del método de diagnóstico por la técnica RT-LAMP (reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (Notomi et al., 2000)). En LAMP el material genético viral es amplificado por una polimerasa con desplazamiento de hebra, sin necesidad de termociclador, y el resultado puede visualizarse a ojo desnudo mediante colorantes sensibles a la reacción de amplificación (indicadores de pH o de metales) (Goto et al., 2009; Tanner et al., 2015). En nuestro laboratorio se implementó la detección por pH, que vira de rosado a amarillo sólo si la muestra contiene material genético viral.



La técnica implementada en nuestro laboratorio amplifica tres genes virales (N, E y ORF1) simultáneamente, utilizando los conjuntos de oligonucleótidos que han sido reportados como los que ofrecen mayor sensibilidad y especificidad (Zhang et al., 2020). Asimismo, se implementó la detección por LAMP de ARNm humano (RNAsa P y actina) como control positivo (la cual debe dar positivo con todas las muestras humanas).

Se analizaron muestras provenientes de hisopados y de saliva, con y sin extracción de ARN, comparando siempre la técnica implementada (RT-LAMP) con la técnica de referencia (RT-PCR), en colaboración con el Laboratorio de Virología Experimental (UdelaR-IPMON). Los mejores resultados se obtuvieron en muestras de hisopados y con extracción de ARN.

Resultados a partir de muestras de hisopados, con extracción de ARN

Límite de detección analítico de la técnica

Se determinó, mediante transcripción in vitro (ARN viral obtenido in vitro) el límite de detección de la técnica implementada para cada uno de los genes virales que se amplifican en el ensayo. El límite de detección en la reacción de LAMP es de 100 moléculas de ARNm de cada uno de los genes, de acuerdo a curvas de calibración realizadas por diferentes operarios.

Sensibilidad y especificidad clínica

De acuerdo a la técnica de referencia (RT-qPCR) una muestra es considerada positiva si su $Ct \leq 35$ (el Ct es el ciclo en el que comienza la amplificación exponencial en la PCR, y por tanto cuando menor el Ct mayor la carga viral). Utilizando diluciones de una muestra positiva de Ct conocido se determinó que la técnica de LAMP implementada detecta una carga viral equivalente a un $Ct \leq 33$.

Se analizó luego un panel de muestras clínicas con SARS-CoV-2 confirmado (39 muestras) y muestras negativas (50 muestras). Las muestras fueron provistas por ATGen, por el Sistema de Vigilancia Epidemiológica del Ministerio de Salud Pública y por el Laboratorio de Virología Experimental (Unidad Mixta Institut Pasteur de Montevideo-Facultad de Ciencias, UdelaR); las muestras fueron obtenidas con consentimiento informado. Como se mencionó anteriormente, fueron consideradas como positivas aquellas muestras que por RT-qPCR tuvieron un Ct \leq 35.0. Los resultados se presentan en la Tabla 1. Todos los negativos por PCR resultaron negativos por LAMP (en el Anexo al final del documento), y 32 de los 39 positivos (82%) por PCR dieron también positivos por LAMP (Tabla 1). El universo de muestras analizadas contenía un rango de Ct de entre 7.9 y 35, y 8 de ellas tenían Ct mayor a 33 (Tabla 1).

Todas las muestras analizadas (positivas y negativas) dieron positivas para el ARNm humano por PCR (RNAsa P) y por LAMP (RNAsa P y actina).

Globalmente los resultados indican que el límite de detección de LAMP en muestras clínicas es equivalente a obtener un Ct de 33 de RT-qPCR. De acuerdo a más de 6500 ensayos realizados en el Institut Pasteur de Montevideo, el número de muestras cuyo Ct está entre 33 y 35 corresponde al 15% de los casos positivos. La sensibilidad de LAMP extrapolada a los datos poblacionales es entonces de 85%, comparado con la técnica de referencia, siendo los casos no detectados los de menor carga viral.

Por otra parte, no se constató ningún falso positivo. El análisis in silico de los oligonucleótidos utilizados reveló que no hibridarían con otros genomas virales analizados (causantes de enfermedades respiratorias), con lo cual la especificidad teórica sería del 100%.

Finalmente, cabe consignar que si la muestra de hisopado se recoge en un mililitro de medio en lugar de 2.5 ml, como se realizó para este estudio, la muestra estaría más concentrada, siendo posible alcanzar un Ct de al menos 34 (más del 90% de las muestras positivas de las 6500 analizadas por PCR en el IPMON).

Resultados a partir de muestras de hisopado, sin extracción de ARN

Se analizó por LAMP la amplificación de muestra directa, sin extracción previa de ARN (Tabla 2). Los resultados indicaron que no es posible eliminar este paso, ya que el límite de detección clínico disminuye en aproximadamente 6 unidades de Ct.

Resultados a partir de muestras de saliva

En colaboración con el Sistema de Vigilancia Epidemiológica del Ministerio de Salud Pública se obtuvieron muestras (simultáneas) de saliva y de hisopado de pacientes, previo consentimiento informado. Dichas muestras fueron obtenidas de pacientes entre el día 2 y 7 luego de ser diagnosticados como positivo para el SARS-CoV-2 por PCR. Los resultados, tanto por PCR como por LAMP, mostraron que la carga viral en saliva, en esta ventana temporal, es significativamente menor que la carga viral proveniente de hisopado nasofaríngeo (para una misma persona, en los 9 casos positivos analizados, el Ct proveniente de muestra de saliva es mayor que el Ct proveniente de muestra de hisopado, en algunos casos de más de 10 unidades de Ct) (Tabla 3). Así pues, la saliva no sería la mejor muestra para detección de SARS-CoV-2. Para descartar totalmente esta posibilidad habría que procurar obtener muestras de saliva más temprano en la infección, en caso que la carga viral en saliva sea mayor al inicio de la infección.

Consideraciones para el uso de LAMP

El tiempo de la RT-LAMP incluyendo la extracción de ARN es de 45 minutos: 5 minutos de inactivación de la muestra a 95°C, de 5 a 10 minutos de extracción de ARN y 30 minutos de RT-LAMP (la transcripción reversa y la amplificación se realiza en un único paso). Para disminuir la manipulación, el “reactivo LAMP” vendría “pronto para usar” en un tubo, que debería estar a -20°C hasta su uso. El reactivo contiene buffer, rojo fenol, cloruro de guanidinio, enzimas (transcriptasa reversa y polimerasa Bst2.0) y oligonucleótidos. A éste reactivo se adicionaría 3 µl de ARN purificado y una gota de aceite mineral para prevenir la formación de aerosoles. La reacción se incubaba durante media hora a 63° C en un baño seco, y una vez finalizada se observa si el rosado viró a amarillo. Puede suceder que una muestra de Ct 34 o 35 de anaranjado, resultado que se considera negativo por LAMP, y que podría derivarse para análisis por RT-qPCR para su confirmación.

Para cada hisopado deben realizarse dos reacciones: una para detectar el virus (LAMP-COVID),

y otra para ARNm humanos (RNAsa P y actina); esta última reacción siempre debe dar positiva. Además, por conjunto de muestras procesadas a un mismo tiempo se debe incluir un tubo control de LAMP-COVID sin molde, que sirve para revelar si hay contaminación ambiental con productos amplificados. Finalmente, el área donde se inactiva la muestra, se extrae el ARN y se agrega la muestra al reactivo LAMP debe estar separada del área de amplificación. Una vez finalizada la reacción el área debe limpiarse con una solución de peróxido de hidrógeno al 4%.

Equipamiento requerido

La técnica de LAMP requiere un freezer de -20 para tener el stock de reactivo LAMP pronto para usar, un baño "seco" de 95°C para los tubos de hisopado, una minicentrífuga de microtubos eppendorf para la extracción de ARN, un baño "seco" de 63°C y un juego de tres pipetas (P10, P100 y P1000). El uso de una cabina SP2 es conveniente, pero no es imprescindible si el hisopado se hace al aire libre con precaución debida y se inactiva correctamente el virus.

Ventajas y desventajas del método LAMP pensando en su aplicación clínica

Como se mencionó al inicio, la principal ventaja del método de LAMP es que no requiere equipo de PCR y la detección binaria (positivo/negativo) es por viraje claro de color. La PCR es la técnica estándar y LAMP no sustituye, sino que complementa al diagnóstico por PCR en puntos de control donde no existe equipamiento para PCR. Como desventajas se debe mencionar que es menos sensible que la PCR y que la contaminación por "carryover" de productos amplificados debe evitarse en todo momento con el mantenimiento de dos áreas separadas, el descarte inmediato del material amplificado, y la limpieza con peróxido de los baños y áreas de trabajo cada vez que culmina una reacción de LAMP.

Tabla 1: Muestras positivas por qPCR analizadas por LAMP.

Muestra	Tipo	Ct promedio		LAMP	
		SARS-CoV-2	Control interno	SARS-CoV-2	RNAsaP y Actina
* 23650	Hisopado	21,8	25,15	positivo	positivo
* 23651	Hisopado	19,69	23,34	positivo	positivo
* 23902	Hisopado	24,13	26,72	positivo	positivo
* 25472	Hisopado	14,62	26,42	positivo	positivo
* 25475	Hisopado	21,1	26,61	positivo	positivo
* NM	Hisopado	28,27	24,01	positivo	positivo
	Saliva	32,43	28,65	positivo	positivo
634938	Hisopado	22,14	23,52	positivo	positivo
	Saliva	34,27	29,84	negativo	positivo
635972	Hisopado	25,8	24,9	positivo	positivo
635989	Hisopado	34,02	25,26	negativo	positivo
634943	Hisopado	26,94	24,83	positivo	positivo
	Saliva	34,93	22,9	negativo	positivo
634935	Hisopado	24,31	24,34	positivo	positivo
634436	Hisopado	32,27	24,84	negativo	positivo
623212	Hisopado	30,44	23,64	positivo	positivo
634944	Saliva	29,24	24,93	positivo	positivo
627298	Hisopado	17,1	22,16	positivo	positivo
623536	Hisopado	33,62	25,49	positivo	positivo
627684	Hisopado	23,52	24,7	positivo	positivo
628539	Hisopado	22,18	23,5	positivo	positivo
* 35119	Hisopado	7,91	22,08	positivo	positivo
* 39417	Hisopado	17,62	21,02	positivo	positivo
* 37061	Hisopado	18,33	23,53	positivo	positivo
5092	Hisopado	34,57	25,13	negativo	positivo

4087	Hisopado	31,31	24,64	positivo	positivo
4089	Hisopado	33,73	25,64	negativo	positivo
3059	Hisopado	32,71	24,92	positivo	positivo
7100	Hisopado	18,99	25,66	positivo	positivo
7086	Hisopado	21,03	29,44	positivo	positivo
7036	Hisopado	11,86	29,3	positivo	positivo
7029	Hisopado	32,4	25,96	positivo	positivo
4129	Hisopado	15,93	30,24	positivo	positivo
4142	Hisopado	33,65	27,27	positivo	positivo
7008	Hisopado	13,56	32,12	positivo	positivo
7011	Hisopado	13,23	35,33	positivo	positivo
5153	Hisopado	31,65	26,43	negativo	positivo
4088	Hisopado	34,03	28,47	positivo	positivo
4024	Hisopado	17,65	24,45	positivo	positivo

*Extracción de ARN realizada con menos de 300 µl.

Tabla 2: Resultados obtenidos por qPCR y LAMP utilizando muestra de hisopado sin extracción de ARN.

Muestra	Tipo	Ct promedio PCR		LAMP
		SARS-CoV-2	Control interno (RNAsa P)	SARS-CoV-2
627298	Hisopado	17.1	22.16	positivo
627684	hisopado	23.52	24.7	positivo
634935	Hisopado	24.31	24.34	positivo
635972	Hisopado	25.8	24.9	positivo
623212	Hisopado	30.44	23.64	negativo
634436	Hisopado	32.27	24.84	negativo
623536	Hisopado	33.62	25.49	negativo
635989	Hisopado	34.02	25.26	negativo
N. M	Hisopado	28.27	24.01	negativo
634938	Hisopado	22.14	23.52	positivo
634943	Hisopado	26.94	24.83	positivo

Tabla 3: Comparación de muestras de ARN de hisopado y de saliva por qPCR y LAMP

Muestra	Tipo	Ct promedio		LAMP	
		SARS-CoV-2	Control interno	SARS-CoV-2	RNAsaP y Actina
NM	Hisopado	28,27	24,01	positivo	positivo
	Saliva	32,43	28,65	positivo	positivo
634938	Hisopado	22,14	23,52	positivo	positivo
	Saliva	34,27	29,84	negativo	positivo
635989	Hisopado	34,02	25,26	negativo	positivo
	Saliva	ND	28,49	negativo	positivo
634943	Hisopado	26,94	24,83	positivo	positivo
	Saliva	34,93	22,9	negativo	positivo
634935	Hisopado	24,31	24,34	positivo	positivo
	Saliva	ND	27,33	negativo	positivo
634436	Hisopado	32,27	24,84	negativo	positivo
	Saliva	ND	26,92	negativo	positivo
623212	Hisopado	30,44	23,64	positivo	positivo
	Saliva	ND	30,94	negativo	positivo
623536	Hisopado	33,62	25,49	positivo	positivo
	Saliva	ND	24,96	negativo	positivo
628539	Hisopado	22,18	23,5	positivo	positivo
	saliva	ND	27,04	negativo	positivo

Referencias

Centers for Disease Control and Prevention (2020). CDC Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel. Available at: <https://www.fda.gov/media/134922/download>.

Goto, M., Honda, E., Ogura, A., Nomoto, A., and Hanaki, K. I. (2009). Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *Biotechniques* 46, 167–172. doi:10.2144/000113072.

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., et al. (2000). Notomi et al LAMP.pdf. *Nucleic Acids Res.* 28, e63. doi:10.1093/nar/28.12.e63.

Tanner, N. A., Zhang, Y., and Evans, T. C. (2015). Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes. *Biotechniques* 58, 59–68. doi:10.2144/000114253.

WHO (2020). Coronavirus disease (COVID-19) technical guidance: Laboratory testing for 2019-nCoV in humans. Available at: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance>.

Zhang, Y., Ren, G., Buss, J., Barry, A. J., Patton, G. C., and Tanner, N. A. (2020).

Enhancing colorimetric loop-mediated isothermal amplification speed and sensitivity with guanidine chloride. *Biotechniques*. doi:10.2144/btn-2020-0078.

Anexo: muestras negativas analizadas. (ND: no determinado y es por tanto negativa por PCR)

Muestra	Tipo	Ct promedio		LAMP		
		SARS-CoV-2	Control interno	SARS-CoV-2	RNAsaP y Actina	
*	26040	Hisopado	ND	26,22	negativo	positivo
*	26041	Hisopado	ND	23,67	negativo	positivo
*	26042	Hisopado	ND	25,06	negativo	positivo
*	26043	Hisopado	ND	24,17	negativo	positivo
*	26044	Hisopado	ND	25,45	negativo	positivo
*	26045	Hisopado	ND	ND	negativo	positivo
*	26046	Hisopado	ND	25,31	negativo	positivo
*	26047	Hisopado	ND	23,7	negativo	positivo
*	26048	Hisopado	ND	25,33	negativo	positivo
*	26049	Hisopado	ND	24,76	negativo	positivo
	CP620817	Hisopado	ND	26,47	negativo	positivo
		Saliva	ND	27,42	negativo	positivo
	CP620818	Hisopado	ND	26,17	negativo	positivo
*		Saliva	ND	24,02	negativo	positivo
	CP620306	Hisopado	ND	24,83	negativo	positivo
*		Saliva	ND	24,66	negativo	positivo
	CP620346	Hisopado	ND	27,26	negativo	positivo
*		Saliva	ND	22,47	negativo	positivo
	SC	Hisopado	ND	26,78	negativo	positivo
*		Saliva	ND	27,08	negativo	positivo
	CP617593	Hisopado	ND	26,58	negativo	positivo
	634945	Saliva	ND	29,77	negativo	positivo
	620769	Hisopado	ND	27,45	negativo	positivo
		Saliva	ND	24,91	negativo	positivo
	624837	Saliva	ND	23,22	negativo	positivo
	627587	Hisopado	ND	23,65	negativo	positivo
		Saliva	ND	27,09	negativo	positivo
	630631	Hisopado	ND	23,96	negativo	positivo
		Saliva	ND	26,1	negativo	positivo
	634946	Saliva	ND	28,28	negativo	positivo
	628573	Hisopado	ND	26,94	negativo	positivo
	628539	Saliva	ND	27,04	negativo	positivo
	623536	Saliva	ND	24,96	negativo	positivo
	623212	Saliva	ND	30,94	negativo	positivo

	634436	Saliva	ND	26,92	negativo	positivo
	634935	Saliva	ND	27,33	negativo	positivo
	635989	Saliva	ND	28,49	negativo	positivo
*	37429	Hisopado	ND	26,77	negativo	positivo
	5143	Hisopado	ND		negativo	positivo
	5144	Hisopado	ND		negativo	positivo
	5134	Hisopado	ND		negativo	positivo
	5071	Hisopado	ND		negativo	positivo
	5156	Hisopado	ND		negativo	positivo
	5154	Hisopado	ND		negativo	positivo
	5145	Hisopado	ND		negativo	positivo
	5132	Hisopado	ND		negativo	positivo
	5159	Hisopado	ND		negativo	positivo
	5153	Hisopado	ND		negativo	positivo
	5160	Hisopado	ND		negativo	positivo
	5155	Hisopado	ND		negativo	positivo

*Extracción de ARN realizada con menos de 300 µl.