

PUBLICACIÓN ANTICIPADA

Publicación anticipada

El Comité Editor de la Revista del Cuerpo Médico Hospital Nacional Almanzor Aguinaga Asenjo aprobó para publicación este manuscrito, teniendo en cuenta la revisión de pares que lo evaluaron y levantamiento de observaciones. Se publica anticipadamente en versión pdf en forma provisional con base en la última versión electrónica del manuscrito, pero sin que aún haya sido diagramado ni se le haya hecho la corrección de estilo. Siéntase libre de descargar, usar, distribuir y citar esta versión preliminar tal y como lo indicamos, pero recuerde que la versión electrónica final y en formato pdf pueden ser diferentes.

Advance publication

The Editorial Committee of the Journal Cuerpo Medico Hospital Nacional Almanzor Aguinaga Asenjo approved this manuscript for publication, taking into account the peer review that evaluated it and the collection of observations. It is published in advance in a provisional pdf version based on the latest electronic version of the manuscript, but without it having been diagrammed or style corrected yet. Feel free to download, use, distribute, and cite this preliminary version as directed, but remember that the final electronic and pdf versions may differ.

Citación provisional / Galdos Rodríguez GA, Atahualpa Manrique AR, Zeballos Carbajal DS. Comparación de los métodos de amplificación isotérmica mediada por asa (LAMP) y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, empleando transcriptasa reversa (qRT-PCR) como métodos de diagnóstico molecular de Sars Cov 2. Rev. Cuerpo Med. HNAAA [Internet]. 4 de diciembre de 2023 [citado 4 de diciembre de 2023];16(3). DOI: [10.35434/rcmhnaaa.2023.163.2142](https://doi.org/10.35434/rcmhnaaa.2023.163.2142)

Recibido / 28/07/2023

Aceptado / 14/09/2023

Publicación en Línea / 04/12/2023



Comparación de los métodos de amplificación isotérmica mediada por asa (LAMP) y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, empleando transcriptasa reversa (qRT-PCR) como métodos de diagnóstico molecular de Sars Cov 2

Comparison of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and real-time polymerase chain reaction methods using reverse transcriptase (qRT-PCR) as molecular diagnostic methods of Sars Cov 2

George Adán Galdos Rodríguez^{1,a,b}; Andrea del Rosario Atahualpa Manrique^{2,a}; Dolly Solange Zeballos Carbajal^{3,a,c}

1. Escuela de Posgrado de la Universidad Católica de Santa María, Arequipa, Perú
2. Egresados de la Universidad Católica de Santa María, Arequipa, Perú
3. Médico Patóloga clínica del Hospital III Goyeneche
 - a. Médico Cirujano
 - b. Ingeniero Biotecnólogo
 - c. Médico especialista en Patología Clínica

ORCID

1. George Adán Galdos Rodríguez / 0000-0003-2298-1009
2. Andrea del Rosario Atahualpa Manrique / 0009-0005-7180-9119
3. Dolly Solange Zeballos Carbajal / 0000-0003-4848-2339

Correspondencia

George Adán Galdos Rodríguez

Dirección: Calle Paz Soldán 112 – Tiabaya – Arequipa

Teléfono: 959394889

Email: 71083366@ucsm.edu.pe

Conflictos de interés

El autor declara no tener conflicto de interés

Financiamiento

Autofinanciamiento

Contribución de autoría

GAGR, conceptualizó, diseño de la metodología, realizó la búsqueda de información y participó en la revisión inicial y final.

AdRAM, conceptualizó, realizó la búsqueda de información, edición y estructura de la redacción y participó en la revisión inicial y final.

DSZC, revisión inicial, correcciones, edición y revisión final.

Sr. Editor

El artículo de Kitajima y colaboradores compara los métodos de amplificación isotérmica por asa (RT-LAMP) con la prueba de oro, reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, para el diagnóstico de COVID 19, mostrando que el desempeño de RT-LAMP es equivalente a qRT-PCR en utilidad y potencialidad aplicable con muestras que tienen ciclos umbrales menores (CT) de 36 ⁽¹⁾. En Perú, lo esperable para un manejo certero de la enfermedad COVID 19, era obtener un resultado temprano y con alta sensibilidad, para ello se necesitaba tener disponibilidad de pruebas con metodología de diagnóstico molecular, experticia en personal calificado, técnica preanalítica y de toma de muestra adecuada en manos capacitadas, sin embargo, en Perú se trabajó con pruebas inmunocromatográficas y de antígeno que daban un resultado en un promedio de 15 minutos, sin embargo, tenían sensibilidades bajas y alta frecuencia de falsos negativos; por ello la necesidad de aplicar pruebas basadas en el método RT-LAMP que no necesita la complejidad de tener laboratorios de ese nivel de seguridad y que brinda el mismo desempeño que la prueba molecular de oro usada para el diagnóstico de COVID 19.

La técnica de RT-PCR requiere de un laboratorio especializado con un nivel de seguridad de 2 a más, por lo que el transporte de muestras es inevitable; como consecuencia de ello, el tiempo estimado para recibir un resultado es de 2 a 3 días. En este caso, la emergencia de salud pública de la COVID 19, se tornó adversa pues no se pudo realizar una contención oportuna de la enfermedad por el retraso del resultado ⁽²⁾.

Como los test inmunodiagnósticos, la RT-PCR tiene dificultades en distinguir entre un verdadero positivo y un verdadero negativo en los casos de pacientes con COVID 19. Esta proporción de fallos en pacientes confirmados con COVID 19 y sus implicaciones clínicas, llevo a tener precaución en la interpretación de la PCR, en la necesidad de repetir el test o tener otras alternativas de diagnóstico. Estos resultados permitieron que aplicáramos una combinación del resultado del test con la clínica del paciente antes de dar un diagnóstico confirmatorio de COVID 19 ⁽³⁾.

Los falsos positivos en un RT-PCR pueden ocurrir por diversas razones, como tener una carga viral baja o tener una muestra mal tomada; la carga viral demuestra la cantidad de ARN presente en la muestra. Mientras más cantidad de carga viral, más cantidad de ARN en la muestra y más posibilidades de que la prueba salga positiva. Segundo, la carga viral de ARN puede estar sujeta a una desnaturalización o degradación de este en la muestra,

debido a una carga inapropiada o almacenamiento inadecuado de la muestra, lo que disminuye el monto final de ARN en la prueba a ser detectado. En tercer lugar, una carga viral suficiente se limita a un tiempo o período específico, en el que el virus se replica rápidamente y se elimina de las células. Cuarto, la carga viral varía en términos del sitio anatómico, de donde es extraída la muestra, pues en algunos pacientes ciertos especímenes obtenidos de una zona anatómica, son menores o mayores que en otros. Ante ello, la variabilidad de los falsos negativos, dependen de la carga viral, que fluctúa a lo largo del curso de la enfermedad, y en los especímenes obtenidos de pacientes con diferente clínica de la enfermedad ⁽³⁾.

Por ello, la importancia de incidir en un control adecuado de la toma de muestra, así como cuidado en la preanalítica y transporte de estas muestras, pues la carga viral del SARS-CoV-2 en la parte superior del tracto respiratorio es relativamente baja ⁽⁴⁾.

Incluso, debemos comparar las fuentes de hisopado para brindar un diagnóstico, pues debido a la menor carga viral en la parte superior del tracto respiratorio, la tasa de detección de SARS-CoV-2 es menor en los hisopados faríngeos que en el esputo según tres ensayos realizados y comparados en el estudio de Yan X ⁽⁴⁾.

Avetyan D, en su estudio de extracción libre usando RT-PCR para detección de SARS COV2, planteo que el éxito de una qRT-PCR está en la calidad de extracción del ARN. Sin embargo, en muchos lugares el asilamiento automático no está disponible, mientras que los asilamientos manuales demoran de 2 a 4 horas, aumentando la posibilidad de errores. La habilidad de omitir la purificación del ARN, implica utilizar kits, pero la sensibilidad de detección disminuye frente a la alternativa de extraer ARN puro. Por lo que, en este estudio, se saltan la extracción del ARN y se inactivaron las muestras a 95°C por 5 minutos antes de pasar a la PCR; comparado con el método convencional se demostró que la precisión de detección con una muestra directa depende en gran medida de la carga viral de esta y la confiabilidad disminuye drásticamente en las muestras con carga viral cerca de los límites de detección ⁽⁵⁾, por ello la importancia de que durante la pandemia cada laboratorio a nivel público y privado cuenten con equipos automatizados para reducir la posibilidad de errores al realizar extracciones de ARN manual.

Muller en su estudio demostró que la especificidad de la qRT-PCR también se ve influenciada si se usan hisopos nasofaríngeos que mostraron una sensibilidad del 87%

(IC:79-92%), mientras que usar hisopos nasales 3D con escobillón turbidinado mostró una sensibilidad del 98% (IC:79-92%), y una especificidad del 100% (IC:90-100%)⁽⁶⁾.

La RT-PCR, tiene que ser procesada con muestras de hisopado, sin embargo, hay personas que toman el espécimen solo de la nasofaringe, y otros que lo hacen tanto de la orofaringe como de la nasofaringe, en un estudio se detalló que ambas metodologías tienen la misma equivalencia, y que usar solo uno es suficiente para detección del virus SARS COV2⁽⁷⁾.

La amplificación isotérmica mediada por asa (LAMP) es un método que constituye una alternativa, pues utiliza cuatro cebadores especialmente diseñados y una ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de cadena para sintetizar ADN diana hasta 10^9 copias en menos de una hora a una temperatura constante de 65 °C⁽¹⁾. Además, los productos finales de LAMP son repeticiones invertidas de ADN en tallo-bucle del gen diana, que llevan estructuras con apariencia de coliflor.

Una ventaja de la técnica LAMP es que se realiza en un medio isotérmico, en comparación con una PCR convencional que si necesita de los cambios de temperatura para su desarrollo. La amplificación y la detección de ácidos nucleicos pueden completarse al mismo tiempo, en un solo paso, incubando la muestra de ácido nucleico, con 4 (o 6) cebadores diseñados específicamente y una ADN polimerasa en el mismo tubo de ensayo con una temperatura alrededor de 60 a 65 °C, dependiendo de la óptima sugerida por el método LAMP⁽⁸⁾. LAMP utiliza el desplazamiento de polimerasas en lugar de desnaturalización por calor para generar una plantilla monocatenaria; por lo tanto, tiene la ventaja de funcionar a una temperatura constante o isotérmica⁽⁴⁾.

Los ensayos mejorados y actuales LAMP emplean un total de seis cebadores, reconociendo ocho sitios distintos de la secuencia diana. Una ADN polimerasa se usa para iniciar la síntesis, mientras que dos cebadores forman estructuras de bucle para facilitar y acelerar las rondas posteriores de amplificación. Específicamente, LAMP emplea dos cebadores internos (FIP y BIP, que a su vez constan de dos partes cada una) y dos cebadores externos (F3 y B3 que puede reconocer un total de seis regiones distintas dentro del ADN diana)⁽⁹⁾.

Comparado con la RT-PCR, LAMP no utiliza muestras de hisopado, que requiere de la exposición del personal para la toma de muestra, por ello existe métodos como HP-LAMP (amplificación isotérmica mediada por bucle de alta performance), que es una prueba

rápida en saliva que tiene como límite de detección 1,4 copias de SARS COV 2 por microlitro de saliva, la especificidad y sensibilidad de la muestra es mayor del 96%, proceso que ocurre en 4 pasos ⁽¹⁰⁾.

La RT-LAMP es una alternativa fácil de usar, con una tecnología que se centra en muestras de secreciones respiratorias y lavados faríngeos en lugar de hisopos porque varios medios de transporte pueden inhibir o reducir la actividad de la transcriptasa reversa. Incluso otra razón de aplicar la RT-LAMP en el contexto de la pandemia fue que el suministro de hisopos con medios de transporte de fluido, estaban sufriendo una escasez crítica en una fase de aumento significativa de las pruebas.

Una limitación del RT LAMP es que requiere de la apertura de tubos RT LAMP y reactivos secundarios, lo que genera un potencial riesgo de contaminación con productos de amplificación de otros ensayos.

Al combinar la técnica de RT-PCR y RT-LAMP aumentan la sensibilidad del diagnóstico al 92 – 100 % ⁽¹⁾.

Tabla 1: Comparación entre RT-PCR y LAMP adaptada de Nyugen T y cols ⁽²⁾

RT- PCR	LAMP
1. Ciclos térmicos de temperatura (múltiples calentamientos y ciclos de enfriamiento).	1. Amplificación continua e isotérmica.
2. Requiere de la concentración de muestras y preparación.	2. Sirve para detección de virus, como norovirus humano o influenza, LAMP ofrece un solo paso de detección.
3. Múltiples protocolos y manos expertas.	3. Un protocolo más rápido y simple.
4. Presencia de inhibidores ocultan la reacción.	4. Inhibidores tolerables y más estable.
5. Sensibilidad de diagnóstico del 95%.	5. Sensibilidad de diagnóstico mayor al 95%.
6. Técnica establecida.	6. Aplicaciones de LAMP ya han sido probadas y exploradas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Kitajima H, Tamura Y, Yoshida H, Kinoshita H, Katsuta H, Matsui C, et al. Clinical COVID-19 diagnostic methods: Comparison of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) and quantitative RT-PCR (qRT-PCR). *J Clin Virol.* 2021; 139:104813.
2. Nguyen T, Duong Bang D, Wolff A. 2019 Novel Coronavirus Disease (COVID-19): Paving the Road for Rapid Detection and Point-of-Care Diagnostics. *Micromachines.* 2020;11(3):306.
3. Teymouri M, Mollazadeh S, Mortazavi H, Naderi Ghale-Noie Z, Keyvani V, Aghababaei F et.al. Recent advances and challenges of RT-PCR tests for the diagnosis of COVID-19. *Pathol Res Pract.* 2021; 221:153443.
4. Xiao Yan. Comparison of three TaqMan real-time reverse transcription-PCR assays in detecting SARS-CoV-2. *J Virol Methods.* 2021; 288:114030.
5. Avetyan, Diana. SARS-CoV-2 detection by extraction-free qRT-PCR for massive and rapid COVID-19 diagnosis during a pandemic in armenia. *J Virol Methods.* 2021; 295:114199.
6. Muller, Meredith. Practical strategies for SARS-CoV-2 RT-PCR testing in resource- constrained settings. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2021;101(2):115469.
7. Desmet T, Paepe P, Boelens J, Coorevits L, Padalko E, Vandendriessche S, Leroux-Roels I, Aerssens A, Callens S, Braeckel EV, Malfait T, Vermassen F, Verhasselt B. Combined oropharyngeal/nasal swab is equivalent to nasopharyngeal sampling for SARS-CoV-2 diagnostic PCR. *BMC Microbiol.* 2021 ;21(1):31.
8. Thompson D, Lei Y. Mini review: Recent progress in RT-LAMP enabled COVID-19 detection. *Sens Actuators Rep.* 1 de noviembre de 2020;2(1):100017.
9. Kashir J, Yaqinuddin A. Loop mediated isothermal amplification (LAMP) assays as a rapid diagnostic for COVID-19. *Med Hypotheses.* 2020; 141:109786.
10. Wei S, Suryawanshi H, Djandji A, Kohl E, Morgan S, Hod EA, et al. Field-deployable, rapid diagnostic testing of saliva for SARS-CoV-2. *Sci Rep.* 2021;11(1):5448.