

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



Porto Alegre

2022

Detecção de SARS-CoV-2 utilizando a metodologia de LAMP em amostras nasofaringeas para alvos moleculares alternativos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Vlademir V. Cantarelli

Porto Alegre

2022

Catálogo na Publicação

da Rosa Hoffmann, Elias

Detecção de SARS-CoV2 utilizando a metodologia de LAMP em amostras nasofaríngeas para alvos moleculares alternativos / Elias da Rosa Hoffmann. -- 2022.

59 p. : 30 cm.

Tese (doutorado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2022.

Orientador(a): Vlademir Vicente Cantarelli.

1. SARS-CoV2. 2. COVID19. 3. LAMP. I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Elias da Rosa Hoffmann

**DETECÇÃO DE SARS-CoV-2 UTILIZANDO A METODOLOGIA DE
LAMP EM AMOSTRAS NASOFARINGEAS PARA ALVOS
MOLECULARES ALTERNATIVOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, com requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Banca examinadora:

Dr. Afonso Barth (UFRGS)

Dr. Cicero Dias (UFCSPA)

Dra. Marina Venzon Antunes (FEEVALE)

Dra. Bruna Amorin (CESUCA)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer principalmente o professor orientador Dr. Vlademir Cantarelli por ajudar e apoiar esse trabalho. Além de agradecer os colegas e amigos que participaram de forma direta e indireta: Tatiane Dreifke, Marco A. Ghiotto, Guilherme Gaboardi, Lisiane Rocha, Everton Inamine, Lisiane Pancotto, Sandrine Wagner, Mauricio Bassuino e Rodrigo Binkowski

Agradeço especialmente aos professores Afonso Barth, Cicero Dias, Marina Antunes, Bruna Amorin e Karine Zimmer, que auxiliaram para a finalização do trabalho.

Resumo

No ano de 2020 a Organização Mundial da Saúde decretou (OMS) pandemia à nível mundial causada pelo SARS-CoV-2. Diversos métodos diagnósticos foram propostos, principalmente imunológicos e moleculares, inclusive pelo *Centers for Disease Control and Prevention*, para identificar o vírus. Este trabalho tem como objetivo validar e padronizar uma técnica de *Loop-mediated isothermal Amplification* (LAMP) tendo como alvo uma região do gene da RNA polimerase viral, tendo em vista que o LAMP é um método mais rápido e de menor custo quando comparado aos demais métodos moleculares. Este trabalho descreve os resultados obtidos com a metodologia de LAMP proposta, aplicada em 115 amostras de nasofaringe (43 positivas para SARS-CoV2 e 72 negativas), previamente testadas pela metodologia da reação em cadeia da polimerase em tempo real com transcrição reversa (RT-PCR), determinando sua sensibilidade e especificidade. A técnica de LAMP proposta mostrou sensibilidade de 90,7%, e especificidade de 100%, para um limite de detecção de 40 cópias/μl. O valor preditivo positivo foi de 100% e o valor preditivo negativo de 94,7%, com acurácia de 96,5%. A técnica de LAMP também apresentou a possibilidade de ser aplicada sem modificações para a detecção das novas variantes do SARS-CoV2. O método de LAMP, usado como gene alvo a região RNA Polimerase (RP). quando comparado com o RT-PCR, demonstrou ser uma técnica rápida e de menor custo, podendo ser uma excelente alternativa para países em desenvolvimento e com poucos recursos. O teste mostrou adequada sensibilidade para a identificação de amostras com cargas virais baixas (40 cópias/μl) e altas (>4000 cópias/μl), porém, em amostras com carga viral extremamente baixas (<40 cópias/μl), e detectadas por RT-PCR, podem resultar falso-negativas. Para corroborar o uso da técnica de LAMP, foi realizada uma revisão sistemática com meta-análise sobre o uso da metodologia de LAMP para a detecção do SARS-CoV-2. A busca resultou em 229 artigos, dos quais 19 artigos foram selecionados para compor a revisão final. A metodologia de LAMP mostrou uma alta especificidade na detecção de SARS-CoV-2 e uma ampla variação de valores de sensibilidade. O método LAMP foi considerado um método rápido e altamente específico para detecção de SARS-CoV-2; no entanto, algumas variáveis como o pH das amostras e concentração do RNA viral podem afetar sua sensibilidade e desempenho geral.

Palavras-chave: SARS-CoV2. LAMP. COVID19.

Abstract

In 2020, the World Health Organization (WHO) declared the state of global pandemic caused by SARS-CoV-2. To identify the virus, several immunological and molecular assays have been proposed by international agencies, including the Centers for Disease Control and Prevention. The aim of this study was to validate and standardize a Loop-mediated isothermal Amplification (LAMP) method targeting the viral RNA polymerase gene, as a faster and low-cost assay as compared to other molecular techniques. This paper describes the results obtained with the proposed LAMP methodology, applied to 115 nasopharyngeal samples (43 positive for SARS-CoV2 and 72 negative), previously tested by reverse transcription polymerase chain reaction assay (RT-PCR). The proposed LAMP technique showed a sensitivity of 90.7% and a specificity of 100%, for a detection limit of 40 copies/ μ l. The positive predictive value was 100% and the negative predictive value was 94.7%, with an accuracy of 96.5%. The LAMP technique also presented the possibility of being applied without modifications for the detection of new variants of SARS-CoV2. The LAMP methodology using the SARS-CoV-2 RP gene as the target was faster and less expensive than other molecular approaches such as the RT-PCR, making it an excellent alternative for developing countries and those with few resources. The test showed adequate sensitivity for identifying samples with low (40 copies/ μ l) and high (>4000 copies/ μ l) viral loads, however, in specimens with extremely low viral loads (<40 copies/ μ l), previously detected by RT-PCR, may result in false negatives when using the LAMP assay. To corroborate the use of the LAMP technique, a systematic review with meta-analysis was carried out on the use of the LAMP methodology for the detection of SARS-CoV-2.. The search resulted in 229 articles, of which 19 articles were selected to compose the final review. In general, the LAMP methodology showed high specificity in the detection of SARS-CoV-2 and a wide range of sensitivity values. The LAMP assay was considered a rapid and highly specific method for detecting SARS-CoV-2; however, some variables such as sample pH and viral RNA concentration can affect its sensitivity and overall performance.

Keywords: SARS-CoV-2; LAMP; COVID19.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Figura representativa do SARS-CoV-2.....	15
Figura 2- Representação da etapa não cíclica da reação de LAMP	23
Figura 3- Representação da etapa cíclica da reação de LAMP	24

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BIP	<i>Backward Inner Prime</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CIVD	Coagulação Intravascular Disseminada
COVID-19	Doença do Coronavírus-2019
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunsorbent Assay</i>
ESPII	Estado de Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional
FIP	<i>Forward Inner Primer</i>
LAMP	<i>Loop-Mediated Isothermal Amplification</i>
MERS-CoV	Coronavirus Síndrome Respiratória do Oriente Médio
NAATs	Testes de Amplificação de Ácido Nucleico
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RP	RNA Polimerase
RT-LAMP	<i>Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification</i>
RT-PCR	Reação em cadeia da Polimerase com transcrição reversa
TP	Tempo de Protrombina
TTPA	Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado
OMS	Organização Mundial de Saúde
SARS-CoV	Coronavirus da Síndrome Respiratória Aguda Grave
SARS-CoV-2	Coronavirus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave
WBC	<i>White Blood Cell</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1.SARS-COV-2: Epidemiologia.....	13
2.2.SARS-COV-2: Estrutura viral	14
2.2.1. Variantes do SARS-CoV-2.....	16
2.2.1.1. Variante monitorada (Variant Being Monitored – VBM)	16
2.2.1.2. Variante de Interesse (Variant of interest – VOI)	17
2.2.1.3. Variante de Preocupação (Variant of Concern – VOC)	17
2.2.1.4. Variante de alta consequência (Variant of High Consequence – VOHC)	17
2.3.Características Laboratoriais	17
2.4.Métodos de detecção do antígeno.....	18
2.5.Metodologia da RT-PCR	20
2.6.Loop-mediated isothermal Amplification (LAMP)	21
3. JUSTIFICATIVA	26
4. OBJETIVOS	27
4.1.Objetivo geral.....	27
4.2.Objetivos específicos	27
5. REFERÊNCIAS	28
6. MANUSCRITO 1	31
7. MANUSCRITO 2	40
8. CONCLUSÃO.....	49
ANEXO	50

1. INTRODUÇÃO

Em dezembro de 2019 o mundo entrou em estado de alerta com o anúncio de muitos casos de pneumonias causadas por um novo coronavírus, confirmado como sendo uma espécie nova de coronavírus na primeira semana de janeiro de 2020. Oriundo da província chinesa de Wuhan, o vírus disseminou-se rapidamente e causando diversos sintomas respiratórios nos pacientes infectados. Em 31 de janeiro de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou “Estado de Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional” (ESPII). Para impedir a disseminação do vírus foram estabelecidos protocolos de contenção e isolamento social, mesmo assim a disseminação global do vírus foi inevitável, resultando em formas graves de COVID-19 entre os infectados, tendo como consequência alto número de óbitos em diversos países.

A COVID-19 foi reconhecida como a quinta pandemia de vírus respiratórios desde a de 1918. Desde seu início, diversas estratégias de métodos diagnósticos foram propostos para a detecção do vírus, iniciando com os testes moleculares e seguidos por testes imunológicos (1). Diversas organizações desenvolveram seus próprios métodos para a detecção do SARS-CoV-2, incluindo o Centers for Disease Control and Prevention (CDC), e o Instituto Johns Hopkins, que comparou diversos ensaios publicados em diferentes regiões (2-5).

A principal metodologia utilizada foi a reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR), precedida pela transcrição reversa do RNA viral. A RT-PCR possui alta sensibilidade e especificidade para a identificação da presença do vírus em amostras clínicas, porém é um método que exige treinamento e equipamentos especiais, e cujo custo pode ser demasiado elevado para determinados centros que almejam a detecção deste patógeno. Este trabalho tem como objetivo validar e padronizar uma técnica baseada em Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) para a detecção direta do SARS-CoV-2 em amostras de nasofaringe, sendo mais rápida, menos trabalhosa e com menor custo quando comparado aos demais métodos moleculares.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. SARS-COV-2: Epidemiologia

No dia 31 de dezembro de 2019, a Organização Mundial da Saúde (OMS) foi notificada sobre o surgimento de 54 casos de pneumonia sem causa evidente, na província de Wuhan, China. Em 07 de janeiro de 2020, autoridades chinesas confirmaram que os casos estavam associados à infecção por um novo vírus respiratório pertencente à classe dos coronavírus. À doença causada pela infecção deste novo vírus deu-se o nome de Doença do Coronavírus-2019 (COVID-19) (6).

Os casos de infecções pelo SARS-CoV-2 foram relatados em janeiro de 2020 na Tailândia e, em poucos meses, aumentaram exponencialmente, espalhando-se para todos os continentes, com exceção da Antártica (7, 8). Em 30 de janeiro de 2020 foi registrado o primeiro caso de COVID-19 na Índia e logo após começaram aumentar as notificações (7). Em Abril de 2020 os casos confirmados estavam sendo relatado em todo mundo, principalmente entre: Estados Unidos (32,63%), Espanha (6,32%), Rússia (5,28%), Reino Unido (5,23%), Itália (5,23%), França (4,22%), Alemanha (4,09%), Brasil (3,88%), Turquia (3,30%), Irã (2,56%), e outros países apresentavam uma taxa de detecção inferior a 2% (9).

Na Itália a epidemia apresentou uma curva de crescimento de casos exponencial, amplamente divulgada inclusive nos meios de comunicação, provavelmente devido a presença de indústrias, agricultura e comércio internacional. Além disso, locais com maior poluição por material particulado fino demonstraram aumento significativo de casos de infecções respiratórias, a taxa de letalidade causada pelo SARS-CoV-2 na Itália chegou à 11,7% (10).

A nível mundial a taxa de letalidade da COVID-19 foi de 6,3%, porém, dependendo do local e faixa etária dos infectados, foi superior a 15%. Segundo os primeiros modelos de contingência adotados para a COVID-19, eram necessárias 10 a 12 semanas para controlar um surto na comunidade (11). No Brasil, o primeiro caso reportado como confirmado foi em fevereiro de 2020 em um paciente que retornava de uma viagem à Itália, e em março 2020 foi notificada a primeira morte associada ao COVID-19, ambos no estado de São Paulo (12). A partir do surgimento de novos

casos, a OMS declarou estado de surto, e foram preconizadas medidas de isolamento social e fechamento das escolas como medidas emergenciais. Em abril de 2020 a taxa mundial de mortalidade era de 5,68% e os programas de rastreamento colaboraram para a identificação e contenção de casos nos grandes centros (11-13).

Até novembro de 2022, foram notificados 637.404.847 casos confirmados de Covid-19 e 6.608.893 mortes, mostrando uma situação pontual de aumento na Europa, onde foram confirmados 264.434.340 casos. O acompanhamento do crescimento dos números da pandemia pode ser realizado através do *dashboard* (<https://covid19.who.int/>), divulgado e atualizado diariamente pela OMS (14).

No Brasil o primeiro caso confirmado de COVID-19 foi em fevereiro de 2020 de um paciente que retornava da Itália, logo após o aumento dos casos foi exponencial tornando o Brasil o epicentro das infecções por SARS-CoV-2 nas américas que mostraram mais de 21,2 milhões de casos e 591,000 mortes em setembro de 2021 (12). De acordo com Giovanetti *et al* (2022), o surgimento de novas variantes no Brasil teve início em 2021, com a segunda onda de COVID-19 e o aparecimento no país das variantes Gamma, Alpha/B1.1.7 e Zeta (12). Conforme dados disponibilizados pela OMS sobre o coronavírus, em 9 de outubro de 2022 foram relatados globalmente mais 2,8 milhões de casos novos de COVID-19 e cerca de 9.000 vítimas fatais registradas neste período (15).

2.2. SARS-COV-2: Estrutura viral

Os coronavírus são uma classe de vírus amplamente distribuídos, que infectam mamíferos e aves, causando doenças de trato respiratório ou gastrointestinais geralmente leves, com exceção da SARS e da MERS(16). O genoma dos coronavírus é composto de RNA de fita simples de sentido positivo, sendo o mais extenso dentre todos os genomas encontrados em vírus de RNA (16, 17). O sequenciamento genético do SARS-CoV-2, inicialmente obtido a partir de isolados de cinco pacientes em Wuhan no início da pandemia, demonstrou uma semelhança de aproximadamente 80% com a sequência genômica do SARS-CoV e 96% com a cepa RaTG13 de coronavírus de morcego, sugerindo que este novo coronavírus seria uma evolução natural desta cepa

(18).

No entanto, novas pesquisas sugeriram que um outro hospedeiro intermediário, o mamífero pangolim, estava associado à mutação que tornou o novo coronavírus infectante para seres humanos. Segundo Lam *et al*, o genoma do SARS-CoV-2 apresenta 97,4% de similaridade com a sequência de um coronavírus de pangolim Guangdong em seu domínio de ligação com o receptor, embora assemelhe-se mais à cepa RaTG13 de morcego no restante do genoma (19).

O genoma do SARS-CoV-2 contém genes que codificam quatro proteínas estruturais do vírus, são elas: proteína espícula (S, *spike*), de membrana (M), de envelope (E) e do nucleocapsídeo (N) e outras 16 proteínas não estruturais (NSP) que auxiliam nos processos de replicação e transcrição de novos vírions, além de algumas proteínas acessórias (16). Os vírus SARS-CoV típicos contêm, pelo menos, seis regiões denominadas *Open Reading Frame* (ORF) em seu genoma, com exceção dos Gammacoronavirus, com nsp1 em sua estrutura que codifica proteínas estruturais. No SARS-CoV-2 a Região ORF1a/b tem cerca de dois terços do comprimento do genoma e codifica 16 nsps, contendo dois polipeptídeos pp1a e pp1ab, que produzem proteínas com características de proteases. Além disso, há também a proteína Hemaglutinina Esterase (HE), responsável pela manutenção e replicação do genoma viral (20). A figura 1 apresenta o esquema de organização das proteínas virais do SARS-CoV-2

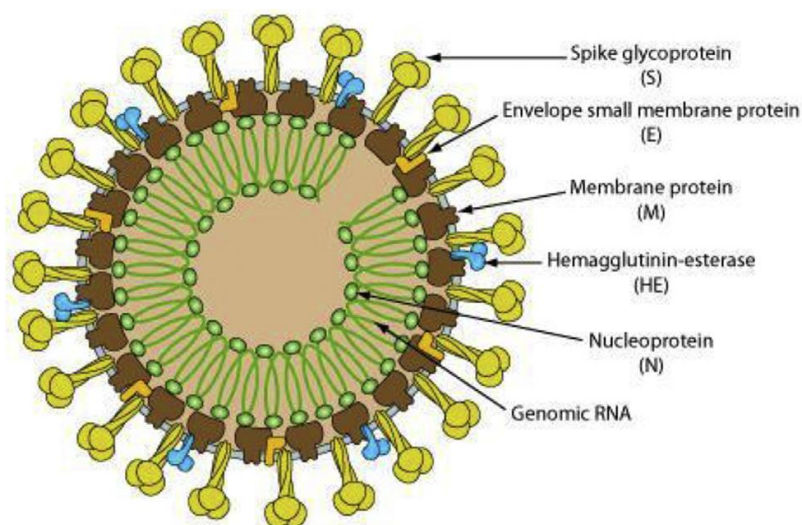


Figura 1: Figura representativa do SARS-CoV-2. Fonte: Adaptado de Mousavizadeh e Ghasemi 2020.

2.2.1. Variantes do SARS-CoV-2

Os vírus, particularmente com material genômico RNA, são conhecidos por sofrerem mutações devido à baixa capacidade de revisão da enzima RNA polimerase, facilitando com isso o aparecimento de vírus emergentes, com melhor adaptação para infectarem seus hospedeiros (21). O SARS-CoV-2 também demonstrou produzir mutações e recombinações, aumentando a preocupação dos órgãos de saúde pública. Durante a pandemia foram notificados em diversas regiões do mundo o surgimento de variantes, sendo atribuindo nomes distintos a cada mutação que surgia (22). As novas variantes modificavam a transmissibilidade e a virulência do vírus. Com isso, em abril de 2022 o CDC propôs uma classificação de todas as variantes do SARS-CoV-2 encontradas até aquele momento, estabelecendo também as características próprias de infecciosidade e preocupação epidemiológica de cada variante (22, 23). Essas variantes foram classificadas em: Variante monitorada (Variant Being Monitored – VBM), Variante de Interesse (Variant of interest – VOI), Variante de Preocupação (Variant of Concern – VOC) e Variante de alta consequência (Variant of High Consequence – VOHC) (22, 23), que serão descritas a seguir.

2.2.1.1. Variante monitorada (Variant Being Monitored – VBM)

As VBM são variantes onde os índices indicam que pode haver potencial impacto nas medidas médicas aprovadas ou autorizadas, associadas a um prognóstico mais grave ou transmissibilidade aumentada, mas com circulação baixa ou não detectada. Indiferente aos índices, essas variantes continuam sendo monitoradas devido ao risco à saúde pública. De acordo com CDC, nesta classificação entram: Alpha (B.1.1.7 e linhagens Q), Beta (B.1.351 e linhagens descendentes), Gamma (P.1 e linhagens descendentes), Delta (B.1.617.2 e linhagens AY), Epsilon (B.1.427 e B.1.429), Eta (B.1.525), Iota (B.1.526), Kappa (B.1.617.1), 1.617.3, Mu (B.1.621, B.1.621.1) e Zeta (P.2) (22).

2.2.1.2. Variante de Interesse (Variant of interest – VOI)

As VOI são variantes que apresentam regiões genéticas alteradas, associadas a ligação do receptor e possibilidade de ocorrer a diminuição da neutralização por anticorpos gerados por infecção prévia do vírus ou vacinação, ocasionando um aumento da transmissibilidade e agravamento da doença. Nesta classificação foram rastreadas: Epsilon (B.1.427 e B.1.429), Zeta (P.2), Eta (B.1.525), Theta (P.3), Iota (B.1.526), Kappa (B.1.617.1), Lambda (C.37) e Um (B.1.621) (22, 24).

2.2.1.3. Variante de Preocupação (Variant of Concern – VOC)

As VOC são variantes associadas ao aumento da transmissibilidade, agravamento da doença, falhas na detecção do vírus e redução significativa da neutralização por anticorpos induzidos por infecção prévia ou vacinação. Essas variantes exigem mais atenção e ações apropriadas dos órgãos de saúde pública, sendo esta classificação atualizada com o surgimento de novas mutações: Omicron (B.1.1.529, BA.1, BA.1.1, BA.2, BA.3, BA.4 e linhagens BA.5) (22).

2.2.1.4. Variante de alta consequência (Variant of High Consequence – VOHC)

As Variantes chamadas VOHC são similares às VOC e VOI, mas demonstram, de acordo com CDC, evidências claras de redução da eficácia, em relação as variantes anteriores, em medidas de prevenção e intervenção médica. Entretanto até o momento não foram identificadas variantes VOHC nos Estados Unidos

2.3. Características Laboratoriais

Diversos parâmetros e marcadores ainda estão sendo aferidos em pacientes para a identificação precoce do prognóstico do paciente som a COVID-19.

Com relação aos aspectos hematológicos, no estudo conduzido na China por Bingwen e colaboradores, foi demonstrado no hemograma que podemos observar, em alguns pacientes na admissão do serviço de saúde, uma leucopenia (<4.000 White Blood Cell [WBC]), com apenas um paciente apresentando uma leucopenia grave, com <2.000 WBC (25). Além disso outros autores relataram linfopenia e monocitopenia como um prognóstico ruim para o paciente (25-27). Em comparação, um estudo mostrou uma neutrofilia absoluta em pacientes logo que admitidos no serviço de saúde, com neutrófilos >5 x10⁹/L em 14/40 casos (28).

Adicionalmente, é possível notar algumas alterações morfológicas nas distensões sanguíneas destes pacientes, como, por exemplo, observação de linfócitos atípicos, sendo alguns com aspectos plasmocitóides (28,29). Outra anormalidade visualizada em pacientes graves foram os chamados “cristais da morte” ou “cristais verdes” presentes nos neutrófilos e monócitos. Esses achados foram mais comumente encontrados em pacientes com doença hepática severa (30).

Referente às plaquetas e seu consumo, os estudos mostraram que podem estar levemente ou severamente diminuídas, e isso pode ser o estágio inicial da Coagulação Intravascular Disseminada (CIVD). (25). Alguns marcadores são úteis para este tipo de coagulopatia da CIVD, que mostram um tempo prolongado como tempo tromboplastina parcial ativado (TTPA) e tempo de protrombina (TP), que, em conjunto com o aumento dos níveis de D-dímeros apontam para o diagnóstico de CIVD (27).

Já na avaliação bioquímica, foram observados níveis aumentados de lactato desidrogenase (LDH), ferritina e prolactina (27). O quadro se caracteriza como uma infecção sistêmica com aumento da interleucina-6, e, com isso requer atenção para o desenvolvimento de uma anemia de doença crônica originada pela liberação de hepcidina e, conseqüentemente, o fechamento dos canais de ferroportina (25, 27).

2.4. Métodos de detecção do antígeno

Com a necessidade de testes rápidos para laboratórios, ou em locais de atendimento (point-of-care), foram criados emergencialmente diversos imunoensaios

para a identificação de antígenos virais e anticorpos (IgM e IgG) produzidos pela infecção viral. Inicialmente porém, a maioria destes testes não mostraram uma sensibilidade e especificidade elevada (31, 32). Também foram desenvolvidos testes para a detecção de proteínas virais diretamente em amostras respiratórias (swabs nasais e nasofaringe) e até mesmo saliva, empregando tecnologias variáveis de detecção, como imunoenaios tipo sanduiche de fluxo lateral, imunofluorescência fluídica e cromatográficos digitais (31). Boum e colaboradores (2021) demonstraram baixa sensibilidade na detecção do SARS-CoV-2 com testes de antígeno e anticorpos, com sensibilidade de 80,0% e 26,8%, respectivamente, nos primeiros 7 dias após o início dos sintomas clínicos. Com testes para detecção de anticorpos sendo utilizado após 14 dias do início dos sintomas, obteve-se um aumento de sensibilidade, para 76,4% (32). De acordo com fabricantes dos testes para detecção do antígeno, entre 5 e 7 dias do início dos sintomas, a precisão destes testes seria semelhante aos testes moleculares. Além disso, em alguns estudos foi demonstrado que nos primeiros 8 dias dos sintomas o vírus pode ser cultivado (33-35).

Em comparação com a reação em cadeia da polimerase junto a transcrição reversa, o teste de ELISA (Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay) para o antígeno em pacientes sintomáticos mostrou uma sensibilidade de 94,0% e especificidade de 91,0% (32). A OMS recomendou que em locais onde testes moleculares não estavam disponíveis ou onde o tempo para o resultado estava prolongado devido à alta demanda, se poderia utilizar testes de antígenos para a detecção do SARS-CoV-2 (31).

Peeling e colaboradores (2021) compararam os principais testes para detecção de antígeno, que seguiam a recomendação da OMS, com um mínimo de 80% de sensibilidade e 97% de especificidade para diagnóstico rápido. No estudo, ficou demonstrado que a especificidade do teste pode ser um problema em períodos de baixa prevalência da infecção, acompanhado pelo valor preditivo positivo que aumenta ou diminui proporcionalmente de acordo com o estado epidemiológico da região. Os autores demonstraram que estes testes poderiam levar a altas taxas de falso-positivos e devem ser acompanhados de testes sorológicos e testes moleculares para confirmação dos resultados, sendo ferramenta necessária para locais endêmicos e com altas taxas de cargas virais (35).

Entretanto, mesmo com a evolução das metodologias de detecção de antígenos ou anticorpos, os testes baseados na amplificação de ácidos nucleicos virais são os que possuem maior capacidade para a detecção do vírus, incluindo o período inicial do aparecimento dos sintomas, potencialmente com maior potencial para controle de isolamento e diminuição das chances de transmissibilidade do vírus entre pessoas assintomáticas próximas (32).

2.5. Metodologia da RT-PCR

Utilizado como padrão ouro para testes moleculares a reação em cadeia da polimerase (PCR) foi desenvolvida nos anos 80 e aprimorada até hoje. O método baseia-se na por amplificação específica de um fragmento de DNA ou cDNA alvo, resultando em bilhões de fragmentos deste DNA alvo, possibilitando a qualificação e/ou quantificação do número de cópias do material genético em estudo (36, 37).

Com os avanços tecnológicos foi possível desenvolver técnicas onde são utilizadas moléculas fluorescentes para a detecção da amplificação em tempo real. Passaram a ser utilizadas sondas marcadas com moléculas fluorescentes ou fluoróforos intercalantes de DNA, como o SYBR-Green, assim possibilitando o acompanhamento em tempo real da amplificação da região de interesse (37).

A técnica da PCR geralmente utiliza um par de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) para flanquear a região de interesse ou gene alvo para a amplificação. Após a etapa de desnaturação das cadeias de DNA e o anelamento específico dos *primers* em suas sequencias complementares, uma enzima (Taq polimerase) polimerase adiciona as bases nitrogenadas complementando a sequência das cadeias amplificando a região compreendida entre os *primers* utilizados, resultando em bilhões de cópias da região alvo. Quando há a necessidade de amplificação de um alvo de RNA, é crucial uma etapa anterior à amplificação pela PCR, que é chamada de transcrição reversa, onde um enzima (*Reverse Transcriptase* - RT) converte previamente o RNA em cDNA, assim tornando possível à amplificação do alvo específico pela PCR (37).

A rápida disseminação e aumento do número de casos de COVID-19, torna

necessária a identificação e diagnóstico precoce, sendo o diagnóstico fundamental para a prevenção e controle da pandemia. Junto ao diagnóstico médico, as abordagens baseadas na detecção de ácidos nucleicos tornaram-se uma tecnologia rápida e confiável para a detecção do SARS-CoV-2. A RT-PCR em tempo real é caracterizada pela capacidade de detecção rápida, alta sensibilidade e especificidade. Portanto, o método de RT-PCR em tempo real pode ser considerado como o principal método a ser aplicado para detectar o agente causador da COVID-19, especialmente nos estágios iniciais da doença, quando há replicação ativa do vírus.(38)

A RT-PCR é a técnica padrão ouro para a identificação do SARS-CoV-2, mas torna necessário espaços dedicados ao setor de biologia molecular no laboratório de análises clínicas, assim como, equipamentos específicos e reagentes próprios. Além da técnica ser mais cara e necessitar pessoal altamente qualificado, tornou-se um problema de saúde pública com a sobrecarga e escassez de insumos nos serviços que ofereciam o teste de RT-PCR para SARS-CoV2 (39). Com essa situação de pandemia mundial a necessidade de testes rápidos, simples e econômicos era uma necessidade, diversos centros de pesquisas, universidades e centros universitários começaram a buscar metodologias para suprir essa demanda (40). A partir disso surgiu a probabilidade de utilização do teste de Loop-mediated isothermal Amplification (LAMP) como uma alternativa confiável de amplificação e detecção do SARS-CoV2. (39, 40)

2.6. Loop-mediated isothermal Amplification (LAMP)

A busca de alternativas diagnósticas para a COVID-19, principalmente para diminuir o custo dos testes e tempo necessário para o diagnóstico de SARS-CoV-2, levou a investigação de novas técnicas moleculares, como, por exemplo, a metodologia de Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) (3, 41-43). A proposta para o uso de LAMP para o diagnóstico de COVID-19 teve seu início em fevereiro de 2020 com El-Tholoth e colaboradores (26), com a introdução de um teste de amplificação de ácidos nucleicos rápido e com o custo mais acessível, especialmente indicado para locais de baixa renda (44).

A metodologia de LAMP foi desenvolvida por Notomi e colaboradores em meados

do ano 2000 como uma técnica que permitia a amplificação de material genético de forma rápida e eficiente e em condições isotérmicas, dispensando assim o uso de termocicladores. (45) .Na reação de LAMP, a enzima Bst polimerase age como ferramenta desnaturante ao deslocar uma das fitas de DNA, deixando as regiões de ligação dos primers expostas, ao mesmo tempo em que é capaz de realizar a polimerização das novas fitas complementares a partir da ligação de iniciadores específicos, tudo sem necessidade de ciclos de aquecimento e resfriamento, como acontece com a PCR (45, 46) .

Originalmente, a solução é aquecida para a desnaturação das fitas de DNA por ação do calor, e, em seguida rapidamente resfriada em gelo antes de ser novamente aquecida e mantida à temperatura constante de aproximadamente 65°C. A reação de LAMP inicia com a adição da Bst polimerase na solução aquecida contendo a amostra e o mix de reação com primers e outros componentes necessários. A reação de LAMP consiste em duas etapas, chamadas: não cíclica e cíclica (45).

Inicialmente, Notomi e colaboradores descreveram a técnica utilizando apenas 2 iniciadores internos, denominados FIP (Forward inner primer) e BIP (Backward inner primer) e 2 iniciadores externos, chamados F3 e B3 (Forward and Backward outer primers), especialmente desenhados para reconhecerem seis áreas distintas e específicas do DNA alvo (45). Opcionalmente um par extra de iniciadores de loop (LF e LR) podem ser adicionados, a fim de acelerar o processo de amplificação, reduzindo de 30% até 50% o tempo de reação e aumentando a especificidade do teste (47, 48).

A etapa não cíclica é a primeira parte da reação de LAMP, onde a região F2 de FIP hibridiza com a região complementar F2c (complementar) do DNA alvo e a enzima Bst polimerase liga-se a extremidade 3' livre do primer iniciando a síntese da fita complementar (Figura 2, passos 1 e 2). O primer externo F3 tem complementariedade com uma região mais externa em relação ao sítio de ligação do primer FIP, a região F3c. Após a hibridização F3/F3c, a polimerase inicia a síntese de DNA com deslocamento de fita dupla, desprendendo a fita complementar recém-sintetizada pela ligação do primer FIP (Figura 2, passos 3 e 4). O fragmento de DNA livre pode então formar o loop em uma das extremidades através da hibridização da região F1c do primer FIP com a região F1 da fita complementar recém-sintetizada (Figura 2, passos 5 e 6). Esta fita de DNA será molde para a síntese de DNA, a partir de BIP, na outra

extremidade, seguido por síntese e deslocamento de fita com início em B3, semelhante ao já descrito para FIP e F3 (Figura 2, passo 7). Como resultado, obtém-se uma fita de DNA em forma de halter (Figura 2, passo 8). Esta estrutura serve como material de partida para a etapa de ciclagem da reação, a próxima parte da reação de LAMP (45).

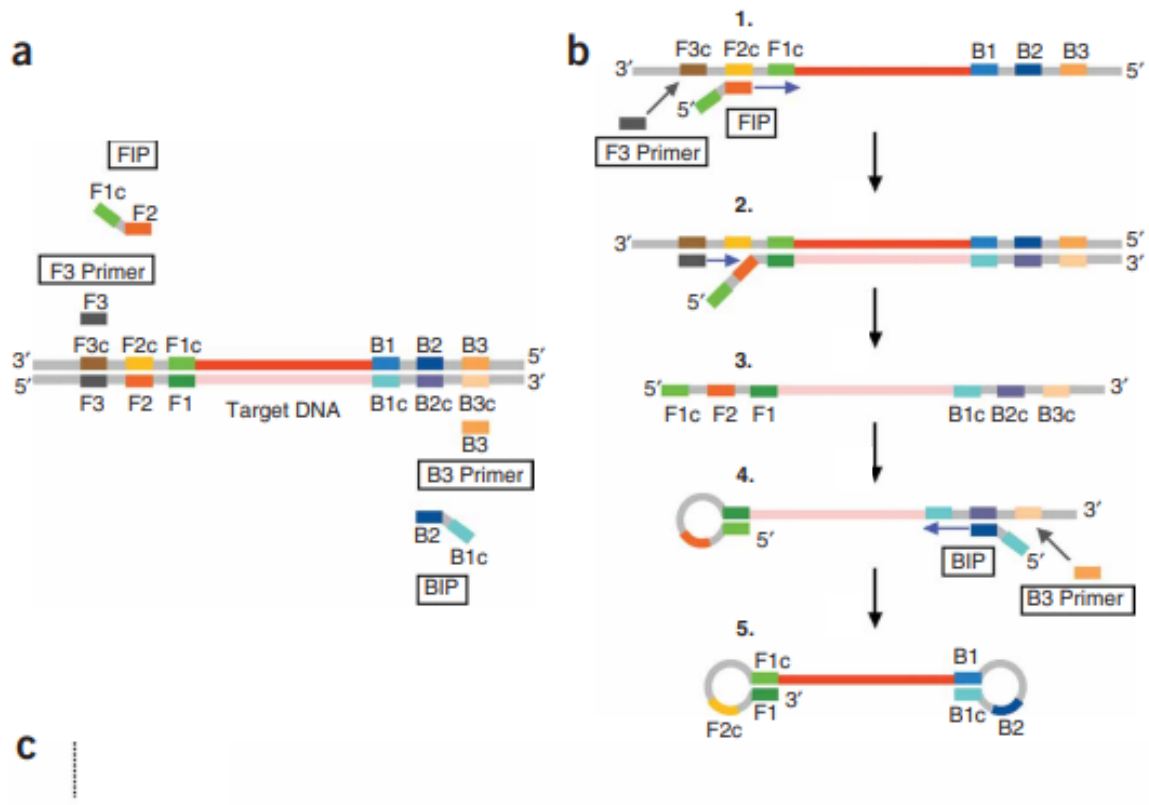


Figura 2: Princípio da metodologia LAMP (a) identificação dos primers para exemplificar e destacar as regiões de ligação com o DNA alvo chamados F1, F2, F3, B1, B2, B3 e suas regiões complementares F1c, F2c, F3c, B1c, B2c, B3c. (b) Etapa inicial na formação do grampo não cíclico onde ocorre a ligação dos primers formando a primeira estrutura de fita simples de DNA. Fonte: Adaptado de Tomita, 2008.

Na etapa cíclica da reação ocorre a amplificação exponencial da sequência alvo (formas em halter) através dos primers internos (Figura 3). Neste estágio, cada nova fita complementar sintetizada servirá como molde para a síntese de novas fitas, formando assim, estruturas de diferentes tamanhos, sintetizadas a partir de repetições alternadas da sequência alvo (45).

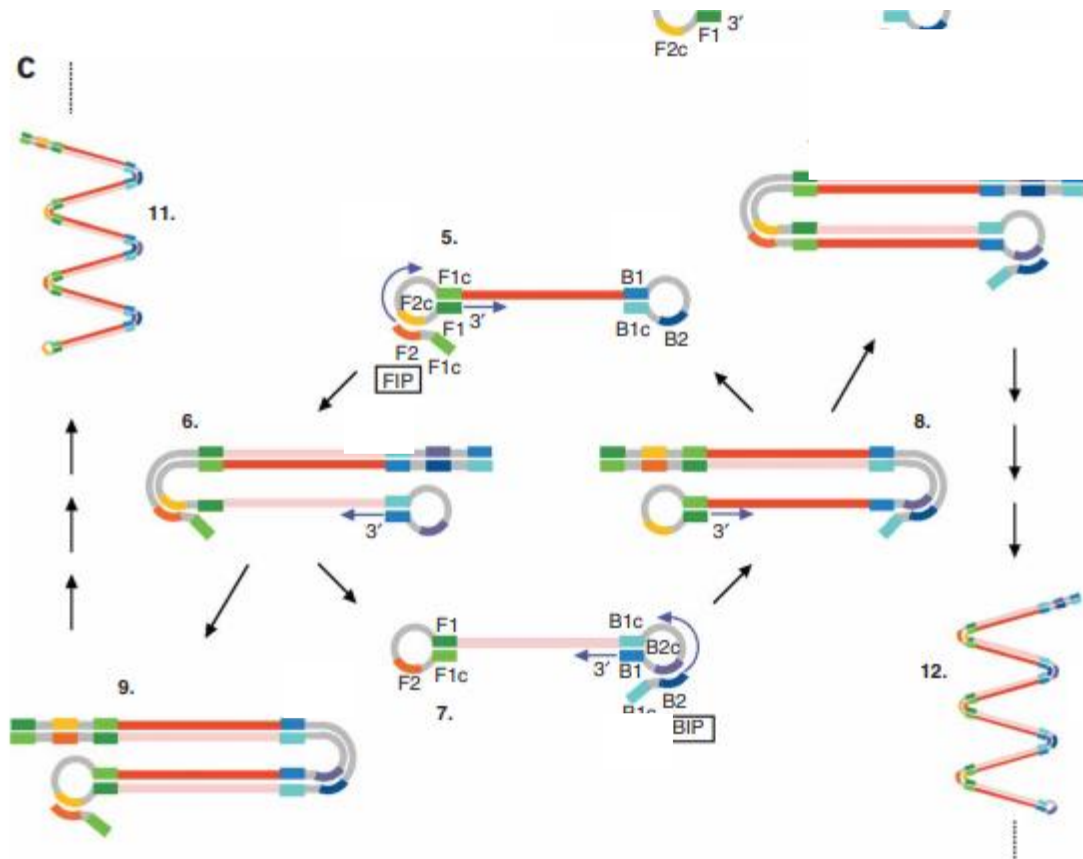


Figura 3: Princípio da metodologia de LAMP (c) etapa chamada de cíclica, onde os primers FIP (Forward inner primer) e BIP (Backward inner primer) se ligam a estrutura de grampo indicando a região de interesse para a Bst polimerase. Ocorre a polimerização da região nos dois sentidos 5' e 3' montando um produto contínuo em formato de escada. Fonte: Adaptado de Tomita, 2008

Para amplificação de alvos de RNA, é possível a combinação das metodologias de Transcrição Reversa (RT) com o método de LAMP (RT-LAMP), adicionando a enzima transcriptase reversa, responsável pela síntese de cDNA, juntamente com a Bst DNA polimerase, ao tubo de reação, permitindo assim a aplicação do teste de LAMP não somente para alvos de DNA, mas também para a identificação de moléculas de RNA (45).

Ao final da reação de LAMP, bilhões de cópias do DNA alvo são geradas e o resultado da reação pode ser observado através de eletroforese em gel, bem como por turbidimetria, devido a formação de precipitados de pirofosfato proporcional à quantidade de DNA sintetizado, ou até mesmo a olho nu, verificando a presença ou

ausência de turvação na solução. Outras opções de leitura dos resultados incluem: visualização da mudança de cor, geralmente vermelho para amarelo, de um indicador de pH, devido a acidificação da solução que ocorre naturalmente quando há amplificação ocorrendo na reação, e leitura de aumento de fluorescência, através da adição de composto que geram fluorescência ao se intercalarem com as cadeias de DNA formados na reação (46, 48).

A disponibilidade das sequências genéticas do SARS-CoV-2, tornou viável o desenvolvimento de iniciadores para regiões específicas do vírus, como: N1, N2, N15, S17, O117 e, assim utilizá-los para a amplificação pela técnica de LAMP (41). Diversos artigos mostraram uma alta especificidade na detecção de SARS-CoV-2 por LAMP (97,6% a 100%). Por outro lado, a sensibilidade analítica variou amplamente entre os estudos (63% a 100%). Valores de sensibilidade mais baixos foram relacionados a ensaios LAMP que usaram amostras clínicas diretamente sem extração prévia do RNA viral, e a amostras com carga viral de SARS-CoV-2 muito baixa, com valores de CTs por RT-PCR acima de 35 (49-53).

3. JUSTIFICATIVA

Considerando a pandemia do novo coronavírus, SARS-CoV-2, onde é observado o quadropatológico da COVID-19 variando desde infecções assintomáticas até quadros graves com desfechos fatais (27). Com a propagação rápida do vírus entre a população, sobrecarregando os sistemas de saúde mundiais, surge a necessidade urgente de detectar e confirmar os casos suspeitos visando a contenção da disseminação viral (54). Diversos métodos diagnósticos foram sendo desenvolvidos ao longo da pandemia para a confirmação da infecção pelo SARS-CoV-2, sendo testados rapidamente e utilizados para tentar diminuir o alastramento do vírus nas comunidades. Mesmo assim, a demora no diagnóstico e o alto custo tornam difícil a testagem em massa das populações com alto índice de transmissibilidade e infecciosidade. A busca por novas metodologias mais viáveis, rápidas e custo-efetivas aumentaram com o avanço da pandemia.

A proposta deste trabalho foi validar e padronizar a técnica de RT-LAMP utilizando como alvo o gene da polimerase viral, uma região ainda não explorada para esta metodologia, permitindo a detecção rápida e com custo desta infecção, ampliando o arsenal de métodos moleculares com potencial para uso em laboratórios sem os recursos necessários para a implantação de métodos baseados na RT-PCR.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Validar e padronizar o teste LAMP para a região da RNA Polimerase (RP) em amostras positivas para SARS-Cov-2.

4.2. Objetivos específicos

- Comparar o método de LAMP em relação ao custo operacional da RT-PCR.
- Utilizar a metodologia de LAMP diretamente em amostras de nasofaringe, sem a utilização de extração prévia de RNA
- Demonstrar a vantagem da utilização do teste LAMP para a identificação do SARS-CoV-2 e suas variantes já encontradas diretamente em amostras de nasofaringe
- Através de revisão sistemática, comparar a sensibilidade e especificidade do teste de LAMP para a região N do genoma viral do SARS-CoV-2.

5. REFERÊNCIAS

1. Liu Y-C, Kuo R-L, Shih S-R. COVID-19: The first documented coronavirus pandemic in history. *Biomedical Journal*. 2020;43(4):328-33.
2. Mercer TR, Salit M. Testing at scale during the COVID-19 pandemic. *Nature Reviews Genetics*. 2021;22(7):415-26.
3. Lu R, Wu X, Wan Z, Li Y, Jin X, Zhang C. A novel reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of SARS-CoV-2. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(8):2826.
4. Kashir J, Yaqinuddin A. Loop mediated isothermal amplification (LAMP) assays as a rapid diagnostic for COVID-19. *Medical Hypotheses*. 2020;141:109786.
5. Hopkins J. Comparison of National RT-PCR Primers, Probes, and Protocols for SARS-CoV-2 Diagnostics. Johns Hopkins Center for Health Security,. 2020.
6. OPAS. Histórico da pandemia de COVID-19 - OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde. 2020 [Available from: <https://www.paho.org/pt/covid19/historico-da-pandemia-covid-19>].
7. Chowdhury SD, Oommen AM. Epidemiology of COVID-19. *Journal of Digestive Endoscopy*. 2020;11(01):03-7.
8. Srivastava N, Baxi P, Ratho R, Saxena SK. Global trends in epidemiology of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Coronavirus disease 2019 (COVID-19)*: Springer; 2020. p. 9-21.
9. Chen J, Lu H, Melino G, Boccia S, Piacentini M, Ricciardi W, et al. COVID-19 infection: the China and Italy perspectives. *Cell Death & Disease*. 2020;11(6):1-17.
10. Remuzzi A, Remuzzi G. COVID-19 and Italy: what next? *The lancet*. 2020;395(10231):1225-8.
11. Afrashteh S, Alimohamadi Y, Sepandi M. The role of isolation, quarantine and social distancing in controlling the COVID-19 epidemic. *Journal Mil Med*. 2020;22(2):210-1.
12. Giovanetti M, Slavov SN, Fonseca V, Wilkinson E, Tegally H, Patané JSL, et al. Genomic epidemiology of the SARS-CoV-2 epidemic in Brazil. *Nature Microbiology*. 2022;7(9):1490-500.
13. Marson F, Ortega M. COVID-19 in Brazil. *Pulmonology*. 2020;26(4):241.
14. WHO. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard: <https://covid19.who.int/>; 2022 [Available from: <https://covid19.who.int/>].
15. Who WHO, editor Virtual press conference on COVID-19–11 March 20202020. [Available from: <https://www.who.int/publications/m/item/covid-19>].
16. Naqvi AAT, Fatima K, Mohammad T, Fatima U, Singh IK, Singh A, et al. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural Genomics Approach. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2020;1866(10):165878.
17. Fan BE. Hematologic parameters in patients with COVID-19 infection: a reply. *American Journal of Hematology*. 2020; 95.8: E215-E215.
18. Zhou P, Yang X-L, Wang X-G, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020b;579(7798):270-3.
19. Lam TT-Y, Jia N, Zhang Y-W, Shum MH-H, Jiang J-F, Zhu H-C, et al. Identifying SARS-CoV-2-related coronaviruses in Malayan pangolins. *Nature*. 2020;583(7815):282-5.
20. Mousavizadeh L, Ghasemi S. Genotype and phenotype of COVID-19: Their

- roles in pathogenesis. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2021;54(2):159-63.
21. Elena SF, Sanjuán R. Adaptive value of high mutation rates of RNA viruses: separating causes from consequences. *Journal of Virology*. 2005;79(18):11555-8.
 22. CDC CDC. SARS-CoV-2 Variant Classifications and Definitions. National Center for Immunization and Respiratory Diseases (NCIRD), Division of Viral Diseases. 2022 [Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-classifications.html>].
 23. Lauring AS, Malani PN. Variants of SARS-CoV-2. *JAMA*. 2021;326(9):880-880.
 24. WHO. Previously circulating VOIs 2022 [Available from: <https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/previously-circulating-vois>].
 25. Fan BE. Hematologic parameters in patients with COVID-19 infection: a reply. *American Journal of Hematology*. 2020;95(8):E215-E.
 26. Duarte FB, Lemes RPG, Duarte IA, Duarte BA, Duarte JVA. Hematological changes in Covid-19 infections. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 2020;66:99-99.
 27. Terpos E, Ntanasis-Stathopoulos I, Elalamy I, Kastritis E, Sergentanis TN, Politou M, et al. Hematological findings and complications of COVID-19. *American Journal of Hematology*. 2020;95(7):834-47.
 28. Zini G, Bellesi S, Ramundo F, d'Onofrio G. Morphological anomalies of circulating blood cells in COVID-19. *American Journal of Hematology*. 2020.
 29. Foldes D, Hinton R, Arami S, Bain BJ. Plasmacytoid lymphocytes in SARS-CoV-2 infection (Covid-19). *American Journal of Hematology*. 2020; 95(7):870-872.
 30. Cantu MD, Towne WS, Emmons FN, Mostyka M, Borczuk A, Salvatore SP, et al. Clinical significance of blue-green neutrophil and monocyte cytoplasmic inclusions in SARS-CoV-2 positive critically ill patients. *British Journal of Haematology*. 2020; 190(2): e89
 31. Lai CK, Lam W. Laboratory testing for the diagnosis of COVID-19. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2021;538:226-230.
 32. Boum Y, Fai KN, Nikolay B, Mboringong AB, Bebell LM, Ndifon M, et al. Performance and operational feasibility of antigen and antibody rapid diagnostic tests for COVID-19 in symptomatic and asymptomatic patients in Cameroon: a clinical, prospective, diagnostic accuracy study. *The Lancet Infectious Diseases*. 2021; 21(8): 1089-1096.
 33. He X, Lau EH, Wu P, Deng X, Wang J, Hao X, et al. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nature Medicine*. 2020;26(5):672-675.
 34. Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, Seilmaier M, Zange S, Müller MA, et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature*. 2020;581(7809):465-469.
 35. Peeling RW, Olliaro PL, Boeras DI, Fongwen N. Scaling up COVID-19 rapid antigen tests: promises and challenges. *The Lancet Infectious Diseases*. 2021;21(9):e290-e295.
 36. Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education*. 2005;29(3):151-159.
 37. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research*. 2002;30(6):1292-305.
 38. Tahamtan A, Ardebili A. Real-time RT-PCR in COVID-19 detection: issues affecting the results. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2020;20(5):453-454.
 39. Carter LJ, Garner LV, Smoot JW, Li Y, Zhou Q, Saveson CJ, et al. Assay

- techniques and test development for COVID-19 diagnosis. ACS Publications; 2020; 591-605.
40. Augustine R, Hasan A, Das S, Ahmed R, Mori Y, Notomi T, et al. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): A Rapid, Sensitive, Specific, and Cost-Effective Point-of-Care Test for Coronaviruses in the Context of COVID-19 Pandemic. *Biology*. 2020;9(8):182.
 41. Huang WE, Lim B, Hsu CC, Xiong D, Wu W, Yu Y, et al. RT-LAMP for rapid diagnosis of coronavirus SARS-CoV-2. *Microbial Biotechnology*. 2020;13(4):950-961.
 42. Jiang M, Pan W, Arasther A, Fang W, Ling L, Fang H, et al. Development and validation of a rapid, single-step reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) system potentially to be used for reliable and high-throughput screening of COVID-19. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2020;10:331.
 43. Kitagawa Y, Orihara Y, Kawamura R, Imai K, Sakai J, Tarumoto N, et al. Evaluation of rapid diagnosis of novel coronavirus disease (COVID-19) using loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Clinical Virology*. 2020;129:104446.
 44. El-Tholoth M, Bau HH, Song J. A single and two-stage, closed-tube, molecular test for the 2019 novel coronavirus (COVID-19) at home, clinic, and points of entry. *ChemRxiv*. 2020; 93(38):13063-1307.
 45. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res. Nucleic Acids Research*. 2000;28.
 46. Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature Protocols*. 2008;3(5):877-882.
 47. Ushikubo H. Principle of LAMP method--a simple and rapid gene amplification method. *Uirusu*. 2004;54(1):107-112.
 48. Parida M, Sannarangaiah S, Dash PK, Rao P, Morita K. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Reviews in Medical Virology*. 2008;18(6):407-21.
 49. Alvarez CU, Lam Q, Baldwin DA, Chernoff J. Low saliva pH can yield false positives results in simple RT-LAMP-based SARS-CoV-2 diagnostic tests. *PloS One*. 2021;16(5):e0250202.
 50. Lalli MA, Chen X, Langmade SJ, Fronick CC, Sawyer CS, Burcea LC, et al. Rapid and extraction-free detection of SARS-CoV-2 from saliva with colorimetric LAMP. *MedRxiv*. 2020; 6:2020.05.07.20093542
 51. Roumani F, Azinheiro S, Sousa H, Sousa A, Timóteo M, Varandas T, et al. Optimization and Clinical Evaluation of a Multi-Target Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for the Detection of SARS-CoV-2 in Nasopharyngeal Samples. *Viruses*. 2021;13(5):940.
 52. Schellenberg JJ, Ormond M, Keynan Y. Extraction-free RT-LAMP to detect SARS-CoV-2 is less sensitive but highly specific compared to standard RT-PCR in 101 samples. *Journal of Clinical Virology*. 2021;136:104764.
 53. Yang Q, Meyerson NR, Clark SK, Paige CL, Fattor WT, Gilchrist AR, et al. Saliva TwoStep for rapid detection of asymptomatic SARS-CoV-2 carriers. *Elife*. 2021;10:e65113.
 54. MacIntyre CR. Case isolation, contact tracing, and physical distancing are pillars of COVID-19 pandemic control, not optional choices. *The Lancet Infectious Diseases*. 2020;20(10):1105-1106.

6. MANUSCRITO 1

“Performance of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Targeting the Nucleocapsid (N) Gene of SARS-CoV-2 for Rapid Diagnosis of COVID-19: Systematic Review and Meta-Analysis”




Elias da Rosa Hoffmann, Tatiane Marines Dreifke, Marco Antonio Ghiotto, Guilherme Gaboardi and Vlademir Vicente Cantarelli

Publicado na revista “COVID”- *Viruses*

Normas: <https://www.mdpi.com/journal/covid/instructions>

Systematic Review

Performance of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Targeting the Nucleocapsid (N) Gene of SARS-CoV-2 for Rapid Diagnosis of COVID-19: Systematic Review and Meta-Analysis

Elias da Rosa Hoffmann^{1,2}, Tatiane Marines Dreifke^{2,3}, Marco Antonio Ghiotto³, Guilherme Gaboardi⁴ and Vlademir Vicente Cantarelli^{1,*}

¹ Basic Health Sciences Department, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSA), Porto Alegre 90050-170, RS, Brazil; hoffmann.elias@gmail.com

² Molecular Biology Department, Bom Pastor Laboratory, Igrejinha 95650, RS, Brazil; tatidreifke@gmail.com

³ Biomedical Sciences Department, Serra Gaúcha University Center (FSG), Caxias do Sul 95020-472, RS, Brazil; marco.ghiotto@outlook.com

⁴ Laboratory of Biomedical Sciences (LEB), Serra Gaúcha University Center (FSG), Caxias do Sul 95020-472, RS, Brazil; gui_gaboardi@hotmail.com

* Correspondence: vlademir@ufcsa.edu.br

Abstract: SARS-CoV-2 emerged as a new respiratory virus spreading rapidly to all areas of the world. A systematic review with meta-analysis concerning the use of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) methodology targeting the SARS-CoV-2 nucleoprotein (N) gene was conducted. The search resulted in 229 articles, of which 19 articles were selected to compose the final review. In general, LAMP showed a high specificity in the detection of SARS-CoV-2 and a wide variation of sensitivity values. The LAMP method was considered a fast and highly specific method for SARS-CoV-2 detection; however, some variables may affect its sensitivity and overall performance.

Keywords: reverse transcriptase-mediated isothermal amplification; LAMP; SARS-CoV-2; coronavirus infections; nucleoprotein gene



Citation: Hoffmann, E.d.R.; Dreifke, T.M.; Ghiotto, M.A.; Gaboardi, G.; Cantarelli, V.V. Performance of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Targeting the Nucleocapsid (N) Gene of SARS-CoV-2 for Rapid Diagnosis of COVID-19: Systematic Review and Meta-Analysis. *COVID* 2022, 2, 759–766. <https://doi.org/10.3390/covid2060057>

Academic Editor: Tohru Suzuki

Received: 18 May 2022

Accepted: 9 June 2022

Published: 13 June 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Starting in December 2019, the world went on alert with the announcement of a new coronavirus in the province of Wuhan, China. The new coronavirus spread rapidly, causing a variety of non-specific respiratory symptoms, in some cases progressing to fatal outcomes [1]. In 2020, the World Health Organization (WHO) declared the state of a world pandemic and several countries started research projects and investigations to better understand the spread and pathogenicity of the so-called SARS-CoV-2 [2]. To contain the spread of the virus, various protective measures have been applied, such as hand washing, wearing face masks, containment, and social distancing. However, there have been thousands of cases with the severe forms of COVID-19 and, as a result, a high number of deaths have been reported worldwide [1]. During the pandemic, several diagnostic strategies were proposed, mainly based on immunological and molecular biology methods [3,4].

The main methodology, considered the gold standard for SARS-CoV-2 detection, is Reverse Transcription, followed by real-time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). RT-PCR is considered extremely sensitive, allowing detection of the viral genome in respiratory samples during the early infectious phase of COVID-19 [5]. However, even RT-PCR is a time-consuming and expensive technique that requires dedicated equipment, which often makes it unfeasible for some diagnostic centers, especially in countries with limited resources [6].

Developed in 2000, loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is a fast molecular method, with target sequence amplification in approximately 30 min. The technique requires only a simple heating block at a fixed temperature of around 65 °C for execution, maintaining a high sensitivity and specificity and at a lower cost compared to other molecular methods [7,8]. The addition of a reverse transcription enzyme makes the amplification of RNA possible by LAMP [6]. Since then, the technique has been used in the molecular identification of several pathogens, mainly in developing countries, affected by endemic tropical diseases [9–12]. LAMP reactions can also be read by different methods, including visual reading by color or turbidity changes, or using fluorophores to combine to double-stranded DNA fragments allowing visualization under UV light or in a dedicated instrument. This adds to the versatility of LAMP as compared to RT-PCR. Despite the advantages, LAMP methods may suffer from a lack of sufficient sensitivity, may be more prone to cross-contaminations and require more expertise to differentiate some positive and negative reactions, especially when color changes are not clear enough.

SARS-CoV-2 is a single-stranded RNA virus with an approximate length of 30 kb. The N gene, which encodes the nucleocapsid protein, was found at the 3' end of the RNA strand, thus being less vulnerable to the action of RNAses that degrade the viral RNA from the 5' to 3' sense during the extraction and purification processes, thus ensuring viral amplification of SARS-CoV-2, even if it is partially damaged [6].

This study aimed to select and analyze published articles that used RT-LAMP methodology targeting the viral N gene, comparing its sensitivity and specificity through a systematic review with meta-analysis, to obtain insights into the performance of this methodology and the utility of the N gene in the detection of SARS-CoV-2 for clinical applications.

2. Materials and Methods

2.1. Article Search and Selection Strategy

For the systematic review and meta-analysis, searches were performed for articles in Medline (PubMed), Science Direct, LILACS and SciELO databases without language restrictions, published until 31 July 2021. The following keywords were used: [(SARS-CoV-2) OR (coronavirus infections)] AND [(Reverse Transcriptase Loop-Mediated Isothermal Amplification) OR (LAMP)]. For each search, the same keywords were used, with strategies compatible with the search tools of the respective databases, in addition to using full text filters in the search in Medline and open access in Science Direct. After the search, the articles found were added to the Rayyan program [13] to assist in article selection and identification of duplicate files.

Two researchers individually selected eligible articles to compose the analysis and a third researcher assisted with articles that received discordant opinions.

For the selection of articles, the researchers read the titles and abstracts separately. The following inclusion criteria were used for the selection of articles in this study: original (observational) diagnostic studies using the LAMP method targeting the N gene for the detection of SARS-CoV-2 in human samples from symptomatic and non-symptomatic patients and with demonstration of the percentage of sensitivity and specificity of the method or the number of true and false positive and negative cases found in comparison with the results obtained by RT-PCR.

Review articles were removed from the analysis, as well as articles that did not include the LAMP method, articles that addressed regions other than the N region of the virus, and articles that did not mention sensitivity and specificity, did not analyze clinical samples, or did not compare the performance of the technique LAMP with RT-PCR.

2.2. Data Analysis

A Microsoft Excel spreadsheet was used to assist in data analysis, in which the following information was extracted: sensitivity and specificity, target genes, type and number of samples, type of reading of the results, execution time and limits of detection (LOD).

The meta-analysis consisted of sensitivity and specificity data, and construction of the forest graph plot was performed using RevMan version 5.4 [14]. For this, the number of true positive and false negative cases, referring to the sensitivity and the number of true negative and false positive cases, referring to their specificity, were used for the construction of the graph.

3. Results

As a result of the initial search, we identified 229 articles in all searched databases. The search in Medline (PubMed) resulted in 196 articles, in Science Direct 25, in LILACS 4 and in SciELO 4. Of these, 22 articles were promptly excluded because they were duplicates. In the first selection round, which included reading the title and abstract, 165 articles were excluded for not meeting the pre-defined eligibility criteria. After this initial selection, 42 articles were considered eligible and read in full. Of these, 23 articles were still excluded because they did not present all the necessary information, defined in the present study, for the meta-analysis, and because they did not compare with RT-LAMP, did not use clinical samples, or did not target the N gene. Finally, the search resulted in 19 articles to compose this review (Figure 1).

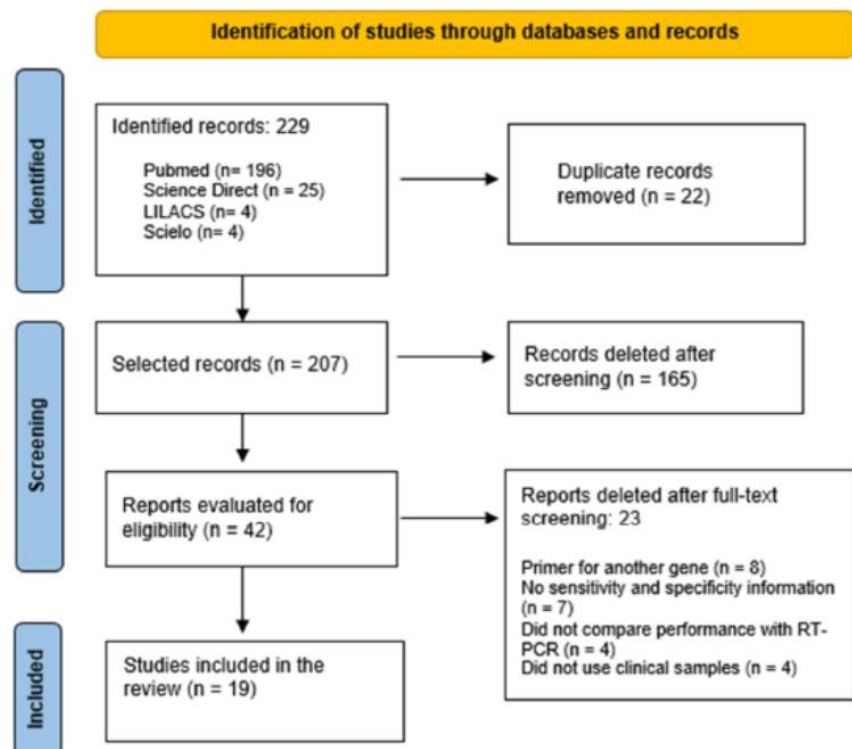


Figure 1. Selection of articles for systematic review and meta-analysis.

A listing containing the 19 articles that make up the review is shown in Table 1.

Table 1. Summary of data from articles that used the LAMP methodology to identify SARS-CoV-2 in symptomatic and asymptomatic patients included in this review.

Author	Target Gene	N° of Samples	Type of Sample	Sample Pre-Treatment	Sensitivity % (CI:88. 0–92. 1)	Specificity % (CI:97. 9–99. 2)	Reading the Results
Alvarez, 2021 [15]	Orf1a, N, HMS Assay 1e	59 (29+/30–)	Swab NP and saliva (with or without purification)	RNA extraction and direct assay	93.1% (purified) 65.5% not purified	100.0%	Colorimetric
Baek, 2020 [16]	N	154 (14+/140–)	Swab NP, sputum and tears	RNA extraction	100.0%	98.7%	Colorimetric
Ganguli, 2021 [17]	Orf1a, S, Orf 8, N	20 (10+/10–)	Swab NP	Without RNA extraction	100.0%	100.0%	Fluorescence
Haq, 2021 [18]	Orf-1ab, N, S	297 (124+/173–)	Swab NP	RNA extraction	91.5%	90.0%	Colorimetric
Jang, 2021 [19]	RdRP, N, E	292 (130+/162–)	Swab NP, oropharyngeal smears, sputum, saliva	RNA extraction	93.9%	100.0%	Fluorescence
Jiang, 2020 [20]	N	260 (47+/213–)	Swab NP, sputum and tears	RNA extraction	91.4%	99.5%	Fluorescence
Kitagawa, 2020 [21]	N	76 (30+/46–)	Swab NP	RNA extraction	100.0%	97.6%	Turbidimetry
Kitajima, 2021 [22]	N	151 (79+/72–)	Swab NP and sputum	RNA extraction	88.6%	98.6%	Turbidimetry and Fluorescence
Lalli, 2021 [23]	N, E	30 (20+/10–)	Saliva	Pre-treated without RNA extraction	85.0%	90.0%	Colorimetric
Lee, 2020 [24]	N	157 (107+/50–)	Swab NP	RNA extraction	87.0%	100.0%	Fluorescence
Li, 2021 [25]	N	45 (15+/30–)	Swab NP	Without RNA extraction	100.0%	100.0%	Colorimetric
Manzano, 2021 [26]	N	183 (127+/56–)	Swab NP	RNA extraction	91.0%	100.0%	Fluorescence
Roumani, 2021 [27]	ORF8, N, ORF3a	152 (49+/103–)	Swab NP	RNA extraction	63.3%	99.0%	Fluorescence
Rödel, 2020 [28]	RdRP M, E, N	73 (38+/35–)	Respiratory Secretions	Without RNA extraction	81.6 %	100.0%	Fluorescence
Schellenberg, 2021 [29]	N	101 (50+/51–)	Swab NP	Without RNA extraction	77.0%	100.0%	Colorimetric
Dao Thi, 2020 [30]	N	235 (35+/200–)	Swab NP	Without RNA extraction	86.0%	99.5%	Colorimetric
Yang, 2021 [31]	N, AS1E	573 (278 +/295–)	Saliva	Pre-treated without RNA extraction	74.8%	100.0%	Colorimetric
Zhang 2021 [32]	ORF1ab, N	12 (8+/4–)	Swab NP	No RNA extraction (pre-treatment with NaOH solution)	100.0%	100.0%	Lateral Flow Assay (LFA)
Zhu, 2020 [33]	ORF1ab, N	129 (33 +/96–)	Oropharyngeal smear	RNA extraction	100.0%	100.0%	Nanoparticle-based lateral flow biosensor (LFB)

Nasopharyngeal swabs collected with swab (Swab NP); Lateral Flow Assay (LFA); Nanoparticle-based lateral flow biosensor (LFB); Confidence Intervals (CI).

Using the specificity and sensitivity data extracted from the selected articles, it was possible to build a forest graph plot using the RevMan 5.4 software [14]. The sensitivity and specificity of the different studies are shown in Figure 2.

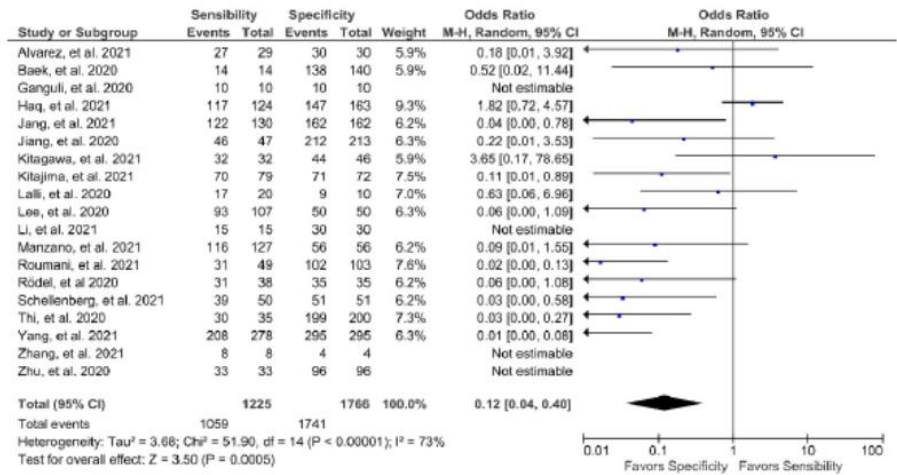


Figure 2. Forest plot graph showing sensitivity and specificity of RT-LAMP methods for SARS-CoV-2. The leftmost column “Study or Subgroup” comprises the 19 studies evaluated in the graph, which include Alvarez, et al., 2021 [15], Baek, et al., 2020 [16], Ganguli, et al., 2020 [17], Haq, et al., 2021 [18], Jang, et al., 2021 [19], Jiang, et al., 2020 [20], Kitagawa, et al., 2021 [21], Kitajima, et al., 2021 [22], Lalli, et al., 2020 [23], Lee, et al., 2020 [24], Li, et al., 2021 [25], Manzano, et al., 2021 [26], Roumani, et al., 2021 [27], Rödel, et al., 2020 [28], Schellenberg, et al., 2021 [29], Thi, et al., 2020 [30], Yang, et al., 2021 [31], Zhang, et al., 2021 [32] and Zhu, et al., 2020 [33]; “Events” represents the number of samples that were true positives and true negatives under “sensibility and sensitivity”, respectively; “Weight” indicates the influence an individual study had on the pooled result; “Odds Ratio” consists of a measure of association between an exposure and an outcome.

4. Discussion

Although the LAMP test results can be evaluated in a variety of ways, for the purpose of this study, the performance of the LAMP methods described in the selected studies was evaluated in terms of sensitivity and specificity when using the N gene region as the molecular target, thus providing indication of the utility of this region for LAMP-based methodologies for the detection of SARS-CoV-2 from clinical samples.

In general, all retrieved articles showed high specificity for the detection of SARS-CoV-2 using RT-LAMP (97.6% to 100%). Analytical sensitivity, however, varied widely between studies (63% to 100%). Lower sensitivity values were related to RT-LAMP assays that used clinical samples directly, without prior RNA extraction, and to samples with very low SARS-CoV-2 viral load, usually with RT-PCR CT values above 35 [15,23,27,29,31]. Only one study using clinical samples directly, without prior RNA extraction, showed 100% RT-LAMP sensitivity compared to RT-PCR, but the total number of analyzed samples was only 45, which may have overestimated the overall performance of the test [25].

Most of the selected articles in this study showed promising results for the amplification of SARS-CoV-2 by RT-LAMP, with excellent specificity, as demonstrated in the forest graph plot (Figure 2). However, only Kitagawa et al. and Haq et al., out of the 19 selected articles, pointed to a more sensitive than specific RT-LAMP test [18,21].

The study by Kitagawa et al. had an excellent overall performance, with 100% and 97.6% sensitivity and specificity, respectively, in just 35 min of reaction time, along with an easy reading of the results by visual inspection of turbidity. However, the authors warned of a possible bias, related to variations in the concentration of RNA in different extracts, given the inconsistency found in two samples, whose results for RT-LAMP were positive, while the RT-PCR showed negative results [21].

The study by Haq et al. used 297 samples from Pakistani repatriated patients with suspected COVID-19, tested with both RT-LAMP and RT-PCR methods. The colorimetric RT-LAMP assay developed by the authors had a sensitivity of 91.45% and a specificity of

90% [18]. Reiterating the performance demonstrated by previous articles, it showed high sensitivity and specificity. This may be due to the concentration of RNA in the samples or their degradation.

In contrast, Roumani et al. showed excellent agreement in terms of specificity (99%), but a slightly lower sensitivity (63.3%), compared to RT-PCR. The authors argued that the false-negative results of RT-LAMP, with positive RT-PCR, were due to a low viral load among these samples, suggesting that these may represent potentially non-infectious samples, and thus the negative result of RT-LAMP should not affect the management of these patients [27]. Similar outcomes were reported by Schellenberg et al., Kitajima et al. and Thi et al., who demonstrated that the sensitivity of RT-LAMP tests compared to RT-PCR in clinical specimens is dependent on the samples viral load. In general, samples with a detection limit around a cutoff threshold (CT) of 30 to 36 cycles by RT-PCR correlated with a low viral load, generating false-negative results in RT-LAMP [22,29,30].

Baek et al. further evaluated the specificity of the primers, targeting the SARS-CoV-2 N region and used their RT-LAMP test against other coronaviruses such as SARS-CoV and MERS-CoV, in addition to other respiratory viruses. The authors reported no amplification in the RT-LAMP assay for any of the tested viruses; therefore, no cross-reactivity of the developed primers was observed with other respiratory viruses [16].

In the final selection of 19 articles, 4 resulted in “not estimable” according to the forest plot, as they presented 100% concordant RT-LAMP and RT-PCR results. Only a limited number of samples was used in these studies to compare with RT-PCR, which may have interfered with the calculation of the actual specificity and sensitivity values, whose results are questionable.

Considering the reaction time required for SARS-CoV-2 detection by RT-LAMP, we found a time variation ranging from 30 to 60 min, which, in any case, makes RT-LAMP an extremely fast method, even when compared with RT-PCR, which, in general, requires about 120 to 160 min to be completed, depending on the protocol being used [6,32].

The observed limit of detection (LOD) across the studies showed a wide range of values with the different LAMP assays, with LOD ranging from 2 to 500,000 copies of viral RNA per reaction [15,29]. This may be evidence of deficient standardization for some of these tests, since some studies used synthetic SARS-CoV-2 RNA to determine the LOD, whereas others did so using clinical samples with a viral load estimated by RT-PCR. In line with this observation, a similar result was reported from a meta-analysis report that compared the performance of the RT-LAMP methodology with digital PCR and quantitative PCR, where the authors found LAMP LOD values ranging from 80 to 10,000 copies per mL, indicating a rather lower analytical sensitivity for this methodology [34].

Two studies analyzed saliva as clinical samples for the LAMP colorimetric assay, pointing out a bias that could be a potential problem in the interpretation of LAMP results. According to the authors, naturally acidic saliva can lead to false-positive results with RT-LAMP due to changes in the pH indicator by an acidic sample, and not by the acidification of the reaction solution due to the amplification of the target sequence [15,31]. To correct the pH, sodium hydroxide (NaOH) was used by the authors, raising the pH of the buffer solution, thus correcting this problem, resulting in a test with 85% sensitivity and 100% specificity for the N gene, demonstrating that saliva can be a good alternative sample for detection of SARS-CoV-2 [31]. Using saliva, Lalli et al. observed that the 1:2 dilution of the sample in buffered saline, associated with pretreatment with RNase inactivation reagents, guanidine and thermal incubation at 65 °C for 15 min, potentially reduced the reaction inhibitors present in the saliva [23].

The development of new, fast, and low-cost molecular methods, while maintaining excellent sensitivity and specificity, is highly desirable, but rigorous standardization and investigation should be performed to identify the best gene targets, limit of detection, reproducibility, and potential application to different samples. One of the advantages highlighted for LAMP is the use of four to six primers, which recognize six to eight distinct targets of the SARS-CoV-2 viral RNA, making this method extremely specific.

5. Conclusions

Although it appears less sensitive than RT-qPCR, the RT-LAMP assay is a simpler option, which has been shown to be extremely specific for the amplification of SARS-CoV-2. Despite the reduction in the sensitivity of RT-LAMP in samples with a very low viral load, the method is a suitable tool for investigating SARS-CoV-2 infection in symptomatic patients. The utility of very low viral loads is debatable, with some authors arguing that individuals presenting with this situation may not transmit the virus; thus, a negative result would not affect the management of these patients, although it may represent an early infection stage, with patients becoming symptomatic thereafter. Nevertheless, another advantage of RT-LAMP demonstrated in some studies is the fact that it does not require prior nucleic acid extraction, reducing sample handling and processing costs. As it is an easy-to-perform molecular method, with the possibility of visual detection, RT-LAMP methodology can be an interesting alternative for laboratories with few resources and real time PCR equipment, or even, as a field methodology, in distant locations and large centers, providing fast results, which can be very useful for the management of infected patients.

In summary, we concluded that there is a need to include more samples in the validation of the tests in order to increase their reliability, in addition to new studies that seek to improve the sensitivity of RT-LAMP, using, for instance, combinations of primers for different target regions of the viral RNA or different clinical specimens. Constant improvements in the LAMP technique are indispensable for the consolidation of this test as a robust technique for the detection and identification of SARS-CoV-2 and other viruses of clinical interest.

Funding: This research received no external funding.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Lu, R.; Wu, X.; Wan, Z.; Li, Y.; Jin, X.; Zhang, C. A Novel Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid Detection of SARS-CoV-2. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2826. [CrossRef] [PubMed]
- Histórico Da Pandemia de COVID-19—OPAS/OMS | Organização Pan-Americana Da Saúde. Available online: <https://www.paho.org/pt/covid19/historico-da-pandemia-covid-19> (accessed on 26 June 2021).
- Nucleic Acid Amplification Tests (NAATs). Available online: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/naats.html> (accessed on 19 June 2021).
- Guidance for Antigen Testing for SARS-CoV-2 for Healthcare Providers Testing Individuals in the Community. Available online: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antigen-tests-guidelines.html> (accessed on 9 May 2021).
- Diagnostic Testing for SARS-CoV-2: Interim Guidance, 11 September 2020*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2020.
- Huang, W.E.; Lim, B.; Hsu, C.; Xiong, D.; Wu, W.; Yu, Y.; Jia, H.; Wang, Y.; Zeng, Y.; Ji, M.; et al. RT-LAMP for Rapid Diagnosis of Coronavirus SARS-CoV-2. *Microb. Biotechnol.* **2020**, *13*, 950–961. [CrossRef] [PubMed]
- Notomi, T. Loop-Mediated Isothermal Amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, e63. [CrossRef] [PubMed]
- 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*, 877–882. [CrossRef]
- Mori, Y.; Notomi, T. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): A Rapid, Accurate, and Cost-Effective Diagnostic Method for Infectious Diseases. *J. Infect. Chemother.* **2009**, *15*, 62–69. [CrossRef]
- Abbasi, I.; Kirstein, O.D.; Hailu, A.; Warburg, A. Optimization of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assays for the Detection of Leishmania DNA in Human Blood Samples. *Acta Trop.* **2016**, *162*, 20–26. [CrossRef]
- Kim, J.H.; Kang, M.; Park, E.; Chung, D.R.; Kim, J.; Hwang, E.S. A Simple and Multiplex Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for Rapid Detection of SARS-CoV. *BioChip. J.* **2019**, *13*, 341–351. [CrossRef]
- Fernández-Soto, P.; Gandasegui Arahuetes, J.; Sánchez Hernández, A.; López Abán, J.; Vicente Santiago, B.; Muro, A. A Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for Early Detection of Schistosoma Mansoni in Stool Samples: A Diagnostic Approach in a Murine Model. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2014**, *8*, e3126. [CrossRef]
- Ouzzani, M.; Hammady, H.; Fedorowicz, Z.; Elmagarmid, A. Rayyan—A Web and Mobile App for Systematic Reviews. *Syst Rev.* **2016**, *5*, 210. [CrossRef]
- Review Manager (RevMan) [Computer Program]. Version 5.4; The Cochrane Collaboration: London, UK, 2020.

15. Uribe-Alvarez, C.; Lam, Q.; Baldwin, D.A.; Chernoff, J. Low Saliva PH Can Yield False Positives Results in Simple RT-LAMP-Based SARS-CoV-2 Diagnostic Tests. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0250202. [[CrossRef](#)]
16. Baek, Y.H.; Um, J.; Antigua, K.J.C.; Park, J.-H.; Kim, Y.; Oh, S.; Kim, Y.; Choi, W.-S.; Kim, S.G.; Jeong, J.H.; et al. Development of a Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification as a Rapid Early-Detection Method for Novel SARS-CoV-2. *Emerg. Microbes Infect.* **2020**, *9*, 998–1007. [[CrossRef](#)]
17. Ganguli, A.; Mostafa, A.; Berger, J.; Aydin, M.Y.; Sun, F.; de Ramirez, S.A.S.; Valera, E.; Cunningham, B.T.; King, W.P.; Bashir, R. Rapid Isothermal Amplification and Portable Detection System for SARS-CoV-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117*, 22727–22735. [[CrossRef](#)]
18. Haq, F.; Sharif, S.; Khurshid, A.; Ikram, A.; Shabbir, I.; Salman, M.; Ahad, A.; Suleman Rana, M.; Raja, A.; Badar, N.; et al. Reverse Transcriptase Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP)-Based Diagnosis: A Potential Alternative to Quantitative Real-Time PCR Based Detection of the Novel SARS-COV-2 Virus. *Saudi J. Biol. Sci.* **2021**, *28*, 942–947. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Jang, W.S.; Lim, D.H.; Yoon, J.; Kim, A.; Lim, M.; Nam, J.; Yanagihara, R.; Ryu, S.-W.; Jung, B.K.; Ryoo, N.-H.; et al. Development of a Multiplex Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for on-Site Diagnosis of SARS CoV-2. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0248042. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Jiang, M.; Pan, W.; Arasthfer, A.; Fang, W.; Ling, L.; Fang, H.; Daneshnia, F.; Yu, J.; Liao, W.; Pei, H.; et al. Development and Validation of a Rapid, Single-Step Reverse Transcriptase Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) System Potentially to Be Used for Reliable and High-Throughput Screening of COVID-19. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **2020**, *10*, 331. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Kitagawa, Y.; Orihara, Y.; Kawamura, R.; Imai, K.; Sakai, J.; Taramoto, N.; Matsuoka, M.; Takeuchi, S.; Maesaki, S.; Maeda, T. Evaluation of Rapid Diagnosis of Novel Coronavirus Disease (COVID-19) Using Loop-Mediated Isothermal Amplification. *J. Clin. Virol.* **2020**, *129*, 104446. [[CrossRef](#)]
22. Kitajima, H.; Tamura, Y.; Yoshida, H.; Kinoshita, H.; Katsuta, H.; Matsui, C.; Matsushita, A.; Arai, T.; Hashimoto, S.; Iuchi, A.; 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. [[CrossRef](#)]
23. Lalli, M.A.; Langmade, J.S.; Chen, X.; Fronick, C.C.; Sawyer, C.S.; Burcea, L.C.; Wilkinson, M.N.; Fulton, R.S.; Heinz, M.; Buchser, W.J.; et al. Rapid and Extraction-Free Detection of SARS-CoV-2 from Saliva by Colorimetric Reverse-Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Clin. Chem.* **2021**, *67*, 415–424. [[CrossRef](#)]
24. Lee, J.Y.H.; Best, N.; McAuley, J.; Porter, J.L.; Seemann, T.; Schultz, M.B.; Sait, M.; Orlando, N.; Mercoulia, K.; Ballard, S.A.; et al. Validation of a Single-Step, Single-Tube Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid Detection of SARS-CoV-2 RNA. *J. Med. Microbiol.* **2020**, *69*, 1169–1178. [[CrossRef](#)]
25. Li, J.; Hu, X.; Wang, X.; Yang, J.; Zhang, L.; Deng, Q.; Zhang, X.; Wang, Z.; Hou, T.; Li, S. A Novel One-Pot Rapid Diagnostic Technology for COVID-19. *Anal. Chim. Acta* **2021**, *1154*, 338310. [[CrossRef](#)]
26. Rodriguez-Manzano, J.; Malpartida-Cardenas, K.; Moser, N.; Pennisi, I.; Cavuto, M.; Miglietta, L.; Moniri, A.; Penn, R.; Satta, G.; Randell, P.; et al. Handheld Point-of-Care System for Rapid Detection of SARS-CoV-2 Extracted RNA in under 20 Min. *ACS Cent. Sci.* **2021**, *7*, 307–317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Roumani, F.; Azinheiro, S.; Sousa, H.; Sousa, A.; Timóteo, M.; Varandas, T.; Fonseca-Silva, D.; Baldaque, I.; Carvalho, J.; Prado, M.; et al. Optimization and Clinical Evaluation of a Multi-Target Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for the Detection of SARS-CoV-2 in Nasopharyngeal Samples. *Viruses* **2021**, *13*, 940. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Rödel, J.; Egerer, R.; Suleyman, A.; Sommer-Schmid, B.; Baier, M.; Henke, A.; Edel, B.; Löffler, B. Use of the Variplex™ SARS-CoV-2 RT-LAMP as a Rapid Molecular Assay to Complement RT-PCR for COVID-19 Diagnosis. *J. Clin. Virol.* **2020**, *132*, 104616. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Schellenberg, J.J.; Ormond, M.; Keynan, Y. Extraction-Free RT-LAMP to Detect SARS-CoV-2 Is Less Sensitive but Highly Specific Compared to Standard RT-PCR in 101 Samples. *J. Clin. Virol.* **2021**, *136*, 104764. [[CrossRef](#)]
30. Dao Thi, V.L.; Herbst, K.; Boerner, K.; Meurer, M.; Kremer, L.P.; Kirrmaier, D.; Freistaedter, A.; Papagiannidis, D.; Galmozzi, C.; Stanifer, M.L.; et al. A Colorimetric RT-LAMP Assay and LAMP-Sequencing for Detecting SARS-CoV-2 RNA in Clinical Samples. *Sci. Transl. Med.* **2020**, *12*, eabc7075. [[CrossRef](#)]
31. Yang, Q.; Meyerson, N.R.; Clark, S.K.; Paige, C.L.; Fattor, W.T.; Gilchrist, A.R.; Barbachano-Guerrero, A.; Healy, B.G.; Worden-Sapper, E.R.; Wu, S.S.; et al. Saliva TwoStep for Rapid Detection of Asymptomatic SARS-CoV-2 Carriers. *Elife* **2021**, *10*, e65113. [[CrossRef](#)]
32. Zhang, C.; Zheng, T.; Wang, H.; Chen, W.; Huang, X.; Liang, J.; Qiu, L.; Han, D.; Tan, W. Rapid One-Pot Detection of SARS-CoV-2 Based on a Lateral Flow Assay in Clinical Samples. *Anal. Chem.* **2021**, *93*, 3325–3330. [[CrossRef](#)]
33. Zhu, X.; Wang, X.; Han, L.; Chen, T.; Wang, L.; Li, H.; Li, S.; He, L.; Fu, X.; Chen, S.; et al. Multiplex Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Combined with Nanoparticle-Based Lateral Flow Biosensor for the Diagnosis of COVID-19. *Biosens. Bioelectron.* **2020**, *166*, 112437. [[CrossRef](#)]
34. Au, W.Y.; Cheung, P.P.H. Diagnostic Performances of Common Nucleic Acid Tests for SARS-CoV-2 in Hospitals and Clinics: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Lancet Microbe* **2021**, *2*, e704–e714. [[CrossRef](#)]

7. MANUSCRITO 2

“Performance of Reverse-Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) Targeting the RNA Polymerase gene for the Direct Detection of SARS-CoV2 in Nasopharyngeal Swabs ”

Elias da Rosa Hoffmann, Lisiane Rocha Balzan, Everton Inamine, Lisiane R Pancotto, Guilherme Gaboardi e Vlademir Vicente Cantarelli.

Manuscrito a ser submetido à revista “COVID”- *Viruses*

Normas: <https://www.mdpi.com/journal/covid/instructions>

Performance of Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) Targeting the RNA Polymerase Gene for the Direct Detection of SARS-CoV2 in Nasopharyngeal Swabs

Elias da Rosa Hoffmann ^{1,2}, Lisiane da Rocha Balzan ³, Everton Inamine ⁴, Lisiane Rech Pancotto ⁴, Guilherme Gaboardi ⁵ and Vlademir Vicente Cantarelli ^{1,*}

¹ Basic Health Sciences Department, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSA), Porto Alegre 90050-170, Brazil; hoffmann.elias@gmail.com

² Bom Pastor Laboratory, Molecular Biology Department, Igreja Nova 95650-000, Brazil

³ Diagnósticos da America S.A., Novo Hamburgo 93520-340, Brazil; lisiane.balzan@dasa.com.br

⁴ Central Laboratory, Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Porto Alegre 90020-090, Brazil; einamine@gmail.com (E.I.); lisianerpancotto@gmail.com (L.R.P.)

⁵ Biomedical Sciences Department, Serra Gaúcha University Center (FSG), Caxias do Sul 95020-472, Brazil; gui_gaboardi@hotmail.com

* Correspondence: vlademirc@ufcsa.edu.br

Abstract: In 2020, a global pandemic caused by SARS-CoV-2 was declared. Different institutes proposed diagnostic molecular methods to detect the virus in clinical samples. This study aims to validate and standardize the use of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP)-based methodology targeting the viral *RP* gene, as a faster and low-cost diagnostic method for SARS-CoV-2 infections. The results obtained with RT-LAMP (Reverse Transcriptase) were compared to the results of real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) to assess its sensitivity and specificity. In total, 115 samples (nasopharyngeal samples) were used for detecting SARS-CoV-2 by RT-LAMP, with 43 positives and 72 negatives. The study showed a positive predictive value (PPV) of 90.7% and a negative predictive value (VPN) of 100%. The LAMP assay also demonstrated a high sensitivity of 90.7% and a specificity of 100% (confidence interval 77.9–97.4%) when using the lower detection limit of 40 copies/μL. The RT-LAMP described here has the potential to detect even the new variants of SARS-CoV-2, suggesting that it may not be significantly affected by gene mutations. The RT-LAMP targeting the *RP* viral region is faster and less expensive than other molecular approaches, making it an alternative for developing countries.

Keywords: reverse transcriptase-mediated isothermal amplification; LAMP; SARS-CoV-2; coronavirus infections; *RP* gene

Citation: Hoffmann, E.R.; Balzan, L.R.; Inamine, E.; Pancotto, L.R.; Gaboardi, G.; Cantarelli, V.V. Performance of Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) Targeting the RNA Polymerase Gene for the Direct Detection of SARS-CoV2 in Nasopharyngeal Swabs. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor: Masahiro Fujimuro

Received: 11 June 2023

Revised: 8 August 2023

Accepted: 10 August 2023

Published: date



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

At the beginning of the SARS-CoV-2 pandemic, the virus was initially imported into Brazil from Europe, where it quickly found a vulnerable environment due to the lack of proper protective measures. This allowed the virus to spread rapidly within the country, resulting in a devastating outcome. Consequently, multiple variants of concern, such as the P.1 variant, emerged and contributed to the already alarming death toll, which currently stands at over 687 thousand people [1]. The number of COVID-19 cases in Brazil has reached a staggering 35 million to date.

To combat the widespread dissemination of the virus, various measures were suggested, including social isolation and other containment protocols. However, as reports from countries across the globe started pouring in, it became evident that the viral spread and severe respiratory diseases were not limited to Brazil alone. As a result, the total number of COVID-19 cases worldwide has climbed to a startling 657 million, with an alarming death toll of 6.9 million (as of May 2023).

Numerous diagnostic methods have been proposed by different institutions in various countries, each striving to tackle the challenges posed by SARS-CoV-2. The Centers for Disease Control and Prevention (CDC) in the United States, among others, initially advocated for molecular methods such as PCR-based assays, which were later followed by immunological assays as the pandemic progressed [2].

Among the diagnostic techniques, reverse transcription real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) emerged as the primary method for detecting SARS-CoV-2 due to its exceptional sensitivity and ability to identify even minute amounts of viral genetic material in clinical samples. Nonetheless, RT-qPCR does have its drawbacks. It is a time-consuming and expensive technique, making its implementation challenging in certain diagnostic centers, particularly those in low- and mid-income countries.

In an effort to address these limitations, an alternative method called loop-mediated isothermal amplification (LAMP) gained attention. LAMP is an isothermal amplification technique developed by Notomi and colleagues in 2000 [3]. One of its key advantages is the ability to generate billions of DNA copies at a constant temperature, eliminating the need for complex thermocyclers and significantly reducing the overall cost of the test. Additionally, LAMP demonstrates high specificity by targeting up to eight distinct regions of the DNA, making it a reliable and accurate diagnostic method. Furthermore, LAMP can be combined with a reverse transcription step, allowing it to be applied to RNA-based pathogens such as SARS-CoV-2. This suggests the possibility of using LAMP alongside RT-qPCR to enhance diagnostic capabilities [4].

The objective of this study was to develop a colorimetric loop-mediated isothermal amplification assay preceded by a reverse transcription step (RT-LAMP). The target for amplification in this assay was the SARS-CoV-2 polymerase gene. To evaluate the performance of the proposed method, the sensitivity and specificity, as well as the negative and positive predictive values, were calculated using RT-qPCR as the reference method.

2. Discussion

In total, 115 nasopharyngeal samples were used for the detection by RT-LAMP. Among the samples tested, a total of 43 samples were determined to be positive for SARS-CoV-2, while 72 samples yielded negative results. These findings were previously established through the utilization of a validated RT-qPCR method targeting the N1 and N2 viral regions. When comparing the results obtained from the RT-LAMP assay with those obtained from RT-qPCR, a total agreement exceeding 96.5% was observed. Furthermore, the RT-LAMP method exhibited a remarkable specificity of 100% and a sensitivity of 90.7%. These values were calculated based on a limit of detection (LOD) of 40 copies/ μ L.

The negative predictive value (NPV) of the RT-LAMP assay was determined to be 94.7%, indicating a high degree of confidence in identifying true negative cases. Conversely, the positive predictive value (PPV) was found to be 100%, underscoring the reliability of the RT-LAMP assay in accurately detecting positive cases. Notably, the LOD observed for this particular method was 40 RNA copies/ μ L, which consistently yielded positive results in over 95% of the test runs (as depicted in Figure 1). To ensure robust test validation, these runs were performed in triplicate over 3 days.

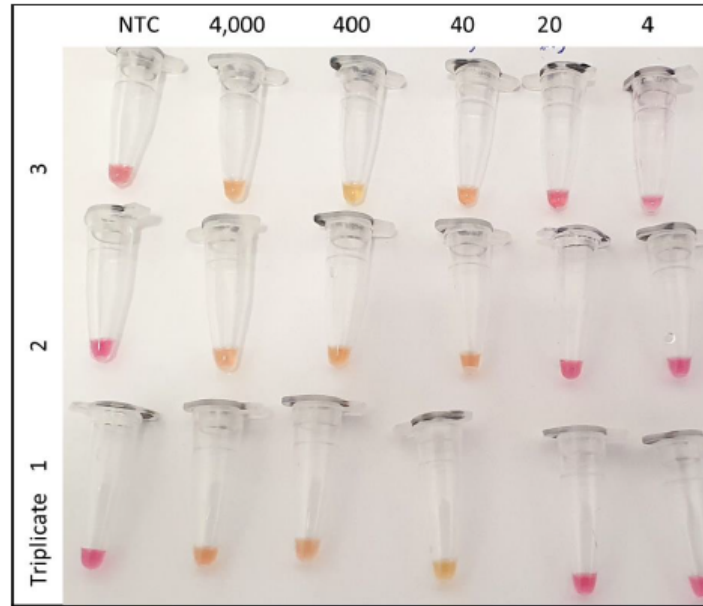


Figure 1. Determination of lower detection limit using RT-LAMP in nasopharyngeal samples. Legend: NTC = No template control. The numbers at the top are copies/ μ L. Red/pinkish color is a negative reaction. Positive reactions in yellow color.

It is worth mentioning that the LOD observed with the RT-LAMP assay corresponded to an RT-PCR CT value of less than 27, emphasizing the comparable sensitivity and accuracy of the two diagnostic methods in detecting SARS-CoV-2 infections.

The RT-LAMP assay was employed to analyze a set of positive samples, each with a CT value below 30 in the RT-PCR analysis. These samples encompassed the predominant SARS-CoV-2 variants that were circulating in the specific region under investigation, including the gamma (P.1), delta, and omicron variants. Each variant was represented by five nasopharyngeal samples previously genotyped by a reference laboratory, which were collected in February 2021 and subsequently subjected to the RT-LAMP assay. Notably, the assay successfully and accurately detected all tested variants, implying that the selected primers remained effective even in the presence of potential gene mutations.

This observation provides valuable insight into the robustness and reliability of the RT-LAMP assay, suggesting that the primer sequences employed in the assay were not compromised by the presence of genetic variations within the targeted regions of the SARS-CoV-2 genome. The ability to detect and identify the different variants using the RT-LAMP assay strengthens its applicability as a valuable diagnostic tool capable of accommodating the dynamic nature of the virus. In our setting, the calculated cost of the RT-LAMP is USD 2.5 compared to USD 10 for the current RT-qPCR assay used in our lab.

The RT-LAMP proposed in this study has emerged as a promising alternative to RT-PCR for the detection of SARS-CoV-2 directly from nasopharyngeal swabs, offering numerous advantages and potential applications. One notable advantage is the simplicity of the reaction, which can be performed using a water bath maintained at a fixed temperature of 63 °C. This eliminates the need for expensive equipment, making the RT-LAMP assay a more cost-effective solution compared to RT-PCR, which typically requires specialized thermal cyclers [1].

A significant bottleneck in molecular testing lies in the nucleic acid extraction step, which is not only time-consuming, but also adds to the overall cost of testing. Extraction-free molecular methods, such as the RT-LAMP assay described here, have the potential to significantly reduce the time and costs associated with testing procedures [5]. By bypassing

the extraction step, the RT-LAMP assay not only streamlines the workflow, but also minimizes the impact on test sensitivity, further contributing to its cost-effectiveness [6,7].

In the specific setting of this study, the RT-LAMP assay demonstrated robust performance, as indicated by its calculated negative predictive value (NPV) of 100% and a positive predictive value (PPV) of 90.7% (as presented in Table 1. These findings underscore the potential of the RT-LAMP assay as a reliable diagnostic tool for SARS-CoV-2 detection.

Table 1. Sensitivity and specificity of LAMP compared to RT-PCR.

	LAMP Positive	LAMP Negative
RT-PCR Positive	39	4
RT-PCR Negative	0	72

Numerous studies investigating the application of RT-LAMP for SARS-CoV-2 detection have consistently reported high sensitivity, with a range of 91% to 100%, even when using different genetic targets and detection strategies [6–15,20]. While the RT-LAMP assay may occasionally yield false-negative results, especially in cases of extremely low viral loads near the limit of detection (LOD), it is unlikely that such false negatives in this study resulted from *Bst* enzyme inhibition. *Bst* polymerase, the key enzyme used in the RT-LAMP assay, exhibits tolerance to various inhibitors that could potentially impact the performance of RT-PCR assays [16]. It is important to note that low viral loads, particularly during the early or late stages of the symptomatic phase of COVID-19, pose a challenge for all detection methods, including RT-PCR, and may result in missed detections [16].

Sensitivity at LOD 40 copies/ μ L = $100 \times (39/39 + 4) = 90.7\%$ Specificity = $100 \times (72/0 + 72) = 100\%$

Recent meta-analyses encompassing large-scale studies involving thousands of SARS-CoV-2-infected patients have revealed that initial false-negative results via RT-PCR can be prevalent, with rates reaching up to 58% [17]. Rapid antigen tests, which have been utilized as an alternative to RT-PCR, also exhibit reduced sensitivity during the earlier stages of COVID-19, with an overall reported sensitivity of approximately 68% [18]. In contrast, the RT-LAMP assay described in this study demonstrates high specificity (100%), which can be attributed to the utilization of six specific primers targeting the selected region, as supported by previous studies [10,13,15,19,20]. This multiple-primer approach enhances the assay's specificity and further reinforces its reliability for SARS-CoV-2 detection.

According to OPAS [2], one potential drawback of colorimetric LAMP methods, including the RT-LAMP assay, is their susceptibility to acidic samples, such as saliva, which can lead to false-positive results due to the color change of the pH indicator [2]. However, it is crucial to note that in such cases, the appearance of a yellow color upon sample addition to the LAMP mix should prompt the interpretation of the reaction as invalid, mitigating the impact of false positive results. Therefore, as an alternative, turbidity or fluorescence-based tests could be utilized. This emphasizes the importance of following proper protocols and recognizing the limitations of the assay when interpreting the results, particularly in the presence of acidic samples.

In summary, the RT-LAMP assay presented in this study offers a simple, efficient, and cost-effective method for the detection of SARS-CoV-2 in nasopharyngeal samples. By eliminating the need for nucleic acid extraction and utilizing a water bath at a fixed temperature, the assay not only reduces the time and cost associated with testing, but also demonstrates comparable sensitivity to RT-PCR and superior specificity. The ability to complete the assay within 45 min further enhances its appeal, allowing for a rapid and timely detection of the virus [2].

The RT-LAMP assay holds great promise as a valuable tool in resource-limited settings, where access to sophisticated laboratory infrastructure and equipment may be limited. Its user-friendly nature and minimal requirements make it accessible to a broader range of healthcare facilities, facilitating the confirmation of COVID-19 infections in a timely and cost-effective manner.

However, it is essential to acknowledge that the field of SARS-CoV-2 research is continuously evolving, with new viral variants emerging. Further studies are necessary to

evaluate the performance of the RT-LAMP assay in the context of these evolving viral genomes. Additionally, expanding the sample size and conducting comparative studies against established diagnostic methods would provide additional validation and strengthen the evidence supporting the efficacy of the RT-LAMP assay for SARS-CoV-2 detection.

In conclusion, the RT-LAMP assay described in this study represents a significant advancement in the field of molecular diagnostics for SARS-CoV-2. Its ability to detect the virus directly from nasopharyngeal swabs, without the need for nucleic acid extraction, coupled with its cost-effectiveness, rapidity, and accuracy, positions it as a valuable alternative to conventional RT-PCR methods. As the global battle against COVID-19 continues, the RT-LAMP assay holds immense potential for widespread implementation, especially in resource-limited settings, contributing to improved patient management and disease control.

4. Materials and Methods

4.1. Nasopharyngeal Samples

Nasopharyngeal samples employed in this investigation were obtained utilizing a sterile swab and transferred into a tube containing 2 mL of saline solution. The samples were collected at a private laboratory, located in Novo Hamburgo, Brazil, in response to medical requests for RT-qPCR to diagnose COVID-19. The collection period spanned from June 2020 to August 2020, and the samples were promptly frozen and preserved until the time of testing, with a maximum storage time of 24 h. Subsequently, after undergoing RT-qPCR analysis (Promega Corporation, Madison WI, USA) an aliquot of approximately 1 mL of the remaining sample was transferred to a new sterile tube and then stored at a temperature of -20°C for a maximum of 48 h prior to RT-LAMP testing. It should be noted that during the thawing process, the aliquots were promptly processed to minimize any potential degradation of viral RNA. All samples utilized in this study were handled anonymously and exclusively identified by an internal numerical code, thereby ensuring the confidentiality of patient information, which remained inaccessible and unused throughout the study (as depicted in Figure 2).

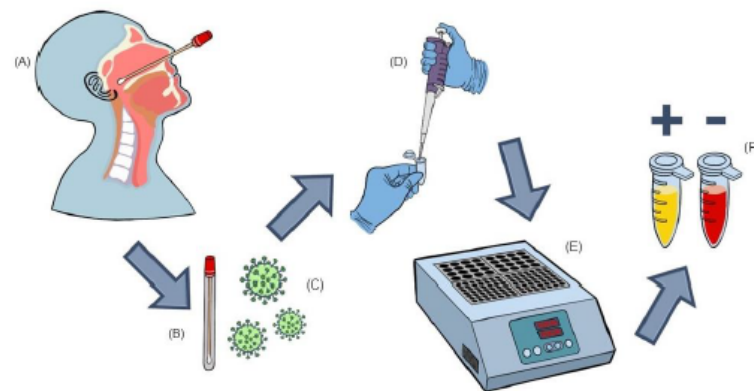


Figure 2. Schematic view of sample collection, transportation, and RT-LAMP analysis. A—Nasopharyngeal sample collection. B—Sample is transferred to a tube containing 2 ml of sterile saline. C—A 1 ml aliquot was transferred to a cryotube and kept frozen until RT-LAMP analysis. D—Thawed sample added directly to the RT-LAMP mix (New England Biolabs®, Ipswich, MA, USA). E—Tubes were incubated at 63°C for 45 min. F—After incubation, the yellow color indicates positivity for SARS-CoV2, while the red color indicates a negative test.

In total, the study encompassed a comprehensive set of 115 nasopharyngeal samples. Among these, 43 samples exhibited positive results (with a CT value below 30) for SARS-CoV-2, as determined by RT-qPCR, which served as the benchmark methodology for method comparison [20].

This project was approved by the Ethical Committee of Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA-Porto Alegre-Brazil) under the identification number 4,769,584.

4.2. Primers for RT-LAMP

Oligonucleotide primers were designed using the online software PrimerExplorer version 5 (<https://primerexplorer.jp/e/>) (accessed on 22 of February 2020) using the consensus RNA polymerase (*RP*) gene sequence from SARS-CoV-2 as the template. Table 1 shows the chosen primer set designed for this study.

Table 2. LAMP primer set used in this study (in bold) and their properties.

Label	Length	T _m	5'dG	3'dG	GC Rate	Sequence
F3	21	55.33	-4.9	-4.18	0.38	ACTGACTTAACAAAGCCTTAC
B3	20	56.19	-3.53	-4.55	0.4	ACTAGTGGTCCAAAACCTGT
FIP	50					GGTGGTATGTCTGATCCCAATATTT- GGGATTTGTTAAAATATGACTTCAC
BIP	45					TTGTGTTAACTGTTTGGATGACAGA- AGTGGGAACACTGTAGAGAA
F2	25	56.51	-4.85	-4.51	0.32	GGGATTTGTTAAAATATGACTTCAC
F1c	25	60.56	-6	-2.28	0.4	GGTGGTATGTCTGATCCCAATATTT
B2	20	57.27	-5.84	-4.1	0.45	AGTGGGAACACTGTAGAGAA
B1c	25	60.88	-4.72	-4.76	0.36	TTGTGTTAACTGTTTGGATGACAGA
LF	25	60.92	-6.19	-4.1	0.4	CGGTCAAAGAGTTTTAACCTCTCTT
LB	21	60.35	-4.96	-5.17	0.43	TGCATTCTGCATTGTGCAAAC

4.3. RT-LAMP

The RT-LAMP reaction was carried out utilizing the WarmStart® Colorimetric LAMP Kit, a product manufactured by New England Biolabs® (Ipswich, MA, USA). The laboratory had previously validated the following protocol for the detection of other pathogens, ensuring its reliability and effectiveness. The final reaction volume was set at 10 µL, comprising 5 µL of WarmStart® Colorimetric LAMP MIX, 1 µL of *RP* primers MIX (with a final concentration of 200 nM for F3/B3 primers, 1600 nM for FIP/BIP primers, and 400 nM for LF/LB primers), 2.0 µL of nuclease-free water, and 2 µL of the sample or controls.

Upon preparing the reaction mixtures, the tubes were promptly subjected to an isothermal reaction at a temperature of 63 °C for a duration of 45 min. Following the incubation period, the reactions were visually examined, and a discernible change from the original red/pinkish color to a distinct yellow color was deemed indicative of a positive result. To ensure the validity of the results, positive controls (known positive samples) and non-template controls (NTCs) were included in each new run, serving as reference points for comparison.

It is important to note that for the sample preparation, a brief vortex homogenization step was employed to ensure proper mixing. Subsequently, 2 µL of the homogenized sample was directly used without undergoing any nucleic acid extraction procedures, simplifying the workflow and reducing processing time.

To determine the limit of detection (LOD) for the RT-LAMP assay, a series of 10-fold dilutions were prepared from a pooled positive sample, which had previously been

quantified using RT-qPCR. These dilutions were tested in triplicate on multiple occasions. The lowest viral load that consistently produced a clear and repeatedly positive result in the RT-LAMP runs was considered the LOD for this assay. For the concordance analysis, the acceptance criterion was used as a global concordance greater than or equal to 95%.

Author Contributions: Conceptualization: Elias da Rosa Hoffmann and Vlademir Vicente Cantarelli; methodology: Elias da Rosa Hoffmann, Everton Inamine and Lisiane Rech Pancotto, software: Vlademir Vicente Cantarelli validation, Elias da Rosa Hoffmann, Everton Inamine and Lisiane Rech Pancotto, and Lisiane da Rocha Balzan; formal analysis: Elias da Rosa Hoffmann and Guilherme Gaboardi, investigation: Elias da Rosa Hoffmann, Everton Inamine and Lisiane Rech Pancotto; resources: Elias da Rosa Hoffmann, Everton Inamine and Lisiane Rech Pancotto; data curation, Elias da Rosa Hoffmann and Guilherme Gaboardi, writing—original draft preparation: Elias da Rosa Hoffmann and Guilherme Gaboardi; writing—review and editing: Elias da Rosa Hoffmann and Guilherme Gaboardi; visualization: Elias da Rosa Hoffmann and Vlademir Vicente Cantarelli; supervision, Vlademir Vicente Cantarelli; project administration: Elias da Rosa Hoffmann and Vlademir Vicente Cantarelli; funding acquisition: Everton Inamine and Lisiane Rech Pancotto. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Review Board of the Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSA Porto Alegre Brazil) under the identification number 4,769,584.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement:

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

- Giovanetti, M.; Slavov, S.N.; Fonseca, V.; Wilkinson, E.; Tegally, H.; Patané, J.S.L.; Viala, V.L.; San, E.J.; Rodrigues, E.S.; Santos, E.V.; et al. Genomic epidemiology of the SARS-CoV-2 epidemic in Brazil. *Nat. Microbiol.* **2022**, *7*, 1490–1500.
- OPAS. Histórico da pandemia de COVID-19—OPAS/OMS|Organização Pan-Americana da Saúde. 2020. Available online: <https://www.paho.org/pt/covid19/historico-da-pandemia-covid-19> (accessed on 03 of December 2022).
- Notomi, T.; Okayama, H.; Masubuchi, H.; Yonekawa, T.; Watanabe, K.; Amino, N.; Hase, T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, e63.
- Soroka, M.; Wasowicz, B.; Rymaszewska, A. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): The Better Sibling of PCR? *Cells* **2021**, *10*, 1931.
- Smyrlaki, I.; Ekman, M.; Lentini, A.; Rufino de Sousa, N.; Papanicolaou, N.; Vondracek, M.; Aarum, J.; Safari, H.; Muradrasoli, S.; Rothfuchs, A.G.; et al. Massive and rapid COVID-19 testing is feasible by extraction-free SARS-CoV-2 RT-PCR. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 4812.
- Alvarez, C.U.; Lam, Q.; Baldwin, D.A.; Chernoff, J. Low saliva pH can yield false positives results in simple RT-LAMP-based SARS-CoV-2 diagnostic tests. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0250202.
- Zhang, C.; Zheng, T.; Wang, H.; Chen, W.; Huang, X.; Liang, J.; Qiu, L.; Han, D.; Tan, W. Rapid One-Pot Detection of SARS-CoV-2 Based on a Lateral Flow Assay in Clinical Samples. *Anal. Chem.* **2021**, *93*, 3325–3330.
- 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.J.; et al. Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification as a rapid early-detection method for novel SARS-CoV-2. *Emerg. Microbes Infect.* **2020**, *9*, 998–1007.
- Haq, F.; Sharif, S.; Khurshid, A.; Ikram, A.; Shabbir, I.; Salman, M.; Ahad, A.; Rana, M.S.; Raja, A.; Badar, N.; et al. Reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP)-based diagnosis: A potential alternative to quantitative real-time PCR based detection of the novel SARS-CoV-2 virus. *Saudi J. Biol. Sci.* **2021**, *28*, 942–947.
- Jang, W.S.; Lim, D.H.; Yoon, J.; Kim, A.; Lim, M.; Nam, J.; Yanagihara, R.; Ryu, S.-W.; Jung, B.K.; Ryoo, N.-H.; et al. Development of a multiplex Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) assay for on-site diagnosis of SARS-CoV-2. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0248042.
- Jiang, M.; Pan, W.; Arasther, A.; Fang, W.; Ling, L.; Fang, H.; Daneshnia, F.; Yu, J.; Liao, W.; Pei, H.; et al. Development and validation of a rapid, single-step reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) system potentially to be used for reliable and high-throughput screening of COVID-19. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2020**, *10*, 331.
- Kitagawa, Y.; Orihara, Y.; Kawamura, R.; Imai, K.; Sakai, J.; Tarumoto, N.; Matsuoka, M.; Takeuchi, S.; Maesaki, S.; Maeda, T. Evaluation of rapid diagnosis of novel coronavirus disease (COVID-19) using loop-mediated isothermal amplification. *J. Clin. Virol.* **2020**, *129*, 104446.
- Li, J.; Hu, X.; Wang, X.; Yang, J.; Zhang, L.; Deng, Q.; Zhang, X.; Wang, Z.; Hou, T.; Li, S. A novel One-pot rapid diagnostic technology for COVID-19. *Anal. Chim. Acta* **2021**, *1154*, 338310.

14. Lu, R.; Wu, X.; Wan, Z.; Li, Y.; Jin, X.; Zhang, C. A novel reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of SARS-CoV-2. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2826.
15. Manzano, J.R.; Malpartida-Cardenas, K.; Moser, N.; Pennisi, I.; Cavuto, M.; Miglietta, L.; Moniri, A.; Perin, R.; Satta, G.; Randell, P.; et al. Handheld point-of-care system for rapid detection of SARS-CoV-2 extracted RNA in under 20 min. *ACS Cent. Sci.* **2021**, *7*, 307–317.
16. Wikramaratna, P.S.; Paton, R.S.; Ghafari, M.; Lourenço, J. Estimating the false-negative test probability of SARS-CoV-2 by RT-PCR. *Eurosurveillance* **2020**, *25*, 2000568.
17. Pecoraro, V.; Negro, A.; Pirotti, T.; Trenti, T. Estimate false-negative RT-PCR rates for SARS-CoV-2. A systematic review and meta-analysis. *Eur. J. Clin. Investig.* **2022**, *52*, e13706.
18. Khandker, S.S.; Nik Hashim, N.H.H.; Deris, Z.Z.; Shueb, R.H.; Islam, M.A. Diagnostic accuracy of rapid antigen test kits for detecting SARS-CoV-2: A systematic review and meta-analysis of 17,171 suspected COVID-19 patients. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 3493.
19. Lee, J.Y.; Best, N.; McAuley, J.; Porter, J.L.; Seemann, T.; Schultz, M.B.; Sait, M.; Orlando, N.; Mercoulia, K.; Ballard, S.A.; et al. Validation of a single-step, single-tube reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of SARS-CoV-2 RNA. *J. Med. Microbiol.* **2020**, *69*, 1169.
20. Ganguli, A.; Mostafa, A.; Berger, J.; Aydin, M.Y.; Sun, F.; de Ramirez, S.A.S.; Valera, E.; Cunningham, B.T.; King, W.P.; Bashir, R.; et al. Rapid isothermal amplification and portable detection system for SARS-CoV-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117*, 22727–22735.

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

8. CONCLUSÃO

O uso de RT-LAMP tendo como alvo a região da polimerase viral demonstrou ser um método viável, rápido e de menor custo quando comparado ao teste padrão-ouro de RT-PCR. O teste apresentou excelente especificidade e adequada sensibilidade para a detecção do SARS-CoV-2 diretamente em amostras de nasofaringe, sem a necessidade de extração de ácidos nucleicos, o que contribui para o reduzido custo da reação de RT-LAMP. Apesar de apresentar um limite de detecção ao redor de 40 cópias/μl, podendo não detectar algumas amostras com cargas virais muito baixas, esta também é uma limitação conhecida das metodologias de RT-PCR e dos testes de detecção rápidos de antígenos disponíveis comercialmente. As análises realizadas sugerem que o teste de RT-LAMP proposto não é afetado pelas mutações genéticas B.1.1.28, B.1.1.33, P1, P2, Omicron, podendo ser utilizado mesmo dentro de um cenário de constante mudanças do SARS-CoV-2. Entretanto, o número limitado de amostras utilizados neste estudo não permite uma conclusão definitiva acerca das limitações do método, sendo necessário a ampliação do n amostral, incluindo de novas variantes, para aprimorar o diagnóstico da COVID-19 com utilização desta técnica de RT-LAMP em escala mundial.

ANEXO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DETECÇÃO DE SARS-CoV2 UTILIZANDO A METODOLOGIA DE LAMP EM AMOSTRAS NASOFARINGEAS PARA ALVOS MOLECULARES ALTERNATIVOS

Pesquisador: Vladimir Vicente Cantarelli

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 46819321.6.0000.5345

Instituição Proponente: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.769.584

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma resposta ao parecer de pendência nº 4.742.935 relativo ao projeto de pesquisa de doutorado do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, intitulado DETECÇÃO DE SARS-CoV2 UTILIZANDO A METODOLOGIA DE LAMP EM AMOSTRAS NASOFARINGEAS PARA ALVOS MOLECULARES ALTERNATIVOS.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivos conforme informações básicas da Plataforma Brasil

Objetivo Primário: Validar e padronizar o teste LAMP para a região da RNA Polimerase (RP) em amostras positivas para SARS-cov-2.

Objetivo Secundário:

- Comparar o método de LAMP com a metodologia padrão ouro RT-PCR
- Identificar a sensibilidade e especificidade da metodologia de LAMP em comparação à RT-PCR
- Comparar os custos do RT-PCR com a metodologia mais acessível do LAMP
- Demonstrar a vantagem da utilização do teste LAMP para a identificação do SARS-CoV2 e suas variantes já encontradas

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Descrição dos riscos e benefícios de acordo com informações básicas da Plataforma Brasil:

Endereço: Rua Sarmiento Leite, 246

Bairro: Sarmiento

CEP: 90.060-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-6804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 4.769.504

Riscos:

Os riscos aos pacientes serão mínimos, pois não há interferência no processo de diagnóstico dos médicos assistentes por se tratar exclusivamente de amostras do descarte extraídas. Os pesquisadores se comprometem a manter os dados dos pacientes em sigilo absoluto a fim de minimizar potenciais riscos por quebra de confidencialidade. Além disso, serão utilizadas amostras do descarte e extraídas com os devidos cuidados de biossegurança conforme descrito na Resolução nº441 de 12 de maio de 2011, do Conselho Nacional de Saúde.

Benefícios:

Os benefícios gerados atingirão a comunidade como um todo, pois conhecendo melhor a epidemiologia mundial de um agente infeccioso viral de importância cosmopolita.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Nenhum comentário ou consideração.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória foram apresentados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendência 1: O texto indica que "As amostras serão buscadas ao final da RT-PCR que se destinam ao descarte no Laboratório de Análises Clínicas Exame", entretanto não está indicado qual o local em que serão feitas as análises do estudo.

ANÁLISE: pendência atendida.

Pendência 2: Além disso, se o local da realização das análises não for o mesmo que o Laboratório de Análises Clínicas Exame, é necessário incluir o termo de anuência do local de realização das análises.

ANÁLISE: pendência atendida.

Pendência 3: o projeto não descreve como se dará o transporte destas amostras até o local das análises e se ocorrerá posterior armazenamento das amostras ou não. Todas as normas de Biossegurança do local devem ser atendidas.

ANÁLISE: pendência atendida.

Endereço: Rua Sarmiento Leite, 246

Bairro: Sarmiento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE**



Continuação do Parecer: 4.706.504

Pendência 4: Como o estudo não fará uso de TCLE, é necessário incluir o TCUD assinado por todos os membros da equipe de pesquisa.

ANÁLISE: pendência atendida.

Pendência 5: O termo de entrega de relatório não foi anexado e sim o próprio relatório em si. Incluir o termo de entrega de relatório, lembrando que para pesquisas que envolvem COVID-19, os relatórios devem ser na frequência semestral.

ANÁLISE: pendência atendida.

Considerações Finais a critério do CEP:

De acordo com o parecer do Relator.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_1734142.pdf	08/06/2021 09:38:28		Acelto
Outros	Carta_ao_CEP.pdf	08/06/2021 09:37:30	ELIAS DA ROSA HOFFMANN	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_DOC_EliasRHoffmann_07062021.pdf	08/06/2021 06:55:28	ELIAS DA ROSA HOFFMANN	Acelto
Declaração de Pesquisadores	anexo_5_tcdu_1.pdf	08/06/2021 06:53:43	ELIAS DA ROSA HOFFMANN	Acelto
Outros	Entrega_relatorio_semestral_final.pdf	08/06/2021 06:52:54	ELIAS DA ROSA HOFFMANN	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Justificativa_de_ausencia_do_TCLE.pdf	12/04/2021 17:45:09	ELIAS DA ROSA HOFFMANN	Acelto
Declaração de concordância	Termo_LAB_EXAME.pdf	12/04/2021 17:43:45	ELIAS DA ROSA HOFFMANN	Acelto
Folha de Rosto	folhaDeRosto/VladimirVicenteCantarelli.pdf	12/04/2021 17:37:44	ELIAS DA ROSA HOFFMANN	Acelto
Cronograma	Cronograma_DOC_Elias_12042021.pdf	12/04/2021 07:35:48	ELIAS DA ROSA HOFFMANN	Acelto

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Endereço: Rua Sarmiento Leite, 245
Bairro: Sarmiento CEP: 90.050-170
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3303-8804 E-mail: cep@ufcspa.edu.br