

# DIAGNÓSTICOS POINT-OF-CARE: AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR ASAS COMO ALTERNATIVA PARA LA DETECCIÓN Y PREVENCIÓN DEL SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO

## Point-of-care diagnostics: loop mediated isothermal amplification for detection and prevention of hemolytic uremic syndrome

Ezequiel Blanco<sup>a</sup>, Rosana Alves<sup>b</sup>.

<sup>a</sup> Laboratorio de Control de Calidad Físico-Químico, Laboratorios Abbott,  
Florencio Varela, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

<sup>b</sup> Área de Microbiología Clínica, Hospital General de Agudos José María Penna,  
Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Contacto: blanco.ezequiel16@gmail.com

Recibido: 24 de enero de 2020. Aprobado: 9 de noviembre de 2020.

### RESUMEN

El Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) es una enfermedad que se caracteriza por un fracaso renal agudo (o crónico) que afecta principalmente a la población pediátrica. Su etiología es variable, aunque la más frecuente está asociada a la ingesta de alimentos contaminados con *Escherichia coli* productora de toxina Shiga. En Argentina, esta enfermedad representa un grave problema de salud pública debido a la tasa alta de ocurrencia y a la falta de un tratamiento específico; esto revela la importancia de la inmediatez y la eficiencia con que intervienen todos los agentes involucrados en la prevención primaria a fin de reducir el impacto sanitario. En este entramado se discute la aplicación de la técnica de Amplificación Isotérmica de ácidos nucleicos Mediada por Asas (LAMP, por sus siglas en inglés), cómo método de diagnóstico alternativo a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), hoy ampliamente utilizada en centros de referencia. Para el desarrollo de este trabajo se llevó a cabo una revisión bibliográfica para analizar el contraste PCR vs LAMP en el marco de los requisitos "ASSURED" de técnicas *point-of-care* adoptados por la Organización Mundial de la Salud. Con un inicial abordaje molecular, se resaltan características diagnósticas, tales como la universalidad de la aplicación, especificidad, sensibilidad de la técnica, las cuales postulan a la LAMP como una herramienta rápida, oportuna y confiable para la detección de una gran cantidad de patógenos bacterianos.

**Palabras clave:** Amplificación isotérmica de ácidos nucleicos, LAMP, técnicas *point-of-care*, *E. coli* O157:H7, gen *rfbE*.

### ABSTRACT

The Hemolytic Uremic Syndrome (HUS) is a disease characterized by an acute (or chronic) renal failure that mainly affects the pediatric population. Its etiology is variable, although the most frequent one is associated with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* contaminated food. In Argentina, this disease represents a serious public health problem due to high incidence rate and lack of specific treatment; this reveals the importance of the immediacy and efficiency that agents involved in primary prevention utilize in order to reduce the health impact. The application of the Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) technique is discussed in this framework as an alternative diagnostic method to Polymerase Chain Reaction (PCR), still widely used in reference centers. For the development of this work, a bibliographic review was carried out to analyze the PCR vs LAMP contrast within the framework of the "ASSURED" criteria of *point-of-care* testing techniques adopted by the World Health Organization. In an initial molecular approach, diagnostic characteristics, such as the universality of the application, specificity, and sensitivity of the technique are highlighted, which nominate LAMP as a fast, timely and reliable tool for the detection of a large number of bacterial pathogens.

**Keywords:** Loop mediated isothermal amplification, LAMP, *point-of-care* techniques, *E. coli* O157:H7, *rfbE* gen.

## Síndrome Urémico Hemolítico

El Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), consecuente a la ingesta de la cepa de *Escherichia coli* O157:H7 productora de Shiga Toxina (STEC, por sus siglas en inglés), es una enfermedad grave que afecta principalmente a niños menores de 5 años y se caracteriza por conducir a un fallo renal agudo o crónico que, en ocasiones, puede causar la muerte o dejar secuelas para toda la vida.

La República Argentina, según la Organización Panamericana de la Salud (OPS), es un área endémica donde se producen más de 400 casos por año<sup>[1]</sup>. La vigilancia epidemiológica indica que la carne picada cruda, los vegetales crudos, el agua de consumo no potable y el contacto con animales de granja son las principales fuentes de infección y, en consecuencia, donde se debería intervenir<sup>[2]</sup>.

La transmisión ocurre a través de la vía fecal-oral, frecuentemente a través de la ingestión de agua o alimentos contaminados o contacto directo con personas o animales infectados u objetos contaminados. El ganado bovino y otros rumiantes son considerados el principal reservorio de STEC O157:H7 y en nuestro país la cepa de *E. coli* productora de Shiga II (Stx II) es la prevalente<sup>[3]</sup>. La importancia del serotipo *E. coli* O157:H7 radica en varios aspectos siendo uno de los más importantes el bajo inóculo que se requiere para infectar al humano, así como también sus factores de virulencia asociados a la producción de sus toxinas por parte de los genes *slt-I* y *slt-II*, el gen *eaeA* para la intimina, el gen de la *uidA* para la betaglucuronidasa y el gen *rfbE* que es específico del serotipo O157, codificante del lipopolisacárido O<sup>[4]</sup>. La evidencia científica apunta a utilizar este último gen como marcador específico del serotipo O157, utilizando técnicas de biología molecular de vanguardia, una de ellas es la amplificación isotérmica de ácidos nucleicos mediada por asas o LAMP, por sus siglas en inglés. Estudios realizados en diversas matrices de muestra comparan su alcance con la clásica reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Teniendo en cuenta la endemicidad y la gravedad de la infección, hoy en día la estrategia de notificación tiene una modalidad individual y de forma inmediata. Los datos para la vigilancia del SUH se originan mediante cuatro subsistemas: la notificación en la Planilla C2, las Unidades Centinelas, el SIVILA y la red regional PulseNet Latino América. El nivel central está compuesto por la Dirección de Epidemiología del Ministerio de Salud y los Institutos del ANLIS-MALBRAN, como laboratorio nacional de referencia que, al originarse un nuevo caso, inician una investigación epidemiológica para evitar la aparición de casos secundarios<sup>[5-7]</sup>.

## Fisiopatogenia y manifestación clínica del Síndrome Urémico Hemolítico

El SUH se define como un fracaso renal agudo (o crónico) consecuente a una anemia hemolítica microangiopática con valores de hemoglobina entre 7-10 g/dL, con casos muy graves cuyos valores se encuentran por debajo de 7 g/dL.

Los pequeños traumatismos en los vasos, debido a la Stx, generan la lisis de los hematíes de forma mecánica en el endotelio

glomerular. También se genera una trombocitopenia similar a la ocasionada en casos de coagulación intravascular diseminada y, en ciertas ocasiones, muy acusada con una disminución marcada del conteo de plaquetas ( $< 50.000/\text{mm}^3$ )<sup>[8]</sup>. Si bien esta triada de anemia-trombocitopenia-fallo renal es patognomónica de la enfermedad, también puede estar acompañada de diarrea sanguinolenta, fiebre y dolor abdominal, siendo los lactantes y niños en la primera infancia, los más vulnerables.

La letalidad durante el período agudo es del 3 al 5% debido al diagnóstico precoz de la enfermedad, instauración temprana de la diálisis y el manejo de la anemia hemolítica. El período de incubación es de dos a diez días, con una media de tres a cuatro días. Luego del comienzo de la diarrea, el período de transmisibilidad es de hasta tres semanas en los niños y de una semana o menos en los adultos<sup>[9]</sup>. A expensas de un endotelio glomerular dañado por la toxina, al evolucionar el SUH, el paciente presenta un alto de compromiso del sistema nervioso central, páncreas, pulmones y corazón<sup>[10-11]</sup>. Del resto de los pacientes y superada la fase aguda, el 60% se recupera sin tener secuelas después de dos o tres semanas de hospitalización. Es crítico un correcto manejo del paciente ya que aún sin síntomas, continúa eliminando la bacteria por materia fecal.

Esta patología implica grandes costos económicos para el sistema de salud, lo cual tiene un impacto importante en los países en desarrollo<sup>[12]</sup>. Es importante destacar que diversas fuentes se refieren al SUH con características propias de brotes epidémicos debido a la circunscripción de los casos.

La Argentina presenta la mayor incidencia anual de casos de SUH en menores de 5 años en el mundo. En el año 2003, la tasa de hospitalización fue de 11,5 casos por cada 100.000 niños, dentro de este grupo. Un lustro más tarde, en el 2008 se presentó otro pico de casos (543) correspondiente al período 2005-2013<sup>[5,6]</sup>. Coincidentemente con los reportes previos, el grupo etario más afectado fue el de los niños menores de 5 años, comprendiendo el 81% (1238) de casos en el período 2010-2013. Los datos mostrados por el boletín de vigilancia del SUH publicado por el Ministerio de Salud en el año 2018, el cual analiza información recopilada entre los años 2011 y la semana epidemiológica 17 (SE17) de 2018, arrojaron una tasa acumulada de 0,81 casos cada 100.000 habitantes<sup>[10]</sup>. Con respecto a los menores de 5 años hasta la SE17 del 2018 se notificaron 75 casos con una mediana de 82 para el período 2010-2017 hasta la misma SE. Siendo el SUH endémico, la modalidad de la notificación es obligatoria e inmediata desde el mes de abril de 2000 (Resolución N°346/00). La modalidad actual es individual y la estrategia involucra la recolección de datos con las fichas C2, L2 y Ficha especial<sup>[5-10]</sup>.

La Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT), organismo regulador de referencia, establece guías sobre el estudio de muestras de alimentos tanto para el *screening* como para el aislamiento y la tipificación de microorganismos, siguiendo los lineamientos del procedimiento según USDA/FSIS: 2010<sup>[16,17]</sup>. Entre las técnicas de *screening* y aislamiento se menciona la utilización de la amplificación por PCR y métodos microbiológicos convencionales. En

concordancia con esto, diversos estudios realizados por la Cátedra de Bacteriología, Facultad de Bioquímica, Química, Farmacia y Biotecnología, Universidad Nacional de Tucumán<sup>[18]</sup> reafirman su utilización. Estos procedimientos son específicos y precisos, pero presentan ciertas características que, a veces, entorpecen o imposibilitan su implementación; entre ellos se destaca que requieren de una clara expertise técnica, así como hasta 24hs para obtener un resultado. La amplificación por PCR a los fines diagnósticos sólo puede realizarse si se cuenta con un termociclador, un aparato de costos sumamente elevados para laboratorios de mediana a baja envergadura que, a menudo, terminan tercerizando los ensayos confirmatorios. Sumado a lo anterior, la necesidad de confirmar un diagnóstico (envío de la muestra y espera de respuesta) requiere tiempo del que muchas veces no se dispone. El método de LAMP ofrece una alternativa a todas estas cuestiones con grandes ventajas como su sensibilidad, especificidad y tiempos reducidos.

#### LAMP: fundamentos moleculares y detección

El principio de la reacción LAMP involucra una mezcla de reacción que consiste en: dNTPs, una polimerasa, un fluorocromo (calceína), 4 a 6 *primers* y el templado de ADN. Los reactivos se encuentran liofilizados en el tubo de reacción, por ende, el agregado al mix consta de *primers* específicos que reconocen 6 a 8 regiones del ADN/ARN blanco y la muestra que se desea analizar<sup>[19]</sup>.

La enzima que extiende la cadena en esta técnica se denomina *Bst* polimerasa y a diferencia de la *Taq* polimerasa, no posee la propiedad 5'-3' exonucleasa<sup>[19,20]</sup>. La reacción se caracteriza por el uso de 4 a 6 *primers* diferentes especialmente diseñados

para reconocer 6 a 8 regiones distintas del ADN/ARN que se quiere estudiar. El *Forward Inner Primer* (FIP) consiste en una región F2 en el Extremo 3' y una región F1c en el extremo 5'; *Forward Outer Primer* (F3 Primer) consiste en una región F3 que es complementaria a la región F3c de la secuencia del templado; *Backward Inner Primer* (BIP) consiste en una región B2 en el extremo 3' y una región B1c en el extremo 5'. *Backward Outer Primer* (B3 Primer) consiste en una región B3 que es complementaria a la región B3c de la secuencia del templado (Figura 1).

La amplificación comienza cuando la región F2 de FIP hibrida con la región F2c del ADN objetivo e inicia la síntesis complementaria de la cadena, seguido a esto el *primer* F3 que hibrida a la región F3c del ADN objetivo y se extiende, desplazando la cadena complementaria unida a FIP. Esta hebra desplazada da forma a un bucle o *loop* en el extremo 5'. Este ADN monocatenario con un *loop* en el extremo 5' sirve como plantilla para BIP. B2 se hibrida con la región B2c del templado de ADN. Se inicia entonces la síntesis de ADN que conduce a la formación de una cadena complementaria y apertura del bucle del extremo 5'. Posteriormente, B3 se hibrida a la región B3c del ADN objetivo y se extiende, desplazando la cadena complementaria unida a BIP. Esto da como resultado la formación de una forma de mancuerna de ADN<sup>[20-25]</sup>.

Los nucleótidos se agregan al extremo 3' de F1 por la *Bst* polimerasa que se extiende y abre el bucle en el extremo 5'. La forma de pesa de ADN ahora se convierte en una estructura de bucle vástago (a y b) que sirve como iniciador para la amplificación exponencial, que es la segunda etapa de la reacción LAMP. Componentes extra

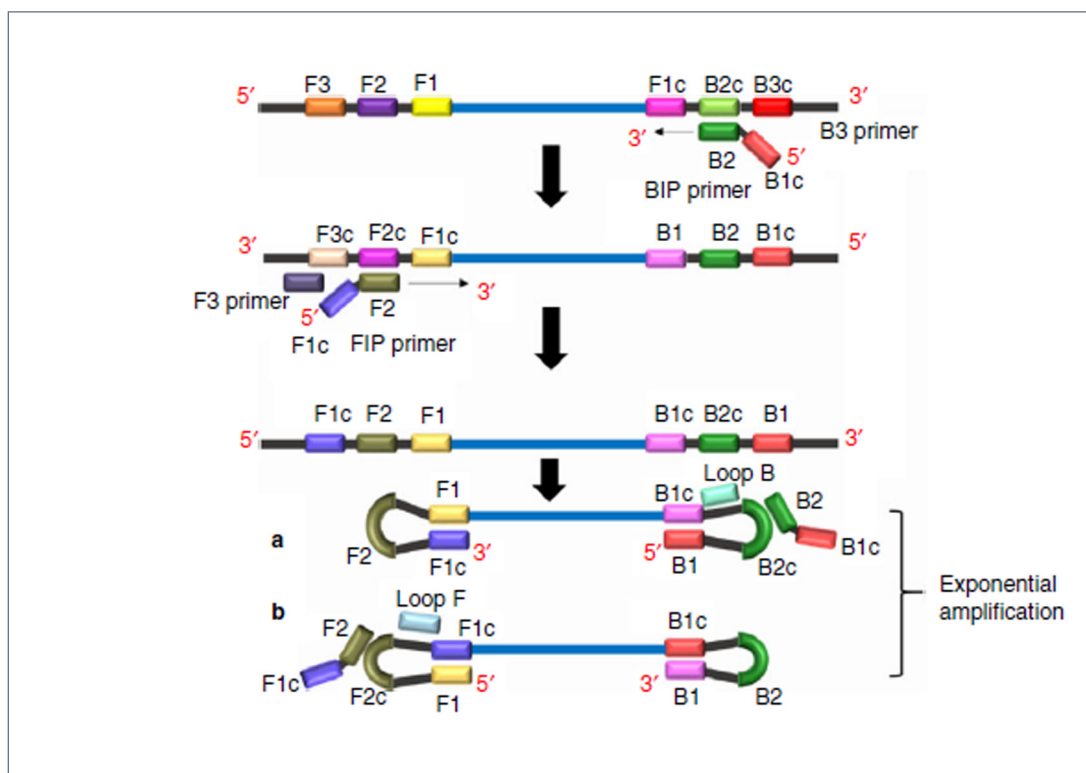


FIGURA 1. MECANISMO DE LA REACCIÓN LAMP (EXTRAÍDO DE WONG, Y. P ET AL, 2018).

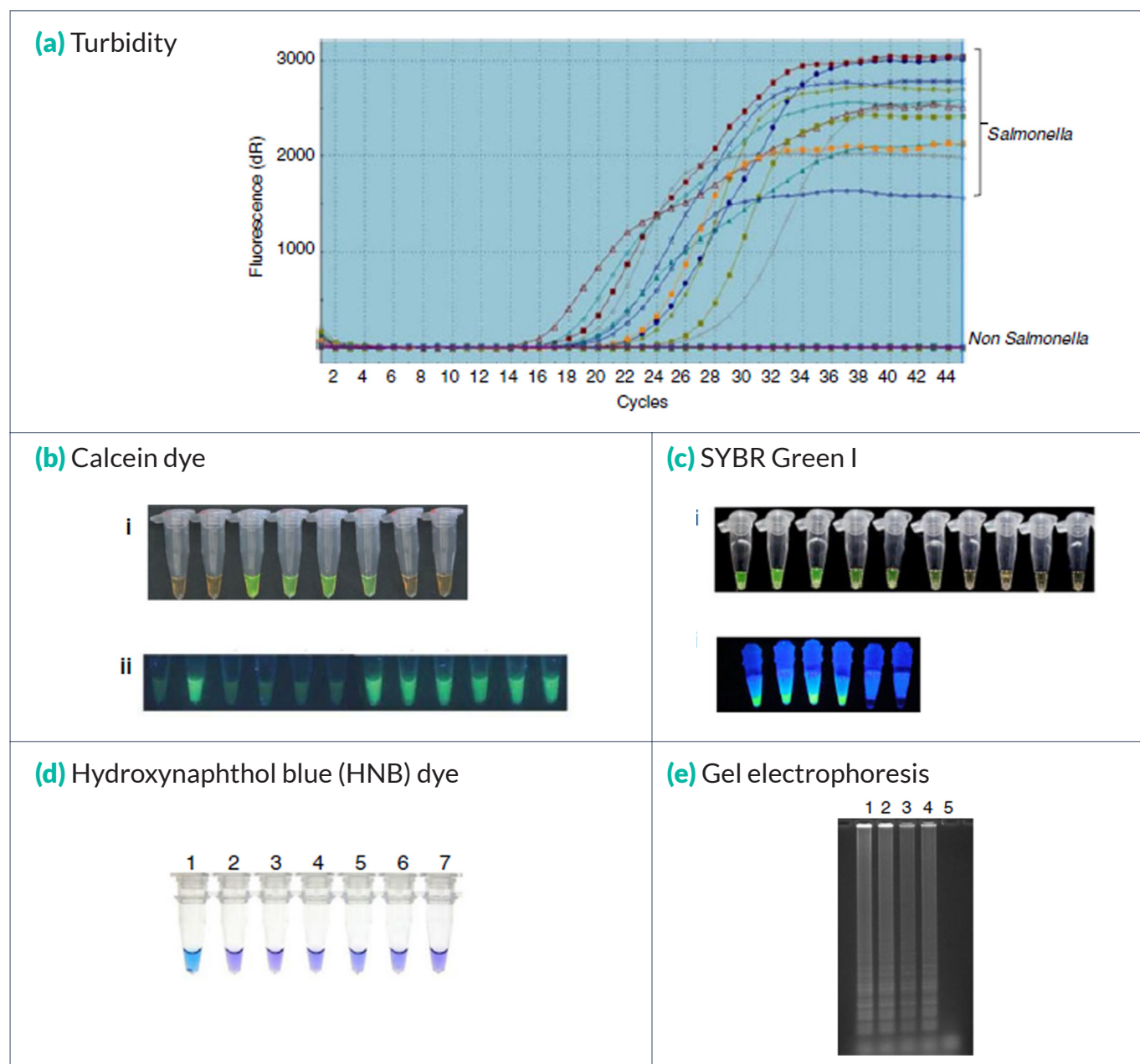
como los *loop primers* también se pueden agregar para generar tiempos más cortos de entrega de resultados. La amplificación se da a una misma temperatura (60-65°C) eliminando la necesidad de costosos termocicladores y los productos finales obtenidos son varias estructuras de tipo coliflor con múltiples bucles que se pueden observar al ojo desnudo<sup>[25-30]</sup>.

La detección de producto de amplificación se puede determinar a través de fotometría de la turbidez causada por una cantidad cada vez mayor de precipitado de pirofosfato de magnesio en solución como un subproducto de la amplificación. Antes de la reacción, la calceína, como reactivo, no emite fluorescencia ya que está unida a iones de manganeso que actúan como inactivadores o *quenchers*. Una vez que la reacción LAMP comienza, los iones pirofosfato

generados se unen a esos iones de manganeso, liberando la fluorescencia de la calceína a niveles tales que permiten la simple detección visual<sup>[24]</sup>.

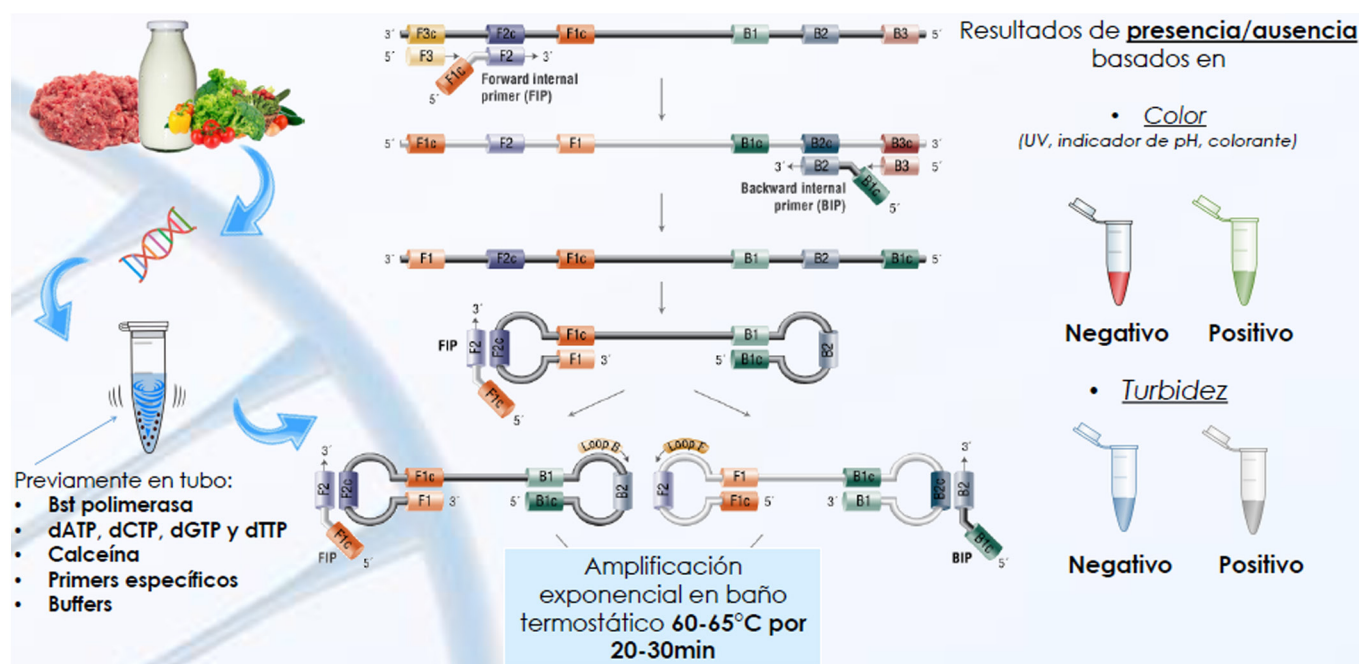
La reacción se puede seguir en tiempo real, ya sea mediante la medición de la turbidez o por fluorescencia y ser correlacionado con el número de copias presentes inicialmente, por lo tanto, también puede ser cuantitativa<sup>[23]</sup>.

A diferencia de la PCR, la LAMP encuentra su desarrollo en la necesidad de disponer de técnicas moleculares simples y costo-efectivas. Sus puntos clave radican en: su corto tiempo de incubación de menos de 1 hora y su fácil detección del producto amplificado (a ojo desnudo, SYBR Green II y exposición a radiación ultravioleta -UV-) (Figura 2).



**FIGURA 2.** MÉTODO DE DETECCIÓN DEL PRODUCTO DE LAMP. **A.** MEDICIÓN EN TIEMPO REAL CON TURBIDIMETRÍA. **B. I.** CALCEÍNA- **II.** CALCEÍNA AL UV. **C. I.** SYBR GREEN- **II.** SYBR AL UV. **D.** INDICADORES DE PH COMO HIDROXINAFTOL AZUL (HNB). **E.** ELECTROFORESIS EN GEL. (EXTRAÍDO DE WONG, Y. P, 2018).





**FIGURA 3.** ESQUEMA DE LOS PASOS DE LA LAMP. IMAGEN DE PROPIA AUTORIA, PRESENTADO EN EL POSTER PARA EL PRIMER CONGRESO DE ALIMENTOS DE ANMAT 2019.

En el marco de la detección de STEC O157:H7, diversos estudios proponen la utilización del gen *rfbE* que es específico del serotipo O157<sup>[15-17]</sup>. Como se observa en la **Figura 3**, la extracción del ADN/ARN puede ser de diversas matrices de muestra como carnes<sup>[17-20,25,27]</sup>, leche cruda, queso<sup>[30]</sup> o material vegetal<sup>[31]</sup>.

#### LAMP vs PCR en la detección de STEC O157:H7

En las fuentes consultadas se destaca un concepto denominado “ASSURED criteria”<sup>[12]</sup> adoptado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como un criterio genérico de aproximación a nuevas técnicas diagnósticas, en el marco de ensayos *point-of-care* (POC). Los ensayos dentro de esta terminología sugieren que una técnica de diagnóstico debe ayudar a la toma oportuna de decisiones para abordar el correcto tratamiento, mejorar la eficiencia del cuidado al paciente y reducir costos, especialmente en laboratorios de bajos recursos (LRS por sus siglas en inglés). Un esquema simple y didáctico sobre los criterios “ASSURED” se muestra en la **Figura 4**.

A = Affordable  
S = Sensitive  
S = Specific  
U = User-friendly (simple to perform in a few steps with minimal training)  
R = Robust and rapid (results available in less than 30 min)  
E = Equipment-free  
D = Deliverable to those who need them

**FIGURA 4.** OMS “ASSURED” CRITERIO (EXTRAÍDO Y ADAPTADO DE LABARRE P. ET AL. 2011).

Siguiendo como regla general estos requisitos a continuación, se analiza cada ítem y su cumplimiento (o no) por ambas técnicas. Por “affordable” se entiende que una técnica diagnóstica debe ser accesible. El pequeño número de laboratorios centralizados que existen en los países en desarrollo tienden a estar en áreas urbanas y atienden principalmente a las personas que rodean las mismas. Por el contrario, las instalaciones de atención médica del área rural o periurbana comúnmente tienen solo equipo básico y los trabajadores de la salud tienen capacitación limitada y poca capacidad para mantener el equipo y manejar los reactivos. Por lo que técnicas como la PCR, que requieren de personal capacitado y termocicladores por demás costosos, presentan esta inicial dificultad en su aplicación universal<sup>[16]</sup>. La LAMP puede ser llevada a cabo, respetando las normas de bioseguridad estándar, en casi cualquier locación que cuente con un área específicamente dispuesta para su realización y un baño termostático que usualmente es un equipo adquirido por la mayoría de los laboratorios de baja a mediana envergadura. La verdadera inversión radica en comprar los tubos de reacción con los reactivos ya liofilizados en su interior.

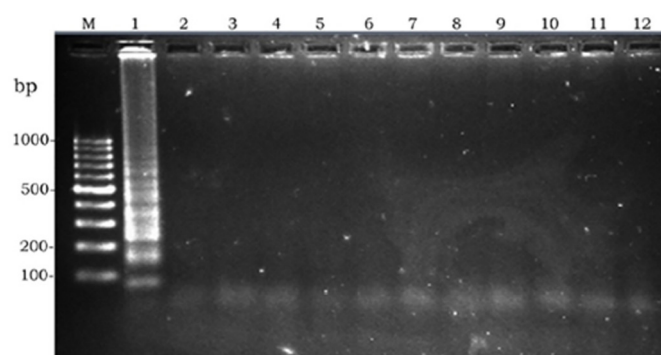
En cuanto a la especificidad (“specificity”), Xihong Zhao et al<sup>[20]</sup> se propusieron analizar la detección de la *E. coli* O 157 en muestras de origen alimenticio. En su trabajo compararon las características diagnósticas de la técnica PCR con la LAMP teniendo como marcadores específicos los genes *rfbE*, *stx1* y *stx2*. Con un N de 417 muestras obtuvieron valores de predicción tanto positivos (*positive predicted values*, PPV) como negativos (*negative predicted values*, NPV) del 100% para el primer gen y 100% de especificidad para todos ellos. También utilizaron 34 aislados Gram negativos (27) y Gram positivos (7) para evaluar la especificidad de ambas técnicas. Sus resultados mostraron que,

de 154 muestras, la LAMP obtuvo una especificidad del 100% (154) para muestras positivas de *E. coli* portadoras del gen O157 mientras que la PCR sólo detectó 146 (Tabla 1). Reza Ranjbar et al<sup>[21]</sup>, encontraron resultados similares (Figura 5). Por otro lado, Yukiko Hara-Kudo et al<sup>[22]</sup>, en sus estudios evaluaron mediante

LAMP 24 cepas de *E. coli* productoras de verotoxina (VT1 y VT2) y todas mostraron resultados positivos, 6 cepas no productoras de verotoxina fueron negativas y, para reconfirmar, evaluaron 46 especies adicionales no productoras que tampoco fueron detectadas (Tabla 2).

**TABLA 1.** CEPAS ATCC ENSAYADAS MEDIANTE LAMP (EXTRAÍDO DE ZHAO X. ET AL. 2010).

Cepas de referencia	N° de cepas	Ensayo LAMP		
		rfbE	stx1	stx2
<b>Organismos Gram-negativo</b>				
<i>Escherichia coli</i> O157: H7 WF01201 ATCC43889, NCTC12900	3	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> O157: H7 WF07803, WF06544, WF05395	3	+	+	-
<i>Escherichia coli</i> O157: H7 WF04402, WF05311, WF06837	3	+	-	+
<i>Escherichia coli</i> O157: H7 WF04587, WF08385, WF06349	3	+	-	-
<i>Escherichia coli</i> O26: H11 WF054489	1	-	+	+
<i>Escherichia coli</i> O127: H6 WF073522	1	-	+	-
<i>Escherichia coli</i> O148: H28 WF063224	1	-	-	+
<i>Escherichia coli</i> C600 ATCC 25922, ATCC8739, C600, DH5a	4	-	-	-
<i>Psuedomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	1	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	1	-	-	-
<i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 13312	1	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	1	-	-	-
<i>Vibrio cholerae</i> SK10	1	-	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802	1	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 23355	1	-	-	-
<i>Acinetobacter baumannii</i> GH31	1	-	-	-
<b>Organismos Gram-positivo</b>	1	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 29887	1	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> GH152	1	-	-	-
<i>Streptococcus pyogenes</i> GH126	1	-	-	-
<i>Streptococcus mitis</i> GH185	1	-	-	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i> GH165	1	-	-	-
<i>Streptococcus hemolyticus</i> GH177	1	-	-	-
Total	34	-	-	-



**FIGURA 5.** TINCIÓN CON BROMURO DE ETIDIO PARA ESTUDIAR LA ESPECIFICIDAD DE LA LAMP CONTRA CEPAS ATCC GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS. REFERENCIA IZQ. A DER: M, MOLECULAR WEIGHT. 1, *ESCHERICHIA COLI* O157:H7. 2, *SHIGELLA DYSENTERIAE*. 3, *SHIGELLA FLEXNERI*. 4, *SHIGELLA SONNEI*. 5, *SHIGELLA BOYDII*. 6, *SALMONELLA TYPHI*. 7, *SALMONELLA ENTERITIDIS*. 8, *SALMONELLA INFANTIS*. 9, *SALMONELLA MURIUM*. 10, *VIBRIO CHOLERA*. 11, *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*. 12, CONTROL NEGATIVO. (EXTRAÍDO DE RANJBAR, R., ET AL. 2016).

**TABLA 2.** ESPECIFICIDAD DE LA TÉCNICA LAMP EN DISTINTAS MATRICES DE MUESTRA (EXTRAÍDO DE HARA-KUDO, Y. 2007).

Sensibilidad y especificidad de <i>E. coli</i> O157					
Método	Sensibilidad			Especificidad	
	Carne picada	Brote de alfalfa		Carne picada	Brote de alfalfa
	(Bajo nivel) <sup>a</sup>	Alto nivel <sup>a</sup>	Bajo nivel		
LAMP assay	1.000 (60/60) <sup>b</sup>	1.000 (60/60)	1.000 (60/60)	0.983 (59/60) <sup>c</sup>	1.000 (60/60)
IMS-plating					
CT-SMAC	1.000 (60/60)	1.000 (60/60)	1.000 (60/60)	0.983 (59/60)	0.950 (57/60)
CHROMAgarO157TAM	1.000 (60/60)	1.000 (60/60)	1.000 (60/60)	1.000 (60/60)	1.000 (60/60)
Subtotal	1.000 (120/120)	1.000 (120/120)	1.000 (120/120)	0.992 (119/120)	0.975 (117/120)
Direct plating					
CT-SMAC	1.000 (60/60)	0.983 (59/60)	1.000 (60/60)	1.000 (60/60)	1.000 (60/60)
CHROMAgarO157TAM	1.000 (60/60)	1.000 (60/60)	0.917 (55/60)	1.000 (60/60)	1.000 (60/60)
Subtotal	1.000 (120/120)	0.992 (119/120)	0.958 (115/120)	1.000 (120/120)	1.000 (120/120)

<sup>a</sup> Bajo nivel: 11.7 UFC/25g, Alto nivel: 46.8 UFC/25g.

<sup>b</sup> N°. de muestras positivas/ inoculadas con *E. coli* O157.

<sup>c</sup> N°. de muestras negativas / sin inocular con *E. coli* O157.

En cuanto a los estudios de sensibilidad (“*sensibility*”), cabe mencionar que se detectó material genético en diluciones de ADN blanco en el orden de los picogramos (pg). Esto cobra especial importancia ya que normalmente los inóculos en los alimentos contaminados suelen ser ínfimos y escapan al alcance de ciertas técnicas de detección. En este sentido, los ensayos que fueron positivos para la LAMP, no lo fueron para la PCR<sup>[17]</sup>. En la **Figura 6** se muestran los resultados de Xihong Zhao et al<sup>[20]</sup>, quienes obtuvieron su límite de detección en el orden de los femtogramos (fg), equivalente a la milbillonésima parte de un gramo (1 fg = 10<sup>-15</sup> g). Cabe recordar la ínfima dosis infectiva del patógeno analizado que se encuentra en el orden de 10-100 bacterias por gramo.

Como se observó en el apartado anterior, el punto final de la técnica LAMP puede detectarse a ojo desnudo (turbidez) o usando colorantes (SYBR Green), indicadores de pH o la exposición a luz UV debido a la gran cantidad de amplicón generado. En cambio, para detectar los productos de PCR es necesario un termociclador que analice la fluorescencia emitida (qPCR).

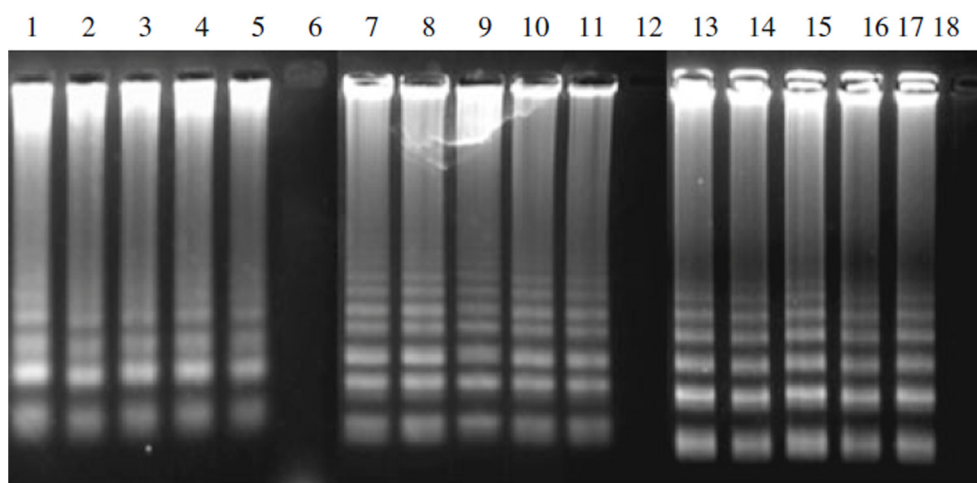
Los reactivos se comercializan de manera liofilizada en un tubo de reacción, lo cual agiliza los pasos en su utilización. En contraste, la PCR requiere la realización del mix, adicionando cada reactivo a un tubo de microcentrífuga y luego rellenar los pocillos de reacción, seguido de la adición de las muestras que finalmente serán introducidas al termociclador. Aquellos que realizan dicha tarea suelen ser operarios altamente capacitados, pero a pesar de esto, la probabilidad de cometer un error es alta debido a los volúmenes minúsculos que se manipulan.

Está reportado también que ciertos inhibidores pueden alterar su sensibilidad (etanol), lo cual debe ser tenido en cuenta durante su aplicación<sup>[21]</sup>. La RT-PCR posee ratios menores de contaminación,

pero el alcance de los LRS a este tipo de tecnologías es muy limitado<sup>[28]</sup>. Lo anterior pone de manifiesto que la LAMP es fácil de usar ya que no requiere de personal altamente capacitado para su implementación ni para la interpretación de resultados, lo que la convierte en una técnica amigable para el usuario (“*user-friendly*”), siendo consistentemente resaltado por diversas fuentes<sup>[16-26,28,32,33-35]</sup>.

Por robusto y rápido (“*robust and rapid*”) se advierte que una técnica debe ser capaz de soportar o superar condiciones adversas y ofrecer resultados en menos de 30 minutos. Reza Ranjbar et al<sup>[21]</sup> destacan que pudieron identificar la cepa STEC en menos de 30 minutos utilizando *loop primers* mediante LAMP, mientras que la PCR tardó 120 minutos. Xihong Zhao et al<sup>[20]</sup> también remarcen la utilidad de los *loops primers* en la obtención de resultados en 30 minutos, sin embargo, dejan constancia que sin el uso de éstos, la reacción se extendió a los 90 minutos y, nuevamente, 120 minutos para la PCR. Hadi Ravan et al<sup>[24]</sup>, al igual que Yukiko Hara-Kudo et al<sup>[22]</sup>, someten a ambas técnicas a la misma cantidad de tiempo pero retoman la capacidad de la LAMP de ser empleada en trabajos de campo por su bajo costo, así como también en LRS. En 2018, Y. P. Wong et al<sup>[19]</sup> realizaron una de las más recientes revisiones de artículos donde se aplica la LAMP y sus variantes con más de 50 autores citados y definen claramente a ésta como una técnica robusta y adaptable.

Cuando se habla de una técnica “*equipment-free*” se refiere, por ejemplo, a aquellas en las que se utilizan tiras reactivas (como es el caso de la inmunocromatografía), donde no se requiere de ningún tipo de equipamiento para su implementación. Son baratas, se pueden conservar a temperatura ambiente, y su pequeño tamaño las hace fáciles de manipular y utilizar. A pesar de estos atributos positivos, no alcanzan parámetros de especificidad y sensibilidad razonables comparadas con las técnicas de biología molecular (ensayos confirmatorios)<sup>[21-23]</sup>. Siguiendo el criterio



**FIGURA 6.** ESTUDIO DE SENSIBILIDAD DE LA LAMP EN LA DETECCIÓN DE *E. COLI* STRAINWF21201: LINEA 1-6, 7-12, 13-18 CORRESPONDEN A ENSAYO DE LAMP SOBRE RFBE,STX1 AND STX2, RESPECTIVAMENTE. LINEA 1, 7, 13: 1 NG TEMPLADO DE DNA; LINEA 2,8, 14: 100 PG TEMPLADO DE DNA; LINEA 3, 9, 15: 10 PG DNA; LINEA 4, 10,16: 1 PG DNA; LINEA 5, 11, 17: 100 FG DNA; LINEA 6, 12, 18: 10 FG DNA. (EXTRAÍDO DE ZHAO X., ET AL. 2010).



propuesto, tanto la LAMP como la PCR requieren de algún tipo de instrumental, no obstante, se ha demostrado que la LAMP ha de requerir de menor y más barata aparatología que la necesaria para implementar una PCR o cualquiera de sus variantes<sup>[17-20,25,27]</sup>. Finalmente, la notificación de caso debe ser inmediata. La LAMP permite la entrega de resultados de una manera rápida y sencilla a aquellos que lo necesitan (*"deliverable to those who need them"*) con su mera identificación visual, lo que acorta tiempos y cumple con lo establecido en los requisitos ASSURED.

Sin embargo, la LAMP requiere validación y estandarización, pero su potencial aplicabilidad y reproducibilidad debería alentar a la comunidad científica a realizar posteriores estudios comparativos y estandarización de métodos de detección.

## CONCLUSIÓN

Dentro del marco de vigilancia y prevención del SUH, la implementación de la LAMP aportaría datos muy interesantes al mundo de la investigación epidemiológica, transformando los hallazgos de investigación en acciones que persigan una mejora en la prevención primaria de la población.

La notificación en tiempos récord de la presencia de la *E. coli* O157: H7 mediante la amplificación isotérmica específica del gen *rfbE* permitiría una rápida detección cualitativa de la bacteria en muestras de alimentos. Así, un resultado positivo indicaría el consecuente rechazo de un lote, así como también el diagnóstico clínico precoz con una especificidad y sensibilidad sin precedentes, además de cumplir de manera razonable lo establecido en los criterios ASSURED adoptados por la OMS dentro del marco de técnicas *point-of-care*.

Tanto en el ámbito de la industria alimenticia (control de calidad), como en estudios epidemiológicos, hospitales locales y laboratorios clínicos de mediana a baja envergadura, la LAMP ofrece la detección rápida, oportuna y confiable de los diversos patógenos bacterianos, así como virales, fúngicos y parasitológicos. En cualquier etapa de la cadena de control, la aplicación de una técnica molecular con resultados rápidos y a costos muy inferiores que los aparatos que se encuentran en centros de referencia constituyen un paso importante para la vigilancia, monitoreo y prevención del SUH.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1- Rivas, M., Miliwebsky, E., Chinen, I., Deza, N. A. T. A. L. I. A., & Leotta, G. A.. Epidemiología del síndrome urémico hemolítico en Argentina. Diagnóstico del agente etiológico, reservorios y vías de transmisión. 2006.
- 2- Mercado, Elsa C. Síndrome Urémico Hemolítico: ¿por qué Argentina? Revista Argentina de Microbiología, vol. 39, núm. 4, diciembre, 2007, pp. 191-192. Asociación Argentina de Microbiología. Buenos Aires, Argentina.
- 3- Rivas, M., Miliwebsky, E., Chinen, I., Roldán, C. D., Balvi, L., García, B. & Griffin, P. M.. Characterization and epidemiologic subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic uremic syndrome and diarrhea cases in Argentina. Foodborne Pathogens & Disease. 2006; 3(1), 88-96..

- 4- Yu, G., Niu, J., Shen, M., Shao, H., & Chen, L. Detection of *Escherichia coli* O157 using equal-length double-stranded fluorescence probe in a real-time polymerase chain reaction assay. Clinica chimica acta. 2006; 366(1-2), 281-286.
- 5- De Vigilancia, E. D. B. I. (2014). SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO (SUH) EN ARGENTINA, 2010-2013. Extracto del Boletín Integrado de Vigilancia N° 222 - SE 30 Agosto 2014.
- 6- SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO (SUH) EN ARGENTINA, 2010-2013 Extracto del Boletín Integrado de Vigilancia N° 222 - SE 30 Agosto 2014.
- 7- Parida, M., Horioka, K., Ishida, H., Dash, P. K., Saxena, P., Jana, A. M., & Morita, K. Rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes by a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. Journal of clinical microbiology. 2005; 43(6), 2895-2903.
- 8- REVISADA, Segunda Edición. Módulo de Principios de Epidemiología para el Control de Enfermedades (MOPECE) 2011.
- 9- Hernández-Aguado, I., Lumbreras, B., & Jarrín, I. La epidemiología en la salud pública del futuro. Revista española de salud pública. 2006; 80(5), 469-474.
- 10- Boletín Integrado de Vigilancia, Dirección Nacional de Epidemiología y Análisis de la Situación de la Salud N° 410 – SE 22 2018, Mayo de 2018. Presidencia de la Nación.
- 11- Roldán, M. L., Chinen, I., Otero, J. L., Miliwebsky, E. S., Alfaro, N., Burns, P., & Rivas, M. Aislamiento, caracterización y subtipificación de cepas de *Escherichia coli* O157: H7 a partir de productos cárnicos y leche. Revista argentina de microbiología. 2007; 39(2), 113-119.
- 12- Spizzirri, F. D., Rahman, R. C., Bibiloni, N., Ruscasso, J. D., & Amoreo, O. R. Childhood hemolytic uremic syndrome in Argentina: long-term follow-up and prognostic features. Pediatric Nephrology. 1997; 11(2), 156-160.
- 13- Kosack, C. S., Page, A. L., & Klatser, P. R. A guide to aid the selection of diagnostic tests. Bulletin of the World Health Organization. 2017; 95(9), 639.
- 14- Cavero, T., & Alonso, M. Síndrome hemolítico urémico: estado actual. Medicina Clínica. 2018; 151(8), 329-335.
- 15- LaBarre, P., Boyle, D., Hawkins, K., & Weigl, B. Instrument-free nucleic acid amplification assays for global health settings. In Sensing Technologies for Global Health, Military Medicine, Disaster Response, and Environmental Monitoring; and Biometric Technology for Human Identification VIII (Vol. 8029, p. 802902). International Society for Optics and Photonics. 2011.
- 16- Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología médica. [Internet]. Sección Alimentos, Ficha técnica número 8 Enfermedades transmitidas por alimentos. Disponible en [http://www.anmat.gov.ar/alimentos/ficha\\_enfermedades\\_alimentos\\_SUH.pdf](http://www.anmat.gov.ar/alimentos/ficha_enfermedades_alimentos_SUH.pdf).
- 17- USDA/FSIS. Detection, Isolation and Identification of *Escherichia coli* O157:H7/NM from Meat Products. Revisión MLG 5.05, 10/01/2010.
- 18- Jure, M. A., Condorí, S., Leotta, G. A., Chinen, I., Miliwebsky, E., Allori, C. & De Castillo, M. C. Detección, aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga

- a partir de carne molida fresca proveniente de carnicerías de Concepción, provincia de Tucumán. 2010.
- 19- Wong, Y. P., Othman, S., Lau, Y. L., Radu, S., & Chee, H. Y. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. *Journal of applied microbiology*. 2018; 124(3), 626-643.
  - 20- Zhao, X., Li, Y., Wang, L., You, L., Xu, Z., Li, L., ... & Yang, L. Development and application of a loop-mediated isothermal amplification method on rapid detection *Escherichia coli* O157 strains from food samples. *Molecular biology reports*. 2010; 37(5), 2183-2188.
  - 21- Ranjbar, R., Erfanmanesh, M., Afshar, D., Mohammadi, M., Ghaderi, O., & Haghazari, A. Visual Detection of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 Using Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Electronic physician*. 2016; 8(6), 2576.
  - 22- Hara-Kudo, Y., Nemoto, J., Ohtsuka, K., Segawa, Y., Takatori, K., Kojima, T., & Ikeda, M. Sensitive and rapid detection of Vero toxin-producing *Escherichia coli* using loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Medical Microbiology*. 2007; 56(3), 398-406.
  - 23- Ferrer, E. Técnicas moleculares para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. SABER. Revista Multidisciplinaria del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente. 2015; 27(3), 359-371.
  - 24- Ravan, H., Amandadi, M., & Sanadgol, N. A highly specific and sensitive loop-mediated isothermal amplification method for the detection of *Escherichia coli* O157: H7. *Microbial pathogenesis*. 2016; 91, 161-165.
  - 25- Bertrand, R., & Roig, B. Evaluation of enrichment-free PCR-based detection on the *rfbE* gene of *Escherichia coli* O157—application to municipal wastewater. *Water research*. 2007; 41(6), 1280-1286.
  - 26- Lee, N., Baker, J., Andrews, K.T., et al., "Effect of sequence variation in *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 on binding of specific monoclonal antibodies: Implications for rapid diagnostic tests for malaria," *Journal of Clinical Microbiology*. 2006; 44(8), 2773-2778.
  - 27- Lee, N., Baker, J., Bell, D., et al., "Assessing the genetic diversity of the aldolase genes of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* and its potential effect on performance of aldolase-detecting rapid diagnostic tests," *Journal of Clinical Microbiology*. 2006; 44(12), 4547-4549.
  - 28- Murray, C.K., Gasser Jr., R.A., Magill, A.J., et al., "Update on rapid diagnostic testing for malaria," *Clinical Microbiology Reviews*. 2008; 21(1), 97-110.
  - 29- Arroyo, M. I., Morales, G. P., Sosa, P. A., Carmona-Fonseca, J., & Maestre, A. Amplificación isotérmica de ácidos nucleicos tipo LAMP para la detección de *Plasmodium*: nueva técnica diagnóstica:[revisión]. *Med. UIS*. 2008; 21(3), 158-175
  - 30- Dantas, V. V., Cardoso, G. V. F., Araújo, W. S. C., de Oliveira, A. C. D. S., da Silva, A. S., da Silva, J. B., ... & Lourenço, L. D. F. H. Aplicación de un ensayo de Reacción en Cadena de la Polimerasa multiplex (mPCR) para detectar fraude por substitución de cortes de carne bovina por carne de búfalo en el norte del Brasil. *CyTA: Journal of food*. 2019; 17(1), 790-795.
  - 31- Owieja, K. E., Sherrill-Mix, S., Liu, C., Song, J., Bau, H., & Bushman, F. D. A reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay optimized to detect multiple HIV subtypes. *PloS one*. 2015; 10(2), e0117852. doi:10.1371/journal.pone.0117852
  - 32- Marzocca, M. A., Marucci, P. L., Sica, M. G., & Álvarez, E. E. Detección de *Escherichia coli* O157: H7 en carne picada fresca y hamburguesas congeladas. *Revista argentina de microbiología*, 2006; 38(1), 38-40.
  - 33- Chiluisa-Utreras, V. P., Cabrera-Rodríguez, M. A., & Valladares-Torres, P. K. Detección de *Listeria* spp. y *Listeria monocytogenes* en muestras de leche cruda y quesos artesanales respectivamente, mediante PCR en Tiempo Real. *Respuestas*. 2017; 22(2), 67-75.
  - 34- Malucelli, G et al. Extracción de biomacromoléculas de tejidos vegetales para su aplicación en el campo de los retardadores del fuego (Doctoral dissertation, PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO). 2016.
  - 35- Horisaka, T., Fujita, K., Iwata, T., Nakada, A., Okatani, A. T., Horikita, T., & Hayashidani, H. Sensitive and specific detection of *Yersinia pseudotuberculosis* by loop-mediated isothermal amplification. *Journal of clinical microbiology*, 2004; 42(11), 5349-5352.