



Diagnóstico Molecular de la Enfermedad de Chagas mediante Amplificación Isotérmica mediada por asas (LAMP)

QUISPE, SERGIO¹

TORRICO, BERNARDO²

GUEVARA, PALMIRA³

FECHA DE RECEPCIÓN: 16 DE ABRIL DE 2014

FECHA DE ACEPTACIÓN 30 DE JULIO DE 2014

Resumen

El seguimiento de las infecciones en triatomíneos es fundamental en la epidemiología de la enfermedad de Chagas. Demostramos la factibilidad de incorporar un nuevo diagnóstico molecular y detectar mediante LAMP, infecciones por *T. cruzi* y *T. rangeli* en muestras de contenido intestinal y hemolinfa preservadas en papel de filtro. La Amplificación Isotérmica mediada por asas (LAMP) es un nuevo método de amplificación de ácidos nucleicos que amplifica DNA con una alta especificidad, eficiencia y rapidez bajo condiciones isotérmicas, utilizando cuatro cebadores y DNA polimerasa con actividad de cadena desplazante. Se ha aplicado un método que acelera la reacción LAMP mediante la utilización de cebadores aceleradores. El método LAMP utilizado en este trabajo produce una reac-

Abstract

The monitoring of triatomino infections is a key step in the epidemiology of Chagas disease. We demonstrate the feasibility of incorporating new molecular identification tools, we obtained positive LAMP identification of infections by *T. cruzi* and *T. rangeli* in haemolymph and digestive track samples preserved in filter paper. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is a novel nucleic acid amplification method that amplifies DNA with high specificity, efficiency and rapidity under isothermal conditions using a set of four specially designed primers and a DNA polymerase with strand displacement activity. We have applied a method that accelerates the LAMP reaction by using additional primers, termed loop primers. The LAMP method presented

1 Encargado Unidad de Identificación Genética, Carrera de Bioquímica, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, UMSA.

2 Director Carrera de Bioquímica. Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, UMSA.

3 Profesor Investigador Instituto de Biología Experimental, Universidad Central de Venezuela. Caracas Venezuela

ción en menos tiempo que el método original, esta reacción fue aplicada sobre muestras de *Trypanosoma rangely* y *Trypanosoma cruzi*. Regularmente el tiempo de detección es menor a una hora, este nuevo método nos facilita el análisis genético, incluyendo el diagnóstico clínico genético en el laboratorio.

here uses loop primers to achieve reaction times of less than half that of the original LAMP method, this reaction was applied to samples from *Trypanosoma rangely* and *Trypanosoma cruzi*. Since the total time of analysis including detection is less than 1 h, this new method should facilitate genetic analysis, including genetic diagnosis in the clinical laboratory

PALABRAS CLAVE

LAMP, Isotérmica, DNA, Trypanosoma.

KEY WORDS

LAMP, isotherm, DNA

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes en Latinoamérica y el Caribe, causadas por agentes patógenos como *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Mycobacterias*, repercuten en la calidad de vida de las poblaciones. Las metodologías tradicionales como el cultivo, serología y la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) vienen siendo utilizadas en muchos países para el diagnóstico y detección de diversas enfermedades, aunque son sensibles y específicos consumen bastante tiempo y costos. Razones fundamentales para la búsqueda de nuevas herramientas diagnósticas de amplificación de ácidos nucleicos; el año 2000 los investigadores *Thekiso* e *Inoue* en Japón desarrollaron la técnica llamada LAMP (Amplificación Isotérmica mediada por asas). Esta nueva técnica tiene las características de ser simple, rápida, específica, sensible y de bajo costo; todo ello la faculta para ser una excelente alternativa como una prueba que pueda desarrollarse en regiones endémicas y con requerimientos básicos de infraestructura, consideramos en un futuro próximo la estandarización de esta técnica en los laboratorios de países latinoamericanos.

La incorporación de la DNA polimerasa de *Basillus stearothermophilus* (polimerasa *Bst*) con actividad desplazante, conjuntamente con un diseño particular de varios pares de iniciadores sobre la región de DNA blanco en la LAMP, son la clave de su especificidad, amplificación autogenerada y alto rendimiento. La polimerasa *Bst* ha resultado ser estable en diferentes condiciones de temperaturas e insensible a inhibidores frecuentemente presentes en muestras biológicas, mostrando un buen desempeño de las pruebas LAMP en muestras de diferente origen con un mínimo de procesamiento (*Thekiso* e *Inoue*, 2011).

En el curso de una década, el análisis de estas ventajas en los procedimientos metodológicos ofrecidos por la LAMP, ha renovado el interés en el desarrollo de pruebas diagnósticas basadas en DNA como una alternativa real en el diagnóstico clínico.

En la biología de la enfermedad de Chagas, la adaptación de los vectores triatominos a los ambientes humanos, junto con la circulación de *Trypanosoma cruzi* entre estos y los animales salvajes y domésticos es el factor de mayor importancia para el establecimiento de la infección en humanos (1). Es necesaria la evaluación y el seguimiento de los triatominos en cuanto a su infección y a los cambios que conduzcan a su adaptación a ambientes humanos. (Quispe, 2007)

METODOLOGÍA

Aislamiento de DNA de muestras clínicas

Se ha embebido en papel filtro FTA una gota de muestra, se dejó secar al menos por tres horas a temperatura ambiente. En un tubo eppendorf se introdujo un pequeño fragmento cortado de papel filtro con muestra. Se añadió 150 uL de reactivo de purificación, incubado a temperatura ambiente por 15 minutos. Se centrifugó brevemente y se descartó el sobrenadante con cuidado. Se repitió los últimos tres pasos nuevamente. Para lavar el sedimento se añadió 150 uL de Tampon TE. Se centrifugó y descartó el sobrenadante con cuidado. Se dejó secar a 50°C por 1 hora.

LAMP para diagnóstico de *Trypanosoma rangeli*

Se ha amplificado mediante la reacción isotérmica LAMP (Thekiso, 2011), para la detección específica de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli*, basado en los genes de RNA ribosomal 18S y los pequeños RNA nucleares.

Muestras. Las muestras correspondieron a DNA de *Trypanosoma rangeli* aislado de perro y DNA de *Trypanosoma rangeli* aislado de Triatomino.

Foto 1

Fotografía del vector infestado. Parásitos observados de *Trypanosoma rangeli*



Master Mix. Se preparó una solución Master Mix con un volumen final de 25 ul por cada reacción que contenía lo siguiente: Tampón 2X, Primer Mix, enzima BST I, agua bidestilada y DNA templado aislado por método de columna.

Tabla 1
Master Mix de los componentes de la reacción LAMP.

Vol. final 25ul	Concentración		Volumen de Reacción (x1)	N° de reacciones (x11)
	CONC.1	CONC. FINAL	uL/Rxn	uL
Reactivo				
Tampón	2X	1X	12,5	137,5
Primer Mix	10X	1X	2,5	27,5
Bst I	8 U/ul	0,32 U/ul	1	11
Agua MQ	-	-	5,5	60,5
AHN	20 mM	120 uM	1,5	16,5
templado	-	-	2	-
Volumen final			25	253

LAMP. Se trabajo con 23 ul de master mix y 2 ul de DNA de la muestra y agua bidestilada como controles del cuarto gris y cuarto blanco, a todos se les coloco 10 ul de parafina para evitar aerosoles de amplicones. En vez de incubarlo en baño de María, como se describe en la técnica original, se amplificó en un termociclador MJ Research a temperatura estable de 63°C por 60 minutos y para terminar la reacción se aplico un shock térmico a 80°C por 5 minutos.

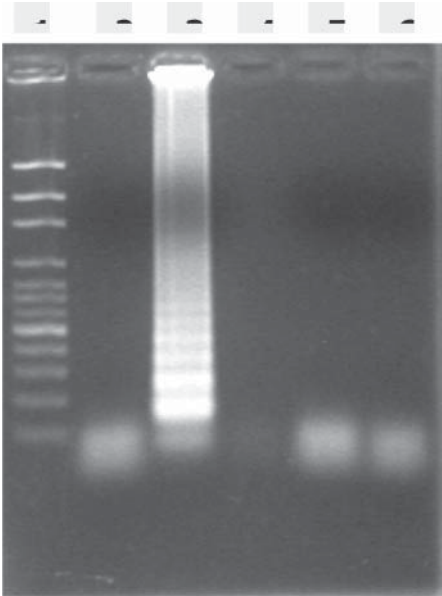
Revelado. Para identificar los productos de LAMP se utilizo la metodología de electroforesis en gel de agarosa al 2% y se reveló con Bromuro de Etidio, se visualizo en luz UV a través de la cámara de Bio-Rad.

El DNA producto de la reacción LAMP fue visualizado mediante electroforesis en geles de agarosa como una escalera que degenera en un barrido, la cual comienza con un fragmento base generalmente mayor a cien pares de bases, cuyo tamaño lo determinan los iniciadores internos FIP/BIP. El patrón de bandas de la escalera llega a alcanzar fragmentos de más de 10 Kb, mostrándose como un barrido o "smear" que alcanza al bolsillo del gel (Notomi, 2000).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se observa en la figura uno, en el carril dos (*T. rangeli* aislado de perro) no hubo amplificación, en el carril tres (*T. rangeli* aislado de Triatomino) si existe amplificación del producto, en los carriles 4, 5 y 6 que contenían agua como control negativo, no se observo amplificación.

Foto 2

Corrida electroforética de *Trypanosoma rangeli* por metodología LAMP

1. Escalera de 100pb
2. Control+ *T. rangeli* Perro (Hueped)
3. Control + *T. rangeli* TRIATOMINO
4. Control - Agua Blanco
5. Control - Agua Gris
6. Control - Agua Blanco

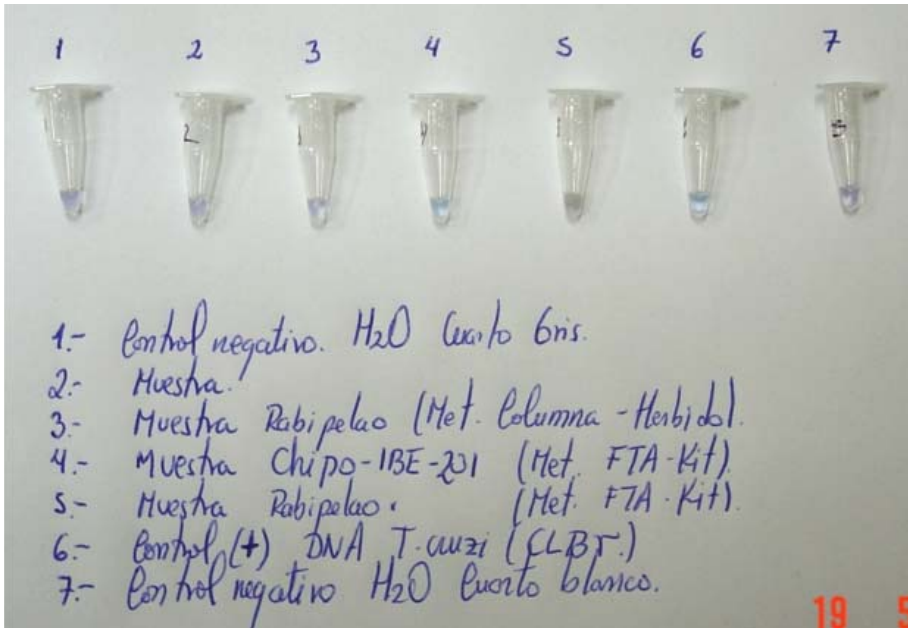
En la muestra de DNA de *T. rangeli* aislado de perro, no se observó producto de amplificación, considerando que las posibles causas sean que el DNA de *T. rangeli* aislado de perro este degradado, ya que se desconocen las condiciones de conservación de la muestra, por lo que sería recomendable realizar una corrida en geles de agarosa al 0.8% para evaluar el estado del mismo. Se determino que el Triatomino se encuentra infectado con *Trypanosoma rangeli*, por los resultados observados en la reacción LAMP, no existe reacción cruzada y/o contaminación ya que en los controles negativos utilizados no amplificaron ningún producto inespecífico.

Detección del producto en la amplificación LAMP

En la reacción de amplificación LAMP, además de la síntesis abundante del DNA blanco (>10 µg/25µL en una hora), se producen en una correlación directa, altas concentraciones del ión pirofosfato. Al reaccionar con los cationes divalentes de magnesio presentes en la mezcla de reacción, se forma un precipitado de la sal de pirofosfato de magnesio detectado a simple vista en el tubo de la reacción (Mori, 2001) (Figura 4). La formación del precipitado es directamente proporcional a la síntesis de DNA durante la amplificación y permite el seguimiento en tiempo real de la reacción LAMP a través de un turbidómetro. La turbidez durante la síntesis de DNA es un fenómeno exclusivo de la reacción LAMP atribuido a su alto rendimiento, esta característica brinda una alternativa para la detección a las PAAN en tiempo real, la cual utiliza equipos de menor costo que el Real Time-PCR (RT-PCR) (Nagamine y col., 2002).

Foto 3

Detección visual de la Formación de precipitado para *Trypanosoma cruzi* por metodología LAMP



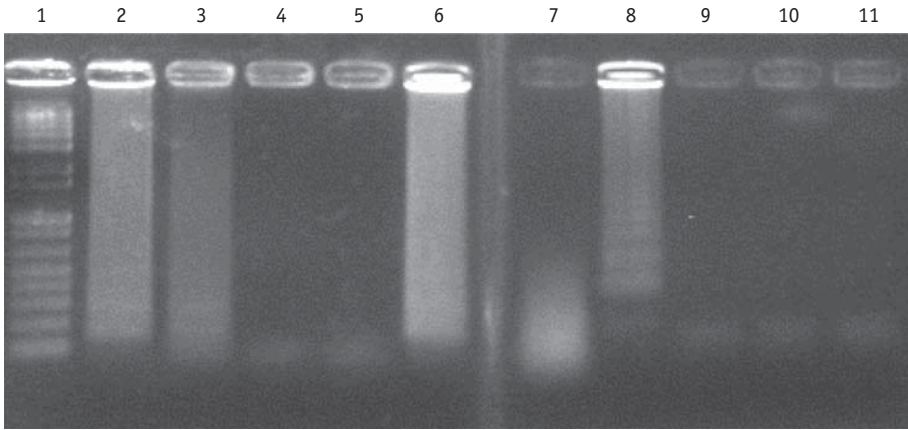
Revelado de la amplificación LAMP mediante electroforesis en muestras diluidas para *Trypanosoma cruzi*

En esta reacción se ha trabajado con Azul de Hidroxinalftol a una concentración final de 120 μM . Asimismo, en los carriles 2, 3 se observa amplificación positiva. La muestra del triatomino amplifica, la muestra de sangre de rabipelao no amplifica, es probable que exista inhibición por la hemoglobina de la sangre adherida en el papel FTA. El control Negativo del protocolo extracción TE, amplificó por lo que se debe repetir nuevamente esta reacción a nuevas condiciones de extracción. (ver Foto 4)

Los resultados de la coloración del Azul de Hidroxinalftol a una concentración final de 120 μM , no muestran ser muy diferenciables por lo que se recomienda trabajar a concentraciones mayores.

Foto 4

Corrida electroforética al 2.0% de agarosa para *T. cruzi*.



- | | |
|--|--|
| 1.Ladder de 1Kb | 7.Muestra de sangre de Rabipelao (fijado en FTA) |
| 2.Muestra de DNA de <i>T. cruzi</i> de 500 parasitos/ml | 8.Control negativo de Extracción TE |
| 3.Muestra de DNA de <i>T. cruzi</i> de 5 parasitos/ml | 9.Control Positivo. DNA de <i>T. rangeli</i> |
| 4.Muestra de DNA de <i>T. cruzi</i> de 0.05 parasitos/ml | 10.Control Positivo. DNA de <i>T. cruzi</i> |
| 5.Control negativo de Agua de Extracción | 11.Control negativo. Agua de Cuarto Blanco |
| 6.Muestra de Chipo 201 IBE (fijado en FTA) | |

CONCLUSIONES

Mediante el desarrollo de esta novedosa técnica realizada, se ha logrado aplicar el diagnostico molecular de enfermedades endémicas causadas por varios patógenos, nosotros realizamos la técnica LAMP para detectar *Trypanosma rangeli* y *Trypanosma cruzi* en varias muestras biológicas.

La técnica LAMP, resultado ser una nueva herramienta aplicable al fácil diagnostico de varias enfermedades en Latinoamérica, muestran una alta especificidad y sensibilidad porque se utilizaron cuatro cebadores y dos aceleradores que reconocen el sitio blanco específico del DNA.

La simplicidad, rapidez y bajos costos del método que utilizamos son ventajas fácilmente reconocibles por los investigadores por lo que se debería seguir estandarizando para todos los microorganismos con el fin de llevar el diagnóstico a las poblaciones más susceptibles y alejadas.

La estandarización de todo método es un hecho sin precedentes y fundamental para que cada país pueda implementarlo, el curso ha sido una magnífica oportunidad para los países Latinoamericanos para poder acercarnos a las nuevas herramientas diagnosticas que se han desarrollado. Por todo esto enaltecemos y felicitamos a todo el grupo organizador y la excelente ponencia de los Profesores Invitados, asimismo a los diferentes invitados especiales de los pueblos de Latinoamérica, Se han creado nuevos lazos de integración de conocimientos y el enfoque hacia la lucha por la salud pública.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo experimental fue Financiado por:
United Nations University. BIOLAC
Biotechnology Programme for Latin America and the Caribbean
Programa de Biotecnología para América Latina y el Caribe

REFERENCIAS

- Aryan E. A novel and more sensitive loop-mediated isothermal amplification assay targeting IS6110 for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex. (Revisión electrónica) *Microbiol Res* 2006; (2009), doi:10.1016/j.micres.2009.05.001. singapore.
- Thekisoe, O. y Noboru, I. Molecular diagnosis of protozoan infections by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) a diagnosis manual (2011). 1° edición, Universidad de Obihiro de agricultura y veterinaria. Japon.
- Thekisoe, O. Bazie, R, Coronel, A., Sugimoto, Ch. Kawazu, Sh. (2009). Stability of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) reagents and its amplification efficiency on crude trypanosome DNA templates. *Revista veterinaria de parasitología*. Japon.
- Han, E.T., Watanabe, R., Sattabongkot, J., Khuntirat, B., Sirichaisinthop, J., Iriko, H., Jin, L., Takeo, S., Tsuboi, T. (2007) Detection of four *Plasmodium* species by genus- and species-specific loop-mediated isothermal amplification for clinical diagnosis. *J Clin Microbiol*. 45:2521-2528.
- Quispe, S., Guevara, P., Abreu M., Bladés, N. Mejoramiento del procesamiento de muestras para la detección molecular de infecciones por *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli* en vectores. (2007). *Revista Ciencias de la Salud*. Universidad de Carabobo. Vol. 11, N° 1.
- Iseki, H., Alhassan, A., Ohta N, Thekisoe, O.M., Yokoyama, N., Inoue, N., Nambo-ta, A., Yasuda, J., Igarashi, I. (2007) Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification (mLAMP) method for the simultaneous detection of bovine *Babesia* parasites. *J Microbiol Methods*. 71:281-7.
- Kaneko, H., Kawana, T., Fukushima, E., Suzutani, T. (2007) Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. *J Biochem Biophys Methods*. 70:499-501.
- Kiatpathomchai, W., Jaroenram, W., Arunrut, N., Jitrapakdee, S., y Flegel, T.W. (2008) Shrimp Taura syndrome virus detection by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *J Virol Methods*. 153:214-217.
- Kiefer JR, Mao C, Hansen CJ, Basehore SL, Hogrefe HH, Braman JC, Beese LS. (1997) Crystal structure of a thermostable *Bacillus* DNA polymerase I large fragment at 2.1 Å resolution. *Structure* 5:95-108.