

ARTÍCULO DE OPINIÓN

Técnica de amplificación isotérmica mediada por bucle o LAMP. Ventajas en el Diagnóstico Sanitario

Las medidas de control dependen de la correcta identificación de las enfermedades y de los agentes causales. Por lo tanto, el diagnóstico es uno de los aspectos más importantes de la prevención de problemas sanitarios. Sin la correcta identificación del agente causante de la enfermedad, las medidas de control de enfermedades pueden ser una pérdida de tiempo y recursos económicos y naturales.

El manejo de una enfermedad depende del correcto diagnóstico. A pesar de que nuevas metodologías de identificación están disponibles para ser utilizadas en laboratorio, su espectro de acción es limitado y difícilmente cubren toda la gama de microorganismos con potencial patogénico. Es por esto que la correcta identificación de un agente causal constituye un reto.

En un mundo globalizado donde el comercio de productos de origen vegetal y animal se ha incrementado a nivel mundial, y existe un constante incremento de la densidad poblacional así como frecuentes cambios climáticos asociados con el calentamiento global, es primordial monitorear la presencia de nuevas o recurrentes amenazas que puedan afectar al sector agropecuario del país. Es por tanto necesario reforzar los sistemas de vigilancia y control fito y zoonosanitario y a su vez, apoyar al desarrollo de nuevas tecnologías basadas en biotecnología, biología molecular y nanotecnología.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una metodología que en las últimas décadas ha facilitado la identificación de microorganismos de una manera

precisa y confiable [1]. Los avances en la biología molecular han permitido desarrollar varias técnicas de detección que usan diferentes variantes de PCR [2, 3] por ejemplo PCR en tiempo real, PCR cuantitativa, PCR de inmunocaptura, etc. Sin embargo para utilizar la técnica de PCR y sus variantes se requiere de un laboratorio sofisticado que disponga de equipos especializados. Según la Organización Mundial de la Salud, los criterios para un adecuado test de diagnóstico son sensibilidad, especificidad, bajo costo, simplicidad, rapidez, adaptabilidad a la temperatura y fácil disponibilidad de equipos. Los análisis de PCR basados en métodos de detección de ADN poseen cualidades de especificidad y sensibilidad pero distan de otras cualidades como bajo costo, rapidez, adaptabilidad a la temperatura y requieren de personal altamente cualificado para efectuar el proceso. La técnica de amplificación isotérmica mediada por bucle o LAMP por sus siglas en inglés, se destaca por ser una prueba de diagnóstico eficaz y fácil de realizar, a pesar de que el principio y mecanismo de acción es complejo.

La técnica LAMP, al igual que la PCR, tiene la capacidad de amplificar fragmentos específicos de ADN (secuencia diana), lo que permite la detección altamente sensible de patógenos. La reacción LAMP es isotérmica, es decir toma lugar a una sola temperatura, lo que constituye una importante ventaja por sobre la PCR convencional. LAMP utiliza una enzima polimerasa de ADN cuya propiedad es la del desplazamiento de la cadena de ADN junto con su propiedad habitual de polimerización. El nivel de sensibilidad y especificidad de la técnica LAMP es superior en contraste con las pruebas de PCR. Adicionalmente, LAMP amplifica el ADN del patógeno al punto de permitir una visualización directa de la reacción, por la liberación de pirofosfatos que causan turbidez. La amplificación por medio de LAMP también puede ser cuantitativa y depende del desplazamiento de la cadena por autociclado, realizado por la ADN polimerasa.

La efectividad de LAMP se basa en el diseño de primers o cebadores que deben ser muy específicos. A

diferencia de la PCR, LAMP requiere de entre 4 y 6 primers, los primers externos F3 y B3, que hibridan con las regiones externas de la secuencia diana, mientras que los internos FIP y BIP poseen secuencias en ambos sentidos que permiten la formación de un bucle [4]. Los primers se diseñan de manera que puedan reconocer 8 regiones diana que permiten dar especificidad al método. El uso de una enzima termoestable hace de LAMP una técnica amigable que encaja en los parámetros de ser un método completo y eficaz. Las enzimas con capacidad recomendada son *Bst* polimerasa aislada de *Bacillus stearothermophilus* y *Bsm* polimerasa aislada de *Bacillus smithii* cuya actividad enzimática es de 66°C y 63°C respectivamente. Estas enzimas tienen actividad similar a la helicasa por lo que es capaz de abrir la cadena de ADN a una temperatura óptima entre 60 y 65°C, desnaturizándose a temperaturas por encima de 70°C. Estas características hacen que sea útil en la amplificación isotérmica ya que no requieren el paso de 90°C requerido para desnaturizar el ADN como el caso de la PCR convencional.

LAMP ha llamado mucho la atención como un nuevo método de amplificación de ADN potencialmente rápido, preciso y rentable para la detección de microorganismos. LAMP se ha utilizado con éxito para detectar enfermedades virales así como agentes patógenos virales como el virus del Nilo Occidental [5], Coronavirus [6] Norovirus [7], la influenza aviar [8], la fiebre aftosa [9], la peste porcina clásica [10], RT LAMP para detección de la enfermedad de Newcastle [11] virus de la anemia del pollo [12], enfermedades bacterianas causadas por *Mycobacterium tuberculosis* [13], *Burkholderia pseudomallei* [14], *Shigella* spp., *Escherichia coli* [15], *Brucella* spp. [16], entre otros. Adicionalmente se ha desarrollado esta técnica para parásitos patógenos como *Babesia gibsoni* [17], *Plasmodium* spp. [18], *Leishmania* spp. [19]. Además, el ensayo de LAMP también se ha utilizado para la rápida determinación del sexo de los embriones antes de la implantación de la especie bovina [20] aves [21] salmón [22].

De igual manera muchos patógenos de plantas se han podido detectar a través de la técnica LAMP como es el caso de hongos como *Rhizoctonia solani* agente



Patricia Garrido
Directora de Diagnóstico Vegetal Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro (AGROCALIDAD)

Ingeniera en Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas del Ecuador- ESPE, adquirió su maestría en Entomología y Fitopatología en Oklahoma State University. Su investigación se enfocó en la genética poblacional de especies patógenas de *Pythium* en viveros forestales y en invernaderos ornamentales de Oregon y Nueva York, respectivamente, y en el análisis filogenético del complejo de especies de *Pythium irregulare*. En Estados Unidos se desempeñó como responsable del laboratorio de Fitopatógenos del suelo en la facultad de Entomología y Fitopatología de la Universidad Estatal de Oklahoma, trabajo en varios proyectos financiados por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América, trabajo en colaboración directa con el National Institute for Microbial Forensics & Food and Agricultural Biosecurity (NIMFFAB), y las Universidades de Cornell y Oregon State. Es miembro de la Asociación Americana de Fitopatología y de la red de investigadores de genética molecular de Oomicetos. Ha participado en numerosas conferencias organizadas por la Asociación Nacional de Fitopatología de Estados Unidos de América y sus divisiones, así como la de la red de investigadores de genética molecular de Oomicetos. Donde fue becada por cuatro ocasiones para presentar su trabajo en Asilomar-California, Honolulu-Hawaii, Austin- Texas, Reino Unido- Inglaterra. Ha publicado varios artículos en revistas indexadas como Phytopathology, Plant Disease, Microbiological Methods. Adicionalmente ha publicado dos artículos de extensión Agrícola en Oklahoma. Sus fortalezas profesionales incluyen: experiencia en genética de poblaciones, filogenética, desarrollo de herramientas moleculares para diagnóstico de enfermedades, manejo de laboratorio, trabajo en equipo y mentora de estudiantes de pregrado y postgrado, Manejo de Medidas Fitosanitarias, Normas ISO 17025 y 9001. Actualmente se desempeña como Directora de Diagnóstico Vegetal en AGROCALIDAD dirigiendo la red de laboratorios de Diagnóstico vegetal que abarca un total de 21 laboratorios a nivel nacional.

causal del añublo de la soya, *Macrophomina phaseolina* – pudrición carbonosa de la soya [23], bacterias como *Ralstonia solanacearum* [24]. *Pseudomonas fuscovaginae* [25], *Xylella fastidiosa* para aplicar en sistemas cuarentenarios o campo [26], *Candidatus Liberibacter solanacearum* [27], *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae* [28], subespecies bacterianas como *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* [29] Virus como virus Y de la papa [30], yellow leaf virus en caña [31], Nemátodos como *Tylenchulus semipenetrans* [32], Oomicetos como *Phytophthora ramorum* [33].

En los países en desarrollo, LAMP tiene un gran potencial de aplicación especialmente para el diagnóstico clínico, junto con la vigilancia de las enfermedades infecciosas, lo interesante es que no existe necesidad de equipos sofisticados y personal altamente especializado, siendo el tiempo de diagnóstico un potencial aliado de la técnica ya que permite realizarlo en aproximadamente 1 día lo que permite tomar acciones oportunas de mitigación.

Referencias

- [1] K. B. Mullis, F. A. Faloona (1987) "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction", 155, pp. 335-350
- [2] A. Abd-Elmagid, P. A. Garrido, R. Hunger, J. L. Lyles, M. A. Mansfield, B. K. Gugino, D. L. Smith, H. A. Melouk, C. D. Garzon (2013) "Discriminatory simplex and multiplex PCR for four species of the genus *Sclerotinia*", 92(3), 293-300
- [3] M. Arif, S. Dobhal, P. Garrido, G. Orquera, A. Espíndola, C. Young, F. Ochoa-Corona, S. Marek, C. Garzón (2014) "Highly Sensitive End-Point PCR and SYBR Green qPCR Detection of *Phymatotrichopsis omnivora*, Causal Fungus of Cotton Root Rot", 98(9), 1205-1212
- [4] M. Parida, S. Sannarangaiah, P. K. Dash, P. Rao, K. Morita (2008) "Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases", 18(6), 407-421
- [5] M. Parida, G. Posadas, S. Inoue, F. Hasebe, K. Morita (2004) "Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus", 42(1), 257-263
- [6] L. L. Poon, C. S. Leung, K. H. Chan, J. H. Lee, K. Y. Yuen, Y. Guan, J. S. Peiris (2005) "Detection of human influenza A viruses by loop-mediated isothermal amplification", 43(1), 427-430
- [7] S. Fukuda, S. Takao, M. Kuwayama, Y. Shimazu, K. Miyazaki (2006) "Rapid detection of norovirus from fecal specimens by real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay", 44(4), 1376-1381
- [8] M. Imai, A. Ninomiya, H. Minekawa, T. Notomi, T. Ishizaki, M. Tashiro, T. Odagiri (2006) "Development of H5-RT-LAMP (loop-mediated isothermal amplification) system for rapid diagnosis of H5 avian influenza virus infection", 24(44), 6679-6682
- [9] J. Dukes, D. King, S. Alexandersen (2006) "Novel reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of foot-and-mouth disease virus", 151(6), 1093-1106
- [10] S. Chakraborty, S. Choudhury (2012) "Recent trends in the diagnosis of Classical Swine Fever", 2(2), 61-71
- [11] H. Kirunda, O. Thekiso, P. Kasajja, S. Kerfua, G. Nasinyama, J. Opuda-Asibo, N. Inoue (2012) "Use of reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification assay for field detection of Newcastle disease virus using less invasive samples", 5(4)
- [12] C. H. Huang, G. H. Lai, M. S. Lee, W. H. Lin, Y. Y. Lien, S. C. Hsueh, J. Y. Kao, W. T. Chang, T. C. Lu, W. N. Lin (2010) "Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of chicken anaemia virus", 108(3), 917-924
- [13] M. Enosawa, S. Kageyama, K. Sawai, K. Watanabe, T. Notomi, S. Onoe, Y. Mori, Y. Yokomizo (2003) "Use of loop-mediated isothermal amplification of the IS900 sequence for rapid detection of cultured *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*", 41(9), 4359-4365
- [14] N. Chantratita, E. Meumann, A. Thanwisai, D. Limmathurotsakul, V. Wuthiekanun, S. Wannapasni, S. Tumapa, N. P. Day, S. J. Peacock (2008) "Loop-mediated isothermal amplification method targeting the TTS1 gene cluster for detection of *Burkholderia pseudomallei* and diagnosis of melioidosis", 46(2), 568-573
- [15] T. Song, C. Toma, N. Nakasone, M. Iwanaga (2005) "Sensitive and rapid detection of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* by a loop-mediated isothermal amplification method", 243(1), 259-263
- [16] L. Song, J. Li, S. Hou, X. Li, S. Chen (2012) "Establishment of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid detection of *Brucella* spp. and application to milk and blood samples", 90(3), 292-297
- [17] H. Ikadai, H. Tanaka, N. Shibahara, A. Matsuu, M. Uechi, N. Itoh, S. Oshiro, N. Kudo, I. Igarashi, T. Oyamada (2004) "Molecular evidence of infections with *Babesia gibsoni* parasites in Japan and evaluation of the diagnostic potential of a loop-mediated isothermal amplification method", 42(6), 2465-2469
- [18] E.-T. Han, R. Watanabe, J. Sattabongkot, B. Khuntirat, J. Sirichaisinthop, H. Iriko, L. Jin, S. Takeo, T.

- Tsuboi (2007) "Detection of four Plasmodium species by genus-and species-specific loop-mediated isothermal amplification for clinical diagnosis", 45(8), 2521-2528
- [19] E. R. Adams, G. J. Schoone, S. El Safi, H. D. Schallig (2010) "Development of a reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the sensitive detection of Leishmania parasites in clinical samples", 82(4), 591-596
- [20] H. Hirayama, S. Kageyama, S. Moriyasu, K. Sawai, S. Onoe, Y. Takahashi, S. Katagiri, K. Toen, K. Watanabe, T. Notomi (2004) "Rapid sexing of bovine preimplantation embryos using loop-mediated isothermal amplification", 62(5), 887-896
- [21] K.-W. Chan, P.-C. Liu, W.-C. Yang, J. Kuo, C.-T. Chang, C.-Y. Wang (2012) "A novel loop-mediated isothermal amplification approach for sex identification of Columbidae birds", 78(6), 1329-1338
- [22] T. H. HSU, Y. T. Adiputra, H. Ohta, J. C. GWO (2011) "Species and sex identification of Formosa landlocked salmon using loop-mediated isothermal amplification", 11(5), 802-807
- [23] C. Lu, B. Song, H. Zhang, Y. Wang, X. Zheng (2015) "Rapid Diagnosis of Soybean Seedling Blight Caused by *Rhizoctonia solani* and Soybean Charcoal Rot Caused by *Macrophomina phaseolina* Using LAMP Assays", 105(12), 1612-1617
- [24] R. Kubota, B. G. Vine, A. M. Alvarez, D. M. Jenkins (2008) "Detection of *Ralstonia solanacearum* by Loop-Mediated Isothermal Amplification", 98(9), 1045-1051
- [25] G. J. Ash, J. M. Lang, L. R. Triplett, B. J. Stodart, V. Verdier, C. V. Cruz, P. Rott, J. E. Leach (2014) "Development of a Genomics-Based LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) Assay for Detection of *Pseudomonas fuscovaginae* from Rice", 98(7), 909-915
- [26] S. J. Harper, L. I. Ward, G. R. G. Clover (2010) "Development of LAMP and Real-Time PCR Methods for the Rapid Detection of *Xylella fastidiosa* for Quarantine and Field Applications", 100(12), 1282-1288
- [27] A. Ravindran, J. Levy, E. Pierson, D. C. Gross (2012) "Development of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Procedure as a Sensitive and Rapid Method for Detection of 'Candidatus *Liberibacter solanacearum*' in Potatoes and Psyllids", 102(9), 899-907
- [28] T. N. Temple, L. J. du Toit, M. L. Derie, K. B. Johnson (2013) "Quantitative Molecular Detection of *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae* in Carrot Seed Before and After Hot-Water Treatment", 97(12), 1585-1592
- [29] J. Yasuhara-Bell, A. de Silva, S. A. Heuchelin, J. L. Chaky, A. M. Alvarez (2015) "Detection of Goss's Wilt Pathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* in Maize by Loop-Mediated Amplification", PHYTO-10-15-0249-R
- [30] X. Nie (2005) "Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification of DNA for Detection of Potato virus Y", 89(6), 605-610
- [31] R. L. Amata, E. Fernandez, D. Filloux, D. P. Martin, P. Rott, P. Roumagnac (2015) "Prevalence of Sugarcane yellow leaf virus in Sugarcane-Producing Regions in Kenya Revealed by Reverse-Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Method", 100(2), 260-268
- [32] B. Lin, H. Wang, K. Zhuo, J. Liao (2015) "Loop-Mediated Isothermal Amplification for the Detection of *Tylenchulus semipenetrans* in Soil", PDIS-07-15-0801-RE
- [33] J. A. Tomlinson, M. J. Dickinson, N. Boonham (2010) "Rapid Detection of *Phytophthora ramorum* and *P. kernoviae* by Two-Minute DNA Extraction Followed by Isothermal Amplification and Amplicon Detection by Generic Lateral Flow Device", 100(2), 143-149

Patricia Garrido Haro

Directora de Diagnostico Vegetal
AGROCALIDAD