

APLICACIÓN DE LA TECNOLOGÍA LAMP EN EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE INFECCIONES POR *Strongyloides stercoralis*

Application of LAMP Technology in the Molecular Diagnosis of Strongyloides stercoralis Infections

Julia FERNÁNDEZ CENCERRADO; Beatriz CREGO-VICENTE; Manuel DIEGO DEL OLMO; Pedro FERNÁNDEZ-SOTO

Laboratorio de Inmunología Parasitaria y Molecular. Grupo e-INTRO (Enfermedades Infecciosas y Tropicales). IBSAL-CIETUS. Área de Parasitología, Facultad de Farmacia, Avda. Ldo. Méndez Nieto s/n 37007 Salamanca, España

*Correo-e: pfsoto@usal.es

RESUMEN: La estrongiloidosis (infección por *Strongyloides stercoralis*) es una enfermedad tropical desatendida de elevada prevalencia mundial, principalmente en climas tropicales y subtropicales. Cursa desde casos asintomáticos hasta crónicos, con relevancia en individuos inmunocomprometidos. En casos graves puede producirse un síndrome de hiperinfección y diseminación larvaria a varios órganos con elevada mortalidad. Su diagnóstico carece de una prueba de referencia estándar que dificulta la estimación de la precisión de otras pruebas diagnósticas. En estudios previos, desarrollamos un método molecular basado en la tecnología LAMP para la detección de ADN de *Strongyloides* spp. (*Strong*-LAMP) con alta especificidad y sensibilidad. Aquí, evaluamos su funcionamiento en muestras de heces de pacientes recogidas y almacenadas en papel de filtro como método simple de conservación y transporte de muestras clínicas desde zona endémica de estrongiloidosis al laboratorio. Se seleccionaron 20 muestras conservadas en papel de filtro de un total de 192 recogidas y analizadas por microscopía y *Strong*-LAMP en un estudio realizado en Cubal, Angola. Se extrajo el ADN y se analizaron en el laboratorio. Los

resultados indican que el papel de filtro es un soporte potencialmente válido para el transporte y conservación de muestras de heces para el diagnóstico molecular mediante *Strong*-LAMP de la estrongiloidosis.

Palabras clave: LAMP; *Strongyloides stercoralis*; *Strong*-LAMP; diagnóstico molecular; Cubal; Angola.

ABSTRACT: Strongyloidiasis (*Strongyloides stercoralis* infection) is a neglected tropical disease of high prevalence worldwide, mainly in tropical and subtropical climates. It ranges from asymptomatic to chronic cases, with relevance in immunocompromised individuals. In severe cases, hyperinfection syndrome and larval dissemination to various organs can occur with high mortality. Diagnosis lacks a standard reference test, which makes it difficult to estimate the accuracy of other diagnostic tests. In previous studies, we developed a molecular method based on LAMP technology for the detection of *Strongyloides* spp. DNA (*Strong*-LAMP) with high specificity and sensitivity. Here, we evaluate its performance on patient stool samples collected and stored on filter paper as a simple method of preservation and transport of clinical samples from a *Strongyloides* endemic area to the laboratory. Twenty samples preserved in filter paper were selected from a total of 192 samples collected and analysed by microscopy and *Strong*-LAMP in a study conducted in Cubal, Angola. DNA was extracted and analysed in the laboratory. The results indicate that filter paper is a potentially valid carrier for transport and preservation of stool samples for *Strong*-LAMP molecular diagnosis of strongyloidosis.

Keywords: LAMP; *Strongyloides stercoralis*; *Strong*-LAMP; molecular diagnostic; Cubal; Angola.

1. INTRODUCCIÓN

La estrongiloidosis es una enfermedad causada principalmente por el nematodo parásito *Strongyloides stercoralis*, endémica de climas tropical y subtropical, aunque también presente en zonas templadas. *S. stercoralis* es un parásito que se transmite por el suelo (geohelminto). Su ciclo biológico es único, con dos formas de transmisión: heteroinfección (por penetración transcutánea de larvas filariformes) y autoinfección (transformación en el intestino grueso de larvas rabditiformes en filariformes); ésta es una característica biológica exclusiva del género *Strongyloides* spp. (Page *et al*, 2018).

Se estima una prevalencia global de 600 millones de personas infectadas con *S. stercoralis*, con un 76% de la carga mundial en África subsahariana, sudeste asiático, Latinoamérica y regiones del Pacífico Oeste (Buonfrate *et al*, 2020). La estrongiloidosis está considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una de las 20 entidades tropicales olvidadas o desatendidas (*Neglected Tropical Diseases*; NTDs) (WHO, 2023).

La clínica de la estrongiloidosis depende de la etapa de invasión y desarrollo del parásito, de la capacidad de autoinfección y del estado inmunológico del paciente. Puede aparecer como: *i*) estrongiloidosis aguda: generalmente en viajeros que regresan de zona endémica, con dermatitis pruriginosa (penetración transcutánea de larvas), neumonitis con tos (paso de larvas por los pulmones) y fiebre. Cuando los parásitos alcanzan el intestino aparece dolor gastrointestinal con diarrea, náuseas y vómitos; *ii*) estrongiloidiasis crónica: habitualmente asintomática, aunque pueden aparecer manifestaciones gastrointestinales, pulmonares, cutáneas y eosinofilia; y *iii*) en individuos inmunosuprimidos (p.ej. tratamientos inmunosupresores por anti-TNF, corticosteroides, trasplante de órganos sólidos o hematopoyéticos, cáncer, infección por HTLV-1) puede aparecer el síndrome de hiperinfección por la migración larvaria, con manifestaciones intestinales y pulmonares graves, fiebre, y aparecerá un número elevado de larvas en las heces y en esputo (Schär *et al*, 2013). Las larvas pueden atravesar la barrera hematoencefálica, produciendo encefalitis con elevadas tasas de mortalidad (hasta el 87%). En esta situación, el tratamiento ya no es efectivo por lo que un cribado de sospecha de posible estrongiloidosis antes de los tratamientos inmunosupresores es de vital importancia.

La ivermectina es el tratamiento de elección de la estrongiloidosis (200 µg/kg/día; 2 días); el alternativo, es el albendazol (400 mg/12h; 2días; puede prolongarse la terapia hasta 7 días) (Henríquez-Camacho *et al*, 2016).

La estrongiloidosis es una de las enfermedades parasitarias más difíciles de diagnosticar debido a la concurrencia de tres factores principales: *i*) la presencia de casos subclínicos o levemente sintomáticos; *ii*) la carga parasitaria generalmente muy baja con una expulsión irregular de larvas y, *iii*) la falta de una prueba diagnóstica “gold standard”. El método diagnóstico de referencia es la observación microscópica de larvas rabditiformes en heces, pero tiene escasa sensibilidad (≤30%). Los métodos serológicos, aunque sensibles, tienen muy poca especificidad y la detección de anticuerpos persiste mucho tiempo tras el tratamiento. Los métodos moleculares (mayoritariamente, basados en la PCR; *polymerase chain reaction*) son sensibles y específicos, pero no están estandarizados, presentan discrepancias en su precisión, son caros y técnicamente complejos de realizar e implementar en zona endémica (Buonfrate *et al*, 2018). Una alternativa molecular de bajo coste, rapidez, simplicidad de realización e interpretación, con elevada sensibilidad y especificidad es la tecnología de amplificación isotérmica de ácidos

nucleicos mediada por bucles tipo LAMP (*Loop-mediated isothermal amplification*) (Notomi *et al*, 2000).

La tecnología LAMP se basa en el principio de síntesis de ADN por desplazamiento de cadena, mediante una *Bst* polimerasa (*de Bacillus stearothermophilus*) en condiciones isotérmicas (60-65 °C) y un sistema de 4/6 cebadores o *primers*: dos internos, *Forward Inner Primer* (FIP) y *Backward Inner Primer* (BIP); dos externos (F3 y B3), y, opcionalmente, 2 cebadores bucle o *loop primers* (FLP y FLB), que permiten acelerar la reacción por unión a sitios no accesibles a los cebadores internos. Se reconocen así 6/8 regiones distintas en el ADN diana, confiriendo una elevada especificidad en la detección. Se puede realizar el LAMP en un simple termobloque y visualizar los resultados por un cambio de color al añadir un reactivo intercalante en el ADN (Soroka *et al*, 2021). Hasta la fecha, solo hay desarrollados dos ensayos LAMP para la detección de ADN de *S. stercoralis*: uno, basado en el gen *28S RNAr* (Watts *et al*, 2014); otro, basado en una secuencia parcial de 329 pares de bases (pb) del gen *18S RNAr* de *Strongyloides* spp., desarrollado en el CIETUS (Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca) y denominado *Strong-LAMP* (Fernández-Soto *et al*, 2016). El *Strong-LAMP* ha demostrado en estudios anteriores su efectividad en la detección de ADN de *S. stercoralis* en muestras de heces y orina en modelo experimental de infección en el laboratorio y en muestras de heces y orina de pacientes con estrongiloidosis confirmada por microscopía, qPCR y/o sospecha serológica. Recientemente, se ha comprobado su mayor eficacia frente a la microscopía en un estudio en zona endémica de estrongiloidosis en Cubal, Angola (Crego-Vicente *et al*, 2023).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El método *Strong-LAMP* desarrollado en el CIETUS para la detección molecular de *S. stercoralis* ha resultado eficaz en el diagnóstico de la estrongiloidosis en muestras frescas de heces de pacientes en condiciones de campo en zona endémica (Cubal, Angola). Sería de interés evaluar su funcionamiento en muestras recogidas y almacenadas en papel de filtro como método simple de conservación y transporte de muestras clínicas desde zona endémica al laboratorio.

Objetivo general. Aplicar y valorar el método *Strong-LAMP* para la detección de ADN de *S. stercoralis* en muestras de heces de individuos residentes en zona endémica de estrongiloidosis (Cubal, Angola) almacenadas en papel de filtro.

Objetivos específicos.

1. Obtener ADN a partir de muestras de heces almacenadas en papel de filtro de individuos residentes en zona endémica.
2. Aplicar y evaluar la técnica *Strong-LAMP* para la detección de *S. stercoralis*.

3. Comparar su eficacia con los resultados de LAMP obtenidos en condiciones de campo en zona endémica.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. *Muestras y zona de estudio*

Se recolectaron 192 muestras de heces de población atendida en el Hospital Nossa Senhora da Paz de Cubal (Angola) como parte de un estudio realizado por el CIETUS y el Hospital Vall d'Hebron durante junio-agosto de 2022 para conocer la prevalencia de *S. stercoralis*. Se analizaron parasitológicamente mediante DSM (*Direct Saline Microscopy*) y Baermann para buscar la presencia de larvas y molecularmente mediante *Strong*-LAMP. Una porción de cada muestra de heces se extendió en un papel de filtro, se secó al aire, se envolvió individualmente en un papel de aluminio, se etiquetó y se envió posteriormente al CIETUS (Salamanca, España) para su almacenaje en refrigeración a 4°C.

3.2. *Selección de muestras*

Se seleccionaron en el CIETUS 20 muestras/192 analizadas en Cubal, incluyendo: 5 parasitológicamente y *Strong*-LAMP positivas; 10 parasitológicamente negativas y *Strong*-LAMP positivas; y 5 parasitológicamente y *Strong*-LAMP negativas.

3.3. *Obtención de ADN*

3.3.1. *Obtención de ADN de Strongyloides venezuelensis*

Como control positivo de amplificación en las reacciones de *Strong*-LAMP se utilizó ADN de larvas L3 infectivas (iL3) de *S. venezuelensis* (*Sv*), cuyo ciclo biológico se mantiene en ratas Wistar infectadas experimentalmente en el CIETUS. Para la extracción del ADN se utilizó el kit comercial *NZY Tissue gDNA Isolation kit* (Nzytech, Lisbon, Portugal), siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de ADN obtenido se midió en un espectrofotómetro NanoDrop y se ajustó a una concentración final de 1 ng/μL. El ADN se almacenó a -20°C hasta su uso. Se utilizaron 2 μL de ADN de *Sv* como control positivo en cada reacción de *Strong*-LAMP.

3.3.2. *Obtención de ADN de heces conservadas en papel de filtro*

Se realizó siguiendo la metodología descrita previamente en Cevallos *et al* (2018) y mediante el kit comercial *NZY Soil gDNA Isolation kit* (Nzytech, Lisbon,

Portugal), siguiendo las instrucciones del fabricante (Fig. 1). Se utilizaron 2 μ L de ADN de cada muestra como molde en las reacciones de *Strong*-LAMP.

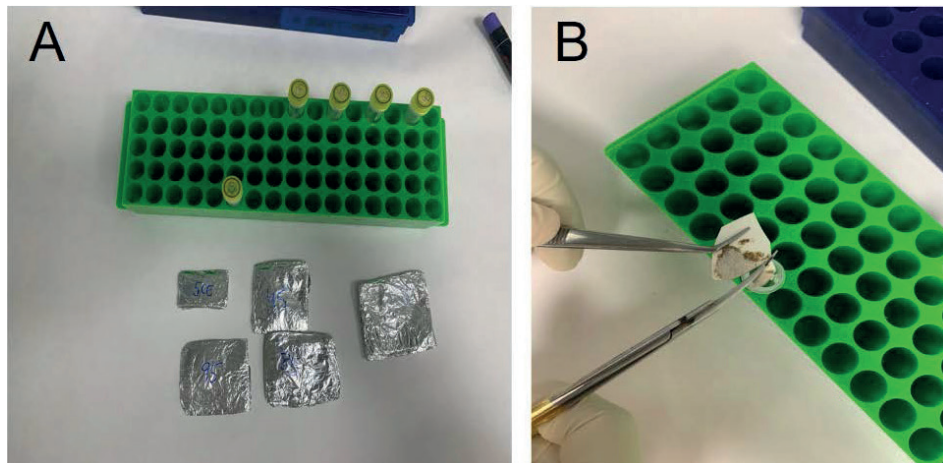


FIGURA 1. Obtención de ADN a partir de muestras de heces de pacientes almacenadas en papel de filtro. A) Las muestras de heces se mantienen en papel de filtro envueltas en papel de aluminio. B) Cada papel de filtro conteniendo la muestra es cortado en pequeños trozos para su incorporación en el buffer de extracción del kit para su digestión inicial. Posteriormente se siguen los pasos del kit según el fabricante.

3.4. *Análisis molecular de muestras heces*

Las 20 muestras seleccionadas se analizaron mediante el método *Strong*-LAMP realizado de forma colorimétrica utilizando las mismas mezclas y metodología descritas en Fernández-Soto *et al* (2016). Las mezclas se incubaron en un termobloque durante 50 min a 65°C, más 10 min a 80°C para desactivar la enzima y parar la reacción. Las reacciones se realizaron en lotes de 5 muestras para favorecer el manejo, evitar contaminaciones e incorporando un control negativo (agua en lugar de ADN) y un control positivo (ADN de iL3 de *Sv*).

3.5. *Detección de los productos de amplificación*

El revelado de los resultados del *Strong*-LAMP colorimétrico se realizó postamplificación, añadiendo a los tubos 2 μ L/tubo del colorante intercalante SYBR® Green I (1:10; 10,000X; Invitrogen). Las muestras negativas (sin ADN amplificado) mantienen el color naranja original del colorante; las muestras positivas (con ADN amplificado) viran a color verde por incorporación del colorante.

4. RESULTADOS

Los resultados de los distintos lotes de las muestras de heces analizadas mediante *Strong*-LAMP se muestran en la Fig. 2 y Tabla 1. De las 5 muestras parasitológicamente y *Strong*-LAMP positivas, solamente se obtuvo un resultado positivo (nº. 70) (Fig. 4A); de las 10 muestras parasitológicamente negativas y *Strong*-LAMP positivas, se obtuvieron 5 resultados positivos (nº. 82, 95 y 5C, 25 y 49) (Fig. 4B y 4C); en el lote de 5 muestras parasitológicamente y *Strong*-LAMP negativas, todas resultaron negativas (Fig.4D).

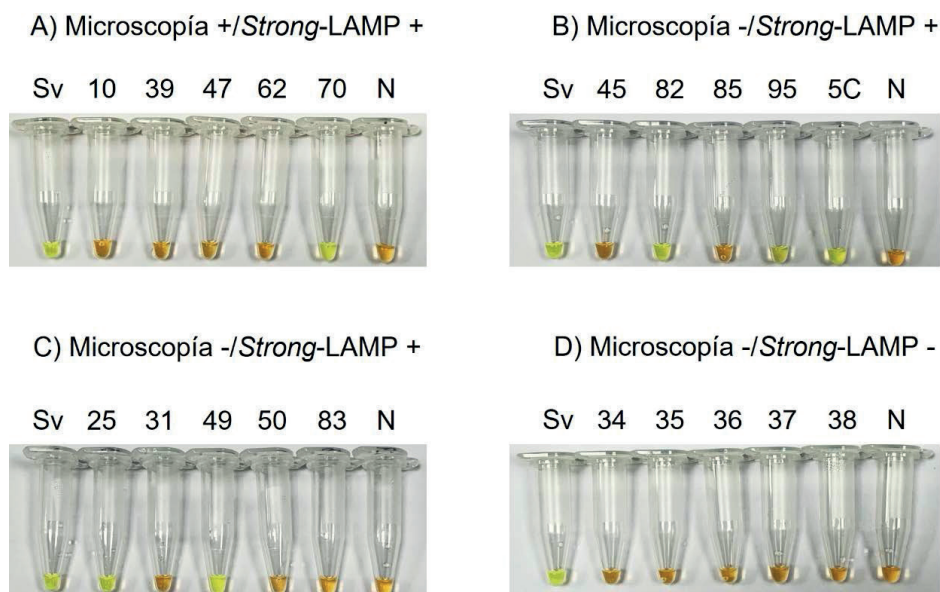


FIGURA 2. *Strong*-LAMP colorimétrico de las muestras de heces almacenadas en papel de filtro recogidas en Cubal, Angola. A) Muestras (5) con resultado parasitológicamente positivo y *Strong*-LAMP positivo. B) y C) Muestras (10) con resultado parasitológicamente negativo y *Strong*-LAMP positivo. D) Muestras (5) con resultado parasitológicamente negativo y *Strong*-LAMP negativo. Sv, controles positivos (ADN de *S. venezuelensis*); N, controles negativos (agua sustituyendo al ADN); los números indican las muestras analizadas. El color verde indica resultado positivo y el color naranja resultado negativo.

TABLA 1. Comparación de los resultados obtenidos (+/-) en muestras de heces de pacientes mediante microscopía (DSM + Baerman) y *Strong*-LAMP realizados en Cubal (Angola) y el *Strong*- LAMP realizado en muestras almacenadas en papel de filtro en el laboratorio del CIETUS (Salamanca, España).

MUESTRA Nº	MICROSCOPÍA CUBAL	STRONG-LAMP CUBAL	STRONG-LAMP CIETUS
10	+	+	-
39	+	+	-
47	+	+	-
62	+	+	-
70	+	+	+
45	-	+	-
82	-	+	+
85	-	+	-
95	-	+	+
5C	-	+	+
25	-	+	+
31	-	+	-
49	-	+	+
50	-	+	-
83	-	+	-
34	-	-	-
35	-	-	-
36	-	-	-
37	-	-	-
38	-	-	-

5. DISCUSIÓN

El diagnóstico de la estrongiloidosis es muy complicado. El análisis coproparasitológico continúa siendo el *gold standard*, pero escasamente sensible. La serología presenta reactividad cruzada con otras helmintosis y baja sensibilidad en países endémicos. Los métodos moleculares (PCR y variantes) son sensibles y específicos, pero técnicamente complejos, caros, requieren equipos y personal especializados no están estandarizados y presentan discrepancias entre estudios, tanto en laboratorio como en zonas endémicas (Buonfrate *et al*, 2018). La tecnología

LAMP reúne las características necesarias de un ensayo de diagnóstico molecular de elevada eficacia con un sencillo funcionamiento para su potencial uso en el diagnóstico clínico de enfermedades infecciosas, incluidas las parasitarias, en condiciones de campo en zona endémica (Li et al, 2017; García-Bernalt Diego et al, 2021). El *Strong-LAMP* diseñado en el CIETUS (Fernández-Soto et al, 2016) se ha utilizado por primera vez en el diagnóstico de campo en zona endémica de estrongiloidosis en Cubal (Angola) con resultados superiores a la microscopía (35.9% vs. 9.4%, respectivamente) (Crego-Vicente et al, 2023).

No obstante, la obtención y análisis de ADN en condiciones de campo presenta habitualmente problemas por falta de infraestructura adecuada y garantías de mantenimiento de la cadena de frío para su conservación y transporte. Se ha comprobado una disminución del rendimiento diagnóstico del *Strong-LAMP* entre condiciones de campo (con ADN recién extraído) y posteriormente en un laboratorio bien equipado (con ADN parcialmente degradado tras un inadecuado almacenaje y transporte) (Crego-Vicente et al, 2023). Una pequeña porción de las 192 muestras de heces analizadas en Cubal se depositó en papel de filtro para comprobar si este soporte resultaría efectivo en la conservación y transporte simple de las muestras y posterior extracción de ADN en el laboratorio. Este procedimiento ya resultó eficaz para detectar ADN de *Amphimerus* sp. en heces humanas procedentes de Ecuador (Cevallos et al, 2018).

En este trabajo, cabría esperar un resultado colorimétrico positivo *Strong-LAMP* en las 15 muestras que resultaron positivas por el mismo método en zona endémica (lotes A, B y C). Sin embargo, sólo obtuvimos un resultado *Strong-LAMP* positivo en 6/15 (40%) (nos. 70, 82, 95, 5C, 25 y 49). El análisis del papel de filtro de las muestras negativas (tanto por microscopía y *Strong-LAMP* en zona endémica) resultó negativo, confirmando la ausencia de falsos positivos y correcta realización de la técnica. Los resultados negativos en 10 muestras podrían explicarse por: i) la pequeña cantidad de materia fecal conservada en el papel de filtro para obtener ADN; ii) la toma de muestras sin concentrar previamente, que hubiera aumentado la posible presencia de larvas (siempre escasísima en infecciones crónicas de zona endémica); y iii) posibles inhibidores que dificultarían la extracción de ADN (nucleasas, proteasas bacterianas, ácidos biliares, etc.) (Crego-Vicente et al, 2023). La eficacia del papel de filtro como soporte para la recogida, transporte y conservación de muestras de heces para la extracción y detección de ADN de larvas de *Strongyloides* spp. podría posiblemente aumentarse en futuros trabajos optimizando los inconvenientes señalados.

6. CONCLUSIONES

Primera. Se ha conseguido extraer ADN de muestras de heces humanas conservadas en papel de filtro de individuos de zona endémica para la detección molecular de *Strongyloides* spp. mediante el método molecular colorimétrico Strong-LAMP.

Segunda. El papel de filtro es un soporte potencialmente válido para el transporte y conservación de muestras de heces para el diagnóstico molecular de la estrongiloidosis.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Buonfrate D, Bisanzio D, Giorli G, Odermatt P, Furst T, Greenaway C, et al. The global prevalence of *Strongyloides stercoralis* infection. *Pathogens*. 2020;9:468.
- Buonfrate D, Formenti F, Perandin F, Bisoffi Z. Novel approaches to the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. *Clin Microbiol Infect*. 2015; 21(6):543-552.
- Buonfrate D, Requena-Mendez A, Angheben A, Cinquini M, Cruciani M, Fittipaldo A, et al. Accuracy of molecular biology techniques for the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection—a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12:e0006229.
- Cevallos W, Fernández-Soto P, Calvopiña M, Buendía-Sánchez M, López-Abán J, Vicente B. *et al.* Diagnosis of amphimeriasis by LAMP_{himerus} assay in human stool samples long-term storage onto filter paper. *PLoS One*. 2018; 13(2):e0192637.
- Crego-Vicente B, Febrer-Sendra B, Nindia A, Pessela A, Aixut S, Martínez-Campreciós J, Mediavilla A, Silgado A, Sulleiro E, Treviño B, Molina I, Muro A, Salvador F, Fernández-Soto P. First field study using Strong-LAMP for diagnosis of strongyloidiasis in Cubal, Angola. *Parasit Vectors*. 2023; 31;16(1):393.
- Fernández-Soto P, Sánchez-Hernández A, Gandasegui J, Bajo Santos C, López-Abán J, Saugar JM, et al. Strong-LAMP: a LAMP assay for *Strongyloides* spp. Detection in stool and urine samples towards the diagnosis of human strongyloidiasis starting from a rodent model. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10:e0004836.
- García-Bernalt Diego J, Fernández-Soto P, Muro A. LAMP in Neglected Tropical Diseases: A Focus on Parasites. *Diagnostics*. 2021; 11(3):521.
- Henríquez-Camacho C, Gotuzzo E, Echevarría J, White AC Jr, Terashima A, Samalvides F *et al.* Ivermectin versus albendazole or thiabendazole for *Strongyloides stercoralis* infection. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016; (1):CD007745.
- Li Y, Fan P, Zhou S, Zhang L. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A novel rapid detection platform for pathogens. *Microb Pathog*. 2017; 107:54-61.
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. 2000; 28(12):E63.
- Page W, Judd J, Bradbury R. The unique life cycle of *Strongyloides stercoralis* and implications for public health action. *Trop Med Infect Dis*. 2018;3:53.

- Schär F, Trostsdort U, Giardina F, Khieu V, Muth S, Vounatsou P *et al.* *Strongyloides stercoralis*: Global Distribution and Risk Factors. Plos Neglect Trop D. 2013; 7(7):e2288.
- Soroka M, Wasowicz B, Rymaszewska A. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): the better sibling of PCR? Cells. 2021;10:1931.
- Watts MR, James G, Sultana Y, Ginn AN, Outhred AC, Kong F, et al. A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for *Strongyloides stercoralis* in stool that uses a visual detection method with SYTO-82 fluorescent dye. Am J Trop Med Hyg. 2014;90:306-11.
- World Health Organization. Soil-transmitted helminth infections. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/soil-transmitted-helminth-infections> (acceso el 22 de enero de 2023).