

APLICACIÓN DE LA TECNOLOGÍA LAMP (*LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION*) PARA EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE INFECCIONES POR *Schistosoma haematobium*

Application of LAMP technology (Loop-mediated isothermal amplification) for molecular diagnosis of Schistosoma haematobium infections

Daniel MATEOS CARRIL; Beatriz CREGO-VICENTE; Manuel DIEGO DEL OLMO; Pedro FERNÁNDEZ-SOTO

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

*Correo-e: pfsoto@usal.es

RESUMEN: *Schistosoma haematobium* (agente causal de la esquistosomosis genitorurinaria) afecta a 112 millones de personas en 54 países de África y Oriente. El diagnóstico de referencia es la observación microscópica de huevos del parásito en orina de pacientes, aunque con limitaciones. El diagnóstico serológico y molecular también presentan limitaciones y son difíciles de realizar en áreas endémicas. Una alternativa es la amplificación isotérmica de ácidos nucleicos tipo LAMP. En estudios previos desarrollamos un método molecular basado en la tecnología LAMP para detectar ADN de *S. haematobium* (*Sh*-LAMP) con alta especificidad y sensibilidad. Aquí, evaluamos su funcionamiento en muestras de orina recolectadas en una zona endémica de esquistosomosis urogenital (Cubal, Angola). Seleccionamos 33 muestras de orina con análisis microscópico de campo: 14 negativas

y 19 positivas. Se extrajo el ADN y se analizaron mediante *Sh*-LAMP colorimétrico. Obtuvimos un resultado *Sh*-LAMP positivo (89,5%) en 17/19 muestras microscópicamente positivas y negativo en las 14 muestras microscópicamente negativas. La facilidad de uso e interpretación y el nivel de reproducibilidad de los resultados respecto a la microscopía, sugieren que el *Sh*-LAMP puede ser una herramienta eficaz para el diagnóstico molecular de la esquistosomosis urogenital y útil en estudios epidemiológicos de mapeo y control de la enfermedad.

Palabras clave: *Schistosoma haematobium*; esquistosomosis urogenital; LAMP; diagnóstico molecular; Cubal; Angola.

ABSTRACT: *Schistosoma haematobium* (the causative agent of genitorurinary schistosomiasis) affects 112 million people in 54 countries in Africa and the East. The gold standard diagnosis is microscopic observation of parasite eggs in urine of patients, although with limitations. Serological and molecular diagnosis also have limitations and are difficult to perform in endemic areas. An alternative is isothermal LAMP-type nucleic acid amplification. In previous studies we developed a molecular method based on LAMP technology to detect *S. haematobium* DNA (*Sh*-LAMP) with high specificity and sensitivity. Here, we evaluated its performance on urine samples collected in a urogenital schistosomiasis endemic area (Cubal, Angola). We selected 33 urine samples with field microscopic analysis: 14 negative and 19 positive. DNA was extracted and analysed by colorimetric *Sh*-LAMP. We obtained a positive *Sh*-LAMP result (89.5%) in 17/19 microscopically positive samples and negative in the 14 microscopically negative samples. The ease of use and interpretation and the level of reproducibility of the results with respect to microscopy suggest that *Sh*-LAMP can be an effective tool for molecular diagnosis of urogenital schistosomiasis and useful in epidemiological mapping and disease control studies.

Keywords: *Schistosoma haematobium*; urogenital schistosomiasis; LAMP; molecular diagnostic; Cubal; Angola.

1. INTRODUCCIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la esquistosomosis es una enfermedad tropical desatendida causada por alguna de las seis especies de gusanos parásitos trematodos del género *Schistosoma* que afectan al hombre,

incluyendo: *Schistosoma haematobium* (esquistosomosis urogenital), *S. mansoni*, *S. intercalatum*, *S. japonicum*, *S. guineensis* y *S. mekongi* (esquistosomosis intestinal) (WHO, 2023). Está considerada la segunda mayor causa de morbilidad y mortalidad asociada a infecciones parasitarias, solo después de la malaria (Beltran et al, 2008). La esquistosomosis es endémica en 79 países tropicales y subtropicales, especialmente en comunidades pobres sin agua potable ni saneamiento adecuado. Afecta a casi 250 millones de personas en el mundo (más del 90% en África subsahariana) y 779 millones viven en riesgo de infección. Aproximadamente, 112 millones de personas en 54 países de África y Oriente Medio sufren esquistosomosis urogenital causada por *S. haematobium*, siendo la especie de esquistosoma que más infecciones produce. Clínicamente, la esquistosomosis se manifiesta típicamente como una dermatitis cercariana, el síndrome agudo de Katayama y la esquistosomosis crónica. En la esquistosomosis urogenital la clínica más llamativa ocurre en la fase crónica, con la presencia de huevos del parásito en la pared de la vejiga, uréter y órganos genitales, produciendo hematuria. Las complicaciones incluyen fibrosis vesical, estenosis uretral e hidronefrosis. También cáncer de vejiga y, en las mujeres, infertilidad y embarazos ectópicos (Colley et al, 2014). El praziquantel es el tratamiento de elección para todas las formas de esquistosomosis (Colley et al, 2014; McManus et al, 2018).

El diagnóstico de referencia de la esquistosomosis urogenital es la observación directa de huevos en orina de pacientes mediante microscopía. Sin embargo, éste tiene limitaciones como la falta de sensibilidad (especialmente en infecciones leves), incapacidad de detección de infección aguda, etc. (Chala B, 2023). Los métodos serológicos también presentan problemas como la obtención de antígenos, reactividad cruzada, falsos positivos tras quimioterapia o incapacidad de detección en fase aguda (Hinz et al, 2017). Para solucionar estas limitaciones, existen métodos moleculares basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *polymerase chain reaction*), con elevada sensibilidad y especificidad diagnósticas, pero que requieren de infraestructura compleja, material costoso y personal especializado, por lo que no resultan útiles para el diagnóstico en zonas endémicas de esquistosomosis con escasos recursos. Una alternativa es la tecnología de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos tipo LAMP (*Loop-mediated isothermal amplification*). Esta técnica fue descrita en el 2000 por Notomi et al. (Notomi et al, 2000). Es un método de amplificación de ácidos nucleicos (ADN o ARN) a temperatura constante (60–65°C) por una *Bst* polimerasa con actividad de desplazamiento de cadena junto con 4 o 6 *primers*/cebadores que reconocen entre 6 u 8 regiones en el ADN diana. La gran ventaja del método es que es posible la detección visual de los resultados por un simple cambio de color (Tomita et al, 2008), por lo que no requiere de equipos sofisticados y se puede realizar fácilmente en condiciones de campo en zona endémica de enfermedad. Un esquema y descripción de su funcionamiento se presenta en la Figura 1.

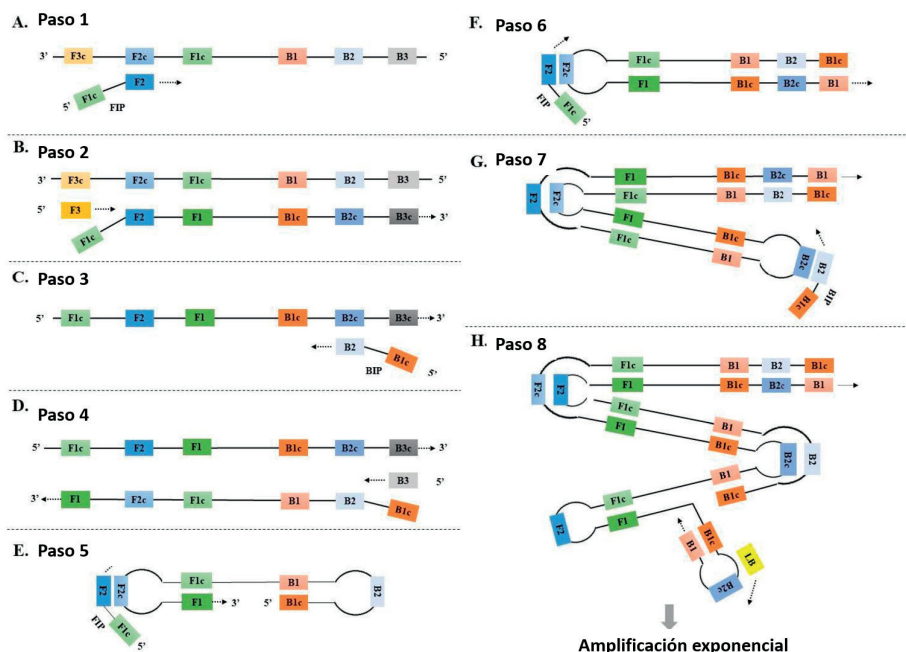


FIGURA 1. Esquema del funcionamiento de la tecnología LAMP. La amplificación LAMP consta de dos fases, una fase de amplificación inicial y una fase de amplificación exponencial. En la fase de amplificación inicial, los cebadores internos (FIP) se hibridan con el ADN diana e inician la síntesis de la cadena complementaria a la cadena 3'-5' (Figura 1A). Al mismo tiempo, los cebadores externos (F3) también inician la síntesis de ADN para desplazar las cadenas de ADN recién sintetizadas a partir de los cebadores internos (Figura 1B). El ADN monocatenario (ADNmc) liberado sirve como molde para la síntesis de ADN con los correspondientes cebadores internos (BIP) (Figura 1C) y externos (B3) (Figura 1D). El ADNmc liberado puede plegarse en una molécula con forma de mancuerna que sirve para iniciar la síntesis de ADN autocebado y como molde para nuevos ciclos de amplificación a través de los cebadores internos (Figura 1E-G). (Esquema tomado de Zhang *et al*, 2023, con modificaciones).

Angola es un país africano con aproximadamente 33 millones de habitantes, de los cuales casi la mitad son menores de 15 años. Se estima una tasa nacional de pobreza del 41%, sobrepasando el 90% en casi la mitad de sus municipios. Estudios previos han reportado una prevalencia oficial de esquistosomosis urogenital en Angola del 28%, mientras que la prevalencia de esquistosomosis intestinal

es casi residual en todo el país. Benguela es una de las 18 provincias angoleñas, clasificada como la segunda provincia con mayor prevalencia del país. En Cubal, un municipio de Benguela, se describió previamente una prevalencia de esquistosomosis urogenital del 61% entre los niños en edad escolar (Sánchez-Marqués *et al*, 2023a; Sánchez-Marqués *et al*, 2023b).

En el Laboratorio de Inmunología Parasitaria y Molecular del CIETUS (Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca) se diseñó un método LAMP para la detección sensible y específica de ADN de *S. haematobium* (*Sh*-LAMP) basado en una secuencia de 2522 pares de bases del espaciador intergénico ribosomal (Gandasegui *et al*, 2015). Este LAMP permitió detectar ADN del parásito en muestras de orina de pacientes en un estudio previo realizado en Cubal (Angola) (Gandasegui *et al*, 2018). También ha resultado eficaz en un estudio reciente del CIETUS para el cribado diagnóstico de la esquistosomosis urogenital importada (Salas-Coronas *et al*, 2023).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El grupo de Inmunología Parasitaria y Molecular del CIETUS tiene amplia experiencia en el desarrollo y aplicación de métodos LAMP para el diagnóstico de diferentes enfermedades parasitarias, incluyendo un LAMP para la detección molecular de *S. haematobium* (*Sh*-LAMP). Sería de interés evaluar su funcionamiento en muestras de orina de individuos residentes en zona endémica y comparar el resultado con el obtenido con la microscopía como método de diagnóstico parasitológico de referencia de la esquistosomosis urogenital.

Objetivo general. Aplicar y valorar la tecnología LAMP para la detección de ADN de *S. haematobium* en muestras de orina de individuos residentes en zona endémica de esquistosomosis urogenital en el municipio de Cubal (Angola) y comparar los resultados con la microscopía.

Objetivos específicos

1. Obtener ADN de muestras de orina recolectada de individuos residentes en zona endémica.
2. Aplicar y evaluar la técnica LAMP para la detección de *S. haematobium*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. *Muestras y zona de estudio*

Se recolectaron un total de 192 muestras de orina y de heces de población atendida en el Hospital Nossa Senhora da Paz (Cubal, Angola) como parte de

un estudio colaborativo realizado por el CIETUS y el Hospital Vall d'Hebrón durante los meses de junio-agosto de 2022 para conocer la prevalencia de diferentes parasitosis en diferentes distritos poblacionales de Cubal.

3.2. Obtención y análisis de las muestras

La orina se recolectó para el análisis microscópico de huevos de *S. haematobium*. En el estudio de campo se determinaron las muestras de orina como parasitológicamente positivas o negativas en función de la presencia o ausencia, respectivamente, de huevos del parásito. Un volumen de 2 mL de cada muestra de orina se almacenó en congelación hasta su envío al CIETUS para su análisis con la técnica *Sh*-LAMP.

3.3. Selección de muestras para el estudio mediante LAMP

Para este estudio, se seleccionaron 33 muestras de orina atendiendo a su resultado parasitológico realizado en campo, incluyendo: 14 muestras parasitológicamente negativas (nos. 1-14) y 19 parasitológicamente positivas (nos. 15-33). Se utilizó orina de un voluntario sano y sin antecedente de viaje a zona endémica de esquistosomosis y se prepararon 5 viales como control negativo en el análisis (nos. 34-38). Como control positivo de amplificación mediante *Sh*-LAMP se utilizó ADN de *S. haematobium* (0,5 ng/μL), disponible en la genoteca del CIETUS.

3.4. Extracción de ADN de las muestras de orina

Se utilizó 1 mL de orina de cada una de las muestras para la extracción del ADN mediante el kit comercial *NZY Tissue gDNA Isolation Kit* (NZYtech, Portugal), siguiendo el protocolo del fabricante. Se obtuvieron 100 μL de eluido de ADN. Posteriormente, se utilizaron 2 μL de ADN de cada muestra como molde de amplificación en las distintas reacciones de *Sh*-LAMP.

3.5. Análisis molecular mediante *S. haematobium*-LAMP

Las 38 muestras de orina se analizaron mediante el método *Sh*-LAMP siguiendo el protocolo descrito previamente en Gandasegui *et al*; 2015. Los componentes de la mezcla de reacción (*master mix*) se indican en la Tabla 1. Las reacciones se incubaron durante 50 min a 65°C en un termobloque, más 10 min adicionales a 80°C para desactivar la enzima y parar la reacción. En todas las reacciones se incluyó ADN de *S. haematobium* (2 μL) como control positivo y agua ultrapura (2 μL) como control negativo. Las muestras se analizaron por duplicado.

TABLA 1. Mezcla de reacción (*master mix*) utilizada en la amplificación de *S. haematobium* mediante LAMP. La enzima *Bst* polimerasa 2.0 *Warm Start* (WS), buffer y MgSO_4 fueron suministrados por New England Biolabs; los *primers* F3/B3, FIP/BIP y LF/LB por Eurofins y los dNTPs por Intron.

COMPONENTE	VOLUMEN (μL /TUBO)
H2O mQ	5,62
dNTPs (10 mM)	2,1
Isothermal buffer 10x	1,5
MgSO_4 (100 mM)	0,9
F3/B3 (10 pmol/ μL)	0,3
FIP/BIP (100 pmol/ μL)	0,24
LF/LB (10 pmol/ μL)	0,6
<i>Bst</i> polimerasa 2.0 WS	0,6
ADN muestra/ADN Sh/H2O	2
TOTAL	15

3.6. Detección de los productos de amplificación

El revelado de las reacciones se realizó post-amplificación, añadiendo a los tubos 2 μL de una dilución 1:10 del agente intercalante de ADN SYBR® Green I (10,000X; Invitrogen). Las muestras que resultaron positivas cambiaron su color a verde, y las negativas mantuvieron el color naranja original del colorante.

4. RESULTADOS

Los resultados obtenidos tras analizar las muestras de orina de los pacientes mediante *Sb*-LAMP se muestran en la Figura 2. Se obtuvo un resultado *Sb*-LAMP negativo (color naranja) en todas las muestras parasitológicamente negativas (nos. 1-14) y un resultado *Sb*-LAMP positivo de amplificación (color verde) en 17/19 (89,5%) muestras parasitológicamente positivas. Se obtuvo un resultado *Sb*-LAMP negativo (color naranja) en las muestras utilizadas control negativo del estudio.

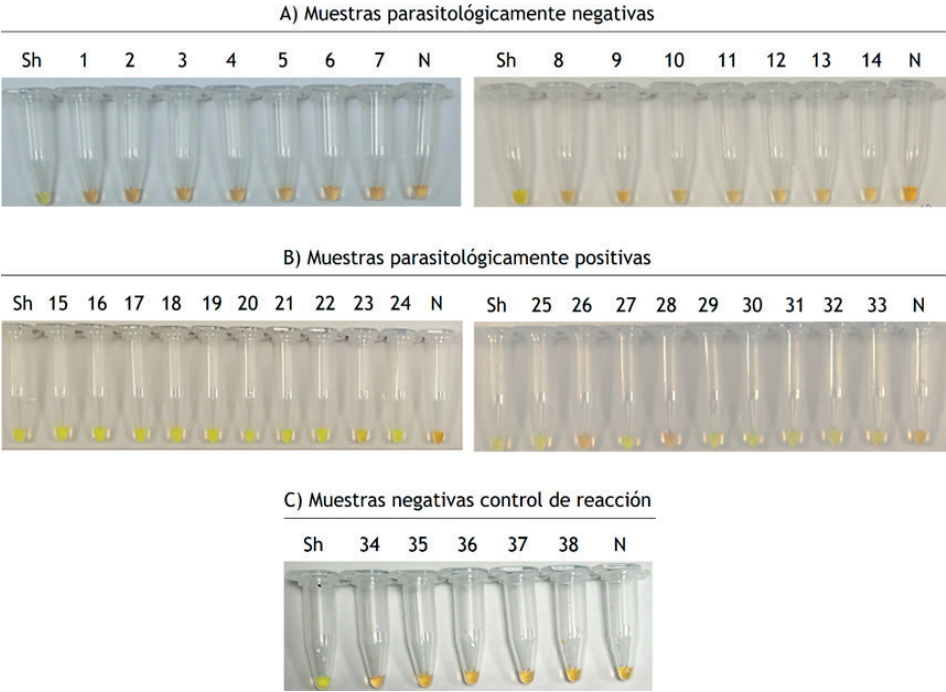


FIGURA 2. Análisis mediante *Sb*-LAMP de las muestras de orina incluidas en este estudio. A) Muestras parasitológicamente negativas (nos. 1-14); B) Muestras parasitológicamente positivas (números 15-33); C) Muestras negativas control de reacción (nos. 34-38). Sh, controles positivos de reacción (ADN de *Schistosoma haematobium*); N, controles negativos de reacción (agua ultrapura sustituyendo al ADN). Color verde, indica resultado positivo; color naranja, indica resultado negativo.

5. DISCUSIÓN

El diagnóstico definitivo de la esquistosomosis urogenital es por la visualización microscópica de huevos de *S. haematobium* en orina mediante la técnica de sedimentación/centrifugación o por filtración con discos de policarbonato (recomendado por la OMS para el mapeo y control de la enfermedad en zonas endémicas) (WHO, 2023). Éste es un método ampliamente utilizado, barato, fácil de realizar y práctico en laboratorios de campo con limitada infraestructura y personal. Sin embargo, presenta baja sensibilidad, especialmente en infecciones con baja carga parasitaria y por la escasa y variable producción diaria de huevos;

además, no es útil en fase aguda, solo en fase crónica de la esquistosomosis, cuando hay producción de huevos (aproximadamente 2 meses tras la infección). La sensibilidad aumenta recogiendo un mayor número de muestras por individuo y en días consecutivos, pero esto complica el manejo en condiciones de campo. Son necesarias herramientas moleculares específicas y más sensibles que permitan la detección de ADN del parásito tanto en fase aguda como crónica de la enfermedad para evitar las complicaciones asociadas a las infecciones crónicas. La tecnología LAMP para la amplificación de ADN tiene una elevada especificidad y sensibilidad y permite la visualización colorimétrica de los resultados sin aparatos sofisticados, permitiendo su aplicación sencilla, fundamentalmente en áreas endémicas pobres de esquistosomosis.

Teniendo en cuenta la eficacia previa demostrada del *Sb*-LAMP en la detección de ADN de *S. haematobium* en muestras de orina de pacientes (Gandasegui *et al*, 2015; Gandasegui *et al*, 2018; Salas-Coronas *et al*, 2023) el resultado obtenido en el análisis de las muestras utilizadas en este estudio es muy aceptable, obteniéndose un resultado positivo de amplificación en un total de 17/19 (89,5%) muestras con confirmación parasitológica de infección por el parásito. Dos muestras parasitológicamente positivas por microscopía en campo (nos. 26 y 28) resultaron negativas por *Sb*-LAMP tal y como indica el color naranja obtenido en el revelado postamplificación. La ausencia de amplificación en estas dos muestras podría deberse a varios factores, como: *i*) una identificación microscópica errónea de los huevos en el estudio de campo, al identificar algún artefacto similar presente en la orina; *ii*) un escaso número de huevos en la orina, de forma que no estuvieran presentes en el volumen utilizado (1mL) en la extracción de ADN en el laboratorio; *iii*) posibles inhibidores en la orina (nucleasas, proteasas bacterianas, etc.) que dificultan la extracción de ácidos nucleicos y la amplificación (Fernández-Soto *et al*, 2013); *iv*) posible degradación del escaso ADN de *S. haematobium* presente en la orina tras un incorrecto mantenimiento de la cadena de frío en condiciones de campo (por múltiples ciclos de congelación/descongelación) y posterior transporte al laboratorio de referencia desde zona endémica (Gandasegui *et al*, 2015) y, por último, *v*) no habría que descartar algún posible error técnico al realizar el ensayo *Sb*-LAMP.

Por otra parte, el resultado negativo mediante *Sb*-LAMP de las muestras de orina parasitológicamente negativas (esto es, aquellas en las que no se determinó la presencia de huevos del parásito), así como las muestras de donante sano sin antecedente de infección posible con *S. haematobium* y, por tanto, también negativas, confirma la ausencia de falsos positivos y, por tanto, una correcta realización de la técnica *Sb*-LAMP.

6. CONCLUSIÓN

La facilidad de uso, la sencillez de interpretación de los resultados, junto con el alto nivel de reproducibilidad de los resultados demostrado en un laboratorio de referencia respecto a la microscopía, sugieren que el ensayo *Sh*-LAMP diseñado para la detección específica de ADN de *S. haematobium* puede ser una prueba eficaz para el diagnóstico molecular de la esquistosomiasis urogenital en condiciones de campo en zonas remotas endémicas de la enfermedad. Su implementación podría ser muy útil en estudios epidemiológicos para el mapeo y posible control de la esquistosomiasis urogenital.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Beltran S, Galinier R, Alliene JF, Boissier J. Cheap, rapid and efficient DNA extraction method to perform multilocus microsatellite genotyping on all *Schistosoma mansoni* stages. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008; 103(5): 501-503.
- Chala B. Advances in Diagnosis of Schistosomiasis: Focus on Challenges and Future Approaches. *Int J Gen Med*. 2023;16: 983-995.
- Colley DG, Bustinduy AL, Secor WE, King CH. Human schistosomiasis. *Lancet*. 2014; 383(9936): 2253-64.
- Fernández-Soto P, Velasco Tirado V, Carranza Rodríguez C, Pérez-Arellano JL, Muro A. Long-term frozen storage of urine samples: a trouble to get PCR results in *Schistosoma* spp. DNA detection? *PLoS ONE* 2013; 8(4): e61703.
- Gandasegui J, Fernández-Soto P, Carranza-Rodríguez C, Pérez-Arellano JL, Vicente B, López-Abán J *et al*. The Rapid-Heat LAMPellet Method: A Potential Diagnostic Method for Human Urogenital Schistosomiasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015; 9(7): e0003963.
- Gandasegui J, Fernández-Soto P, Dacal E, Rodríguez E, Saugar JM, Yepes E *et al*. Field and laboratory comparative evaluation of a LAMP assay for the diagnosis of urogenital schistosomiasis in Cubal, Central Angola. *Trop Med Int Health*. 2018;23(9):992-1001.
- Hinz R, Schwarz NG, Hahn A, Frickmann H. Serological approaches for the diagnosis of schistosomiasis - A review. *Mol Cell Probes*. 2017; 31:2-21.
- McManus DP, Dunne DW, Sacko M, Utzinger J, Vennervald BJ, Zhou XN. Schistosomiasis. *Nat Rev Dis Primers* 2018; 4(1): 13.
- 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.
- Salas-Coronas J, Luzón-García MP, Crego-Vicente B, Soriano-Pérez MJ, Febrer-Sendra B, Vázquez-Villegas J *et al*. Evaluation of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) in Urine Samples for the Diagnosis of Imported Schistosomiasis. *Trop Med Infect Dis*. 2023;8(12):518.

- Sánchez-Marqués R, Bocanegra C, Salvador F, Nindia A, Pintar Z, Martínez-Campreciós J *et al.* Prevalence and morbidity of urogenital schistosomiasis among pre-school age children in Cubal, Angola. PLoS Negl Trop Dis. 2023; 17(11): e0011751.
- Sánchez-Marqués R, Salvador F, Bocanegra C, Nindia A, Pintar Z, Martínez J *et al.* *Schistosoma haematobium* infection and morbidity risk factors for pre-school age children in western Angola: A knowledge, attitudes and practices survey. PLoS Negl Trop Dis. 2023; 17(10): e0011650.
- Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. Nat Protoc. 2008; 3(5): 877-882.
- WHO. Fact Sheet Schistosomiasis [Internet]. WHO [actualizado 01 Feb 2023; citado 22 Ene 2024]. Disponible en: <https://www.who.int/en/newsroom/fact-sheets/detail/schistosomiasis>.
- Zhang X, Zhao Y, Zeng Y, Zhang C. Evolution of the Probe-Based Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assays in Pathogen Detection. Diagnostics. 2023; 13 (9): 1530.