



Memoria del 45º Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM

Sistemas de amplificación isotérmica para la detección molecular de los virus zika, dengue y chikungunya

Isothermal amplification systems for the molecular detection of zika, dengue and chikungunya viruses

Lira Carmona, Rosalía^{1*}; De la Cruz Pérez, Jeshermi¹; Maldonado Rodríguez, Angélica¹ y Rojas Montes, Othón¹

1. Laboratorio de Virología. Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, UMAE Hospital de Pediatría, CMN Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

*Correspondencia. Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Av. Cuauhtémoc 330 Col. Doctores. Del. Cuauhtémoc, Ciudad de México, C.P. 06720. Tel.: +52(55) 5627-6900 Ext. 22407. rolica36@yahoo.com

Resumen

Los sistemas de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos son procesos simples rápidos y eficientes que amplifican secuencias de un templado específico a una temperatura constante. La amplificación isotérmica mediada por asa es una técnica de alta especificidad y eficiencia, que utiliza una DNA polimerasa termofílica con actividad de helicasa, y un grupo de *primers* novedosamente diseñados para amplificar la secuencia blanco. Los virus dengue, chikungunya y zika son arbovirus, que comparten vectores, distribución geográfica y síntomas; por lo que es urgente el desarrollo de métodos diagnósticos que permitan detectar diferencialmente estos virus con alta sensibilidad. Nuestro grupo de investigación ha desarrollado un sistema de detección diferencial de los virus dengue, chikungunya y zika, utilizando un sistema de amplificación isotérmica, obteniendo un ensayo rápido, eficiente, y sensible, que además de poder realizarse en los sitios de atención primaria, requiere infraestructura mínima, lo que representa una aplicación valiosa en el campo del diagnóstico de enfermedades virales emergentes.

Palabras clave: Amplificación isotérmica, diagnóstico molecular, arbovirus.

Abstract

Loop mediated isothermal amplification methods are simple, fast and efficient processes that amplify sequences of DNA under isothermal conditions by using a thermophilic DNA polymerase with displacement strand activity and a set of *primers* designed to amplify targeted DNA. The system has been developed for the detection of several diseases caused by microorganisms, the viruses. Dengue, chikungunya and zika viruses share vectors, geographic distribution and symptoms, and the differential diagnosis is a challenge in areas of co-circulation. The development of diagnostic methods to detect these viruses with high sensitivity and specificity to be used as a point of care device is urgent. Our research group has developed a differential isothermal amplification system for the detection of these viruses that requires minimal infrastructure and represents a valuable application in the field of the diagnosis of emerging viral diseases.

Key words: Isothermal amplification, molecular diagnostics, arboviruses.

Conceptos generales

El avance en el desarrollo de las técnicas de biología molecular y la introducción de la amplificación de ácidos nucleicos (AN) por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ha tenido un gran impacto en el desarrollo y aplicaciones en la biología molecular y el diagnóstico médico.

Los métodos de amplificación de AN tienen diferentes requerimientos para iniciar la síntesis de DNA. Por ejemplo, la PCR involucra la desnaturalización de la doble cadena de DNA, y ciclos de desnaturalización-amplificación. Sin embargo, estos métodos requieren de equipos sofisticados como un termociclador, así como de métodos elaborados para amplificar las secuencias blanco. Una de las estrategias para resolver estas limitaciones, ha sido el desarrollo de las técnicas de amplificación isotérmica para la detección de AN. Esta técnica ha surgido como una alternativa promisoría en la que se obtiene una rápida y eficiente amplificación de un templado específico a una temperatura constante, lo cual difiere considerablemente de los sistemas de PCR convencionales.

Desarrollo de los sistemas de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos

Desde los años 90's varias técnicas de amplificación isotérmica han sido desarrolladas. La mayoría de estos métodos tiene una sensibilidad muy alta para la detección de AN e incluso algunas ya han sido comercializadas. Las diferentes técnicas de amplificación isotérmica se han expandido para detectar un amplio espectro de blancos que incluyen no sólo DNA y RNA, sino también proteínas, células, pequeñas moléculas e iones. Los primeros métodos estuvieron basados en una reacción simple en tubos de ensayo; sin embargo, debido a los avances en la tecnología, se incluyen formatos en *microchips*, plataformas capilares y de microfluidos, así como otros sistemas que nos permiten analizar fenómenos biológicos a nivel de una célula o inclusive de una molécula [1]. La combinación de los sistemas de amplificación isotérmica y la nanotecnología también ha atraído mucha atención. Es así como la amplificación isotérmica se ha adaptado para generar cantidades abundantes de ácidos nucleicos así como materiales para construir nanoestructuras altamente ordenadas, de metal templado o hidrogeles, que tienen un gran potencial de aplicación en las áreas de los biosensores, bioimagen y nanomedicina (Cuadro 1).

La amplificación de desplazamiento de cadena (SDA), la de círculo rodante (RCA), la de blanco

cruzado (CPA), y la amplificación mediada por asa (LAMP, *loop mediated amplification*), son algunos ejemplos de técnicas de amplificación de DNA que utilizan como principio la amplificación isotérmica. Aunque estas técnicas se basan principalmente en la replicación del DNA, la mayoría de estos métodos amplifican los templados de AN utilizando *primers* diseñados con estrategias diferentes a las utilizadas en la PCR. Además, pueden alcanzar una amplificación exponencial utilizando únicamente una DNA polimerasa (como el caso de la técnica de LAMP) aunque algunas otras requieren enzimas o proteínas adicionales [2].

Cuadro 1. Aplicaciones de los sistemas de amplificación isotérmica. Modificado de Zhou Y, et al. [1]

Aplicación	Descripción
Biosensores	Detección de AN, proteínas, células o pequeñas moléculas por amplificación.
Bioimagen	Detección <i>in situ</i> o intracelular de DNA nuclear, mitocondrial, mRNA, miRNA, etc.
Diagnóstico	Pruebas clínicas de DNA, SNPs, antígenos de patógenos.
Pruebas de diagnóstico en el punto de atención (POC)	Integración de sistemas o chips de microfluidos, plataformas capilares, o pruebas rápidas.

Amplificación isotérmica mediada por "asa" (LAMP)

La técnica de LAMP fue desarrollada en el 2000 por Notomi y colaboradores [3] con el fin de tener un método alternativo a la PCR, que fuera específico y sensible (Cuadro 2), que pudiera ser utilizada fuera de los laboratorios de diagnóstico y en los sitios de atención primaria, donde se requieren que los sistemas de detección sean rápidos, sensibles y precisos para emitir un diagnóstico.

La reacción de LAMP o amplificación isotérmica mediada por asa, tiene un amplio rango de aplicaciones, incluyendo las pruebas de detección en puntos de atención, pruebas genéticas en lugares de bajos recursos y pruebas rápidas de productos alimenticios y muestras medioambientales [4].

El principio fundamental de esta técnica es la amplificación del templado original para producir una gran cantidad de productos de amplificación de DNA, que contienen una secuencia mutuamente complementaria y alternada, de una estructura repetida. Para lograr esto, se diseñan dos *primers* que contienen una secuencia reverso-complementaria de la secuencia inicial blanco en sus extremos 5',

localizada río abajo del sitio del *primer* que se une al inicio de la reacción.

Cuadro 2. Comparación de sistemas de amplificación y detección de ácidos nucleicos.

Característica	PCR	LAMP
Molécula blanco	DNA/RNA	DNA/RNA
Ciclos de temperatura	sí, múltiples	no, isotérmica
Numero de <i>primers</i>	2	4-6
Diseño de <i>primers</i>	sencillo	complejo
Tiempo de realización	60 min	30-60 min
Cantidad de DNA amplificado	~ 0.2 µg	~10-20 µg
Detección visual	no	sí
Sensibilidad a inhibidores	sí	no
Termoestabilidad	hasta 90°C	≤70°C

Descripción de método

El ensayo de LAMP involucra dos tipos de reacciones de amplificación de templados a partir de una estructura de asa formada en el extremo terminal 3' y la unión y elongación de nuevos *primers* de la región de asa. Se utilizan 4 *primers*, dos *primers* que flanquean la región de interés denominados: F3, que es el primer externo en sentido, y B3, primer externo reverso; y los otros dos *primers* son: el primer FIP, interno en sentido y BIP, externo en reverso. Estos 4 *primers* reconocen 6 regiones distintas en un gen de interés (Fig. 1a). Los *primers* internos FIP y BIP están constituidos por una región denominada F1c/B1c, respectivamente, seguido de un espaciador de timina (TTTT) y la región F2/B2 que son complementarias a la región F2c/B2c (localizadas en la cadena complementaria), y los *primers* externos F3 y B3 son complementarios a F3c y B3c en la secuencia blanco de amplificación (Fig. 1a) [3]. Debido a que el diseño de estos *primers* es complejo, se encuentra disponible una aplicación de ayuda en línea (<http://primerexplorer.jp/e/>).

Se ha propuesto modificaciones a la técnica original de Notomi, que es la inclusión de un par de *primers* denominados *Loop primer F* y *Loop primer B*, que contienen secuencias complementarias entre las regiones F1 y F2 / B1 y B2 donde se forma el asa, implicando un número mayor de puntos de partida para la síntesis del DNA, lo que se ve reflejado en la disminución del tiempo de amplificación [5].

La enzima

La sensibilidad del método de amplificación LAMP está regulado en gran medida por el uso de una DNA polimerasa termostable proveniente del bacilo

Bacillus stearothermophilus, denominada “*Bst*”. La *Bst* DNA polimerasa tiene una actividad de helicasa para abrir la doble cadena de DNA, además de poseer una actividad de exonucleasa 5'-3' y carecer de actividad de corrección exonucleasa 3'-5'. Esta enzima funciona óptimamente entre 60-65°C, aunque su estabilidad térmica está en un rango de 45-65°C y se desnaturaliza arriba de 70°C, por lo que es considerada como un buen candidato para uso biotecnológico, y aplicaciones en sistemas de detección [6] como la amplificación isotérmica mediada por asa.

La reacción de LAMP

Mecanismo

La amplificación de los AN se realiza a través de repeticiones de reacciones de elongación que ocurren a través de las regiones de asa que se forman en la estructura original para la amplificación de LAMP.

En la primera etapa de la reacción se utilizan los *primers* internos (FIP y BIP) y externos (F3 y B3). Cada uno de los *primers* internos tiene una secuencia complementaria a una de las cadenas de amplificación de la región terminal 3' idénticos a la región interna de la misma cadena en el extremo 5'-terminal (Fig. 1a). La reacción de LAMP comienza cuando la secuencia F2 del primer FIP se alinea y se une a la secuencia blanco, como la secuencia F1c del primer no es una secuencia complementaria queda suelta, entonces, la DNA polimerasa *Bst* sintetiza una primera cadena. En el espacio que quedó entre la secuencia blanco y F1c, la *Bst* desplaza la cadena y el primer F3 se alinea en su secuencia complementaria y a partir de aquí se sintetiza una nueva cadena, liberando la primera cadena sintetizada. En el extremo 3' de la cadena recién liberada, el primer BIP sigue el mismo proceso que FIP, la secuencia B2 del primer BIP alinea en la primera cadena liberada, la polimerasa sintetiza la cadena y B3 se alinea e inicia la copia de la cadena, liberando una segunda cadena, que contiene las regiones antisentido en los extremos, por lo que se alinean entre ellos formando la estructura que posee los bucles o asas en ambos extremos (Fig. 1b). De esta forma, los *primers* continúan alineándose con las regiones complementarias en la fase de amplificación exponencial, durante la cual se forman repetidos invertidos de la secuencia blanco por extensión repetida, y las reacciones de elongación se repiten secuencialmente por la actividad de desplazamiento de cadena a una temperatura constante, formando diferentes estructuras de manera azarosa (Fig. 1b).

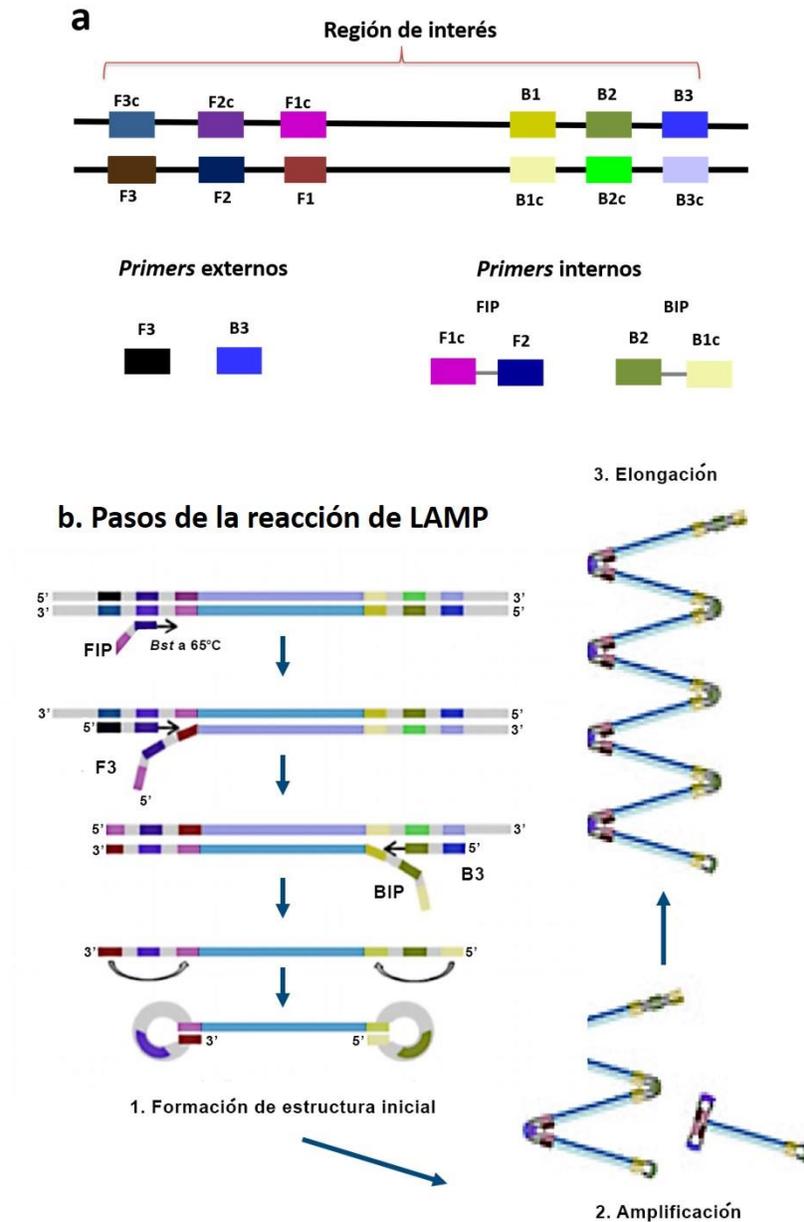


Figura 1.- Reacción de LAMP [7]. a) Diseño de los primers, b) Pasos de la reacción de LAMP: 1. Síntesis y formación de la estructura inicial; 2. Amplificación; 3. Elongación

Detección de los productos.

Existen diferentes métodos para detectar los productos de la amplificación por LAMP. Estos pueden ser diversos y fáciles de analizar como la turbidez, el cambio de color o la fluorescencia. La turbidez se produce debido a la formación del pirofosfato liberado tras la incorporación de desoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs) durante la

polimerización [8]. Otro método emplea el Azul de hidroxinaftol (HNB) el cual cambia de color violeta a azul cielo por la quelación de iones Mg^{2+} de los dNTPs. La calceína se puede usar en combinación con iones de manganeso libres que tienen un efecto quelante. A medida que el manganeso se une fuertemente al pirofosfato recién formado, la calceína se libera y se une al magnesio libre, dando como resultado una fluorescencia verde brillante después de

la excitación con luz visible o UV [9]. La adición de intercalantes del DNA como SYBR Green, Eva Green o berberina, puede hacerse durante o después de que terminó la reacción de LAMP siendo fácil de visualizar bajo la luz UV [10].

Los productos amplificados tienen una estructura repetida, en donde, cadenas idénticas se unen en direcciones opuestas. Esto permite la formación de diferentes estructuras y tamaño de amplicones que pueden ser fácilmente detectados, como un barrido o escalera, mediante la electroforesis en geles de agarosa.

Transcripción reversa-LAMP (RT-LAMP)

La transcripción reversa de la amplificación mediada por asa (RT-LAMP) es una técnica de amplificación de ácidos nucleicos de un solo paso para la detección de genomas de RNA que requieren la adición de una transcriptasa reversa para convertir el RNA a DNA complementario (cDNA) y ser amplificado posteriormente con la DNA polimerasa. El método es muy práctico porque involucra un solo paso de reacción, incubando los primers y la enzima a una temperatura constante [4,11], por lo que resulta un sistema muy útil y efectivo para la detección de virus que tienen un genoma de RNA.

Aplicaciones del sistema LAMP

Durante los últimos 10 años LAMP ha sido utilizada para detectar patógenos de importancia médica y veterinaria, enfermedades parasitarias en plantas, productos genéticamente modificados, e identificación de tumores y sexo de embriones, entre otros usos [12].

Se ha reportado el uso del método LAMP para la detección de parásitos, hongos, virus, patógenos de plantas y de alimentos (Fig. 2). En el caso de patógenos de vías respiratorias humanas, se ha logrado la detección de las bacterias: *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bordetella pertussis* y *Klebsiella pneumoniae*. Por otro lado, se han desarrollado sistemas de diagnóstico para patógenos asociados con enfermedades adquiridas a través de los alimentos, como son *Salmonella typhi*, *Campylobacter jejuni* y *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes* y *Entamoeba histolytica*. la aplicación de estos ensayos en este campo provee de un potencial

enorme para detectar diferencialmente no sólo patógenos humanos, sino también aquellos que afectan a animales y plantas [11-13].

Aplicaciones del método de LAMP en la detección de virus

Una de las áreas de aplicación de la técnica de LAMP más reportadas ha sido en el diagnóstico y la vigilancia de virus de importancia médica, para evitar potenciales brotes sin control que puedan repercutir en la salud pública, tanto a niveles locales e internacionales como es el caso del virus de influenza y de los arbovirus emergentes (Fig. 2). De forma temprana, los métodos de LAMP y RT-LAMP han sido utilizados para la detección de una gran variedad de virus como son: adenovirus, varicela zóster, citomegalovirus y hepatitis B (HBV) [13]. Los resultados obtenidos en los ensayos para HBV son muy promisorios tanto para el diagnóstico, el tamizaje en donadores de sangre, en estudios epidemiológicos, así como el seguimiento terapéutico de pacientes con tratamiento antiviral [14]. De manera análoga, para el diagnóstico de retrovirus como el VIH, se desarrolló un sistema de RT-LAMP acoplado a un equipo digital que puede reportar la prueba positiva en tiempo real, utilizando un teléfono inteligente. Este sistema puede diagnosticar el estado latente del VIH en individuos infectados con una gran sensibilidad [15].

Sistemas de amplificación isotérmica para la detección de los virus dengue, zika y chikungunya

La reciente emergencia de los arbovirus (*arthropod-borne viruses*) con potencial de diseminación urbana han representado un importante problema de salud pública [16]. El caso de los virus chikungunya (CHIKV) y zika (ZIKV) que actualmente circulan en áreas endémicas para dengue (DENV), ha puesto en evidencia la necesidad de establecer sistemas de detección diferencial en las áreas o sitios donde se producen los brotes [17]. Estos virus además de compartir el mismo vector, (insectos del género *Aedes*, como *A. aegypti* o *A. albopictus*), comparten síntomas lo que ocasiona que los médicos que atienden a nivel primario de atención no pueden diferenciar clínicamente por síntomas estas tres infecciones virales.

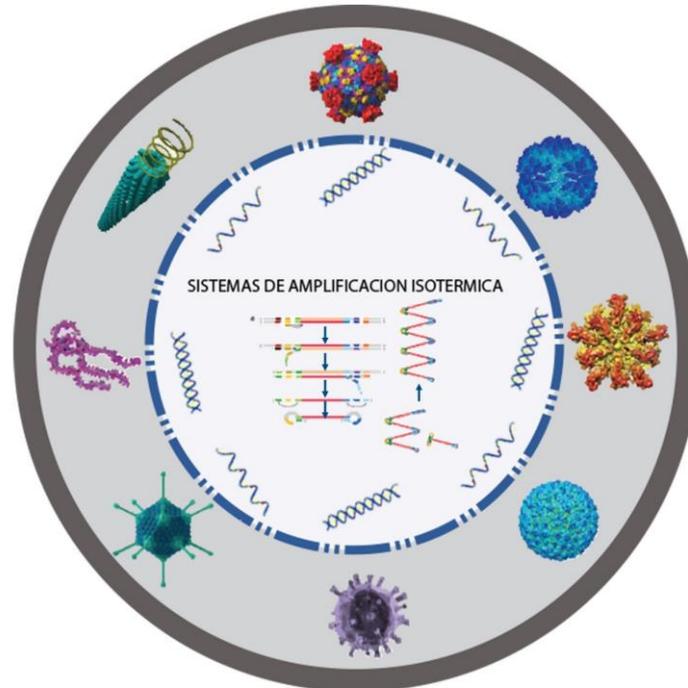


Figura 2. Detección de genoma viral mediante LAMP

El virus Dengue

El dengue es un arbovirus transmitido por mosquitos del género *Aedes* que ocasiona una enfermedad aguda y sus principales síntomas son: fiebre, dolor de cabeza, dolor retro-ocular, dolores musculares y/o articulares, náuseas, vómitos, agrandamiento de ganglios linfáticos o salpullido. El agente causal es el Virus del Dengue (DENV), un flavivirus del que se conocen 4 serotipos (DENV 1-4) [19]. El genoma es de RNA de cadena sencilla con polaridad positiva (ssRNA+) de 10.7 Kb que codifica para una poliproteína que se procesa en las tres proteínas estructurales: cápside (C), Pre-Membrana (PrM) y Envoltura (E), y siete proteínas no estructurales: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 [20]. El DENV es el virus más prevalente y de los arbovirus emergentes. De acuerdo con la OMS, es el virus que se disemina más rápidamente, y es endémico en las regiones donde se ha establecido mundialmente excepto para el continente Europeo [18].

El virus chikungunya

La fiebre Chikungunya es una enfermedad aguda transmitida por los mismos mosquitos que el dengue y sus síntomas incluyen fiebre, dolores musculares, dolores de cabeza, náuseas, cansancio y erupciones cutáneas. Los dolores articulares suelen ser

incapacitantes y generalmente desaparecen en pocos días, sin embargo, hay reportes de que el virus puede persistir causando una enfermedad crónica [21]. El agente causal es el virus Chikungunya (CHIKV), un alphavirus del cual se conocen tres genotipos Este Centro y Sur de África (ECSA), Oeste de África (Waf) y Asiático. El CHIKV es de ssRNA+ de 11.8 Kb, posee dos marcos abiertos de lectura (ORF), que codifican para una poliproteína que será escindida en cuatro proteínas no estructurales (nsP1-4), y las cinco proteínas estructurales (Cápside, E3, E2, 6K y E1) se traducen en una poliproteína a partir de un mRNA subgenómico (mRNA 26S) [22].

El virus Zika

El virus de Zika (ZIKV) es un flavivirus transmitido también por mosquitos *Aedes*, sin embargo, se ha demostrado que puede adquirirse por transmisión vertical y contacto sexual. Los síntomas incluyen fiebre, dolor de cabeza, erupciones cutáneas, conjuntivitis, dolores musculares y articulares [23]. En el caso de mujeres embarazadas, existe alto riesgo de microcefalia en el primer y segundo trimestre del embarazo, así como muerte fetal y crecimiento intrauterino retardado. El ZIKV es un flavivirus del que se conocen 3 genotipos: Este de África (EA), Oeste de África (WA) y Asiático, el genoma es de ssRNA+ con 10.7 Kb que codifican para 3 proteínas estructurales y 7 no estructurales [24].

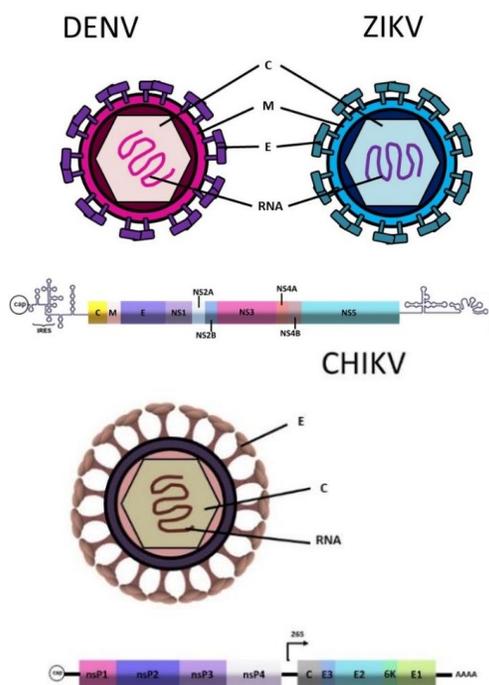


Figura 3. Estructura y genoma de los virus. Arriba flavivirus: DENV y ZIKV; abajo Alfavirus: CHIKV.

Sistema de detección de LAMP en la detección de virus emergentes

El sistema de RT-LAMP ha sido utilizado para la identificación de los virus responsables del dengue, influenza, hepatitis C, ébola, virus sincicial respiratorio, virus zika, y coronavirus del síndrome respiratorio; entre otros [13]. Un estudio realizado por Tian y colaboradores (2016), para la detección de virus zika con los *primers* dirigidos hacia el gen NS5, y usando virus sintéticos, demostró una alta sensibilidad y rapidez. En este estudio se demostró la actividad dual de la polimerasa *Bst* 3.0 que puede amplificar a partir de DNA o RNA utilizando las mismas condiciones, lo cual es una ventaja en costos, ya que no es necesario incluir una transcriptasa reversa en la reacción. También se reportó que no hubo reactividad cruzada para flavivirus relacionados [25].

En el cuadro 3 se resumen los diferentes estudios que han sido realizados para la detección de los virus emergentes, los que han sido combinados con

diferentes sistemas de visualización, con la finalidad de aplicarse en los sitios de atención primaria, e inclusive pruebas simples para realizarse en campo. Para el DENV pueden diferenciarse los 4 serotipos y el ZIKV en zonas de cocirculación.

Estandarización de un sistema de detección diferencial de DENV, CHIKV y ZIKV en México

Nuestro grupo de investigación, en el laboratorio de Virología de la Unidad de investigación médica en enfermedades infecciosas y parasitarias del IMSS, tiene como un objetivo principal, el desarrollo de sistemas de detección de virus de importancia médica. Hemos desarrollado un sistema de detección diferencial de genomas de DENV, CHIKV y ZIKV utilizando la técnica de RT-LAMP ante la necesidad de contar con un sistema de detección en los puntos de atención primaria de la Institución, como son los estados del sureste del país, donde los brotes de arbovirus han causado un gran problema de salud pública, y que han rebasado el diagnóstico y manejo de los pacientes en las regiones endémicas para el virus dengue.

Para obtener este sistema, diseñamos los *primers* para el ensayo de RT-LAMP para cada uno de estos virus. Para DENV se diseñaron *primers* que pudieran reconocer los 4 serotipos, y la región blanco fue en el gen de la cápside (Fig. 4a). Para CHIKV el gen E1 (Fig. 4b) para el ZIKV el gen NS1 (Fig. 4c).

Para la optimización de la reacción de RT-LAMP para los 3 virus, se evaluaron diferentes intervalos de concentración para los *primers* F3 y B3 (0.2-0.8 μ M), para la DNA polimerasa *Bst* (0.8-8 U), 1.6 μ M de los *primers* FIP/BIP, 1.4mM de cada uno de los dNTP's y 6 mM de $MgSO_4$ en el buffer de amplificación Isotérmica a 1X. Como control se empleó DNA purificado de cada virus obtenido de cultivos en células Vero. Para determinar el tiempo óptimo de la reacción se llevó a cabo el proceso de amplificación a diferentes tiempos (15, 30, 45 y 60 minutos), seguido de un paso final de inactivación de la polimerasa a 85°C durante 5 minutos. La mejor amplificación se obtuvo con una mezcla de reacción que contenía 1.6 U de *Bst*, 0.8 μ M de *primers* F3 y B3 para DENV, mientras que para ZIKV y CHIKV se utilizó 0.2 μ M. El tiempo óptimo de amplificación para CHIKV fue de 45 min y para DENV y ZIKV, 60 min.

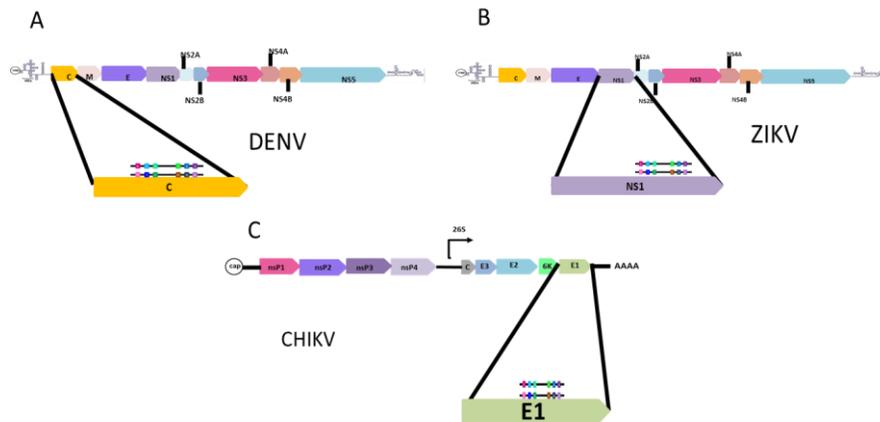


Figura 4. Diseño de *primers* en los diferentes genes de los virus.

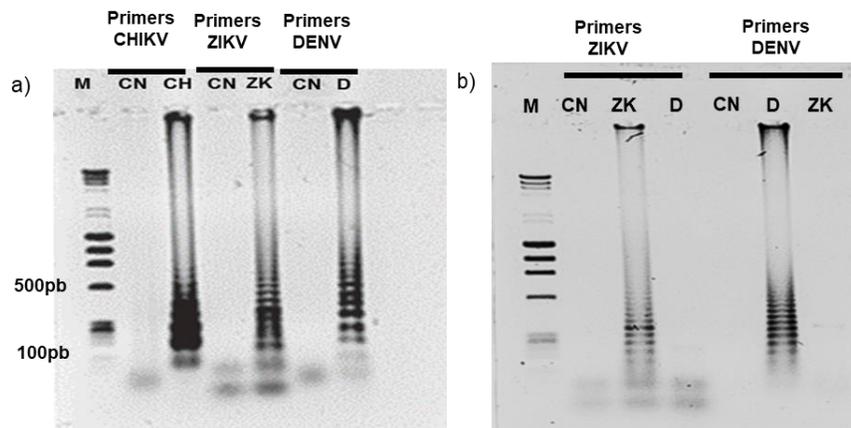


Figura 5- Detección del genoma viral mediante RT-LAMP. a) Amplificación de DENV (D), CHIKV (CH) y ZIKV (ZK). b) Prueba de especificidad de primers para DENV y ZIKV. M: Marcador, CN: Control Negativo (Agua estéril).

La detección de los productos del ensayo de RT-LAMP se realizó por electroforesis en geles de agarosa al 2% (Fig. 5a). Debido a que los genomas de ZIKV y DENV (Flaviviridae) tienen un alto porcentaje de identidad las secuencias nucleotídicas de su genoma, se utilizó el templado de RNA-ZIKV con los *primers* del ensayo de DENV, y el templado de RNA-DENV con los primers de ZIKV. El resultado del ensayo fue que no hay reactividad cruzada entre ellos (Fig. 5b)

Durante la realización de los ensayos es importante considerar que RT-LAMP es una técnica altamente sensible, razón por la cual es susceptible a las contaminaciones, por lo que el uso de áreas separadas para la preparación de la mezcla de reacción y la adición del templado, así como el manejo de material exclusivo para LAMP debe ser considerado. Además, de que la inclusión de un control negativo para cada

área de trabajo aumenta la confiabilidad del ensayo. Otras consideraciones previas al ensayo incluyen la limpieza y el uso de luz UV en las áreas y el material de trabajo, evitar corrientes de aire, uso de diferentes guantes por área, entre otros.

Conclusiones

El sistema de amplificación isotérmica mediado por asa (LAMP) es una herramienta de detección de AN que tiene las ventajas de ser rápida, específica, sensible y de fácil detección, por lo que ha sido aplicada en la detección y diagnóstico de virus emergentes de importancia médica. Además, tiene el potencial de aplicación en las diferentes áreas de diagnóstico clínico, especialmente en los lugares de bajos recursos, ya que no se necesita tener un laboratorio ni equipo sofisticado para realizarlos.

Cuadro 3. Sistemas de detección de virus DENV, CHIKV y ZIKV por RT-LAMP. Abreviatura tr, tiempo real.

Virus	Aplicación	Sistema de detección	Región del Genoma	Ref.		
DENV	Detección y diferenciación de los 4 serotipos del dengue	Fluorescencia tiempo real (tr) SYBR Green I Electroforesis en gel de agarosa Colorimétrica (SYBR Green I)	DENV1-NS2A DENV2-NS4B DENV3-NS4A DENV4-3' UTR	[26]		
		Turbidez en tr Colorimétrica (HNB)	5' UTR	[27]		
		Fluorescencia en tr Electroforesis en gel de agarosa Colorimétrica UV (SYBR safe)	NS1	[28]		
		Turbidez en tr Colorimétrica (SYBR Green I) Electroforesis en gel de agarosa	3'UTR	[29]		
		Fluorescencia en tr (SYBR Green I) Electroforesis en gel de agarosa		[30]		
		Turbidez en tr Colorimétrica (SYBR Green I)		[31]		
		Fluorescencia en tr (SYBR Green I)		[32]		
		Identificación de dengue y chikungunya	Turbidez en tr Electroforesis en gel de agarosa	C E1	[33]	
		CHIKV	Detección en tiempo real de chikungunya	Turbidez en tr Electroforesis en gel de agarosa Colorimétrica (SYBR Green I)	E1	[34]
				Turbidez en tiempo real		[35]
Loopamp Real-time Turbidimeter Loopamp Real-time Turbidimeter				[36]		
Turbidez en tr Electroforesis en gel de agarosa						
Fluorescencia en tr Colorimétrica (UV)	E			[37]		
ZIKV	Diagnóstico de Zika por RT-LAMP	Turbidez en tr Colorimétrica (calceína)	NS1	[38]		
				[39]		
		Diferenciación entre linajes de Zika	Fluorescencia en tr Turbidez	NS2A	[40]	
		Detección Atomolar de Zika por RT-LAMP	Susceptibilidad magnética AC Electroforesis en gel de agarosa	NS5	[25]	

Durante los últimos años el método ha sido aplicado en detección molecular no sólo de virus, sino también de bacterias, hongos y parásitos de plantas y animales, haciendo la técnica una herramienta con posibilidades de ser utilizado en el diagnóstico y vigilancia de enfermedades virales como las ocasionadas por los virus CHIKV y ZIKV, que han representado un reto en el diagnóstico y control durante los últimos 3 años. En la Unidad de investigación médica de enfermedades infecciosas y parasitarias del IMSS, hemos estandarizado un sistema de detección diferencial de estos virus por el método de RT-LAMP, que podría ser de gran utilidad

para aplicarse en los sitios de atención primaria en los futuros brotes de arbovirus en nuestro país.

Agradecimientos

Se agradece el apoyo otorgado por el Fondo de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social, FIS/IMSS/PROT/G16/1574. Agradecemos al Dr. Adolfo Chávez Negrete por el apoyo en la colecta de las muestras en Veracruz. Agradecemos al Arq. José Manuel Lira y a la M. en BE. Jeshermi De la Cruz por la elaboración de las figuras.

Referencias

- Zhao, Y., Chen, F., Li, Q., Wang, L., and Fan, C. (2015) Isothermal Amplification of Nucleic Acids. *Chem Rev* **115**, 12491-12545
- Yan, L., Zhou, J., Zheng, Y., Gamson, A. S., Roembke, B. T., Nakayama, S., and Sintim, H. O. (2014) Isothermal amplified detection of DNA and RNA. *Mol Biosyst* **10**, 970-1003
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., and Hase, T. (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic acids research* **28**, E63
- Notomi, T., Mori, Y., Tomita, N., and Kanda, H. (2015) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *J Microbiol* **53**, 1-5
- Nagamine, K., Hase, T., and Notomi, T. (2002) Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes* **16**, 223-229
- Aliotta, J. M., Pelletier, J. J., Ware, J. L., Moran, L. S., Benner, J. S., and Kong, H. (1996) Thermostable Bst DNA polymerase I lacks a 3'→5' proofreading exonuclease activity. *Genet Anal* **12**, 185-195
- Niessen, L. (2015) Current state and future perspectives of loop-mediated isothermal amplification (LAMP)-based diagnosis of filamentous fungi and yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol* **99**, 553-574
- Mori, Y., Nagamine, K., Tomita, N., and Notomi, T. (2001) Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem Biophys Res Commun* **289**, 150-154
- Zhu, R. Y., Zhang, K. X., Zhao, M. Q., Liu, Y. H., Xu, Y. Y., Ju, C. M., Li, B., and Chen, J. D. (2009) Use of visual loop-mediated isothermal amplification of rimM sequence for rapid detection of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium bovis. *J Microbiol Methods* **78**, 339-343
- Goto, M., Honda, E., Ogura, A., Nomoto, A., and Hanaki, K. (2009) Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *Biotechniques* **46**, 167-172
- Mori, Y., Kanda, H., and Notomi, T. (2013) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): recent progress in research and development. *J Infect Chemother* **19**, 404-411
- Fu, S., Qu, G., Guo, S., Ma, L., Zhang, N., Zhang, S., Gao, S., and Shen, Z. (2011) Applications of loop-mediated isothermal DNA amplification. *Appl Biochem Biotechnol* **163**, 845-850
- Wong, Y. P., Othman, S., Lau, Y. L., Son, R., and Chee, H. Y. (2017) Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP): A Versatile Technique for Detection of Microorganisms. *J Appl Microbiol*
- Nyan, D. C., Ulitzy, L. E., Cehan, N., Williamson, P., Winkelman, V., Rios, M., and Taylor, D. R. (2014) Rapid detection of hepatitis B virus in blood plasma by a specific and sensitive loop-mediated isothermal amplification assay. *Clin Infect Dis* **59**, 16-23
- Damhorst, G. L., Duarte-Guevara, C., Chen, W., Ghonge, T., Cunningham, B. T., and Bashir, R. (2015) Smartphone-Imaged HIV-1 Reverse-Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) on a Chip from Whole Blood. *Engineering (Beijing)* **1**, 324-335
- Weaver, S. C., Charlier, C., Vasilakis, N., and Lecuit, M. (2017) Zika, Chikungunya, and Other Emerging Vector-Borne Viral Diseases. *Annu Rev Med*
- Patterson, J., Sammon, M., and Garg, M. (2016) Dengue, Zika and Chikungunya: Emerging Arboviruses in the New World. *West J Emerg Med* **17**, 671-679
- OMS. (2009) OMS | Dengue: Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control. *WHO*
- Chen, L. H., and Wilson, M. E. (2016) Update on non-vector transmission of dengue: relevant studies with Zika and other flaviviruses. *Trop Dis Travel Med Vaccines* **2**, 15
- Phillips, S. L., Soderblom, E. J., Bradrick, S. S., and Garcia-blanco, M. A. (2016) Identification of Proteins Bound to Dengue Viral RNA In Vivo. **7**, 1-10
- Couderc, T., and Lecuit, M. (2015) Chikungunya virus pathogenesis: From bedside to bench. *Antiviral research* **121**, 120-131
- Solignat, M., Gay, B., Higgs, S., Briant, L., and Devaux, C. (2009) Replication cycle of chikungunya: a re-emerging arbovirus. *Virology* **393**, 183-197
- Song, B. H., Yun, S. I., Woolley, M., and Lee, Y. M. (2017) Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation. *J Neuroimmunol* **308**, 50-64
- Yun, S. I., and Lee, Y. M. (2017) Zika virus: An emerging flavivirus. *J Microbiol* **55**, 204-219
- Tian, B., Qiu, Z., Ma, J., Zardan Gomez de la Torre, T., Johansson, C., Svedlindh, P., and Stromberg, M. (2016) Attomolar Zika virus oligonucleotide detection based on loop-mediated isothermal amplification and AC susceptometry. *Biosens Bioelectron* **86**, 420-425
- Hu, S.-f., Li, M., Zhong, L.-l., Lu, S.-m., Liu, Z.-x., Pu, J.-y., and Wen, J.-s. (2015) Development of reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes 1 - 4. *BMC Microbiology*, 1-15
- Lau, Y. L., Lai, M. Y., Teoh, B. T., Abd-Jamil, J., Johari, J., Sam, S. S., Tan, K. K., and AbuBakar, S. (2015) Colorimetric Detection of Dengue by Single Tube Reverse-Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification. *PLoS One* **10**, e0138694
- Dauner, A. L., Mitra, I., Gilliland, T., Jr., Seales, S., Pal, S., Yang, S. C., Guevara, C., Chen, J. H., Liu, Y. C., Kochel, T. J., and Wu, S. J. (2015) Development of a pan-serotype reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of dengue virus. *Diagn Microbiol Infect Dis* **83**, 30-36
- Parida, M., Horioka, K., Ishida, H., Dash, P. K., Saxena, P., Jana, A. M., Islam, M. A., Inoue, S., Hosaka, N., and Morita, K. (2005) Rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes by a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. *J Clin Microbiol* **43**, 2895-2903
- Neeraja, M., Lakshmi, V., Lavanya, V., Priyanka, E. N., Parida, M. M., Dash, P. K., Sharma, S., Rao, P. V., and Reddy, G. (2015) Rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes by NS1 specific reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay in patients presenting to a tertiary care hospital in Hyderabad, India. *J Virol Methods* **211**, 22-31
- Sahni, A. K., Grover, N., Sharma, A., Khan, I. D., and Kishore, J. (2013) Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for diagnosis of dengue. *Med J Armed Forces India* **69**, 246-253
- Teoh, B. T., Sam, S. S., Tan, K. K., Johari, J., Danlami, M. B., Hooi, P. S., Md-Esa, R., and AbuBakar, S. (2013) Detection of dengue viruses using reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. *BMC Infect Dis* **13**, 387
- Lu, X., Li, X., Mo, Z., Jin, F., Wang, B., Zhao, H., Shan, X., and Shi, L. (2012) Rapid Identification of Chikungunya and Dengue Virus by a Real-Time Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification Method. **87**, 947-953
- Parida, M. M., Santhosh, S. R., Dash, P. K., Tripathi, N. K., Lakshmi, V., Mamidi, N., Shrivastva, A., Gupta, N., Saxena, P., Pradeep Babu, J., Lakshmana Rao, P. V., and Morita, K. (2007) Rapid and real-time detection of Chikungunya virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *Journal of Clinical Microbiology* **45**, 351-357

35. Lakshmi, V., Department of Microbiology, H., Neeraja, M., Department of Microbiology, H., Subbalaxmi, M. V. S., Department of Medicine, N. s. I. o. M. S., Hyderabad, Parida, M. M., Department of Virology, D. a. R. a. D. E., Gwalior, India, Dash, P. K., Department of Virology, D. a. R. a. D. E., Gwalior, India, Santhosh, S. R., Department of Virology, D. a. R. a. D. E., Gwalior, India, Rao, P. V. L., and Department of Virology, D. a. R. a. D. E., Gwalior, India. (2008) Clinical Features and Molecular Diagnosis of Chikungunya Fever from South India. *Clinical Infectious Diseases* **46**, 1436-1442
36. Jaianand K*1., R. M., Gunasekaran.P1 and Sheriff.A.K3. (2010) Molecular Detection of Chikungunya Virus Targeting the Immunodominant Envelope (E1) Gene: Current Status and Future Applications (PDF Download Available).
37. Kurosaki, Y., Martins, D. B. G., Kimura, M., Catena, A. D. S., Borba, M., Mattos, S. D. S., Abe, H., Yoshikawa, R., de Lima Filho, J. L., and Yasuda, J. (2017) Development and evaluation of a rapid molecular diagnostic test for Zika virus infection by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Sci Rep* **7**, 13503
38. Calvert, A. E., Biggerstaff, B. J., Tanner, N. A., Lauterbach, M., and Lanciotti, R. S. (2017) Rapid colorimetric detection of Zika virus from serum and urine specimens by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *PLoS One* **12**, e0185340
39. Wang, X., Yin, F., Bi, Y., Cheng, G., Li, J., Hou, L., Li, Y., Yang, B., Liu, W., and Yang, L. (2016) Rapid and sensitive detection of Zika virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *J Virol Methods* **238**, 86-93
40. Chotiwan, N., Brewster, C. D., Magalhaes, T., Weger-Lucarelli, J., Duggal, N. K., Ruckert, C., Nguyen, C., Garcia Luna, S. M., Fauver, J. R., Andre, B., Gray, M., Black, W. C. t., Kading, R. C., Ebel, G. D., Kuan, G., Balmaseda, A., Jaenisch, T., Marques, E. T. A., Brault, A. C., Harris, E., Foy, B. D., Quackenbush, S. L., Perera, R., and Rovnak, J. (2017) Rapid and specific detection of Asian- and African-lineage Zika viruses. *Sci Transl Med* **9**.



DRA. ROSALIA LIRA CARMONA

La Dra. Rosalía Lira Carmona es investigadora en la Unidad de Investigación Médica de enfermedades infecciosas y parasitarias (UIMEIP) del Hospital de Pediatría en el CMN SXXI, Instituto Mexicano del Seguro Social. Es Bióloga egresada de la Facultad de Ciencias de la UNAM, y realizó la Maestría y el

Doctorado en Ciencias en el CINVESTAV del IPN. Realizó una estancia postdoctoral total en el NIH, en el laboratorio de enfermedades parasitarias en Bethesda MD, en E.U. y otra en el Departamento de Bioquímica del IFC de UNAM. El laboratorio de Virología que dirige tiene una amplia experiencia en la estandarización de ensayos moleculares para la identificación de genotipos y análisis de genomas virales, y en la implementación de estrategias de diagnóstico, seguimiento y prevención. Actualmente esta realizando proyectos de investigación de las infecciones virales emergentes en colaboración con los médicos infectólogos y virólogos de diferentes Instituciones y Universidades. Ha publicado más de 20 artículos de investigación originales y cuenta con 1000 citas a sus trabajos. Ha dirigido 7 tesis de licenciatura, 2 de maestría y uno de doctorado y coordina un curso de Virología Médica en el Hospital Infantil de México. Pertenece al Sistema Nacional de Investigadores Nivel 1.