

Amplificación isotérmica de ácidos nucleicos tipo LAMP para la detección de Plasmodium: nueva técnica diagnóstica

*María Isabel Arroyo A. **
*Gloria Patricia Morales L. **
*Paula Andrea Sosa V. **
*Jaime Carmona-Fonseca ***
*Amanda Maestre B. ****

RESUMEN

Recientemente se introdujo en el diagnóstico de malaria una técnica llamada amplificación isotérmica de ácidos nucleicos, que usa el material genético plasmodial. Este escrito revisa la información disponible sobre amplificación isotérmica de ácidos nucleicos, especialmente en el campo del paludismo. Metodología: se revisaron las bases electrónicas Lilacs, Scielo, PubMed (Medline) y Ovid. Resultados: solo se encontraron tres referencias sobre amplificación isotérmica de ácidos nucleicos y malaria pero hubo abundante información sobre amplificación isotérmica de ácidos nucleicos en otras infecciones y campos de la medicina, en especial la infectología. La reacción de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos requiere de una ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de cadena y cuatro cebadores especialmente diseñados para reconocer seis secuencias distintas. Esto garantiza alta especificidad para la amplificación. Varias alternativas de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos se han desarrollado para la identificación de virus, bacterias, micoplasmas, protozoos, hongos y levaduras. Ventajas de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos son capacidad de amplificar ácidos nucleicos bajo condiciones isotérmicas (60-65 °C); posibilidad de lectura y semicuantificación a simple vista y de cuantificación con un turbidímetro; altas sensibilidad y especificidad y, en general, capacidad diagnóstica; rapidez, bajo costo y facilidad de aplicación; tolera los componentes de los medios de cultivo y las sustancias biológicas. Entre las desventajas están que la baja concentración de ADN molde disminuye la eficacia del reconocimiento de los cebadores; la observación de la turbidez fue menos sensible que la visualización de los productos en gel de agarosa teñidos con bromuro de etidio y es crítica la prevención de la contaminación. (MÉD.UIS. 2008;21(3):158-75).

Palabras clave: Amplificación isotérmica. Malaria. Plasmodium. Diagnóstico.

*Estudiante de Microbiología y Bioanálisis. Escuela de Microbiología. Universidad de Antioquia. Medellín.

**MD Epidemiólogo. Microbiólogo. Profesor Titular. Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina. Grupo de Investigación "Salud y Comunidad". Universidad de Antioquia. Medellín.

***MD Microbiólogo. PhD. Profesora asociada. Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina. Grupo de Investigación "Salud y Comunidad". Universidad de Antioquia. Medellín.

Correspondencia: Dra Maestre. Carrera 51 D 62-29. Facultad Medicina. Medellín (Colombia) e-mail: aemaestre@quimbaya.udea.edu.co

Artículo recibido el 9 de junio de 2008 y aceptado para publicación el 10 de diciembre de 2008

INTRODUCCIÓN

La malaria es una enfermedad que afecta anualmente entre 300 y 500 millones de personas en el mundo, particularmente en países tropicales y subtropicales; en Colombia, constituye un importante problema de salud pública. Esta enfermedad es producida en los humanos generalmente por cuatro especies de *Plasmodium*, de las cuales las de mayor prevalencia en Colombia son *P. falciparum* y *P. vivax*, 30% y 65% respectivamente; el porcentaje restante lo determinan las infecciones por *P. malariae* y las mixtas (generalmente *P. vivax* y *P. falciparum*)¹. En el

territorio colombiano, la malaria se concentra principalmente en cuatro regiones que son: Urabá-Bajo Cauca- Córdoba, Pacífico, Orinoquía y Amazonía donde *P. vivax* es la especie predominante, excepto en el Pacífico, donde predomina ampliamente *P. falciparum*¹⁻³.

Los síntomas y signos de la malaria pueden ser fácilmente confundidos con los presentados por otras enfermedades febriles, lo cual contribuye a las altas tasas de mortalidad y morbilidad en los países tropicales⁴. Es por esto que la sospecha clínica de malaria debe confirmarse mediante el uso de pruebas de laboratorio¹.

En malaria, la realización de un diagnóstico oportuno y preciso es de vital importancia, pues ayuda a reducir los índices de morbimortalidad y la administración inadecuada de los medicamentos (tratamiento sin tener en cuenta la especie), al permitir diferenciarla de otras enfermedades febriles no maláricas⁴. Además, la Organización Mundial de la Salud (OMS) destaca la importancia de pruebas de diagnóstico confiables para dirigir una terapia pronta y eficaz⁵.

El diagnóstico de la malaria ha atravesado varias etapas: la primera, basada en la búsqueda del parásito en muestras de sangre coloreadas y observadas con microscopía de luz; la segunda, con tres lustros de desarrollo, centrada en la búsqueda de antígenos específicos del parásito en la sangre del paciente, búsqueda basada en reacciones inmuno-químicas; la tercera ha hecho uso del análisis de ácidos nucleicos (ADN) del parásito y llamada genéricamente como "Reacción en Cadena de la Polimerasa" (PCR, del inglés *Polimerase Chain Reaction*), de la cual existen varias alternativas (PCR básica, PCR en tiempo real, etc.); la cuarta, objeto de esta revisión, la amplificación isotérmica de ácidos nucleicos (LAMP, del inglés, *Loop-mediated isothermal amplification*), que como la PCR usa el material genético plasmodial para hacer el diagnóstico. Este escrito revisa la información disponible y

más relevante sobre LAMP, especialmente en el campo del paludismo.

METODOLOGÍA

Se revisaron las bases electrónicas de literatura biomédica Lilacs, Scielo, PubMed (Medline) y Ovid. Se usaron estas palabras para la búsqueda: LAMP, *isothermal*; LAMP, *isothermal* con límite en *humans*; LAMP, *isothermal*, malaria. En Lilacs se buscó con LAMP, amplificación isotérmica. La búsqueda se limitó a los artículos completos en español, portugués, francés e inglés, de cualquier fecha y fue ejecutada directamente por los autores. La fecha límite de la búsqueda fue 15 de mayo de 2008.

RESULTADOS

En Lilacs no hubo referencias. En Scielo hubo una referencia (con: amplificación isotérmica). En Pubmed con LAMP, *isothermal* hubo 151 referencias, con LAMP, *isothermal* con límites: *humans*, se hallaron 73 referencias (publicadas entre 2001 y 2008); con LAMP, *isothermal*, malaria se encontraron tres referencias. En Ovid con *isothermal amplification* se hallaron 576 resultados. Solo se encontraron tres referencias sobre LAMP y malaria pero hubo abundante información sobre LAMP en otras infecciones y campos de la medicina, en especial la infectología.

MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

GOTA GRUESA-EXTENDIDO Y "PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO RÁPIDO" (DETECCIÓN DE ANTÍGENOS PLASMODIALES)

El diagnóstico de malaria se ha basado en las pruebas llamadas gota gruesa y extendido sanguíneo, que se hacen con una gota de sangre puesta en una placa de vidrio, coloreada con una de varios tipos de coloraciones y observada con microscopio de luz convencional para buscar *Plasmodium*, identificar la especie y cuantificar la parasitemia. Aunque la gota gruesa y el extendido (en adelante referidos en conjunto como gota gruesa) son muy específicos, los resultados dependen de la

calidad en la preparación de la muestra, de la habilidad del observador en la lectura y del nivel de parasitemia, entre otros factores^{4,6,7}. Dentro de las debilidades de la gota gruesa se encuentran la dificultad para la identificación de especies al romperse los eritrocitos^{5,6} y una sensibilidad limitada cuando la parasitemia es baja^{5,6,8,9}, entendiéndose por ello menos de 1000 parásitos por microlitro (<1000 parásitos asexuados/ μ L). Además, requiere de microscopio e infraestructura adecuada para mantener insumos y ese equipo, lo cual limita su uso en las regiones carentes de tales recursos⁴.

En los últimos quince años, se han desarrollado otros métodos diagnósticos como las pruebas de diagnóstico rápido, basadas en la detección de antígenos específicos del parásito, como las enzimas Lactato Deshidrogenasa (PLDH) y aldolasa de *Plasmodium*, las cuales, aunque no necesitan de un experto, pues son fáciles de ejecutar e interpretar, tienen como desventajas el alto costo, la capacidad de diagnosticar infecciones mixtas (por dos o más plasmodios) muy reducida y no permiten cuantificación parasitaria^{1,5} y, además, en su mayoría están diseñadas sólo para la identificación de *P. falciparum*, presentan un gran número de resultados falso-positivos y su sensibilidad depende de la densidad parasitaria^{4,5}. Como la vida media de los antígenos parasitarios es relativamente prolongada, estas pruebas no sirven para evaluar la respuesta al tratamiento, porque siguen dando resultado positivo durante, al menos, 7-10 días después de administrado el tratamiento. En el 2001, Rubio y colaboradores reportaron que tres pruebas rápidas de diagnóstico mostraron una alta proporción de falsos-positivos y falsos-negativos, además de una baja sensibilidad en niveles bajos de parasitemia¹⁰.

PRUEBAS CON AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Los métodos moleculares como la PCR presentan mayor sensibilidad y especificidad que la gota gruesa y permiten la diferenciación de las cuatro especies que parasitan al hombre^{1,11}.

En las técnicas basadas en PCR, dos cebadores se unen a la secuencia blanco de *Plasmodium* y polimerasas tipo Taq son usadas en ciclos sucesivos de desnaturalización y extensión de ADN para generar millones de copias de la secuencia blanco¹². Numerosos ensayos de PCR se han desarrollado para los laboratorios de diagnóstico de malaria incluyendo las técnicas PCR convencional y en tiempo real¹¹. Adicionalmente, estudios realizados en Venezuela, Estados Unidos de América y Singapur reportaron que la PCR tuvo mayor capacidad que la gota gruesa para detectar infecciones mixtas^{9,11,13}. Sin embargo, la complejidad de la técnica, el tiempo que requiere para su realización, el alto costo, la necesidad de personal experto y laboratorios con equipos especializados hacen que esta técnica no se pueda utilizar en la práctica clínica rutinaria ni en el trabajo en campo^{9,11,12,14}, todo ello con menor posibilidad en los países endémicos de paludismo en donde más se requiere hacer el diagnóstico de esta enfermedad. Estos métodos se han utilizado para el diagnóstico inicial, seguimiento de la respuesta al tratamiento, estudios sobre la variación y mutación de genes del parásito implicados en la resistencia a medicamentos y como estándares sensibles contra los cuales se han evaluado otros métodos para el diagnóstico de malaria⁵. La principal ventaja de usar la PCR es su habilidad para detectar infecciones en pacientes con bajas parasitemias; infecciones con 0,5 parásitos por microlitro pueden ser detectadas con 100% de especificidad¹⁵.

AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA DE ÁCIDOS NUCLEICOS (LAMP)

La disponibilidad de las técnicas rápidas y la PCR representan un avance importante en el diagnóstico de la infección plasmodial. No obstante, existe la necesidad de superar las limitaciones que dichas pruebas presentan y de desarrollar e implementar nuevas técnicas que reúnan las especificaciones para un diagnóstico ideal: altas sensibilidad y especificidad, capacidad para discriminar especies, límite de detección de 1 parásito/ μ L de sangre, aplicación en campo y eficiencia

(facilidad de uso e interpretación, requisitos mínimos de experiencia, rapidez y bajo costo).

Se requiere mejorar los métodos de diagnóstico y su capacidad para diferenciar las especies y cuantificar la parasitemia porque esto se relaciona con la gravedad de la enfermedad y el tratamiento específico de especie y es, por tanto, esencial para poder adoptar tratamientos correctos y oportunos. Un diagnóstico incorrecto puede retrasar el tratamiento, lo cual conduce al desarrollo de formas severas de la enfermedad y al aumento de la mortalidad.

En el 2000, Notomi y colaboradores, publicaron un estudio sobre una nueva prueba molecular llamada LAMP, que consiste en la amplificación de ácidos nucleicos en condiciones isotérmicas¹⁶. El autor revisó hace poco la información sobre la prueba¹⁷. El protocolo de laboratorio para aplicar LAMP acaba de ser examinado¹⁸ y los autores insisten en que, como la señal química de reconocimiento es altamente sensible, el sistema permite la discriminación visual de resultados sin equipos especializados costosos. La empresa Eiken Chemical Company, Ltd. es líder actual en la tecnología de LAMP.

Mecanismo y pasos de la reacción de LAMP

El método LAMP está basado en el principio de síntesis de ADN por desplazamiento de cadena, el cual es llevado a cabo por una polimerasa con alta actividad de desplazamiento de cadena y un sistema de dos cebadores internos y dos cebadores externos para reconocer un total de seis secuencias distintas en el ADN blanco¹⁶. Desde su publicación en el año 2000, varios métodos LAMP se han desarrollado para la identificación de virus, bacterias, protozoos y hongos.

En los pasos iniciales de la reacción de LAMP, se utilizan los cuatro cebadores, pero cuando se completa un ciclo de la reacción solo los cebadores internos son usados para la síntesis de ADN (Figura 1). Los cebadores internos se denominan *Forward Inner Primer* (FIP) y *Backward Inner Primer* (BIP), respectivamente,

y cada uno contiene dos secuencias distintas que corresponden a las secuencias sentido y antisentido del ADN blanco, uno para cebar en la primera etapa y el otro para auto-cebarse en etapas posteriores. Las secuencias (23-24 nucleótidos típicamente) dentro de ambos extremos de la región blanco para la amplificación en un ADN son denominadas F2c y B2, respectivamente. Dos secuencias internas (23-24 nucleótidos típicamente) a 40 nucleótidos de los extremos de F2c y B2 son designadas F1c y B1 y dos secuencias (17-21 nucleótidos) externas a los extremos de F2c y B2 son denominadas F3c y B3. Las secuencias de FIP y BIP son diseñadas así: FIP contiene F1c, un espaciador de TTTT y la secuencia F2 complementaria a F2c. BIP contiene la secuencia B1c complementaria a B1, un espaciador de TTTT y a B2. Los dos cebadores externos consisten en B3 y la secuencia F3 complementaria a F3c.

Una muestra de ADN que contiene la secuencia blanco y los cuatro cebadores se desnaturaliza con calor y rápidamente se enfría en hielo. La reacción de LAMP se inicia después por la adición de un fragmento considerable de ADN polimerasa Bst (*Bacillus stearothermophilus*) y es llevada a 65°C durante una hora¹⁶.

El cebador interno FIP se une a F2c en el ADN blanco e inicia la síntesis de la hebra complementaria. El cebador externo F3, que es unas pocas bases más cortas y está en menor concentración que FIP, lentamente se une a F3c en el ADN blanco e inicia la síntesis de ADN por desplazamiento de la hebra. Al liberar una cadena complementaria unida a FIP, puede formar una estructura enrollada (en bucle, crespado o asa; del inglés, *loop*) en un extremo. Esta hebra sencilla de ADN sirve como molde para la síntesis de ADN iniciada por BIP y la subsiguiente síntesis de ADN por desplazamiento de la hebra a partir del cebador B3 originando la producción de un ADN en forma de doble asa (*dumb-bell*), que es rápidamente convertida a una forma de bucle en tallo (*stem loop*) por la síntesis de ADN del autocebador. A continuación, esta forma

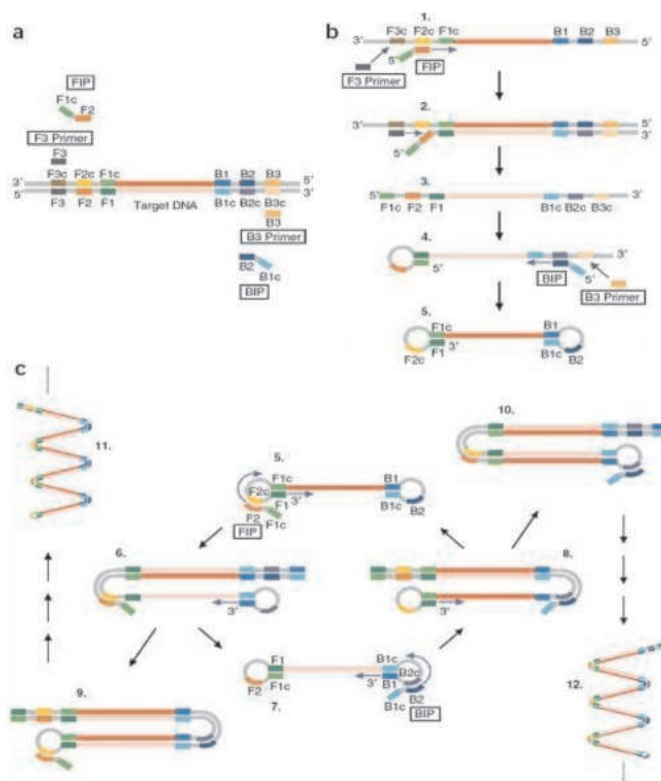


Figura 1. Fundamento de LAMP. (a) Diseño de cebadores, seis regiones diferentes constituyen el ADN blanco, F3, F2, F1, B1c, B2c y B3 del extremo 5', donde c representa una secuencia complementaria. La secuencia F1c es complementaria a F1. Dos cebadores internos (FIP y BIP) y dos externos (F3 y B3) son utilizados. FIP (o BIP) es un cebador híbrido que comprende las secuencias de F1c (B1c) y F2 (B2). (b) Paso de inicio de la estructura. La region F2 se une a su complementaria F2c en el ADN blanco y se inicia la elongación. La amplificación continúa con BIP en forma similar. F3 se une a F3c y ocurre la síntesis por desplazamiento de la hebra. La cadena alargada a partir de FIP es reemplazada y liberada para formar una estructura en forma de asa en el extremo 3'. La síntesis continúa con la hebra sencilla como molde con los cebadores BIP y B3, en la misma forma ya descrita para generar (5) la estructura con doble asa. (c) La amplificación en ciclos ocurre a partir de esta estructura como molde y la síntesis de ADN da lugar con F1 a partir de 3', mientras que la elongación inicia con la unión de FIP a la hebra sencilla a nivel de F2c. Después de varios pasos la estructura (7) es generada y ella es complementaria a la estructura 5, mientras que la 5 es producida a partir de la 8. Las estructuras 9 y 10 son producidas a partir de las 6 y 8, respectivamente, y estructuras más alargadas (11 y 12) son también fabricadas.

Adaptado de: 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):877-8217.

sirve de inicio para los ciclos de LAMP, la segunda etapa de la reacción de LAMP¹⁶.

Para iniciar los ciclos de LAMP, FIP se une a la estructura en herradura de ADN y se inicia la síntesis por desplazamiento de la hebra, lo que genera una separación intermedia en la estructura en herradura de ADN con una copia invertida adicional de la secuencia blanco en la base y un asa o bucle formada en el extremo opuesto a través de la

secuencia BIP. Posteriormente, la síntesis de ADN por desplazamiento de la hebra produce una estructura complementaria a la herradura de ADN original y un ADN en herradura reparado con una base elongada dos veces (hasta el doble de copias de la secuencia blanco) y un bucle en el extremo opuesto. Ambos productos sirven luego como molde para un cebador BIP en los ciclos siguientes de la reacción por desplazamiento de la hebra, de los cuales, una parte es denominada

elongación y reciclaje. Así, la secuencia original de LAMP es amplificada tres veces cada medio ciclo. Los productos finales son una mezcla de ADN en herradura con diferentes longitudes en su tallo y con estructuras similares a una coliflor con múltiples bucles formados por la unión entre repeticiones invertidas alternativas de la secuencia blanco en la misma cadena¹⁶.

El uso de cuatro cebadores (reconocimiento de seis secuencias diferentes) en las etapas iniciales de LAMP y dos cebadores (reconocimiento de las cuatro secuencias) durante los siguientes pasos garantiza alta especificidad para la amplificación. Por lo tanto, se espera que la selectividad del blanco

sea superior a las obtenidas por PCR y SDA (del inglés, *Strand displacement amplification*)¹⁶.

1. Procedimientos estándares de LAMP

Los procedimientos estándares de LAMP son básicamente tres: 1) Extracción del ADN o del ARN, según el agente infeccioso presente en la muestra (sangre, secreción, cultivo, etc.); 2) Amplificación del ácido nucleico; 3) Detección del ácido nucleico presente por inspección visual directa (con fluorescencia) o con turbidímetro en tiempo real (Figura 2). LAMP genera estructuras de alto peso molecular que contienen hasta 109 copias del blanco¹⁹.

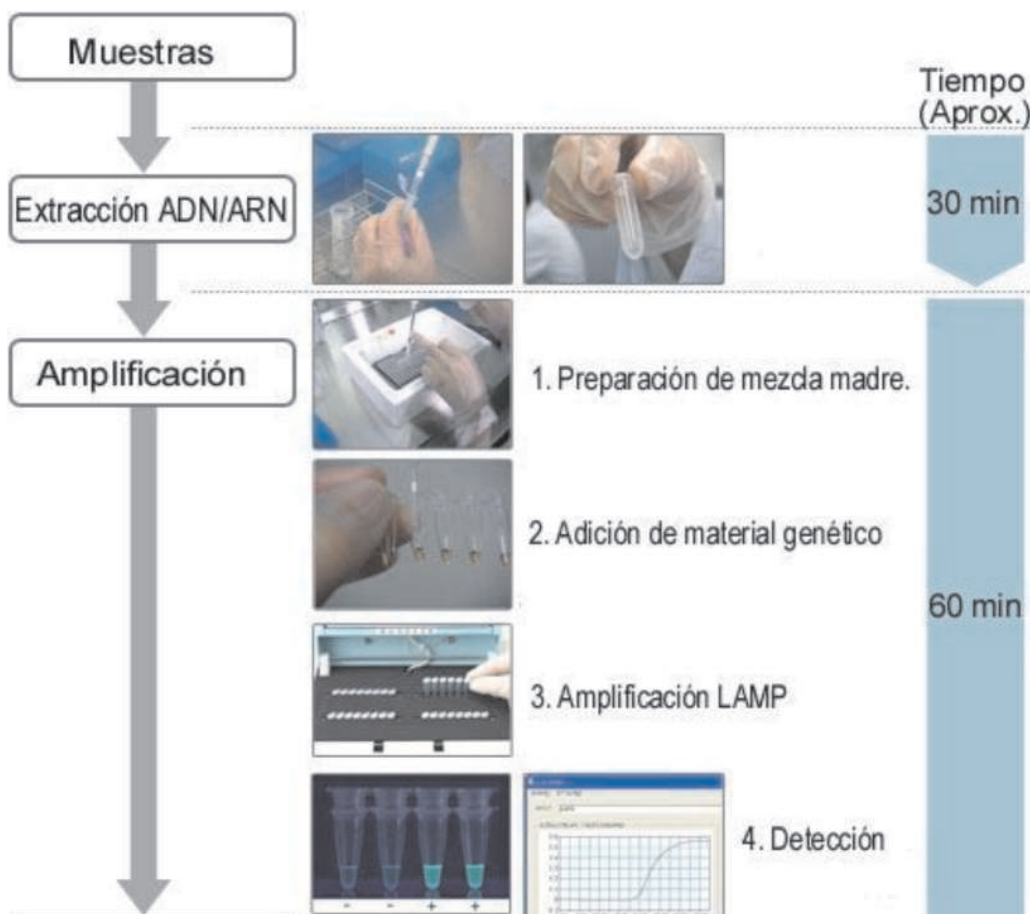


Figura 2. Procedimientos estándares de LAMP.
Adaptado de: <http://loopamp.eiken.co.jp/e/tech/index.html>

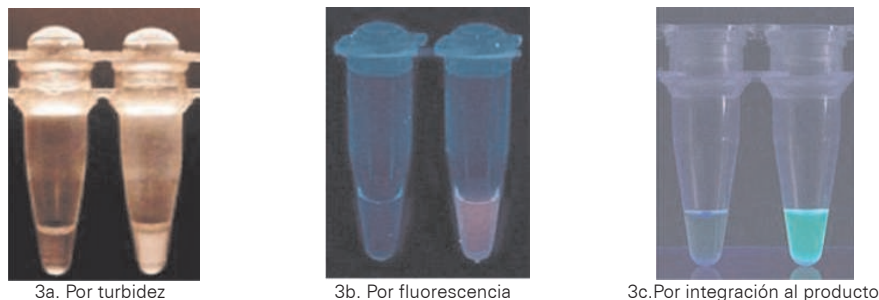


Figura 3. Métodos de detección a simple vista.

Adaptado de: http://loopamp.eiken.co.jp/e/tech/detect_index.html

2. Métodos de detección

2.1. Detección visual por turbidez

La turbidez de pirofosfato de magnesio, un subproducto de la reacción de amplificación, es producida en proporción directa con la cantidad de los productos amplificados. Debido a que la amplificación LAMP puede producir una cantidad extremadamente grande de productos amplificados, la turbidez blanca puede ser apreciada a simple vista. Según esto, la presencia de turbidez puede indicar la presencia del gen de interés y la detección visual puede lograrse (Figura 3).

2.2. Detección visual por fluorescencia

La calceína en el reactivo de detección fluorescente de LAMP fue combinada inicialmente con iones de magnesio para conseguir el efecto de amortiguación. La

amplificación genera el subproducto, iones pirofosfato, los cuales se unirán y quitarán iones manganeso de la calceína para irradiar fluorescencia. La fluorescencia es intensificada mucho más a medida que la calceína se combina con los iones magnesio. En consecuencia, la presencia de fluorescencia puede indicar la presencia del gen blanco y la detección visual puede lograrse. (Figura 3).

2.3. Detección visual por sustancias que se integran al producto.

Si el tubo con los productos de amplificación y en presencia del colorante fluorescente que se integra al ADN (bromuro de etidio, etc.), es iluminado con lámpara UV, se verá un aumento de la fluorescencia. En consecuencia, la presencia de fluorescencia puede indicar la presencia del gen blanco y la detección visual puede lograrse (Figura 3).

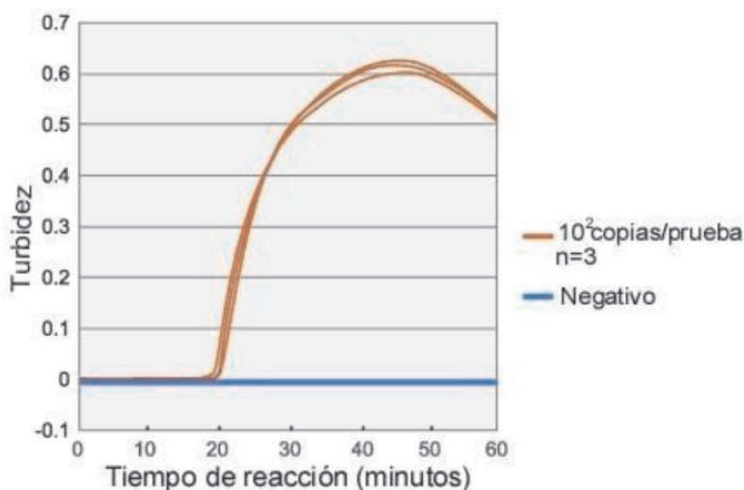


Figura 4. Detección en tiempo real de la turbidez.

Adaptado de: http://loopamp.eiken.co.jp/e/tech/detect_real.html

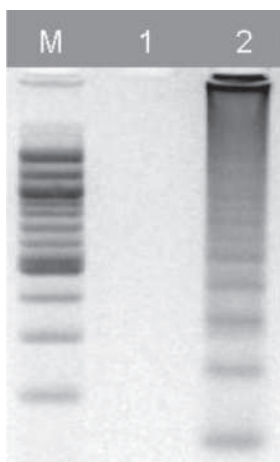


Figura 5. Detección por electroforesis de LAMP en gel de agarosa. Ejemplo de amplificación de ADN

Linea M: marcador de peso molecular de 100 pares de bases.

Linea 1, control negativo. Linea 2 con el DNA de interés

Adaptado de: http://loopamp.eiken.co.jp/e/tech/detect_electro.html; Tomita et al. 2008. 17

2.4. Detección en tiempo real por turbidez

La turbidez del pirofosfato de magnesio, un subproducto de la reacción, puede ser detectada en un turbidímetro de tiempo real (Figura 4).

2.5. Detección por electroforesis

En un gel de agarosa se pueden separar los productos de amplificación de la misma forma que en una PCR convencional (Figura 5).

3. Procedimientos de tipificación de polimorfismos de nucleótido único

Simplemente incubando ADN genómico y los reactivos, incluyendo el reactivo de detección de fluorescencia, a una temperatura constante (60°C) por un período fijo, la tipificación de los polimorfismos de nucleótido único (PNU o SNP, del inglés *SNPs typing-procedures*) puede lograrse al determinar si la amplificación ha ocurrido o no. El método LAMP permite que el proceso completo de reacción, incluyendo la denaturalización, ocurra a temperatura constante al incubar los reactivos en un baño maría. La presencia del producto amplificado puede ser detectada en un breve tiempo con el fin de proporcionar

un método simple y rápido de amplificación de genes.

El método LAMP tiene, además, estas características: 1) No requiere reactivos especiales; 2) No requiere dispositivo complejo de control de temperatura; 3) El patrón o molde puede ser detectado en forma sencilla mediante la presencia del producto amplificado. Dado que sólo necesita de equipos sencillos, puede tenerse una prueba genética rentable. Tanto la detección simple como en tiempo real son posibles. Con el uso de un cebador de asa (del inglés, *Loop primer*) se puede acortar el tiempo de amplificación en un tercio o la mitad (Figura 6).

4. Método de cuantificación

Esta se realiza mediante un turbidímetro con capacidad de realizar la cuantificación de las copias en tiempo real (Figura 7).

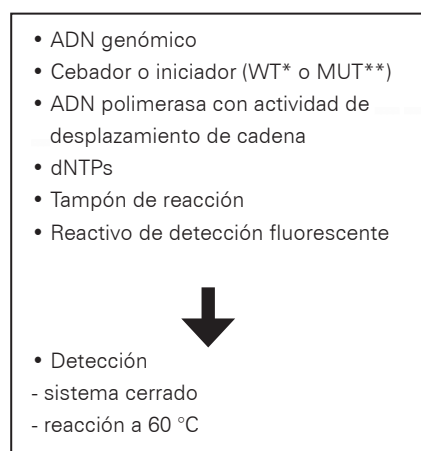


Figura 6. Procedimientos de tipificación de polimorfismos de nucleótido único.

*Tipo silvestre (no mutado)

**Tipo mutado

Adaptado de: <http://www.eiken.co.jp/en/index.html>; <http://loopamp.eiken.co.jp/e/tech/index.html>

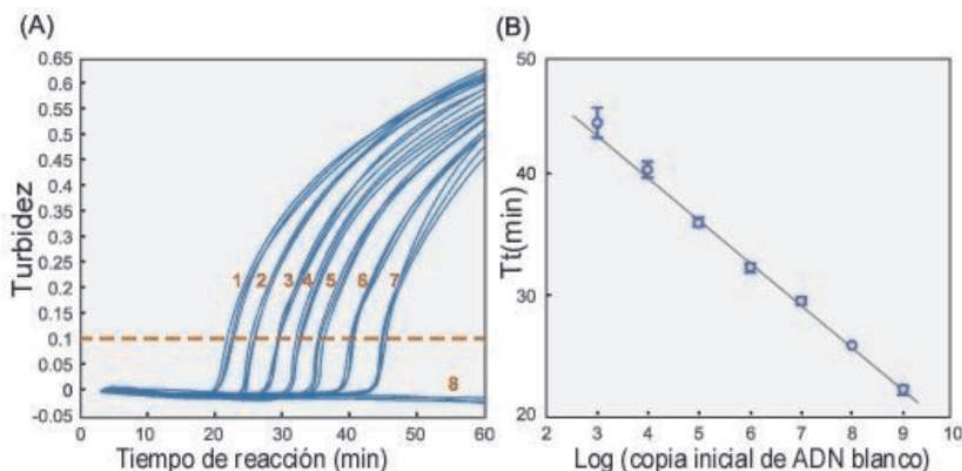


Figura 7. Método de cuantificación con turbidimetría en tiempo real.

(A) 1: 2×10^9 copias. 2: 2×10^8 copias. 3: 2×10^7 copias. 4: 2×10^6 copias.
5: 2×10^5 copias. 6: 2×10^4 copias. 7: 2×10^3 copias. 8: sin molde ADN

(B) La relación entre los umbrales de tiempo (Tt) de cada muestra y el logaritmo de la cantidad de molde inicial de ADN (promedio \pm desviación estándar: $n = 3$).

El panel A muestra los resultados de medición de la turbidez en tiempo real en las reacciones LAMP que simultáneamente empezaron a partir de diferente cantidad de molde inicial de ADN (preparado por diluciones seriadas) y el tiempo de amplificación requerido excedió la turbidez de 0,1 (Tt). El resultado indica que el valor Tt está relacionado con la cantidad inicial de molde, en el rango de 2×10^3 a 2×10^9 copias. Un gráfico de Tt versus el logaritmo de molde inicial de ADN muestra una relación lineal (panel B). Este resultado revela que la curva de calibración de la cantidad de patrón inicial, obtenida con turbidímetro en tiempo real, puede ser aplicada en el análisis cuantitativo con LAMP de los genes blanco. Adaptado de Mori Y, Kitao M, Tomita N, Notomi T. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *J Biochemical Biophysical Methods*. 2004;59:145-57.

Adaptado de: <http://loopamp.eiken.co.jp/e/tech/quantify.html>

USOS DE LAMP EN INFECTOLOGÍA Y OTROS CAMPOS

1. Virus

LAMP tiene aplicaciones para la detección de virus ADN o ARN; esta última depende de una transcriptasa reversa¹⁶. En diferentes estudios en los que se evaluó con LAMP en tiempo real el ARN de virus de influenza y Ébola, se observó que el sistema poseía una fiable especificidad y alta sensibilidad, rapidez y facilidad de aplicación^{20,21}. La mayoría de los estudios concuerdan en que la técnica LAMP es adecuada para la detección y el rápido diagnóstico de infecciones virales en el contexto clínico²⁰⁻²² y, como solo requiere un sencillo y eficaz equipo, se puede usar en campo y en regiones altamente endémicas para dichas enfermedades infecciosas^{21,22}.

Se ha usado LAMP para identificar virus existentes en Colombia como rubéola²³,

papera²⁴, sarampión²⁵, herpes simplex²⁶, varicela-zoster²⁷, citomegalovirus²⁸, Epstein-Barr²⁹, parvovirus³⁰, adenovirus³¹, dengue³², Chikungunya³³, influenza humana A^{34,35} y B³⁵, hepatitis A³⁶.

2. Bacterias y micoplasmas

En cuanto al uso de LAMP para la detección de bacterias, pueden señalarse, como ejemplos, estas: *Helicobacter pylori*³⁷, *Shigella* y *Escherichia coli* enteroinvasiva³⁸, *Escherichia coli* productora de toxina Shiga en carne³⁹, *Mycobacterium tuberculosis*^{40,41}, *M. avium* y *M. intracellulare*⁴⁰, *Pseudomonas aeruginosa*⁴², *Haemophilus influenzae*⁴³, *Bordetella pertussis*⁴⁴, *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente⁴⁵, *Staphylococcus aureus* enterotoxigénico⁴⁶. También se ha usado

LAMP para el diagnóstico de *Mycoplasma pneumoniae*⁴⁷.

Se ha ejecutado detección directa de esporas de *Bacillus anthracis* en cultivos puros, que se llevó a cabo en muy poco tiempo; el producto de amplificación se detectó por electroforesis en gel de agarosa e inspección visual de fluorescencia en un transiluminador, después de la adición de SYBER Gold, EB y EvaGree. El método podría ser explotado como una prueba de campo⁴⁸.

3. Hongos y levaduras

También se ha usado LAMP para identificar hongos⁴⁹ y levaduras⁵⁰. Inclusive para el hongo suramericano *Paracoccidioides brasiliensis* se ha aplicado esta técnica⁵¹.

4. Parásitos hemáticos, tisulares e intestinales

Kuboki y colaboradores en el 2003 usaron cebadores específicos para detectar *Trypanosoma brucei* (*T. brucei brucei*, *T. brucei gambiense*, *T. brucei rhodesiense*, y *T. evansi*) o *T. congolense*. La especificidad de LAMP fue evaluada frente a parásitos protozoarios tales como *Trypanosoma cruzi*, *Theileria orientalis*, *Babesia bigemina*, *B. bovis*, *B. caballi*, *B. equi*, *Toxoplasma gondii*, y *Neospora caninum*, pero la prueba fue negativa para dichos parásitos, lo cual indica que LAMP puede detectar *T. brucei* y *T. congolense* con alta especificidad⁵².

LAMP se usó para analizar muestras clínicas de pacientes africanos con tripanosomiasis y la compararon con la amplificación de diferentes genes por PCR convencional. La lectura del producto de amplificación de LAMP la realizaron por electroforesis en gel, visualización directa después de la adición de SYBR Green y por tinción con SYTO-9 en equipo de PCR en tiempo real, obteniendo resultados similares en los tres métodos y comprobando la especificidad de los mismos. Los resultados óptimos se obtuvieron cuando la temperatura de reacción se mantuvo en 62°C⁵³. *Pneumocystis pneumonia* también ha sido identificado con LAMP⁵⁴.

LAMP se ha usado para el diagnóstico de *Babesia gibsoni* en perros⁵⁵ y un método de

múltiples LAMP (mLAMP) fue informado como nuevo y conveniente para la simultánea detección de parásitos bovinos de *Babesia*⁵⁶. También hay datos sobre el potencial diagnóstico de LAMP en la piroplasmosis equina⁵⁷. De igual manera, parásitos intestinales como *Cryptosporidium* se han diagnosticado con LAMP⁵⁸.

5. Cáncer, artritis

LAMP también se ha empleado en el diagnóstico de enfermedades como cáncer⁵⁹ y artritis reumatoidea⁴⁹. Adicionalmente, LAMP se ha usado para identificar mutaciones puntuales en cortes tisulares preparados en parafina⁶⁰.

6. Malaria

Algunos estudios recientes han mostrado que LAMP puede constituirse en una prueba simple y confiable para el diagnóstico de malaria⁶¹⁻⁶³. Según Poon et al, en 2006, LAMP detectó *P. falciparum* directamente en sangre sometida a un tratamiento térmico⁶³. El estudio se realizó con muestras de 102 pacientes con infección por *P. falciparum*, admitidos al Hospital de Bangkok para Enfermedades Tropicales, en Tailandia. El diagnóstico de dichos pacientes fue realizado por microscopía de luz convencional (gota gruesa) en el momento de la admisión. Además, 100 muestras de donantes sanos fueron tomadas como control. Usaron PCR como método de referencia para evaluar el funcionamiento de LAMP. Los resultados fueron interpretados por turbidimetría en tiempo real y visualmente al final de la prueba. Se halló sensibilidad y especificidad de LAMP de 95% y 99%, respectivamente. Con un turbidímetro en tiempo real, LAMP puede ser usada como un método objetivo para determinar la cantidad de parásitos en muestras de sangre, puesto que los datos cuantitativos de la prueba correlacionaron con las parasitemias del parásito obtenidas por microscopía de luz. Como característica adicional de LAMP se destacó que no requirió ADN purificado para su amplificación eficiente, reduciendo el tiempo y costo para el diagnóstico de *P. falciparum*.

Además, se observó que los inhibidores presentes en sangre afectaron seriamente la amplificación de ADN en la prueba PCR, mientras que estos inhibidores tuvieron poco impacto en la reacción de LAMP⁶³. LAMP tuvo un costo diez veces menor y fue más rápida y fácil de realizar que la PCR porque empleó instalaciones mínimas de laboratorio, no necesitó termociclador, ni la purificación previa a la amplificación del ADN y el producto de la amplificación pudo ser detectado por inspección visual o por un turbidímetro⁶³.

En el 2007, Paris y colaboradores, en Bangladesh, evaluaron la exactitud de LAMP para diagnosticar malaria por *P. falciparum* al compararla con microscopía, la prueba de diagnóstico rápido PfHRP2 y utilizando PCR anidada como método de referencia. Evaluaron tres métodos diferentes de LAMP: extracción de ADN por método convencional y lectura en gel, extracción por calor y lectura visual y extracción de ADN por calor y lectura en gel. Concluyeron que el método LAMP con extracción con calor y determinación visual mostró una sensibilidad del 79,1% y especificidad del 58,3%. Dicho método tuvo la mayor incidencia de resultados falsos positivos. Cuando se usó LAMP con extracción con calor y visualización en gel de agarosa la especificidad se elevó a 83,3%. Sin embargo, el informe concluye que LAMP carece de suficiente exactitud porque muestra altos índices de falsos positivos y falsos negativos y agrega que la extracción de ADN por medio de tratamiento térmico deteriora la especificidad de la prueba⁶².

En el 2007, Han y colaboradores utilizaron LAMP para la detección de las cuatro especies de *Plasmodium* que afectan a los humanos, para lo cual se requirió de una enzima y cuatro cebadores diseñados para secuencias de genes de la subunidad de 18s del ARN ribosomal (rARN). La reacción de amplificación se puede realizar en un baño de agua que proporcione una temperatura constante a 60°C⁶¹. La técnica se aplicó a 68 muestras de sangre que fueron positivas para *Plasmodium* por gota gruesa, obtenida en clínicas de malaria en Tailandia. También se usaron 53 muestras que fueron

negativas por gota gruesa. Los resultados de LAMP fueron comparados con los de la PCR anidada y la gota gruesa. Esta última fue usada como el estándar de referencia. La reacción se llevó a cabo a 60°C por 100 minutos, y luego la enzima fue inactivada a 80°C por 2 minutos. Según los resultados de dicho estudio, los límites de detección para una señal positiva de la turbidez en LAMP fueron 10 copias para *P. malariae* y *P. ovale* y 100 copias para el género *Plasmodium*, *P. falciparum* y *P. vivax*. Cada LAMP específica de especie amplificó solamente la especie blanco y la especificidad de la amplificación fue confirmada por la digestión de los productos de LAMP con enzimas de restricción. Respecto a la microscopía, LAMP tuvo sensibilidad y especificidad levemente menores que las de la gota gruesa para identificar el género *Plasmodium*, aunque para *P. falciparum* y *P. ovale* la sensibilidad y la especificidad fueron de 100% y para *P. vivax* y *P. malariae* fueron inferiores.

Se sabe que LAMP es una prueba semicuantitativa, sin embargo, aún es necesario precisar su capacidad para cuantificar el nivel de parasitemia pues existen pocos datos al respecto. Además, el método LAMP se utilizó para cuantificar parásitos en sangre infectada, aunque según los resultados obtenidos las concentraciones bajas de ADN molde pueden retrasar el tiempo de amplificación requerido para exceder el valor del umbral de turbidez. Finalmente, los investigadores concluyeron que el método LAMP puede ser útil para el diagnóstico clínico y la vigilancia activa de *Plasmodium* en lugares donde la malaria es endémica porque tiene una sensibilidad y especificidad similares a la PCR anidada, requiere de instalaciones mínimas de laboratorio, y es más simple, y menos costoso de realizar que la PCR⁶¹. La tabla 1 permite apreciar en forma resumida los tres estudios anteriores.

VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LAMP

Pueden señalarse las ventajas y desventajas de LAMP, varias de las cuales han sido

Tabla 1. Evaluación de LAMP contra otras pruebas en malaria.

	Poon et al, 2006 ⁶³		Paris et al, 2007 ⁶²				Han et al, 2007 ⁶¹		
País	Tailandia		Bangladesh				Tailandia		
Especie	P. falciparum por GG(a)		P. falciparum				4 especies por GG(a)		
Maláricos (n)	102		67 con P. falciparum según PCR en 115 febriles				68		
No- maláricos (n)	100		no usó.				53 por GG		
Prueba (b)	PCR (r)	LAMP	PCR (r)	LAMP(c)	GG	PfHRP2	GG (r)	PCR	LAMP
Sensibilidad(b)	100	95	100	76	73	78	100	98,5	98
Especificidad(b)	100	99	100	90	100	100	100	94	94

(a) GG, Gota Gruesa.

(b) los datos de sensibilidad y especificidad según Han et al, 2007 se refieren a diagnóstico de género Plasmodium

(c) Evaluaron tres formas de LAMP: (1) extracción de ADN por método convencional y lectura en gel, (2) extracción por calor y lectura visual y (3) extracción de ADN por calor y lectura en gel. Las opciones (2) y (3) tuvieron sensibilidad y especificidad, frente a la gota gruesa, de 76 y 83% y 79 y 58%, respectivamente.

(r) indica la prueba patrón

recientemente señaladas por Snounou, un investigador del Museo de Historia Natural de París (Francia), sin nexos con los promotores de LAMP¹⁹:

- Ventajas

1. Alta capacidad diagnóstica: en varios estudios realizados el método LAMP ha sido altamente sensible, específico y extremadamente rápido en el diagnóstico molecular de infecciones. La técnica es altamente específica para la secuencia de interés, lo cual es atribuible al reconocimiento de la secuencia blanco en seis sitios independientes con cuatro cebadores²¹.

2. Amplificación isotérmica: una característica de LAMP es su capacidad de amplificar ácidos nucleicos bajo condiciones isotérmicas a temperaturas entre 60 y 65°C. La eficacia de la amplificación del método LAMP es extremadamente alta debido en parte a su naturaleza isotérmica, pues no se pierde tiempo para realizar el cambio térmico y la reacción se puede conducir en la temperatura óptima para

el funcionamiento de la enzima⁴⁸. Esta característica exige solo un bloque de calentamiento o baño maría¹⁹.

3. Rapidez, bajo costo y facilidad de aplicación: LAMP no requiere de la extracción de ADN que desperdicia tiempo y aumenta los costos, tampoco utiliza equipos sofisticados como el termociclador. Las reacciones de amplificación de LAMP se realizan entre 35 y 60 minutos. La amplificación máxima ocurre en menos de una hora. No requiere desnaturalización. Además, el molde de ADN se prepara por tratamiento directo con calor constante de las muestras de sangre^{21,61,62,64}.

4. Inspección visual y cuantificación: uno de los hechos atractivos de la prueba LAMP es su capacidad para generar una gran cantidad de precipitado blanco de pirofosfato de magnesio en una reacción positiva^{52,63,65}.

5. A medida que la reacción de LAMP progresa, los iones de pirofosfato del producto se unen a los iones de magnesio y forman un precipitado blanco de pirofosfato de magnesio.

Por lo tanto, la turbidez causada en el tubo de reacción determina el punto final del proceso de amplificación, permitiendo la visualización de los resultados positivos a simple vista⁶¹. Alternativamente, el tubo con el producto de la reacción de LAMP puede ser visualizado con una fuente de luz ultravioleta (UV), añadiendo un colorante de fluorescencia en la mezcla de la reacción. Se ha observado que la detección visual de la fluorescencia es concordante con la detección de la turbidez en tiempo real de la prueba²⁰. Además, debido a que la turbidez es proporcional a la cantidad de DNA amplificado, es posible hacer una cuantificación de los productos⁶¹.

6. Menor inhibición: los inhibidores en sangre pueden afectar seriamente la amplificación del ADN en los análisis por PCR. No se sabe, sin embargo, por qué estos inhibidores de PCR tienen poco impacto en las reacciones de LAMP; se sospecha que la ADN polimerasa Bst usada en las reacciones de LAMP es más resistente⁶³. Se ha informado que LAMP tolera mejor que la PCR los componentes de los medios de cultivo y las sustancias biológicas⁶⁶.

7. Puede usar muestra de sangre fresca o almacenada en papel de filtro^{19,61}, siendo esto último una gran ventaja sobre la gota gruesa y una enorme facilidad para el trabajo de campo con centenares de muestras captadas en pocas horas, pero esto implica que la preparación del molde se prolonga por horas¹⁹.

Desventajas

1. La baja concentración de ADN molde disminuye la eficacia del reconocimiento de los cebadores, lo cual puede causar retraso en el tiempo del umbral de detección^{22,61}.

2. Aunque LAMP es un método eficaz en la amplificación de ADN viral, la observación de la turbidez fue menos sensible que la visualización de los productos en gel de agarosa y teñidos con bromuro de etidio. Sin embargo, en comparación con la electroforesis en gel de agarosa, la prueba de turbidez permite una reducción en el tiempo de operación y

disminuye los riesgos de contaminación. Aunque recientemente se observó que el suero puede tener un ligero efecto inhibitor en las reacciones de LAMP, una pequeña cantidad de ADN se detectó directamente en el suero humano utilizando este método. No obstante se necesita un estudio más a fondo para determinar si LAMP sería útil para la detección del ADN viral en otras muestras clínicas tales como células mononucleares de sangre periférica y suero²².

3. Es crítica la prevención de la contaminación⁶².

4. Debe señalarse que los reactivos químicos necesarios en la gota gruesa pueden ser enviados, almacenados y transportados a temperatura ambiente, mientras que los de LAMP (ADN polimerasa, oligonucleótidos, etc.) deben mantenerse a -20 °C, lo que obligaría al uso de congeladores cuando se esté en el campo¹⁹.

Snounou señala estas otras ventajas/desventajas de LAMP¹⁹:

- La automatización de LAMP puede ser muy útil en estudios epidemiológicos, porque se pueden procesar las muestras en lotes, pero no en los hospitales, donde se requiere un diagnóstico individual en el momento del ingreso.

- En áreas de alta endemia, la elevada sensibilidad de LAMP puede resultar contraproducente, debido a que una proporción variable de personas alberga infecciones inaparentes.

- La cuantificación de parásitos con LAMP exige costosos turbidímetros.

- LAMP puede aplicarse para evaluar el efecto de medidas de control, sobre todo si llega a desarrollarse para detectar ADN plasmodial en muestras de saliva, como lo hace la PCR agregado⁶⁷.

- LAMP debería ser ideal para estudios de transmisión con análisis de vectores, donde un

gran número de mosquitos debe ser evaluado, y que ha sido un gran impedimento.

TAREAS FUTURAS

Desde el punto de vista técnico, la validación de la solidez y desempeño de LAMP tiene un largo camino por recorrer. El uso de sangre almacenada en papel de filtro⁶¹ es una importante ventaja para recolección de muestras, pero la preparación del ADN molde se extiende por horas. La estrategia de una preparación simple del molde, aplicada por Poon y colaboradores 2006⁶³, requiere más validación con relación a la pérdida de especificidad y sensibilidad. El desempeño del protocolo LAMP debe ser rigurosamente validado con un panel de ADN moldes y diluciones de ellos preparados de las muestras de sangre infectada¹⁹.

Desde el punto de vista práctico, conviene considerar las situaciones donde el reemplazo de la gota gruesa por el diagnóstico molecular puede ser útil. El diagnóstico pronto y preciso debe ser de beneficio en ambientes clínicos y la velocidad y eficacia de LAMP supera muchas de las preguntas planteadas en este contexto con respecto a la amplificación con PCR⁶⁸. Las instalaciones de salud, grandes o pequeñas, asentadas en países pobres o ricos, deberían beneficiarse de las ventajas de LAMP en cuanto al tiempo requerido para el diagnóstico¹⁹.

Snounou concluye que LAMP es la primera prueba molecular para diagnóstico de malaria que es barata (menos de US\$1 la reacción), sólida y sencilla de ejecutar, que supera a la gota gruesa en especificidad y sensibilidad y la iguala en velocidad de producción del resultado. Esos resultados ofrecen por primera vez una posibilidad real de un importante papel de las técnicas moleculares en la lucha contra la malaria. Sin embargo, recomienda proceder con cautela y no descartar aun el uso de microscopios de luz y de microscopistas expertos. Adicionalmente concluye que el entusiasmo por la adopción masiva de LAMP para el diagnóstico de malaria

debe abrirse a algunas consideraciones particulares¹⁹.

Debido a la oportunidad que ofrece LAMP para el diagnóstico de malaria, es necesario verificar si la técnica es reproducible en Colombia, considerando que la población circulante de *Plasmodium* en el país es genéticamente muy homogénea⁶⁹, pero es diferente a la de otros países en los cuales existe alta variación genética del parásito. Se requiere medir la concordancia de LAMP respecto a los resultados de las pruebas realizadas en otros países, teniendo en cuenta que hasta el momento en Colombia no se conocen estudios al respecto. Hay que evaluar la reproducibilidad, capacidad diagnóstica y realizar un análisis costo-efectivo de LAMP frente a gota gruesa y PCR en el laboratorio y en el campo (directamente en zonas endémicas de malaria). Actualmente nuestro grupo de investigación adelanta una evaluación de campo de LAMP comparada con la gota gruesa y la PCR.

Además, desde su publicación en el año 2000, varias alternativas de LAMP se han desarrollado para la identificación de virus, bacterias, micoplasmas, protozoos, hongos y levaduras, lo que ofrece una excelente oportunidad para estandarizar esta técnica y tratar, luego, de aplicarla en las zonas endémicas de paludismo, que también lo son de muchas infecciones de diversa etiología, lo cual permitiría disponer de una herramienta de elevada capacidad diagnóstica y desempeño eficaz y eficiente en áreas como Urabá, Bajo Cauca, la costa del Pacífico, los Llanos Orientales, la Amazonía, entre otras. Esas alternativas son relativamente simples, en general basta cambiar los cebadores, lo cual carece de problemas científico-técnicos y por tal razón es importante explorar la posibilidad de usar LAMP no solo en malaria sino al menos en muchos otros campos de la infectología, pues también se han explorado otros como cáncer, artritis reumatoidea, etc.

Aparte de la aplicación en humanos, LAMP ha demostrado su utilidad en el diagnóstico de infecciones en animales, con lo que el potencial de esta técnica en las zonas maláricas del país

se expande grandemente. Es necesario evaluar en Colombia la prueba en este campo.

CONCLUSIONES

Está disponible LAMP, una nueva técnica de diagnóstico de infecciones y otros problemas, incluido el diagnóstico de *Plasmodium* y malaria, la cual es altamente sensible y específica y permite la discriminación visual de resultados sin equipos especializados costosos. La técnica es potencialmente automatizable.

LAMP es aplicable en las condiciones de campo imperantes en las zonas endémicas de malaria, tiene alta eficacia por su naturaleza isotérmica, tiene bajo costo y facilidad de aplicación. LAMP puede usar muestra de sangre fresca o almacenada en papel de filtro.

La cuantificación de parásitos con LAMP exige costosos turbidímetros, lo cual es una desventaja actual, comparada con la gota gruesa. La baja concentración de ADN molde disminuye la eficacia del reconocimiento de los cebadores, lo cual puede causar retraso en el tiempo del umbral de detección y la observación de la turbidez es menos sensible que la visualización de los productos en gel de agarosa y teñidos con bromuro de etidio. Urge medir la concordancia de LAMP frente a los resultados logrados en otros países.

FINANCIACIÓN

Universidad de Antioquia.

DECLARACIÓN DE CONFLICTOS

Ninguno conocido.

SUMMARY

Isothermal nucleic acid amplification type LAMP for the detection of Plasmodium: A new diagnostic technique

Introduction: isothermal nucleic acid amplification (LAMP) was recently reported in the diagnosis of malaria. This uses plasmodial DNA to confirm the diagnosis. This paper reviews the most relevant available information on LAMP, especially in the field of malaria. Methodology: the electronic databases Lilacs, Scielo, PubMed (Medline) and Ovid, were reviewed. Results:

only three references were found on LAMP and malaria but there was abundant information on LAMP and other infections in fields of medicine, mainly in infectious diseases. The LAMP reaction requires a strand displacement DNA polymerase and a system of four primers specifically designed to recognize a total of six different sequences in the DNA target. This guarantees high specificity. Several alternatives of LAMP have been developed to identify viruses, bacteria, mycoplasma, protozoa, fungi and yeast. Advantages of LAMP: ability to amplify nucleic acids under isothermal conditions (60 and 65 °C); possibility of semi-quantitative reading by observation and quantitative interpretation using a turbidimeter; high sensitivity and specificity and, in general, diagnostic capacity, speed, low cost and ease of implementation; better performance than PCR when culture media and biological substances are processed. Disadvantages: the low concentration of DNA template reduces the primers efficacy recognition; turbidimetry was less sensitive than the agarose gel and ethidium bromide analysis, prevention of contamination is critical. (MÉD. UIS. 2008;21(3):158-75). Key words: Isothermal amplification. Malaria. Plasmodium. Diagnosis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Maestre-Buitrago A. Plasmodios. Microbiología de las infecciones humanas. Vol. 1. Medellín: CIB; 2007.340-51.
2. Carmona-Fonseca J. La malaria en Colombia, Antioquia y las zonas de Urabá y Bajo Cauca: panorama para interpretar la falla terapéutica antimalárica. Parte 1. Iatreia 2003;16:299-318.
3. Carmona-Fonseca J. La malaria en Colombia, Antioquia y las zonas de Urabá y Bajo Cauca: panorama para interpretar la falla terapéutica antimalárica. Parte 2. Iatreia. 2004;17:34-53.
4. Bell D, Barnwell J. Ensuring quality and access for malaria diagnosis: how can it be achieved?. Nat Rev Microbiol. 2006;4:682-95.
5. Moody A. Rapid diagnostic tests for malaria parasites. Clin Microbiol Rev 2002;15:66-78. Comentario en: Clin Microbiol Rev 2002;15(4):771; discusión 771-2.
6. Oyedeji I, Awobode H, Monday G, Kendjo E, Kremsner P, Kun J. Comparison of PCR-based detection of *Plasmodium falciparum* infections based on single and multicopy genes. Malaria J. 2007;6:112.
7. Schoone Gc, Oskam L, Kroon N, Schallig H, Omar S. Detection and quantification of *Plasmodium falciparum* in blood samples using quantitative nucleic acid sequence-based amplification. J Clin Microbiol. 2000;38:4072-5.
8. Coleman R, Sattabongkot J, Promstaporn S, Maneechai N, Tippayachai B, Kengluetcha A, et al. Comparison of PCR and microscopy for the detection of asymptomatic malaria in a *Plasmodium falciparum/vivax* endemic area in Thailand. Malaria J. 2006;5:121.

9. Rodolfo H, De Donato M, Mora R, González L, Contreras C. Comparison of the diagnosis of malaria by microscopy, immunochromatography and PCR in endemic areas of Venezuela. *Braz J Med Biol Res.* 2007;40:535-43.
10. Rubio J, Buhigas I, Subirats M, Baquero M, Puente S, Benito A. Limited level of accuracy provided by available rapid diagnosis tests for malaria enhances the need for PCR-based reference laboratories. *J Clin Microbiol* 2002;39:2736-7. Comentario en: *J Clin Microbiol.* 2002;40(2):736-7.
11. Johnston S, Pieniazek N, Xayavong M, Slemenda S, Wilkins P, Da Silva A. PCR as a confirmatory technique for laboratory diagnosis of malaria. *J Clin Microbiol.* 2006;44:1087-9. .
12. Makler M. A review of practical techniques for the diagnosis of malaria. *Ann Trop Med Parasitol.* 1998;92:419-33.
13. Tham J, Lee S, Tan T, Ting R, Kara U. Detection and species determination of malaria parasites by PCR: comparison with microscopy and with ParaSight-F and ICT Malaria Pf tests in a clinical environment. *J Clin Microbiol.* 1999;37:1269-73.
14. Boonma P, Christensen P, Suwanarusk R, Price R, Russell B, Lek-Uthai U. Comparison of three molecular methods for the detection and speciation of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*. *Malaria J.* 2007;6:124.
15. Gama BE, Silva-Pires F, Lopes M, Cardoso M, Britto C, Torres K, et al. Real-time PCR versus conventional PCR for malaria parasite detection in low-grade parasitemia. *Exp Parasitol.* 2007;16:427-32.
16. 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:E63.
17. Notomi T. [Loop-mediated isothermal amplification] [artículo en japonés; resumen en inglés]. *Nippon Rinsho.* 2007;65:957-61.
18. Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature Protocols.* 2008;3:877-82.
19. Snounou G. Rapid, sensitive and cheap molecular diagnosis of malaria: is microscopy on the way out? *Future Microbiology.* 2007;2:477-80.
20. Imai M, Ninomiya A, Minekawa H, Notomi T, Ishizaki T, Tashiro M, et al. Development of H5-RT-LAMP (loop-mediated isothermal amplification) system for rapid diagnosis of H5 avian influenza virus infection. *Vaccine.* 2006;24:6679-82
21. Kurosaki Y, Takada A, Ebihara H, Grolla A, Kamo N, Feldmann H, et al. Rapid and simple detection of Ebola virus by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. *J Virol Methods.* 2007;141:78-83.
22. Kuhara T, Yoshikawa T, Ihira M, Watanabe D, Tamada Y, Katano H, et al. Rapid detection of human herpesvirus 8 DNA using loop-mediated isothermal amplification. *J Virol Methods.* 2007;144:79-85.
23. Mori N, Motegi Y, Shimamura Y, Ezaki T, Natsumeda T, Yonekawa T, et al. Development of a new method for diagnosis of rubella virus infection by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol.* 2006;44:3268-73.
24. Okafuji T, Yoshida N, Fujino M, Motegi Y, Ihara T, Ota Y, et al. Rapid diagnostic method for detection of mumps virus genome by loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol.* 2005;43:1625-31.
25. Fujino M, Yoshida N, Yamaguchi S, Hosaka N, Ota Y, Notomi T, et al. A simple method for the detection of measles virus genome by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *J Med Virol.* 2005;76:406-13.
26. Kaneko H, Iida T, Aoki K, Ohno S, Suzutani T. Sensitive and rapid detection of herpes simplex virus and varicella-zoster virus DNA by loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol.* 2005;43:3290-6.
27. Enomoto Y, Yoshikawa T, Ihira M, Akimoto S, Miyake F, Usui C, et al. Rapid diagnosis of herpes simplex virus infection by a loop-mediated isothermal amplification method. *J Clin Microbiol.* 2005;43:951-5.
28. Suzuki R, Yoshikawa T, Ihira M, Enomoto Y, Inagaki S, Matsumoto K, et al. Development of the loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of cytomegalovirus DNA. *J Virol Methods.* 2006;132:216-21.
29. Iwata S, Shibata Y, Kawada J, Hara S, Nishiyama Y, Morishima T, et al. Rapid detection of Epstein-Barr virus DNA by loop-mediated isothermal amplification method. *J Clin Virol.* 2006;37:128-33.
30. Yamada Y, Itoh M, Yoshida M. Sensitive and rapid diagnosis of human parvovirus B19 infection by loop-mediated isothermal amplification. *Br J Dermatol.* 2006;155:50-5.
31. Wakabayashi T, Yamashita R, Kakita T, Kakita M, Oshika T. Rapid and sensitive diagnosis of adenoviral keratoconjunctivitis by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. *Curr Eye Res.* 2004;28(6):445-50.
32. Parida M, Horioko K, Ishida H, Dash P, Saxena P, Jana A, et al. Rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes by a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. *J Clin Microbiol.* 2005;43:2895-903.
33. Parida M, Santhosh S, Dash P, Tripathi N, Saxena P, Ambuj S, et al. Development and evaluation of reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and real-time detection of Japanese encephalitis virus. *J Clin Microbiol.* 2006;44:4172-8.
34. Poon L, Leung C, Chan K, Lee J, Yuen K, Guan Y, et al. Detection of human influenza A viruses by loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol.* 2005;43:427-30.

35. Ito M, Watanabe M, Nakagawa N, Ihara T, Okuno Y. Rapid detection and typing of influenza A and B by loop-mediated isothermal amplification: comparison with immunochromatography and virus isolation. *J Virol Methods*. 2006;135:272-5.
36. Yoneyama T, Kiyohara T, Shimasaki N, Kobayashi G, Ota Y, Notomi T, et al. Rapid and real-time detection of hepatitis A virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *J Virol Methods*. 2007;145:162-8.
37. Minami M, Ohta M, Ohkura T, Ando T, Torii K, Hasegawa T, et al. Use of a combination of brushing technique and the loop-mediated isothermal amplification method as a novel, rapid, and safe system for detection of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol*. 2006;44:4032-7.
38. Song T, Toma C, Nakasone N, Iwanaga M. Sensitive and rapid detection of Shigella and enteroinvasive *Escherichia coli* by a loop-mediated isothermal amplification method. *FEMS Microbiol Lett*. 2005;243:259-63.
39. Hara -K, Y, Niizuma J, Goto I, Iizuka S, Kaji Y, Kamakura K, et al. Surveillance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef with effective procedures, independent of serotype. *Foodborne Pathog Dis*. 2008;5:97-103.
40. Iwamoto T, Sonobe T, Hayashi K. Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis complex*, *M. avium*, and *M. intracellulare* in sputum samples. *J Clin Microbiol*. 2003;41:2616-22.
41. Boehme C, Nabeta P, Henostroza G, Raqib R, Rahim Z, Gerhardt M, et al. Operational feasibility of using loop-mediated isothermal amplification for diagnosis of pulmonary tuberculosis in microscopy centers of developing countries. *J Clin Microbiol*. 2007;45:1936-40.
42. Sekiguchi J, Asagi T, Miyoshi-Akiyama T, Kasai A, Mizuguchi Y, Araake M, et al. Outbreaks of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in community hospitals in Japan. *J Clin Microbiol*. 2007;45:979-89.
43. Torigoe H, Seki M, Yamashita Y, Sugaya A, Maeno M. Detection of Haemophilus influenzae by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of the outer membrane protein P6 gene. *Jpn J Infect Dis*. 2007;60:55-8.
44. Kamachi K, Toyozumi-Ajisaka H, Toda K, Soeung S, Sarath S, Nareth Y, et al. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid diagnosis of *Bordetella pertussis* infection. *J Clin Microbiol*. 2006;44:1899-902.
45. Misawa Y, Yoshida A, Saito R, Yoshida H, Okuzumi K, Ito N, et al. Application of loop-mediated isothermal amplification technique to rapid and direct detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in blood cultures. *J Infect Chemother*. 2007;13:134-40.
46. Goto M, Hayashidani H, Takatori K, Hara-Kudo Y. Rapid detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* harbouring genes for four classical enterotoxins, SEA, SEB, SEC and SED, by loop-mediated isothermal amplification assay. *Lett Appl Microbiol*. 2007;45:100-7.
47. Saito R, Misawa Y, Moriya K, Koike K, Ubukata K, Okamura N. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Med Microbiol*. 2005;54(Pt 11):1037-41.
48. Qiao Y, Guo Y, Zhang X, Zhou Y, Zhang Z, Wei H, et al. Loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of *Bacillus anthracis* spores. *Biotechnol Lett*. 2007;29:1939-46.
49. Nakamura N, Ito K, Akahashi M, Hashimoto K, Kawamoto M, Yamanaka M, et al. Detection of six single-nucleotide polymorphisms associated with rheumatoid arthritis by a loop-mediated isothermal amplification method and an electrochemical DNA chip. *Anal Chem*. 2007;79:9484-93.
50. Hayashi N, Arai R, Tada S, Taguchi H, Ogawa Y. Detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeasts with a loop-mediated isothermal amplification method. *Food Microbiol*. 2007;24:778-85.
51. Endo S, Komori T, Ricci G, Sano A, Yokoyama K, Ohori A, et al. Detection of gp43 of *Paracoccidioides brasiliensis* by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. *FEMS Microbiol Lett*. 2004;234:93-7.
52. Kuboki N, Inoue N, Sakurai T, Di Cello F, Grab D, Suzuki H, et al. Loop-mediated isothermal amplification for detection of African trypanosomes. *J Clin Microbiol*. 2003;41:5517-24.
53. Njirua Z, Mikosza A, Matovu E, Enyaru J, Ouma J, Kibona S, et al. African trypanosomiasis: sensitive and rapid detection of the sub-genus Trypanozoon by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of parasite DNA. *Int J Parasitol*. 2008;38:589-99.
54. Uemura N, Makimura K, Onozaki M, Otsuka Y, Shibuya Y, Yazaki H, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification method for diagnosing *Pneumocystis pneumonia*. *J Med Microbiol*. 2008;57(Pt 1):50-7.
55. Ikadai H, Tanaka H, Shibahara N, Matsuo A, Uechi M, Itoh N, et al. Molecular evidence of infections with Babesia gibsoni parasites in Japan and evaluation of the diagnostic potential of a loop-mediated isothermal amplification method. *J Clin Microbiol*. 2004;42:2465-9.
56. Iseki H, Alhassan A, Ohta N, Thekisoe O, Yokoyama N, Inoue N, et al. Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification (mLAMP) method for the simultaneous detection of bovine Babesia parasites. *J Microbiol Methods*. 2007;71(3):281-7.

57. Alhassan A, Thekisoe O, Yokoyama N, Inoue N, Motloang M, Mbatia P, et al. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for diagnosis of equine piroplasmiasis. *Vet Parasitol.* 2007;143:155-60.
58. Karanis P, Thekisoe O, Kiouptsi K, Ongerth J, Igarashi I, Inoue N. Development and preliminary evaluation of a loop-mediated isothermal amplification procedure for sensitive detection of cryptosporidium oocysts in fecal and water samples. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73:5660-2.
59. Horibe D, Ochiai T, Shimada H, Tomonaga T, Nomura F, Gun M, et al. Rapid detection of metastasis of gastric cancer using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Int J Cancer.* 2007;120:1063-9.
60. Ikeda S, Takabe K, Inagaki M, Funakoshi N, Suzuki K. Detection of gene point mutation in paraffin sections using in situ loop-mediated isothermal amplification. *Pathol Int.* 2007;57:594-9.
61. Han E, Watanabe R, Sattabongkot J, Khuntirat B, Sirichaisinthop J, Iriko H, et al. Detection of four *Plasmodium* species by genus- and species-specific Loop-Mediated Isothermal Amplification for clinical diagnosis. *J Clin Microbiol.* 2007;45:2521-8.
62. Paris D, Imwong M, Faiz A, Hasan M, Yunus E, Silamut K, et al. Loop-Mediated Isothermal PCR (LAMP) for the diagnosis of falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;77:972-6.
63. Poon L, Wong B, Ma E, Chan Q, Chow L, Abeyewickreme W, et al. Sensitive and inexpensive molecular test for falciparum malaria: detecting *Plasmodium falciparum* DNA directly from heat-treated blood by loop-mediated isothermal amplification. *Clin Chem.* 2006;52:303-6.
64. Nagamine K, Watanabe K, Ohtsuka K, Hase T, Notomi T. Loop-mediated Isothermal Amplification Reaction using a non-denatured template. *Clinical Chemistry.* 2001;47:1742-3.
65. Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate reaction. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;289:150-4.
66. Kaneko H, Kawana T, Fukushima E, Suzutani T, Kaneko H, Kawana T, et al. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. *J Biochem Biophys Methods.* 2007;70:499-501.
67. Mharakurwa S, Simoloka C, Thuma PE, Shiff CJ, Sullivan DJ. PCR detection of *Plasmodium falciparum* in human urine and saliva samples. *Malaria J.* 2006;5:103.
68. Hanscheid T, Grobusch M. How useful is PCR in the diagnosis of malaria? *Trends Parasitol.* 2002;18:395-8.
69. Montoya L, Maestre A, Carmona J, Lopes D, Do Rosario V, Blair S. *Plasmodium falciparum*: diversity studies of isolates from two Colombian regions with different endemicity. *Exp Parasitol.* 2003;104:14-9.