

# Evaluación de un ensayo de amplificación isotérmica mediada por bucles (LAMP) para detectar el gen *stx*<sub>2</sub> en aislamientos clínicos de

## *Escherichia coli* en Argentina

Leiva, CL.<sup>1</sup>; Rivero, R.<sup>2</sup>; Redondo, L.<sup>1</sup>; Fernández Miyakawa, M.<sup>1</sup>; Bruno, S.<sup>3</sup> y Rogé, A.<sup>3</sup>

1) Instituto de Patobiología, CICVyA, INTA; 2) Instituto Nacional de Parasitología, ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán";  
3) Servicio de Antígenos y Antiseros, Instituto Nacional de Producción de Biológicos, ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán"  
leiva.carlos@inta.gob.ar

### Introducción

*Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC del inglés Shiga toxin-producing *Escherichia coli*) es un patógeno de transmisión alimentaria que puede producir enfermedades en humanos tales como diarreas hemorrágicas así como síndrome urémico hemolítico (1). Dos tipos diferentes de toxinas Shiga han sido descritos (Stx1 y Stx2) que junto a otros factores de virulencia facilitan la colonización efectiva en el tracto intestinal y ocasionan las enfermedades antes mencionadas (2). Actualmente, con el fin de identificar STEC existen ensayos de amplificación de ácidos nucleicos tales como PCR. Sin embargo, el uso de costosos termocicladores es un requisito indispensable, lo cual limita su amplia aplicabilidad. La amplificación isotérmica mediada por bucles (LAMP del inglés *Loop-mediated isothermal amplification*) es un método de amplificación de ácidos nucleicos simple, específico, económico y rápido en comparación con el ensayo de PCR convencional (3). De esta manera, en el presente trabajo se evaluó el ensayo LAMP para la detección del gen *stx*<sub>2</sub> de *E. coli* y se compararon los resultados obtenidos con el ensayo de PCR.

### Materiales y métodos

La mezcla de reacción de LAMP (25 µl) consistió en *buffer* de reacción ThermoPol 1X, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, 1,4 mM de cada dNTP, *primers* internos FIP/BIP 1,8 mM, *primers* externos FOP/BOP 0,1 mM, *primers* de unión al bucle FLP/BLP 1 mM, ADN polimerasa *Bst* 2.0 WarmStart 8 U y 2 µl de ADN molde. La reacción fue llevada a cabo en un termobloque a 65°C durante 1 hr. y posteriormente a 80°C por 2 min. para terminar la reacción. El producto de amplificación fue detectado a simple vista mediante el agregado de 1 µl SYBR® Green I 1000X, así como también mediante electroforesis en gel de agarosa (1,5%) junto con la posterior tinción con bromuro de etidio y visualización bajo luz UV.

### Resultados

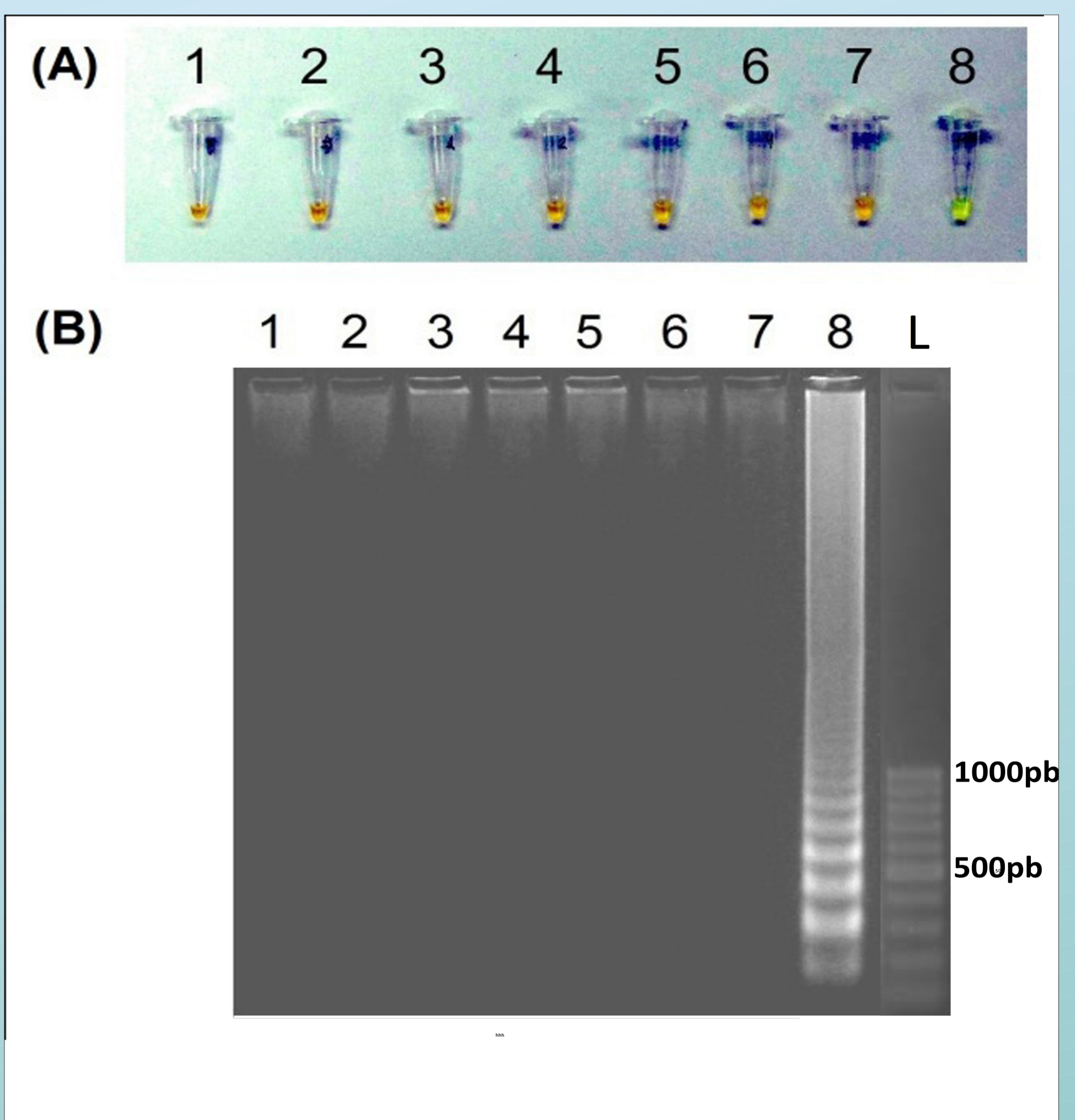
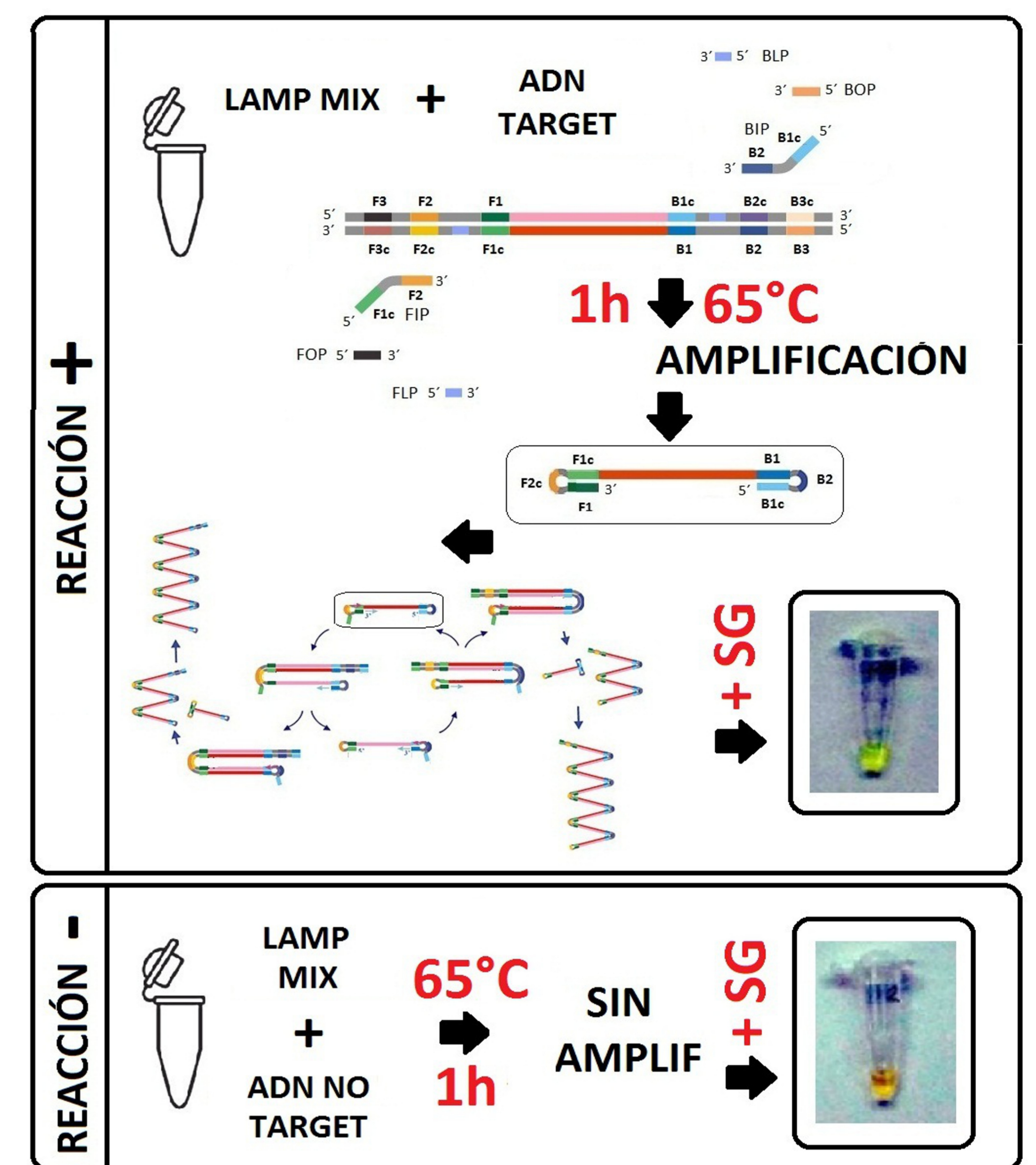
De un total de 61 aislamientos de *E. coli* analizados, no se observaron resultados falsos positivos ni falsos negativos mediante el ensayo LAMP. Para determinar la especificidad del ensayo LAMP, fueron usadas como controles negativos diferentes especies de bacterias. Cuando el reactivo SYBR® Green I fue agregado, el color de la solución fue verde en las reacciones positivas, mientras que en las negativas se mantuvo naranja. A su vez, al revelarse las muestras positivas mediante electroforesis en gel de agarosa se observó el patrón "escalonado", característico de las reacciones LAMP.

### Conclusiones

En este sentido, mediante el ensayo LAMP se obtuvo una especificidad de 100% en comparación con el ensayo de PCR convencional. Nuestros resultados demuestran que el ensayo LAMP es una herramienta rápida, específica y eficiente para la detección del gen *stx*<sub>2</sub> en *E. coli* aisladas a partir de muestras clínicas. Probamos que LAMP sólo requiere el uso de un termobloque sin el requerimiento de equipos de alto costo como termocicladores y transiluminadores. De esta manera, la inspección de resultados puede llevarse a cabo a simple vista sin la necesidad de realizar electroforesis en gel. En conclusión, el ensayo LAMP resulta adecuado como herramienta adicional de detección para laboratorios clínicos sin acceso a equipamiento sofisticado y costoso.

#### REFERENCIAS

- 1 - Karmali M. Infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 1989; 2: 15-38.
- 2 - Favier G, Estrada C, Cortiñas T, Escudero M. Detection and characterization of Shiga toxin producing *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., and *Yersinia* strains from human, animal, and food samples in San Luis, Argentina. Int J Microbiol. 2014; 284649.
- 3 - Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop-Mediated Isothermal Amplification of DNA. Nucleic Acids Res. 2000; 28 (12): e63.



Especificidad de LAMP para la detección del gen *stx*<sub>2</sub>. (A) Producto de amplificación detectado a simple vista con SYBR® Green I. Tubo 1: *S. salamae*; 2: *S. enterica*; 3: *S. flexneri*; 4: *S. sonnei*; 5: non-STEC O4:H1; 6 y 7: control sin ADN molde; 8: control positivo. (B) Producto de amplificación detectado mediante electroforesis en gel de agarosa. Calle 1: *S. salamae*; 2: *S. enterica*; 3: *S. flexneri*; 4: *S. sonnei*; 5: non-STEC O4:H1; 6 y 7: control sin ADN molde; 8: control positivo; L: marcador de peso molecular.