

**Universidad ORT Uruguay
Facultad de Ingeniería**

**INCORPORACIÓN DE LA TECNOLOGÍA LAMP AL
DIAGNÓSTICO DE *E. coli* UROPATÓGENA.**

Entregado como requisito para la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

Felipe Burgos - 208166

**Tutor: Dra. Paola Scavone
2022**

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Felipe Burgos declaró que el trabajo que se presenta en esta obra es de propia mano. Se asegura que:

- ❖ La obra fue producida en su totalidad mientras realizamos el Proyecto de grado;
- ❖ Cuando hemos consultado el trabajo publicado por otros, lo hemos atribuido con claridad;
- ❖ Cuando hemos citado obras de otros, hemos indicado las fuentes. Con excepción de estas citas, la obra es enteramente nuestra;
- ❖ En la obra, hemos acusado recibo de las ayudas recibidas;
- ❖ Cuando la obra se basa en trabajo realizado conjuntamente con otros, hemos explicado claramente qué fue contribuido por otros, y qué fue construido por nosotros;
- ❖ Ninguna parte de este trabajo ha sido publicada previamente a su entrega, excepto donde se han realizado las aclaraciones correspondientes.



Felipe Burgos

12 de Julio 2022

DEDICATORIA

Quiero dedicar mi trabajo final de carrera a mi familia y amigos que me brindaron su apoyo durante esta etapa de mi vida, sin las cuales esto no hubiera sido posible.

AGRADECIMIENTOS

En mi formación han contribuido muchas personas como al desarrollo y conclusión de este trabajo final de grado. En primer lugar quiero agradecer al Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable y especialmente a mi tutora Dra. Paola Scavone, por brindarme la posibilidad de llevar a cabo este proyecto y compartir su metodología de trabajo y conocimientos necesarios para lograrlo.

También a todos los integrantes del grupo de investigación, especialmente a la Dra. Luciana Robino, que aportó ideas, conocimiento, ayuda y enseñanzas que fueron fundamentales en distintas etapas del trabajo. Además de sus contactos como médica que han logrado conseguir los materiales para una validación exitosa de la técnica.

A la Universidad ORT del Uruguay por brindarme la educación y ambiente necesario para desarrollarme en mi carrera profesional.

RESUMEN

Actualmente las infecciones de tracto urinario (ITU) son de las más frecuentes a nivel mundial, afectando a más de 150 millones de personas por año. Su incidencia es muy alta debido a que el 40 % de las mujeres tendrán al menos un episodio de infección urinaria a lo largo de su vida. A su vez el 12 % de los hombres tendrán al menos un episodio de infección urinaria a lo largo de su vida. Esta problemática genera una seria dificultad a nivel salud pública, sanitario, social y económico, que se refleja sobre todo en el costo sobre el sistema de salud donde sobrepasa en gran medida a los gastos en diálisis y trasplantes. Estudios previos en Estados Unidos se estimó que los costos totales en gastos relacionados a ITU fueron 3500 millones de dólares estadounidenses por año solamente en este país.

En clínica se utilizan dos métodos complementarios de detección de ITU, un test rápido e indirecto de detección de ITU por tiras reactivas y un test confirmatorio de la infección por cultivo llamado urocultivo. Nuevos estudios del comportamiento diagnóstico de las tiras reactivas arrojan resultados de poca sensibilidad y especificidad por lo tanto urge la necesidad de mejorar el diagnóstico rápido de esta enfermedad. *Escherichia coli* uropatógena es el agente causal del 75% de las infecciones urinarias a nivel mundial. Se encuentra dentro de una subclasificación llamada *E. coli* patógena extraintestinal y tiene genes asociados a virulencia específicos y únicos de este tipo de bacteria. Esta característica puede ser explotada para su diagnóstico a nivel molecular, aunque estas están presentes comúnmente en la orina. En particular 2 genes demostraron ser de utilidad para el diagnóstico de infecciones del tracto urinario causadas por *E. coli*. Los genes con potencial para el diagnóstico molecular son: *chuA* el cual codifica una proteína receptora de hemo de la membrana externa y *malB* que forma parte del regulón de maltosa.

“Loop-Mediated Isothermal Amplification” (LAMP) es un método de amplificación de ácidos nucleicos, diseñado para amplificar el ADN de interés de una forma muy específica, rápida y en condiciones isotérmicas. Estas características otorgan grandes ventajas a la hora de realizar un diagnóstico, en tiempo reducido, ajustado a la duración de una consulta clínica promedio, no necesita instalaciones sanitarias de complejidad y detecta directamente el material genético del patógeno. Por demás LAMP muestra una alta tolerancia a diferentes inhibidores que están naturalmente presentes en varias muestras biológicas, esto permite utilizarlas con un nivel de tratamiento mínimo evitando pasos extra de purificación del material genético.

Este proyecto consistió en el desarrollo de un test rápido para la detección de *E. coli* uropatógena en orina, basándose en la tecnología LAMP.

Tras estudiar el comportamiento de la reacción se optimizó el proceso de extracción del material genético, llegando a la conclusión que utilizar un paso de extracción térmica simple era necesario. Se determinó el punto de corte de la técnica, ajustándose para detectar concentraciones indicadoras de infección. Y por último se estudió la especificidad de la técnica con otros microorganismos.

Se efectuó la validación de la técnica con un número de 30 muestras clínicas de orina sospechosas de ITU. Este estudio logra dar una idea del comportamiento del test diagnóstico en condiciones de muestras clínicas. Se obtuvo una gran precisión de diagnóstico y sensibilidad comparándolas con tiras reactivas. Se presenta ideal para un test de screening previo a la confirmación con urocultivo.

Si bien se pueden hacer mejoras y se tendrá que ampliar el número de muestras de la validación para alcanzar números estadísticamente más confiables. Se ha logrado obtener un test de diagnóstico rápido para *E. coli* uropatógena en orina.

PALABRAS CLAVE:

LAMP, *Loop Mediated Isothermal Amplification*, ITU, Infecciones de tracto urinario, *Escherichia coli* uropatógena, Diagnóstico molecular.

ABREVIATURAS:

ADN: Ácido desoxirribonucleico

BIBC: *E. coli* enteroinvasiva

BIP: Backward inner primer

BLASTN: Herramienta básica de búsqueda de alineación local de nucleótidos

DAEC: *E. coli* difusamente adherente

DEC: *E. coli* diarreogénica

DO₆₀₀: Densidad óptica a 600 nm

EAGGEC: *E. coli* enteroagregativa

EPEC: *E. coli* enteropatogénica

ETEC: *E. coli* enterotoxigénica

ExPEC: *E. coli* patógena extraintestinal

FIP: Forward inner primer

FN: Falsos negativos

FP: Falsos positivos

IIBCE: Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

ITU: Infección del tracto urinario

LAMP: Loop mediated isothermal amplification

LB: Loop backward primer

LB: Luria bertani

LF: Loop forward primer

NEB: Empresa "new england biolabs®"

NMEC: *E. coli* asociada a meningitis neonatal

OA: Orina artificial

PCR: Polymerase chain reaction

STEC: *E. coli* productora de toxina shiga

TU: Tracto urinario

UPEC: *E. coli* uropatógena

VN: Verdaderos negativos

VP: Verdaderos positivos

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| INTRODUCCIÓN | 9 |
| Infecciones del Tracto Urinario. | 9 |
| <i>E. coli uropatógena</i> | 10 |
| Técnicas de diagnóstico microbiológico. | 13 |
| Cultivo cuantitativo de orina (urocultivo) | 13 |
| Métodos rápidos de diagnóstico indirecto | 14 |
| Testeo de ácidos nucleicos en el punto de atención (POC) | 14 |
| Métodos isotérmicos | 15 |
| Amplificación isotérmica mediada por bucle | 15 |
| OBJETIVOS | 19 |
| Objetivo General | 19 |
| Objetivos específicos | 19 |
| METODOLOGÍA | 20 |
| Diseño, adquisición de cebadores específicos. | 20 |
| Selección de secuencias genéticas | 20 |
| Diseño de los cebadores | 20 |
| Estandarización del protocolo de LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification). | 22 |
| Selección de cepas | 22 |
| Medio Orina Artificial (OA) | 23 |
| Curvas de crecimiento | 23 |
| <i>Escherichia coli 144</i> | 23 |
| Otras bacterias uropatógenas. | 24 |
| Reacción de LAMP. | 24 |
| Comparación de métodos de extracción del material genético. | 25 |
| Suspensión bacteriana. | 25 |
| ADN extraído por Kit comercial. | 25 |
| ADN extraído por lisado térmico. | 25 |
| Calidad de las muestras utilizadas. | 26 |
| Ensayos comparativos de las muestras en test LAMP. | 27 |
| Preparación de un control positivo para el test diagnóstico. | 27 |
| Determinación de punto de corte de la prueba diagnóstica LAMP. | 27 |
| Evaluación de la reactividad cruzada con otros microorganismos uropatógenos. | 27 |
| Validación con muestras clínicas positivas y negativas comparando con técnica “gold standard”. | 28 |
| Obtención de muestras. | 28 |
| Protocolo final de LAMP para <i>E. coli</i> UPEC en orina. | 28 |
| Análisis e interpretación de los resultados. | 28 |
| RESULTADOS | 31 |
| Diseño, adquisición de cebadores específicos LAMP específicos. | 31 |
| Estandarización del protocolo de LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification). | 32 |

| | |
|---|-----------|
| Curvas de crecimiento | 32 |
| <i>Escherichia coli</i> 144 | 32 |
| Otras bacterias uropatógenas. | 33 |
| Comparación de métodos de extracción del material genético. | 34 |
| Ensayos comparativos de las muestras en test LAMP. | 34 |
| Determinación de punto de corte de la prueba diagnóstica LAMP. | 35 |
| Evaluación de la especificidad del test diagnóstico y reactividad cruzada con otros microorganismos uropatógenos. | 36 |
| Validación con muestras clínicas positivas y negativas comparando con técnica “gold standard”. | 38 |
| DISCUSIÓN | 42 |
| CONCLUSIÓN | 44 |
| REFERENCIAS | 45 |

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Infecciones del Tracto Urinario.

Una infección del tracto urinario (ITU) se define por la presencia de microorganismos patógenos que colonizan y proliferan en el tracto urinario inferior como en el superior (Mody and Juthani-Mehta 2014). Las infecciones urinarias son causadas tanto por bacterias gram negativas como gram positivas, así como por ciertos hongos (fig. 1). Se clasifican según los síntomas (con y sin síntomas), el lugar de la infección (cistitis, infección del tracto urinario inferior, pielonefritis o infección del tracto urinario superior) o la presencia de complicaciones. Si afecta a los riñones y la pelvis renal, se llama pielonefritis; si afecta a la vejiga, se llama cistitis (Yoshikawa and Norman 2001).

Las ITU complicadas se describen como aquellas infecciones con factores de erradicación dificultosa de los uropatógenos del tracto urinario (TU) (Naber 1999). Las causas pueden ser tanto anatómicas como funcionales; uso de antibióticos en un lapso prolongado de tiempo generando diferentes formas de resistencia, ITU causada por más de un microorganismo o la presencia de patógenos multirresistentes, así como cateterización o inmunocompromiso (Nicolle 2002)(Tice 1999)

El término bacteriuria significa "bacterias en la orina" puede ser una infección es asintomática cuando los resultados de un urocultivo cumplen los criterios cuantitativos de bacteriuria y no hay signos o síntomas atribuibles a ITU o sintomática si cumple por lo menos 2 de los siguientes criterios: fiebre ($>38^{\circ}\text{C}$), polaquiuria o urgencia urinaria, disuria, dolor postero-superior o supraclavicular (no explicado por otros diagnósticos); urocultivo positivo con al menos 10^5 Unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL) o piuria (>10 leucocitos/ mm^3 en sedimento urinario) (Yoshikawa and Norman 2001).

Los grupos en riesgo de contraer una ITU incluyen bebés, niñas en edad escolar, mujeres sexualmente activas, mujeres embarazadas y hombres adultos mayores (Sobel and Kaye 2010). Es una de las infecciones más comunes a nivel mundial, afectando a más de 150 millones de personas por año. La incidencia de infecciones urinarias es muy alta, ya que el 40 % de las mujeres y el 12 % de los hombres tendrán al menos un episodio de infección urinaria a lo largo de su vida. Alrededor de una cuarta parte de las mujeres afectadas tendrán un segundo episodio en los próximos 6 a 12 meses (McLellan and Hunstad 2016). Esta problemática genera una seria dificultad a nivel sanitario, social y económico, que se refleja sobre todo en el costo sobre el sistema de salud donde sobrepasa en gran medida a los gastos en diálisis y trasplantes. En un estudio realizado en 2007 en Estados Unidos, se registraron 10.5 millones de visitas médicas ambulatorias por ITU sintomáticas y de 2 a 3 millones de consultas en emergencia. En 2015, los costos sociales de estas infecciones, incluidos los costos de atención de la salud y ausentismo laboral fueron de aproximadamente 3500 millones de dólares estadounidenses por año sólo en los Estados Unidos (Flores-Mireles et al. 2015). A pesar de esto, es difícil determinar la incidencia de las ITU porque muchos casos no son reportados y en otros países no hay registros de su incidencia o costos. (Foxman 2002)

Las ITU son usualmente tratadas con antibióticos, siendo la segunda causa de prescripción de antibióticos luego de la otitis media (Álvez 2010). Estos son generalmente buenos erradicando ITU no

complicadas. La aparición de resistencia a los antibióticos es un grave problema de salud pública y, en particular, las bacterias patógenas urinarias han mostrado un aumento lento pero constante de la resistencia a otros antibióticos en las últimas décadas (Gales et al. 2002; Álvez 2010). Por esta razón, la magnitud del problema que crean las ITU justificaría claramente el desarrollo de vacunas que puedan prevenir esta enfermedad.

En ITU no complicadas su etiología ha permanecido estable a lo largo del tiempo aunque con un gran aumento en las resistencias antimicrobianas. Entre los agentes más frecuentes se encuentran *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* y *Pseudomonas aeruginosa* entre otros (Flores-Mireles et al. 2015). El agente causal del 75% de las ITU no complicadas es *E. coli* uropatógena, mientras que en las complicadas es un poco menor con un 65% de las infecciones causadas por este patógeno. *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *Enterococcus spp.* y *Candida spp.* causan un 30% de las infecciones complicadas, mientras que en la patología no complicada los causantes principales son *K. pneumoniae*, *S. saprophyticus* y *Enterococcus spp.* (sin tener en cuenta a *E. coli*). (Flores-Mireles et al. 2015).

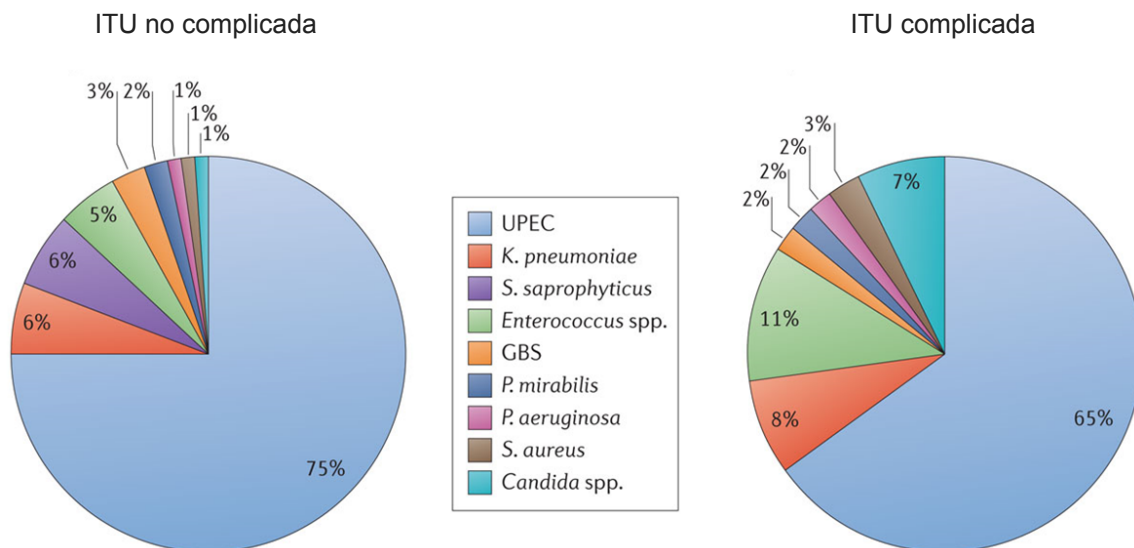


Figura 1 : Epidemiología de las infecciones de tracto urinario. (Flores-Mireles et al. 2015)

Un estudio realizado para investigar la etiología de las ITU y la sensibilidad a los antibióticos en Latinoamérica mostró que los agentes causales de las ITU no complicadas fueron *E. coli* (82%), *P. mirabilis* (4,5%), *K. pneumoniae* (4,2%), *S. saprophyticus* (4,1%), *P. aeruginosa* (3,3%) y otros microorganismos (2%). De los 100 aislados del Uruguay, el 89% corresponde a *E. coli* y el 5% a *P. mirabilis* y 2% *Klebsiella spp.* (Casellas et al. 2003)

1.2 *E. coli* uropatógena

E. coli es un bacilo gram negativo, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Es una especie muy

diversa de bacterias que se encuentra naturalmente en el tracto intestinal de todos los humanos y muchas otras especies animales (Morabito 2014; Barber et al. 2016). Algunas cepas han desarrollado la capacidad de causar enfermedades en humanos y se subdividen en grupos dependiendo de qué parte del cuerpo afectan y de su mecanismo de patogenicidad. Los síndromes clínicos resultantes de la infección con cepas patógenas de *E. coli* incluyen: infección del tracto urinario, sepsis/meningitis y enfermedad entérica/diarreica. Las cepas que causan los dos primeros síndromes clínicos se denominan *E. coli* patógena extraintestinal (ExPEC), mientras que las cepas que inducen la enfermedad gastroentérica se conocen como *E. coli* diarreogénica (DEC). Las DEC se subdividen en diferentes patotipos según su mecanismo de adhesión y/o colonización y las toxinas que producen. Los tipos de bacterias DEC son: *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAaggEC), *E. coli* difusamente adherente (DAEC) y *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC). El otro grupo es el de ExPEC en el que se encuentran *E. coli* uropatógena (UPEC) y *E. coli* asociada a meningitis neonatal (NMEC) (Morabito et al. 2014).

Como se mencionó anteriormente, el patógeno urinario *E. coli* es la causa de las infecciones del tracto urinario. A menudo poseen un número heterogéneo de genes de virulencia. La Tabla 1 resume los principales factores de virulencia asociados con UPEC. La posesión de estos agentes (o una combinación de ellos) convierte a UPEC en un patógeno eficaz para el desarrollo de infecciones del tracto urinario (Nielubowicz and Mobley 2010; Pitout 2012; Flores-Mireles et al. 2015).

Tabla 1. Genes asociados a virulencia para UPEC y función desempeñada.(Nielubowicz and Mobley 2010; Pitout 2012; Flores-Mireles et al. 2015)

| ADHERENCIA | | |
|-------------------|---------------------------------|---|
| Gen | Factor de Virulencia | Función |
| <i>fim</i> | Pili tipo 1 | Adherencia al uroepitelio media la invasión |
| <i>sfa</i> | Fimbria S | Adherencia a uroepitelio |
| <i>drb</i> | Adhesina de la Familia Dr | Factor de adhesión que se une al factor de aceleración de decaimiento |
| <i>focG</i> | Fimbria F1C | Adherencia a uroepitelio |
| <i>hra</i> | Aglutinina resistente al calor | Factor de adhesión |
| <i>usp</i> | Proteína uropatógena específica | Factor de adhesión |
| <i>iha</i> | Adhesina homóloga IrgA | Factor de adhesión |
| <i>papGII</i> | Pili tipo P clase II | Adherencia a uroepitelio |
| <i>papGIII</i> | Pili tipo P clase III | Adherencia a uroepitelio |
| <i>sfa</i> | Familia fimbria S | Factores de adhesión |
| <i>fliC</i> | Subunidad de la flagelina | Adherencia/movilidad |

| CAPTACIÓN DE HIERRO | | |
|----------------------------|-------------------|-------------------------------------|
| <i>iroN</i> | Salmoquelina | Sideróforo hierro |
| <i>iucD</i> | Aerobactina | Sideróforo hierro |
| <i>fyuA</i> | Yersibactina | Sideróforo hierro |
| <i>Ent</i> | Enterobactina | Sideróforo hierro |
| <i>ireA</i> | Receptor Siderofo | Receptor Sideróforo |
| <i>Iro</i> | Receptor Siderofo | Receptor Salmoquelina |
| <i>chu</i> | Receptor hierro | Captación de Hemina |
| <i>sit</i> | Receptor | Transportador de Hierro y Manganeso |

| TOXICIDAD | | |
|------------------|--|--|
| <i>hyl</i> | Alfa hemolisina | Lisa eritrocitos |
| <i>astA</i> | Toxina de EAEC | Toxicidad |
| <i>sat</i> | Proteína Autotransportadora Secretada | Toxina |
| <i>prc</i> | Serin Proteasa | Toxina |
| <i>cnf1</i> | Factor de Necrosis Citotóxico | Causa multinucleación y redondeamiento de células humanas (Toxina) |
| <i>vat</i> | Proteína Autotransportadora Vacuolizante | Toxina |
| <i>tsh</i> | Hemaglutinina sensible a Temperatura | Toxicidad |

| OTROS | | |
|-------------------|--------------------------------------|--|
| <i>kpsMT</i> | Cápsula | Evasión del sistema inmune |
| <i>K1, K2, K5</i> | Variantes Cápsula | Evasión al sistema inmune |
| <i>traT</i> | Resistencia asociada al suero | Evasión del sistema inmune |
| <i>iss</i> | Incremento de sobrevivencia al suero | Evasión del sistema inmune |
| <i>picU</i> | Autotransportador Serin proteasa | Involucrada en colonización intestinal |
| <i>ompT</i> | Proteasa de membrana externa | Proteasa de membrana externa |
| <i>malX</i> | Marcador de isla de Patogenicidad | Asociado a Virulencia |

Existen genes que son conservados dentro de un género bacteriano y su presencia permite la detección del microorganismo. Uno de los genes es *chuA*, que codifica una proteína receptora de hemo de la membrana externa de *E. coli*, descrita por primera vez en *E. coli* enterohemorrágica (Mills and Payne 1995). En estudios de genética de poblaciones, se encontró que *chuA* estaba restringida a ciertos grupos de esta bacteria (Mills and Payne 1995; Clermont et al. 2000), los cuales comprenden la mayoría de las cepas patógenas. Hay otros grupos de *E. coli* que no contienen *chuA* y la mayoría son cepas comensales (Mills y Payne, 1995). Por lo tanto, *chuA* se considera un poderoso discriminador entre estos dos conjuntos de grupos (Clermont et al., 2000). En la investigación de aislamientos clínicos de (Hoffmann et al. 2001), se informó que el 95% de los grupos patogénicos lo contenían y el 7,7% de las cepas comensales albergaban *chuA* (Hoffmann et al. 2001).

Por otro lado, *malB* de *E. coli* UPEC forma parte del regulón de maltosa y se asocia a fuertemente a virulencia. Los genes contenidos en estos operones están todos involucrados en el transporte de maltosa y maltodextrinas a través de la envoltura bacteriana (Raibaud et al. 1979). La región *malB* está constituida por dos operones transcritos en direcciones opuestas, de manera divergente (Raibaud et al. 1979). Está conservado en diversos linajes de *E. coli* y no lo comparten otras bacterias gram negativas, excepto *Shigella* spp., según el análisis BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

1.3 Técnicas de diagnóstico microbiológico.

1.3.1 Cultivo cuantitativo de orina (urocultivo)

El “*gold standard*” para el diagnóstico de ITU es el cultivo cuantitativo de orina (urocultivo) que se realiza para cuantificar el número de bacterias por mililitros y se expresa como unidades formadoras de colonias/mL (UFC/mL). Teóricamente, cada UFC en el cultivo representa una bacteria viable en la muestra; sin embargo, cuando las bacterias en orina existen como agregados (estafilococos) o como cadenas (estreptococos) el número de UFC puede ser inferior al número real de bacterias en la muestra (Hooton 1990; Barnett and Stephens 1997)

La técnica de cultivo cuantitativo más habitual es la siembra con un ansa calibrada que permite depositar una determinada cantidad de orina en la superficie del medio de cultivo. En general, las ansas de 0,001 mL o 0,01 mL se utilizan comúnmente para estimar la bacteriuria en el rango de 100-1000 CFU/mL a más de 100 000 CFU/mL. Actualmente, se utilizan ansas calibradas de plástico desechables para lograr tamaños de muestra estables. Sin embargo, la forma en que se inserta el ansa en el recipiente de la muestra puede causar una diferencia significativa, hasta del 100 %, en el tamaño de la muestra analizada (Andreu et al. 2011; Baron 2015).

Los medios de cultivo de orina deben soportar el crecimiento de la mayoría de los patógenos urinarios. Tradicionalmente se ha fomentado el uso de dos cultivos: medios selectivos y diferenciales, como el Agar de McConkey o el Azul de Metileno Eosina, que permiten el crecimiento de bacterias entéricas, bacilos Gram-negativos y levaduras. Como único medio de cultivo puede emplearse el agar CLED (cistina-lactosa deficiente en electrolitos), un medio diferencial no selectivo, que permite el crecimiento de bacterias gram negativas, gram positivas y levaduras, inhibiendo el fenómeno de swarming de *Proteus* spp. (Kunin 1994; Silver et al. 2009)

Valor predictivo negativo

1.3.2 Métodos rápidos de diagnóstico indirecto

En las últimas décadas se han desarrollado varias pruebas para detectar bacteriuria y/o piuria que permiten un diagnóstico rápido de las ITU. Una de las pruebas más empleada hoy en día es la tira reactiva de orina que detecta nitritos y las esterasas leucocitarias (Waller et al. 2018). Se utiliza con mayor frecuencia en el lugar donde el paciente está siendo asistido (*point of care*), presentando la ventaja de no requerir equipamiento ni personal calificado para su realización. Sin embargo, no todas las bacterias pueden reducir el nitrato de la orina a nitrito, sólo las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* pueden hacerlo. Por lo tanto la prueba de nitritos no detecta la presencia de algunos uropatógenos frecuentes como *S. saprophyticus*, *Pseudomonas*, *Enterococcus* y *Candida* (Waller et al. 2018). Por otro lado, la prueba de esterasas leucocitarias es una prueba indirecta de la presencia de leucocitos en la orina. Por lo tanto, no determina directamente la presencia de bacterias en la orina, ya que las plaquetas se pueden detectar en otras condiciones como la vulvovaginitis y la uretritis. Otro límite es la interpretación de los resultados por parte de los médicos clínicos. La ausencia de nitrito y nitrato de esterasa leucocitaria tiene un valor predictivo negativo cercano al 90%, pero la sensibilidad a nitrito y esterasa leucocitaria es baja (48% y 64%), con buena especificidad cercana al 93% en el caso de los nitritos, pero baja (73%) para ésteres de leucocitos. La presencia de ambos parámetros mejora su sensibilidad y especificidad (80%)(Waller et al. 2018). Otra desventaja de la tira reactiva de orina es que no detecta directamente la presencia de bacterias en la orina y no proporciona datos sobre el organismo que causa la infección y su sensibilidad a los antibióticos.

1.4 Testeo de ácidos nucleicos en el punto de atención (POC)

Actualmente, las pruebas diagnósticas basadas en amplificación de ácidos nucleicos se llevan a cabo de forma rutinaria para la detección de enfermedades infecciosas, con mayor frecuencia en forma de pruebas basadas en la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La PCR es un proceso impulsado por una enzima, que permite la amplificación exponencial de secuencias cortas de nucleótidos *in vitro* (Mullis and Faloona 1989). En la PCR se reproduce lo que sucede durante la replicación celular. La síntesis de nuevas secuencias de ADN se logra mezclando: ADN que contiene el o los fragmentos a amplificar, polimerasa, cebadores (fragmento de ADN de 15 a 30 nucleótidos ubicado junto a la región a amplificar y proporciona extremos 3' OH para iniciar la

transcripción), desoxinucleótidos (dNTP), cloruro de magnesio (MgCl₂) u otro cofactor para la actividad polimerasa y el tampón que mantiene un pH adecuado para que se lleve a cabo la síntesis de las copias de ADN (Ochodo et al. 2018). Esta mezcla se somete a la repetición de varios ciclos a diferentes temperaturas (ciclos de PCR) reemplazando la mayoría de las proteínas activas durante la replicación celular. Consisten en una serie de 20 a 35 cambios de temperatura repetitivos llamados ciclos. Cada ciclo generalmente consta de 2-3 etapas con diferentes temperaturas. La PCR convencional se realiza con ciclos de temperatura de tres pasos. Las fases del ciclo suelen estar precedidas por un choque térmico (llamado 'hold') a alta temperatura (>90 °C) y seguidas de un hold adicional al final del proceso para prolongar el producto final o un almacenamiento breve. La temperatura de aplicación y el tiempo de aplicación en cada ciclo dependen de muchos parámetros diferentes (Sambrook 2001).

Una clara ventaja de los métodos de diagnóstico basados en PCR, en comparación con las opciones no moleculares como los inmunoensayos, son las altas sensibilidades que se pueden alcanzar. El límite de detección de los ensayos de PCR comerciales en tiempo real son típicamente ~ 10 copias por reacción, que concuerda con los niveles ampliamente informados en la literatura (Poon et al. 2003)(Welzel et al. 2006). Una comparación hecha por Uhl et. al. de un inmunoensayo rápido de antígeno (kit de prueba Direct Antigen 1-2-3 para estreptococos del grupo A, BD Diagnostic Systems, Sparks, Maryland) y un ensayo de PCR en tiempo real para la detección de estreptococos del grupo A encontraron que la sensibilidad del método basado en PCR era del 93%, en comparación con el 55% del inmunoensayo. Esta diferencia de sensibilidad es típica entre los dos tipos de análisis (Uhl et al. 2003).

1.5 Métodos isotérmicos

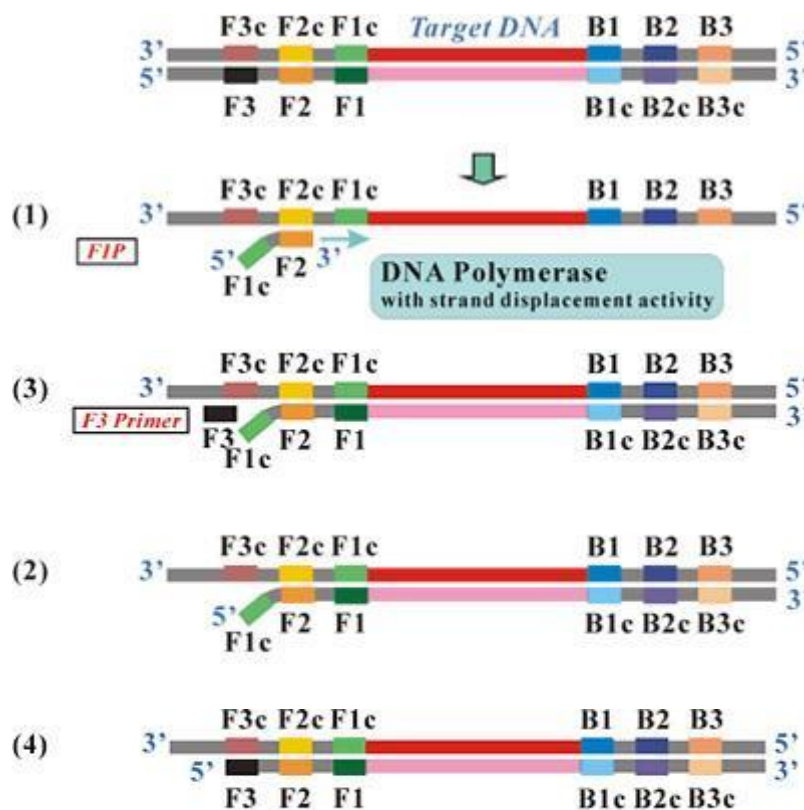
Un gran avance para el diagnóstico molecular fue el desarrollo de métodos isotérmicos de amplificación. Su importancia radica en su capacidad de amplificar un fragmento de material genético en específico sin utilizar ciclado de temperaturas utilizado en el PCR tradicional y PCR en tiempo real. Esto permite utilizar equipos mucho más simples a la hora de realizar una amplificación, simplificado a un termobloque o hasta un baño de agua a la temperatura de reacción. Otra característica distintiva de los métodos de amplificación isotérmica es que típicamente también son más rápidos que los PCR convencionales. Esto obedece a que ocurre a máxima velocidad todo el tiempo de la reacción, ya que actúa a una única temperatura, lo cual tiene muchas ventajas a la hora de llevarlo a la práctica, debido a que incrementa la portabilidad de la instrumentación necesaria y el costo de la misma haciéndola muy atractiva para los testeos POC (Hindiye et al. 2001; Gill and Ghaemi 2008)

1.6 Amplificación isotérmica mediada por bucle

“Loop-Mediated Isothermal Amplification” (LAMP) es un novedoso método de amplificación de ácidos nucleicos, diseñado para amplificar el ácido nucleico de interés de una forma muy específica, rápida y en condiciones isotérmicas (Boehme et al. 2007). Se utiliza una ADN polimerasa con la capacidad de desplazamiento de cadena en conjunto con cuatro cebadores especialmente diseñados específicos para un total de 6 regiones distintas de la secuencia de ADN de interés (cebador directo: F3, cebador regresivo: B3, cebador interno delantero: FiP, cebador interno regresivo BiP). La detección del ADN

amplificado puede llevarse a cabo en un equipo de PCR en tiempo real, utilizando un intercalante fluorescente, como Syber Green I (Qiagen, EE. UU.), o mediante detección visual de punto final. Adicionalmente, la detección puede realizarse mediante el seguimiento de la turbidez de la reacción, cambios en el pH de la misma, con un Sistema de CRISPR Cas 12, entre otros. LAMP se puede utilizar para amplificar un ADN de interés o amplificar un *target* de ARN mediante la adición de una transcriptasa inversa a la mezcla de reacción (Parida et al. 2008). También ya existen variantes comercializadas que cuentan con la capacidad de amplificar ARN como ADN.

La reacción de LAMP se ve iniciada como se muestra en la figura 2 con los cebadores F3 o B3 uniéndose a la hebra complementaria de ADN doble cadena. La polimerasa con acción de desplazamiento de cadena comienza la síntesis de ADN, desplazando y liberando la hebra sintetizada (1). A continuación, se sintetiza una hebra de ADN complementaria al ADN molde a partir del extremo 3' de la región F2 de la FiP(2). El cebador F3 luego se hibrida con el molde de ADN, justo fuera de la FiP. Se produce la síntesis de ADN, desplazando la hebra complementaria unida a FiP y formando una doble hebra a partir del primer F3 (3,4). La hebra sintetizada a partir de FiP se libera y forma una estructura de bucle en el extremo 5' debido a que las regiones F1c y F1 son complementarias (5,6). Esta hebra luego forma el molde para los cebadores B3 y BiP, formando una doble hebra de ADN con una estructura lineal, lo que finalmente resulta en el desplazamiento de la hebra complementaria unida a BiP (6,7). La hebra forma una estructura con bucles en ambos extremos, formando una forma característica de mancuerna. Esto sirve como punto de partida para el ciclo de amplificación en la reacción LAMP (Sánchez et al. 2014).



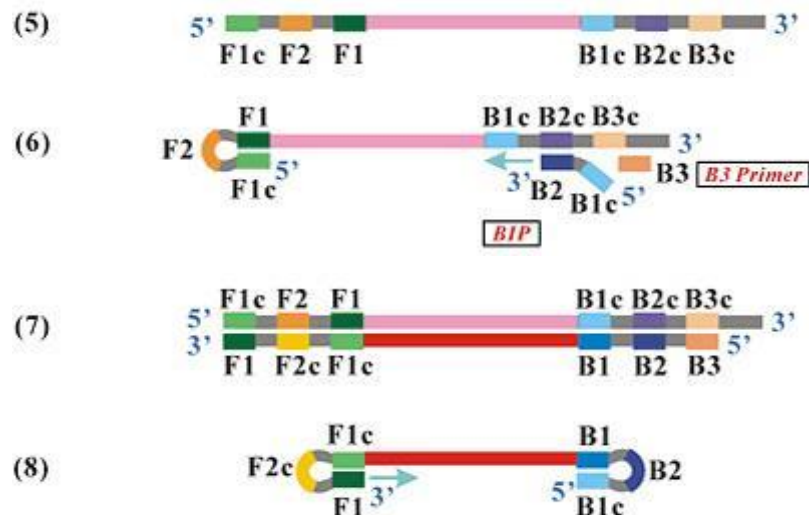


Figura 2 : Diagrama de evolución de reacción LAMP a partir de un ADN target. (1)La polimerasa con acción de desplazamiento de cadena comienza la síntesis de ADN, desplazando y liberando la hebra sintetizada. A continuación, se sintetiza una hebra de ADN complementaria al ADN molde a partir del extremo 3' de la región F2 de la FIP(2). El cebador F3 luego se hibrida con el molde de ADN, justo fuera de la FiP. Se produce la síntesis de ADN, desplazando la hebra complementaria unida a FiP y formando una doble hebra a partir del primer F3 (3,4). La hebra sintetizada a partir de FiP se libera y forma una estructura de bucle en el extremo 5' debido a que las regiones F1c y F1 son complementarias (5,6). Esta hebra luego forma el molde para los cebadores B3 y BiP, formando una doble hebra de ADN con una estructura lineal, lo que finalmente resulta en el desplazamiento de la hebra complementaria unida a BiP (6,7). La hebra forma una estructura con bucles en ambos extremos, formando una forma característica de mancuerna. Esto sirve como punto de partida para el ciclo de amplificación en la reacción LAMP (Sánchez et al. 2014).

La estructura inicial similar a una mancuerna se convierte luego a través de la síntesis de ADN autocebante en una hebra de ADN de bucle. La síntesis de ADN por desplazamiento de cadena FiP libera la cadena sintetizada previamente, que después forma una estructura de bucle debido a las regiones B1c y B1 complementarias (9). Posteriormente, la hebra complementaria unida a FIP se libera debido a un mayor desplazamiento de la hebra, formando una estructura en forma de mancuerna debido a las regiones complementarias en los extremos 3' y 5' (11). El resultado es una estructura de bucle único, como al comienzo de la reacción, además de una estructura de bucle que tiene el doble de largo (10). La síntesis mediada por BIP y B3 luego actúa para crear estructuras similares, y la síntesis de ADN continúa desplazando el ADN de doble cadena. Como resultado, se forman amplicones de ADN de varios tamaños mediante repeticiones alternativamente invertidas de la secuencia target original.

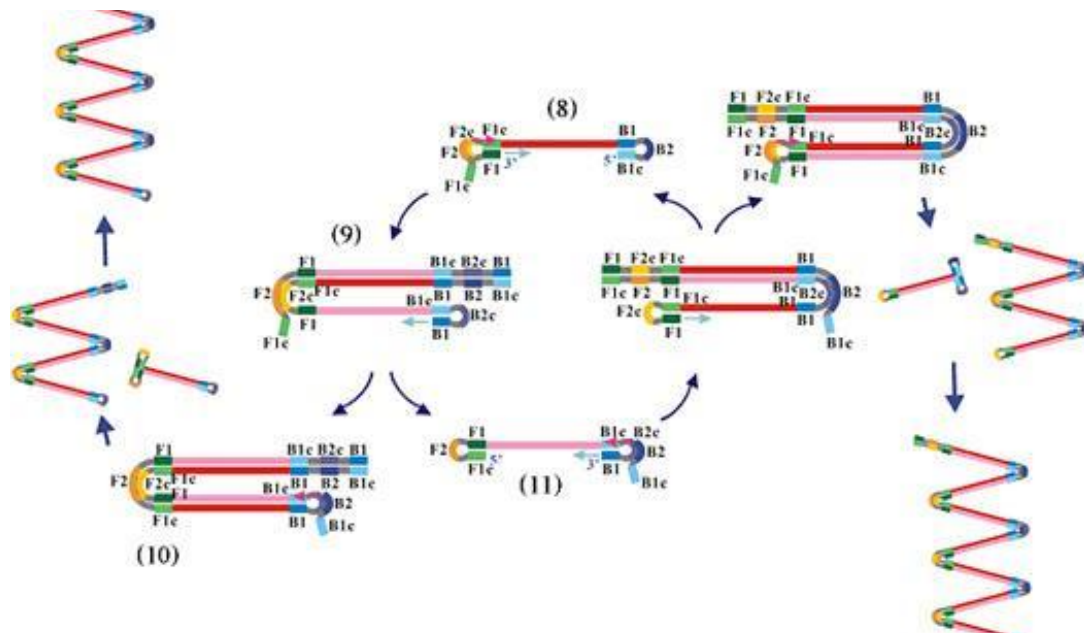


Figura 3 : Diagrama de evolución de reacción LAMP a partir de un ADN target. La síntesis de ADN por desplazamiento de cadena FIP libera la cadena sintetizada previamente, que después forma una estructura de bucle debido a las regiones B1c y B1 complementarias (9). Posteriormente, la hebra complementaria unida a FIP se libera debido a un mayor desplazamiento de la hebra, formando una estructura en forma de mancuerna debido a las regiones complementarias en los extremos 3' y 5' (11). El resultado es una estructura de bucle único, como al comienzo de la reacción, además de una estructura de bucle que tiene el doble de largo (10). La síntesis mediada por BIP y B3 luego actúa para crear estructuras similares, y la síntesis de ADN continúa desplazando el ADN de doble cadena. Como resultado, se forman amplicones de ADN de varios tamaños mediante repeticiones alternativamente invertidas de la secuencia target original (Sánchez et al. 2014).

La reacción es capaz de producir 10^9 copias de un target de ADN a partir de por lo menos de 10 copias originales, en una hora (Notomi et al. 2000). Uno de los mayores beneficios de este método en comparación con la PCR estándar es el aumento de la especificidad que se observa, debido al uso de 4 cebadores específicos para 6 regiones separadas de la secuencia diana. Estudios previos han demostrado que tiene un límite de detección diez veces más bajo que un ensayo de PCR para la misma secuencia objetivo, y también está menos influenciado por compuestos inhibidores en muestras clínicas (Notomi et al. 2000; Kaneko et al. 2007). Esto hace que el ensayo sea muy adecuado para la detección de patógenos en muestras positivas con una carga de organismos potencialmente baja.

Se han descrito modificaciones del proceso original de LAMP, que implican el uso de conjuntos de cebadores adicionales. Los más comunes son los cebadores de bucle, que se pueden diseñar con el paquete de software gratuito de diseño de cebadores LAMP de PrimerExplorer. Los cebadores de bucle se hibridan con los bucles del producto de la fase inicial de la reacción LAMP, generando un amplicón más grande y acelerando la síntesis de ADN (Nagamine et al. 2002). Se ha demostrado que la inclusión de estos conjuntos de cebadores reduce el tiempo de detección en ensayos de tiempo real hasta en un 50 % (Nagamine et al. 2002). La capacidad de incluir estos cebadores depende de la secuencia de los bucles y de su longitud de secuencia, ya que los cebadores deben estar entre los sitios B2 y B1, o entre los sitios F2 y F1 (Gandelman et al. 2011).

Una ventaja significativa de LAMP sobre la PCR convencional es la temperatura de reacción constante (típicamente entre 63°C y 67°C). Esto elimina la necesidad de costosos equipos de termociclado, debido a que la reacción se puede llevar a cabo en un bloque térmico o incluso en un baño de agua. Una innovación es el uso de un calentador de bolsillo desechable para proporcionar la temperatura de reacción necesaria para un ensayo LAMP aplicado para la detección de *Bacillus anthracis* (Hatano et al. 2010; Gandelman et al. 2011). Esta prueba fue diseñada para uso de campo en países en desarrollo, y no requiere electricidad para funcionar. Se observaron límites de detección idénticos al usar el calentador de bolsillo que un termobloque caliente. Esto proporciona una forma de realizar diagnósticos moleculares sensibles en cualquier entorno, sin necesidad de más equipo que un simple calentador de bolsillo y los componentes del ensayo en sí.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

El objetivo del presente proyecto consiste en el desarrollo de un test rápido para la detección de infección de tracto urinario causado por *E. coli* uropatógena en orina, basándose en Amplificación Isotérmica Mediada por Bucles de Ácidos Nucleicos (LAMP)

2.2 Objetivos específicos

- Diseñar y adquirir primers específicos para la amplificación LAMP de genes bacterianos de *E. coli*.
- Evaluar y estandarizar el protocolo de LAMP.
- Evaluar la reactividad cruzada con otros microorganismos uropatógenos.
- Evaluar la detección de distintas concentraciones de *E. coli* en el ensayo de LAMP en equipo de real time PCR de *E. coli* en medio de orina artificial.
- Validar el kit diagnóstico LAMP para *E. coli* UPEC con ensayo ciego utilizando muestras de origen clínico positivas y negativas comparando con técnica "gold standard".

3. METODOLOGÍA

3.1 Diseño, adquisición de cebadores específicos.

3.1.1 Selección de secuencias genéticas

Fueron estudiados 131 genes seleccionados en el trabajo de Brons et al., se comprobó que el gen a amplificar está presente exclusivamente en cepas *E. coli* UPEC. Se utilizó la herramienta básica de búsqueda de alineación local de nucleótidos, se comparó con cepas de *E. coli* comensales y fecales además de otras bacterias uropatógenas como *K. pneumoniae*, *S. saprophyticus*, *Enterococcus spp*, *Streptococcus* del grupo B, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Candida*. Del análisis se desprende que el gen *chuA* tendría potencial para su uso diagnóstico en LAMP. El gen *malB* fue seleccionado por revisión bibliográfica, encontrando varios autores que decidieron enfocarse en este gen debido a que contiene regiones que se encuentran solamente en *E. coli* uropatógena. (Hill et al. 2008; Ramezani et al. 2018; Saengsawang et al. 2021).

3.1.2 Diseño de los cebadores

Los cebadores se diseñaron empleando “PrimerExplorer software” versión 5. Se dejaron por fuera las regiones poco específicas de los genes en el diseño presentes en el alineamiento y se eligieron cebadores con los valores negativos más bajos para la energía libre de Gibbs (ΔG) en dímeros y formaciones de bucles en horquilla para garantizar la optimización de la técnica. También se validaron sus propiedades termodinámicas usando “OligoCalc Software” y se garantizó su especificidad utilizando la herramienta “Primer-Blast – NCBI – NIH” comparando contra las secuencias de humanos y cualquier otro microorganismo en la base de datos. Así se obtuvieron los cebadores que amplifican para *chuA* y *malB* (Tabla 9)(PrimerExplorer 2022).

Se corroboró el alineamiento de los oligonucleótidos LAMP a la región homóloga de su gen (*malB* o *chuA*) y se garantizó que la distancia entre los extremos terminales 5' de F2 y B2 sea de 120-160 pb y F2 y F1c sea de 40-60 pb (este es el tamaño del loop formado en la amplificación). La distancia de extremo terminal 3' de F3 y B3 al extremo 5' de F2 o B2 debe de ser entre 0-60pb (Notomi et al. 2000).

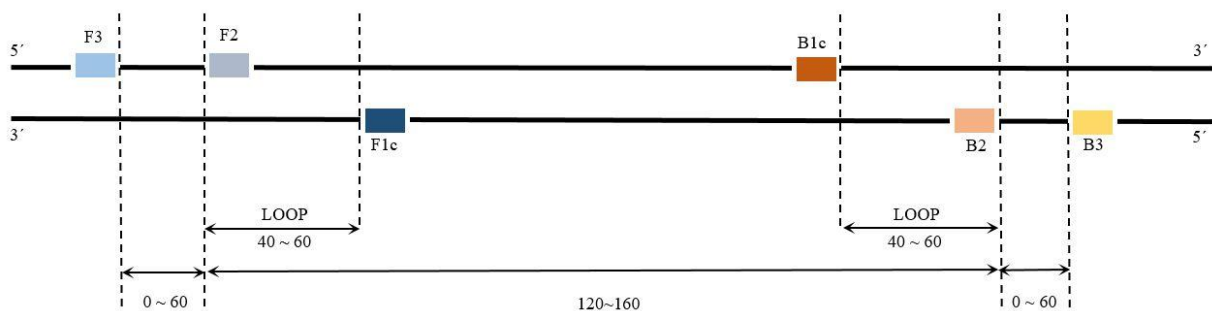


Figura 4: Esquema de localización y distancia entre los cebadores LAMP.

Se estudió la energía libre de Gibbs de los extremos terminales, debido a que es muy importante en su estabilidad para que funcione correctamente la síntesis de ADN, su valor debió ser próximo a 4 kcal/mol (Notomi et al. 2000).

Los oligonucleótidos LAMP deben tener también un contenido de GC específico, este es calculado mediante el programa "OligoCalc Software". Deben estar diseñados de manera tal que el contenido de GC se encuentre entre el 50-60%, para que funcionen de manera óptima (Notomi et al. 2000). Los cebadores fueron adquiridos en MacroGen.

Por simplicidad al realizar la preparación de reacciones LAMP se realizaron previamente stocks de cebadores LAMP para cada juego de cebadores a una concentración de uso. Para este fin se realizaron diluciones de los tubos madre según tabla 2 y se prepararon los mix de los cebadores siguiendo la tabla 3.

Tabla 2: Tabla de stocks de cebadores.

| Primer | Concentración stock (μM) | Concentración final (μM) |
|---------------|---|---|
| FIP | 30 | 16 |
| BIP | 30 | 16 |
| F3 | 30 | 2 |
| B3 | 30 | 2 |
| LOOP F | 30 | 4 |
| LOOP B | 30 | 4 |

Tabla 3: Tabla de preparación de mix de cebadores.

| Primer | Concentración 10X stock (μM) | Concentración final 1X (μM) | Volumen para 100 μL (μL) |
|---------------|---|--|---|
| FIP | 16 | 1.6 | 16 |
| BIP | 16 | 1.6 | 16 |
| F3 | 2 | 0.2 | 2 |

| | | | |
|---------------|---------------------------|-----|-----|
| B3 | 2 | 0.2 | 2 |
| LOOP F | 4 | 0.4 | 4 |
| LOOP B | 4 | 0.4 | 4 |
| | Agua para PCR (μL) | | 56 |
| | Volumen final (μL) | | 100 |

3.2 Estandarización del protocolo de LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification).

El estudio se realizó en el Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE).

3.2.1 Selección de cepas

Se utilizaron cepas pertenecientes al cepario del Depto. de Microbiología y del Depto de Bacteriología y Virología (Instituto de Higiene, Facultad de Medicina) previamente caracterizadas en ambos departamentos (Zunino et al. 1999; Robino et al. 2014). Robino et al. realizó la caracterización de la cepa *E. coli* UPEC 144 mediante la búsqueda por Reacción en Cadena de la Polimeras (PCR) multiplex de factores de virulencia característicos así como la determinación de grupos filogenéticos. Los factores de virulencia analizados fueron *afa*, *papA*, *papC*, *papEF*, *papGII* (genes relacionados al *pili P*), *fimH* (*pili* tipo 1), *sfa/FocDE* (fimbria), *kpsMIII* (capsula tipo II), *iutA* (sideróforo aerobactin) (Robino et al., 2014).

De estas cepas se seleccionó la cepa de *E. coli* UPEC 144 para llevar a cabo la puesta a punto debido a que contaba con los factores de virulencia y viabilidad que se consideran necesarios en este ensayo.

Para los ensayos de evaluación de la reactividad cruzada con otros microorganismos uropatógenos se utilizaron cepas pertenecientes al mismo cepario estudiado (Zunino et al. 1999; Robino et al. 2014). La selección de los microorganismos uropatógenos a utilizar se hizo a partir del trabajo realizado por (Casellas et al. 2003), el cual concluye que los mayores agentes causales de las ITU no complicadas son *Escherichia coli* (81%), *Proteus mirabilis* (4,5%), *Klebsiella pneumoniae* (4,2%), *Staphylococcus saprophyticus* (4,1%), *Pseudomonas aeruginosa* (3,3%), y otros microorganismos (3%). Debido a la frecuencia de los agentes no *E. coli* en casos de ITU se estudió el comportamiento del test diagnóstico en presencia de 4 lisados térmicos en medio de orina artificial conteniendo una concentración de infección de las bacterias *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Pseudomonas aeruginosa*.

3.2.2 Medio Orina Artificial (OA)

La composición de OA de stock fue de 11,5 g/L de Sulfato de sodio (anhidro), 3,25 g/L de Cloruro de magnesio hexahidratado, 23 g/L Cloruro de sodio, 3,25 g/L de Citrato de trisodio, 0,1 de Oxalato de sodio, 14 g/L de Ortofosfato de dihidrógeno de potasio, 8 g/L de Cloruro de potasio, 5 g/L de Cloruro amónico, 3,25 g/L de Gelatina y 5 g/L de TSB de acuerdo a Brooks et. al. (Brooks and Keevil 1997). Posteriormente se almacenó y se guardó a -20°C hasta su uso.

Se empleó una solución de Calcio/Urea stock de complemento para el OA stock, para ello se disolverán 125 g de Urea y 3.25 g de Cloruro de calcio en 350 mL de agua destilada esteril en un recipiente. Se calentó suavemente (<30°C, contrarresta la solvatación extremadamente endotérmica, acelera en gran medida el proceso). Esto se transfirió a un recipiente volumétrico donde se completó su volumen con agua destilada esteril hasta llegar a 400 mL. Por último se esterilizó por filtrado de 0,45 µm y se almacenó a -20°C hasta su uso (Brooks and Keevil 1997).

Para 1 L de medio de OA se utilizarán 200 mL de OA concentrada, 720 mL de agua destilada esteril y 80 mL de solución de Calcio/Urea.

3.2.3 Curvas de crecimiento

1) *Escherichia coli* 144

Para la curva de crecimiento en medio Luria Bertani (LB) de *E. coli* 144 se comenzó recuperando la cepa en medio LB agar por 24 horas a 37°C. Posteriormente se utilizó el estándar de turbidez de McFarland, que se emplea como referencia en suspensiones bacteriológicas para saber el número de bacterias por mililitro. Se realizó una suspensión bacteriana equivalente a un McFarland N°1 a partir de una suspensión en buffer fosfato salino (PBS) y se comparó con su estándar. Inmediatamente, 0,5 mL de esa solución se inoculó en un matraz conteniendo 200 mL de medio LB y se incubó a 37°C con agitación de 100 rpm. Se midió la densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀) en tiempo inicial, 1,2,3,4 y 24 horas. En cada uno de estos tiempos se retirarán 100µL y se realizarán diluciones seriadas de 1:10 hasta la llegar a dilución de 1:10⁶. Cada una de estas diluciones (100µL) se sembraron en placas de LB agar, a las cuales se les realizó un conteo de colonias a las 24 h. Los valores de DO₆₀₀ y el conteo de colonias se compararon para establecer el crecimiento de colonias bacterianas en el tiempo y poder medir solamente con un valor de DO₆₀₀ y tiempo la cantidad de colonias en un punto fijo de crecimiento.

Para la curva de crecimiento de *E. coli* 144 en medio OA, se procedió de igual manera que el ensayo anterior, cambiando los 200 mL de LB del matraz de incubación por 200 mL medio OA.

2) Otras bacterias uropatógenas.

Para realizar las curvas de crecimiento de las cepas de *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*, *S. saprophyticus*, *P.*

aeruginosa se procedió de igual manera a los descrito para *E. coli* 144.

3.2.4 Reacción de LAMP.

La pre-mezcla de reactivos se hizo siguiendo la metodología descrita por WarmStart® LAMP Kit (DNA & RNA) de New England Biolabs Inc. (2020), los reactivos fueron descongelados siguiendo los protocolos de esterilidad, a continuación se homogeneizaron en vortex por 5-10 segundos y se centrifugaron a máxima velocidad durante 20 segundos.

Se preparó siguiendo el orden y las concentraciones presentadas en la tabla 5. Una vez preparada la pre-mezcla se homogeneizó en vortex por 5-10 segundos, y se procedió a dispensar 22 μ L de pre-mezcla en tubos para PCR previamente etiquetados.

Tabla 5: Volúmenes necesarios de la pre-mezcla LAMP.

| Reactivo | Volumen de reacción x1 (μL) |
|-------------------------------------|---|
| WarmStart LAMP 2X Master Mix | 12,5 |
| Mix cebadores 10 X LAMP | 2,5 |
| Agua para PCR | 6,5 |
| Dye | 0,5 |
| Muestra | 3 c/u |
| Volumen total | 25 |

De manera individual se añadirán 3 μ L del control positivo, negativo y muestra según corresponda la etiqueta de cada tubo y se llevó a condiciones isotérmicas en un equipo de PCR en tiempo real. Bajo las condiciones de la tabla 6, donde se midieron las unidades de fluorescencia relativa (UFR) emitidas por el colorante fluorescente.

Tabla 6: Condiciones de amplificación LAMP.ml

| Etap | Temperatura | Tiempo (min) |
|-------------|--------------------|---------------------|
|-------------|--------------------|---------------------|

| | (°C) | |
|---------------------|------|----|
| EXTENSIÓN | 65 | 60 |
| INACTIVACIÓN | 80 | 10 |
| CONSERVACIÓN | 4 | ∞ |

3.2.5 Comparación de métodos de extracción del material genético.

La purificación previa de ADN es un requisito muy importante en diversas técnicas que realizan amplificación de ácidos nucleicos, sin embargo, en el caso de LAMP no necesita de ADN purificado para tener una amplificación eficiente ya que es capaz de tolerar componentes de medios de cultivo y sustancias biológicas que pueden inhibir la reacción en otras técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (Jevtuševskaja et al. 2016). Tres métodos de extracción del material genético se realizaron y se compararon en los ensayos de LAMP: ADN extraído por KIT comercial, ADN extraído por lisis térmica a partir del cultivo de *E. coli* y suspensiones bacterianas directas. La calidad del material genético se evaluó midiendo concentración y pureza de las muestras utilizando espectrofotometría con el equipo Nanodrop 1000.

1) Suspensión bacteriana.

Para esta técnica se cultivó la cepa de *E. coli* en medio Luria Bertani agar por 24 horas a 37°C. Está bacteria creció en las mismas condiciones que describe el apartado de curva de crecimiento en LB, aproximadamente por 3 horas hasta que el valor de DO₆₀₀ fue de 0,3. Se almacenó 1 mL en un tubo eppendorf estéril de 1.5 mL con su respectiva rotulación y se separaron alícuotas para realizar extracción de ADN por kit y por lisado térmico.

2) ADN extraído por Kit comercial.

Siguiendo la metodología descrita por la misma casa comercial ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit, utilizando los reactivos provistos por el Kit, se procedió a realizar la extracción de ADN a partir de una suspensión bacteriana de la cepa de *E. coli*. Se almacenó en un tubo eppendorf estéril de 1.5 mL a -20°C hasta su uso.

3) ADN extraído por lisado térmico.

Se realizó la extracción de ADN a partir de una suspensión bacteriana de la cepa *E. coli*. La suspensión se homogeneizó en vortex por 30 segundos, se dejó en incubación a 95 °C por 5 minutos en Termobloque y se centrifugó a 14000 rpm por 5 minutos. Para finalizar se procedió a retirar el sobrenadante colocándolo en un tubo eppendorf estéril de 1.5 mL con su respectiva rotulación y

almacenado a -20 °C hasta su uso.

4) Calidad de las muestras utilizadas.

Se cuantificó la concentración de ADN y su pureza de muestras de suspensiones bacterianas y lisado termico de *E. coli* 144 en medio LB y OA y extracción de ADN por kit comercial de *E. coli* 144 utilizando el equipo Nanodrop 1000.

Se comparó la concentración de ADN y su pureza. El primero se midió gracias a que esta molécula presenta la máxima absorbancia a 260 nm. Así mismo también se midió su pureza, esta se mide por dos parámetros en este equipo: la relación 260/280 mide que es un buen indicador de contaminación por proteínas y la relación 260/230 que indica la existencia de contaminación causada probablemente por componentes orgánicos o agentes caotrópicos. Los valores de aceptabilidad de pureza se muestran en la tabla 7. Todos los valores mostrados tienen validez con concentraciones altas de ADN (mayores a 50ng/μL) (Bancoadn 2022).

Tabla 7: Valores indicativos de pureza en muestras de ADN (Bancoadn 2022).

| Técnica de análisis | Análisis | Criterios de validez |
|---------------------|----------|--|
| Espectrofotometría | A260/280 | <p>≥1,8-2,1 Pureza óptima</p> <p>≥1,6-1,7 Pureza aceptable</p> <p><1,6 ADN contaminado por compuestos aromáticos</p> <p>>2,1 ADN contaminado con ARN</p> |
| | A260/230 | <p>≥2-2,2 Pureza óptima</p> <p>>1,8 Pureza aceptable</p> <p><1,8 ADN contaminado con sales, fenol, hidratos de carbono...</p> <p>< 1,5 ADN altamente contaminado con sales, fenol, hidratos de carbono...</p> |

5) Ensayos comparativos de las muestras en test LAMP.

Para todas las muestras de los ensayos comparativos (suspensión bacteriana en OA, extracción por lisado térmico, por kit comercial y controles) y juego de cebadores se añadió 22 µL de la pre-mezcla en cada tubo PCR. Posteriormente se añadieron de 3 µL de las muestras dando un volumen final de 25 µL. Luego todos los tubos fueron llevados a condiciones isotérmicas de incubación 65 °C por 60 minutos usando un equipo de PCR en tiempo real Biorad.

3.2.6 Preparación de un control positivo para el test diagnóstico.

Se seleccionó el lisado térmico de *E. coli* 144 en medio LB como control positivo, debido a que se evaluó la correcta y estable amplificación de los genes de interés. Se realizó una suspensión bacteriana en medio LB, la cual se la dejó más tiempo en incubación que el protocolo aplicado anteriormente, hasta que llegó a un DO_{600} de 0,4. Posteriormente se le realizó una extracción de ADN por lisado térmico especificada previamente. Por último se almacenó a -20°C hasta su uso.

3.2.7 Determinación de punto de corte de la prueba diagnóstica LAMP.

Primero se realizó una suspensión bacteriana en medio OA de *E. coli* 144 equivalente a un DO_{600} de 1 (equivalente a 10^7 UFC/mL según nuestra curva de crecimiento) y se efectuó una lisis térmica. El material genético extraído se cuantificó con la finalidad de evaluar su calidad y realizar diluciones seriadas a partir de una concentración conocida. Se realizó una dilución 1:10 (10 µL en 100 µL) de las muestras de ADN extraídas. Se homogeneizó y se midió su contenido y pureza de ADN con el equipo de espectrofotómetro UV-Vis NanoDrop® ND-1000 como se realizó en ensayos anteriores.

A partir de esta solución con concentración de ADN conocida se procedió a realizar diluciones seriadas 1:10 hasta llegar a una concentración de ADN equivalente a la encontrada en 10^2 UFC/mL. Así se obtuvieron soluciones equivalentes en concentración de ADN de $10^7, 10^6, 10^5, 10^4, 10^3$ y 10^2 UFC/mL. A estas soluciones se le realizó el protocolo de LAMP en 60 minutos para lograr obtener un tiempo de corte para la reacción.

3.3 Evaluación de la reactividad cruzada con otros microorganismos uropatógenos.

Se realizaron lisados térmicos de las cepas de *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*, *S. saprophyticus* y *P. aeruginosa* como se describió en los métodos de extracción del material genético. Posteriormente se realizó la técnica previamente descrita de LAMP en 60 minutos.

3.4 Validación con muestras clínicas positivas y negativas comparando con técnica “gold standard”.

3.4.1 Obtención de muestras.

Se estudiaron 30 muestras de orina de pacientes con sospecha de ITU a los cuales se les solicitaron urocultivos provenientes del Centro Hospitalario Pereira Rossell. A estos pacientes se les pidió consentimiento informado para poder utilizar las muestras para esta validación. Los urocultivos y la identificación bacteriana fueron realizados según técnicas estándar en el laboratorio clínico de dicho centro hospitalario. Estas muestras son parte de una colaboración con dicho centro en el marco del proyecto titulado: “Caracterización de la microbiota urinaria y sus implicancias clínicas en niños y adultos.” Una vez ingresadas las muestras se las codificó, se les realizó una lisis térmica a 95°C por 5 minutos, centrifugación a 10000 rpm y se trasladó el sobrenadante a un tubo esteril nuevo. Los resultados de los urocultivos fueron enviados posteriormente a realizada la reacción de LAMP (muestras ciegas).

3.4.2 Protocolo final de LAMP para *E. coli* UPEC en orina.

En cada tubo de PCR se añadió 22 µL de la pre-mezcla para cada tipo de set de cebadores y de manera individual se añadieron de 3 µL de de control positivo, control negativo y las muestras a analizar, dando un volumen final de 25 µL. Luego todos los tubos fueron llevados a condiciones isotérmicas de incubación a 65 °C por 50 minutos usando un equipo de PCR en tiempo real Biorad. Una vez transcurrido este tiempo se interrumpe la reacción y se observan los resultados.

3.4.3 Análisis e interpretación de los resultados.

Los resultados se analizaron de forma que el control positivo amplifica en un rango de 32-34 minutos para los cebadores *chuA* y de 35-36 para los cebadores *malB* para poder tomar como válido el ensayo. Para las muestras se tomó como referencia el ensayo de determinación de punto de corte de la prueba diagnóstica LAMP, el minuto 46 para cebadores *chuA* y 47 para los *malB*, la amplificación antes de estos tiempos se tomará como test positivos y amplificaciones posteriores o inexistentes test negativos.

Los datos obtenidos en los ensayos se analizaron en una tabla de cuatro casillas como se especifica en la tabla 8 comparando con la técnica gold standard de urocultivo (Sarmiento and Alexander 2018).

Tabla 8: Tabla de cuatro casillas.(Sarmiento and Alexander 2018)

| Resultado de la Prueba | Urocultivo | |
|------------------------|------------|----------|
| | Positivo | Negativo |

| | | | |
|-------------|-----------------|---------------------------|---------------------------|
| LAMP | Positivo | Verdaderos Positivos (VP) | Falsos positivos (FP) |
| | Negativo | Falsos Negativos (FN) | Verdaderos Negativos (VN) |

La especificidad se refiere a la probabilidad de que en una prueba diagnóstica un sujeto sano tenga un resultado negativo, se calculó usando la siguiente fórmula (Sarmiento and Alexander 2018).

$$Especificidad = \frac{Verdaderos\ Negativos\ (VN)}{Falsos\ positivos\ (FP) + Verdaderos\ Negativos\ (VN)} * 100\%$$

La Sensibilidad se define como la probabilidad de que en una prueba diagnóstica un sujeto enfermo dé un resultado positivo y se calculó mediante la siguiente fórmula (Sarmiento and Alexander 2018).

$$Sensibilidad = \frac{Verdaderos\ Positivos\ (VP)}{Verdaderos\ Positivos\ (VP) + Falsos\ Negativos\ (FN)} * 100\%$$

La reproducibilidad se define como la capacidad del test para repetir los mismos resultados en circunstancias similares, se probó mediante la valoración por duplicado de cada ensayo (Sarmiento and Alexander 2018).

El valor predictivo positivo (VPP) como la probabilidad de estar enfermo una vez que el resultado es positivo. En el denominador pondremos el total de positivos, mientras que en el numerador pondremos aquellos enfermos que dan positivo a la prueba (Bravo-Grau and Cruz Q 2015).

$$VPP = \frac{Verdaderos\ Positivos\ (VP)}{Verdaderos\ Positivos\ (VP) + Falsos\ positivos\ (FP)} * 100\%$$

Por su parte, el valor predictivo negativo (VPN) será la probabilidad de que un negativo esté sano. En el denominador pondremos el número total de negativos y en el numerador el número de sanos que tienen prueba con resultado negativo. (Bravo-Grau and Cruz Q 2015)

$$VPN = \frac{Verdaderos\ Negativos\ (VN)}{Verdaderos\ Negativos\ (VN) + Falsos\ negativos\ (FN)} * 100\%$$

Los likelihood ratios (LR) o razones de verosimilitud se definen como cuántas veces es más probable que un paciente con la enfermedad tenga un determinado resultado en el test que pacientes sin la enfermedad. Dicho de otra manera, es la razón de probabilidad de un resultado específico en pacientes con la enfermedad versus en aquellos que no la tienen. (Bravo-Grau and Cruz Q 2015)

$$LR(+) = \frac{Sensibilidad}{1 - Especificidad}$$

$$LR(-) = \frac{1 - Sensibilidad}{Especificidad}$$

Por último la exactitud diagnóstica es la probabilidad de que el resultado del test prediga correctamente

la presencia o ausencia de la enfermedad.(Bravo-Grau and Cruz Q 2015)

$$\textit{Exactitud diagn\u00f3stica} = \frac{VP + VN}{\textit{Total de muestras}} * 100\%$$

4. RESULTADOS

4.1 Diseño, adquisición de cebadores específicos LAMP específicos.

Se seleccionó el gen *chuA* como respuesta a la búsqueda dentro de los 131 genes reportados por Brons et al., se estudió con una herramienta online de alineamientos “blastn” y resultó un gen exclusivo de *E. coli* UPEC. No se encontró homología en *E. coli* comensales y fecales además de otras bacterias uropatógenas. En cambio *malB* fue seleccionado de material bibliográfico de otros estudios similares para la técnica LAMP, los cuales resaltan su relativa conservación en *E.coli* pero con regiones suficientemente variables para poder obtener una amplificación específica para *E.coli uropatogena* (Hoffmann et al. 2001; Hill et al. 2008; Ramezani et al. 2018; Saengsawang et al. 2021).

Se generaron 46 juegos de primers con el programa “PrimerExplorer software” versión 5, los cuales se analizaron en cuanto a su especificidad con el programa online “Primer-Blast – NCBI – NIH”, sus características fisicoquímicas en “OligoCalc Software” y se alinearon con secuencias de *E. coli* UPEC utilizando el programa “BioEdit Sequece Alignment Editor” para evaluar los mismatches entre los cebadores y con la secuencia genómica de *E. coli* UPEC. Este análisis resultó en la selección de 2 juegos potenciales de cebadores para cada gen, mostrando un alto grado de identidad. El análisis realizado con el programa “BioEdit Sequece Alignment Editor”, detectó que los cebadores del gen *malB* presentan bases que no se aparean con uno de los genotipos estudiados. Esto no debería ser un problema porque al no encontrarse en los extremos del cebador no debería afectar la hibridación. El análisis de especificidad se realizó con el programa “Primer-Blast – NCBI – NIH” y no encontró homologías significativas con secuencias humanas para ninguno de los 4 juegos de cebadores. Sin embargo para los cebadores de *malB* se observó que contiene algunas hibridaciones con *Klebsiella*, sin embargo decidimos proceder con este juego de cebadores debido a que la incidencia en el test podría ser poco relevante después de la puesta a punto del test. Igualmente se trabajó con el programa “Multiple Primer Analyzer - Thermo Scientific TM”, con el cual se modificó a mano la secuencia para disminuir su compatibilidad con el microorganismo no deseado. Por lo tanto después de este análisis se eligió un juego de cebadores para cada gen presentes en la Tabla 9 y se los mando a sintetizar a la empresa MacroGen.

Tabla 9: Lista de secuencias de oligonucleótidos LAMP y características fisicoquímicas.

| Gen | Cebador | Secuencia (5'-3') | Tamaño (pb) | Tm (°C) | Contenido GC (%) |
|-------------|---------|--|-------------|---------|------------------|
| <i>chuA</i> | F3 | CGACAGCTGCAGTTTCATCA | 20 | 60.32 | 50 |
| | B3 | CCTGATCAACCACAAACCGT | 20 | 60.05 | 50 |
| | FIP | CCAACCTCCTACCGTACCTCGCAC-ATGTTTCAT CTGCCAGTCG | 41 | 72.3 | 57 |

| | | | | | |
|-------------|-----|---|----|-------|----|
| <i>malB</i> | BIP | TTAGTGC GTGATCGTGCACCAT-ACTGGCTTT GGTCGTCATG | 40 | 69.5 | 51 |
| | LF | ACCCTTACGCTGAAGAGATGCT | 22 | 63.35 | 50 |
| | LB | AGCACGTTATCGAATCCTTTGCC | 23 | 63.37 | 48 |
| | F3 | TACCTGCCCAGATGGTGG | 18 | 60.20 | 61 |
| | B3 | CGTCTTGGCAACGAATGTGA | 20 | 60.55 | 50 |
| | FIP | AGCTACCGATCCGGCCTTCC-CTGGCAGCCA TTCGATCAG | 39 | 72.9 | 60 |
| | BIP | TCTGTTGTGCGACGGAATAGGC-TGGGTCAG GAAGTGTGGA | 40 | 70.6 | 55 |
| | LF | TGAAGCAAACGTGCAGGGTAA | 21 | 62.47 | 48 |
| | LB | CGAAATAGAAGCTCTTATCGCCCT | 24 | 62.22 | 46 |

4.2 Estandarización del protocolo de LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification).

4.2.1 Curvas de crecimiento

1) *Escherichia coli* 144

Se efectuó una curva de crecimiento de *E. coli* 144 en medio LB. Se obtuvo como resultado un comportamiento similar de las curvas realizadas mediante recuento (concentración de unidades formadoras de colonias por mL de medio) y la densidad óptica del cultivo (DO_{600}) como se muestra en las figuras 5 y 6.

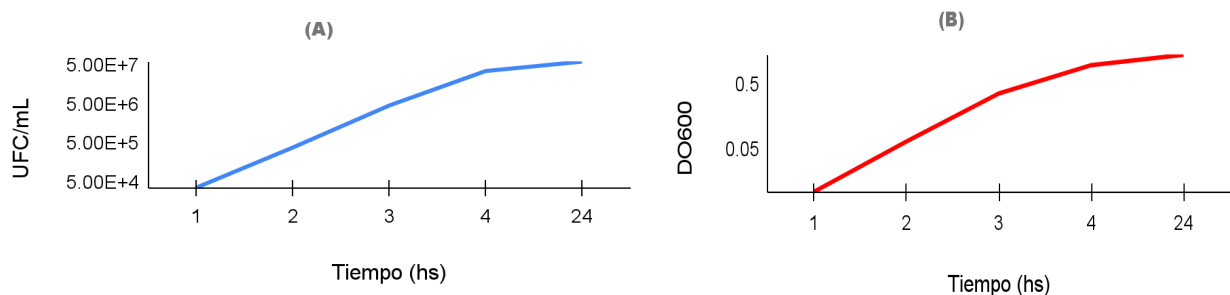


Figura 5: Curvas de crecimiento de *E. coli* 144 en medio LB. Para el panel (A) se relacionan las unidades

formadoras de colonias y el tiempo transcurrido de incubación. Por otro lado en el panel (B) se relaciona DO_{600} del mismo medio y los mismos tiempos que en el panel (A).

Observando los resultados de la figura 5, se estimó que la DO_{600} necesaria para obtener una concentración típica de infección en orina (10^5 UFC/mL) se logra a partir de un valor de DO_{600} de 0,3.

Considerando que la muestra a estudiar será orina, se realizó una curva de crecimiento de *E. coli* 144 cambiando el medio de incubación por medio OA. Como se muestra en la figura 6, se efectuó una comparativa de velocidad de crecimiento y la turbidez del cultivo (DO_{600}). Esta relación se usó para los ensayos subsiguientes.

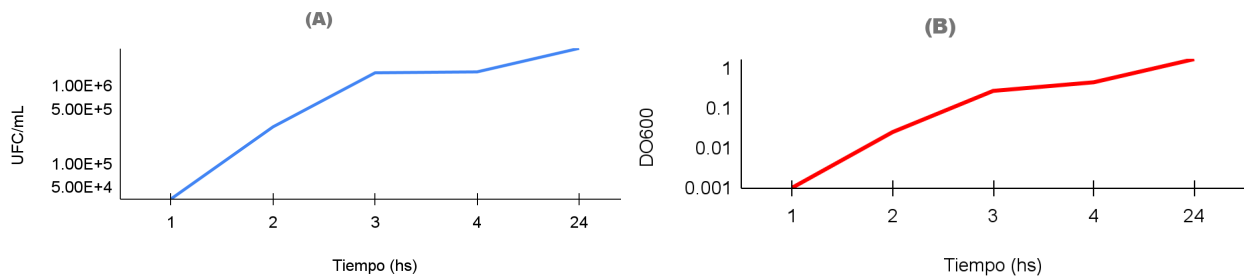


Figura 6: Curvas de crecimiento de *E. coli* 144 en medio OA. Para el panel (A) se relacionan las unidades formadoras de colonias y el tiempo transcurrido de incubación. Por otro lado en el panel (B) se relaciona DO_{600} del mismo medio y los mismos tiempos que en el panel (A).

Según los datos recabados de la Figura 6, la DO_{600} necesaria para llegar a la concentración típica de infección en urocultivo fue de 0,3. Este valor se tomó como referencia para los siguientes ensayos.

2) Otras bacterias uropatógenas.

Con las cepas seleccionadas *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*, *S. saprophyticus*, *P. aeruginosa* se llevó a cabo un ensayo de curva de crecimiento de la misma manera que para la curva de *E. coli* 144 en OA.

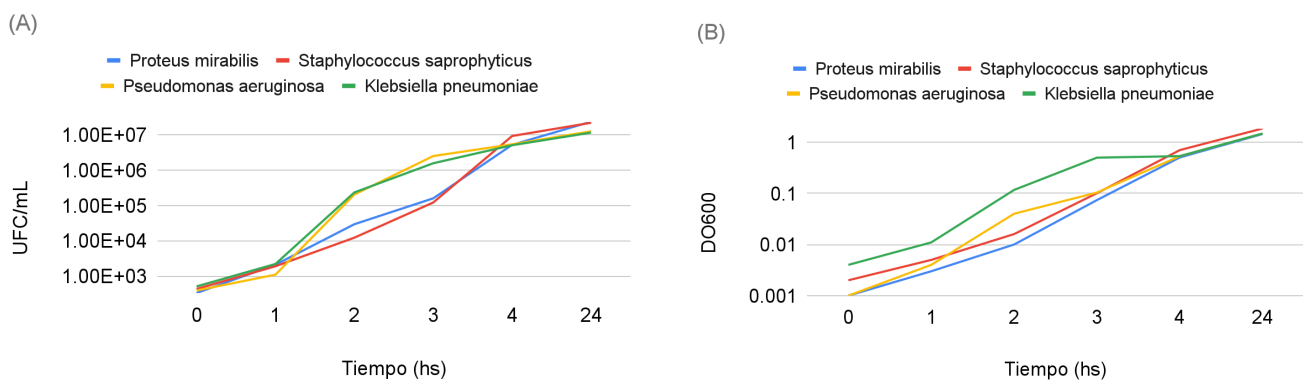


Figura 7: Curvas de crecimiento de microorganismos uropatógenos en medio OA. Para el panel (A) se relacionan

las unidades formadoras de colonias y el tiempo transcurrido de incubación. Por otro lado en el panel (B) se relaciona DO₆₀₀ del mismo medio y los mismos tiempos que en el panel (A).

Los resultados mostraron un comportamiento similar al mostrado por *E. coli* en medio OA, obteniendo una concentración típica de infección (10⁵ UFC/mL) antes de las 4 horas de ensayo. Se estimó un valor de DO₆₀₀ correspondiente a una concentración típica de infección, esta se alcanza después de obtener un DO₆₀₀ de 0,3. Este valor se utilizará más adelante en otros ensayos.

4.2.2 Comparación de métodos de extracción del material genético.

Se realizaron suspensiones bacterianas y lisados térmicos de *E. coli* 144 en LB y OA de 10⁵ UFC/mL, a los cuales se les midió su concentración de ADN y pureza. Los resultados están expresados en la Tabla 10.

Tabla 10: Resultados obtenidos mediante la medida con Nanodrop del ADN presentes en las muestras de suspensión bacteriana, lisado térmico y extracción de ADN.

| Muestra | ng/μL | 260/280 | 260/230 |
|---|-------|---------|---------|
| Suspensión bacteriana de <i>E. coli</i> en medio LB | 912,4 | 1,11 | 1,44 |
| Suspensión bacteriana de <i>E. coli</i> en medio OA | 805,2 | 0,91 | 1,03 |
| Lisado termico de <i>E. coli</i> en medio LB | 921,4 | 1,49 | 1,62 |
| Lisado termico de <i>E. coli</i> en medio OA | 670,5 | 1,19 | 1,12 |
| Extracción de ADN con kit comercial de <i>E. coli</i> en medio LB | 108,8 | 1,71 | 1,93 |

4.2.3 Ensayos comparativos de las muestras en test LAMP.

Para todas las muestras comparadas analizadas (suspensión bacteriana OA usando extracción de lisado térmico usando kit comercial y control) y conjunto de cebadores, se agregan 22 μL de premezcla a cada tubo de PCR. Luego se agregaron 3 μL de muestra hasta un volumen final de 25 μL. A continuación, todos los tubos se sometieron a incubación isotérmica a 65 °C durante 60 min en termociclador Real-Time PCR.

Los resultados obtenidos en medio OA muestran que la técnica LAMP es capaz de amplificar ADN usando 3 μl de suspensión bacteriana, ADN extraído por Kit o ADN extraído por lisado térmico. LAMP

presenta una tolerancia importante a componentes del medio de cultivo y sustancias biológicas que pueden inhibir la reacción en otras técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (Arroyo et al., 2008, Motamedi et al., 2011, Cheng et al., 2014, Sánchez et al., 2014; Fernández-Soto et al., 2016).

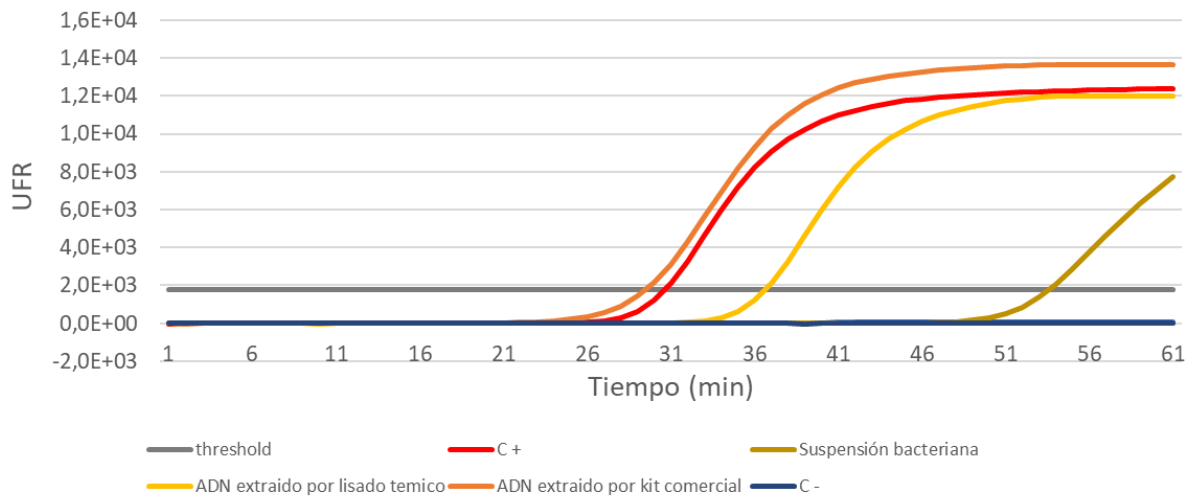


Figura 8: Gráfico prueba diagnóstica LAMP en cebadores *chuA*, ensayo comparativo de las muestras de suspensión bacteriana y lisado térmico en medio OA y extracción de ADN genómico de *E. coli* en medio LB por kit comercial.

Según los datos mostrados en la Figura 8, esta técnica fue capaz de detectar los genes *chuA* y *malB* de la extracción de ADN por lisis térmica y extracción de ADN mediada por kit. Sin embargo, la detección del ADN presente en la suspensión bacteriana en AO se obtuvo en un tiempo mucho mayor a que el control positivo o las extracciones.

4.2.4 Determinación de punto de corte de la prueba diagnóstica LAMP.

Para detectar el punto de corte del test, primero se realizó una suspensión bacteriana equivalente a 10^7 UFC/mL, se cuantificó el ADN en esa muestra y se realizaron diluciones seriadas de 10 μ L en 100 μ L. Obteniendo así soluciones con material genético equivalente a $10^7, 10^6, 10^5, 10^4, 10^3$ y 10^2 UFC/mL. En cada tubo de PCR se añadieron 22 μ L de la pre-mezcla de reacción y 3 μ L de cada dilución seriada de la muestra de ADN, con un volumen final de 25 μ L. Luego los tubos fueron llevados al termociclador, Amplificador de ADN Bio-Rad modelo C1000, en el cual se programó el protocolo de termociclador bajo las condiciones de reacción LAMP.

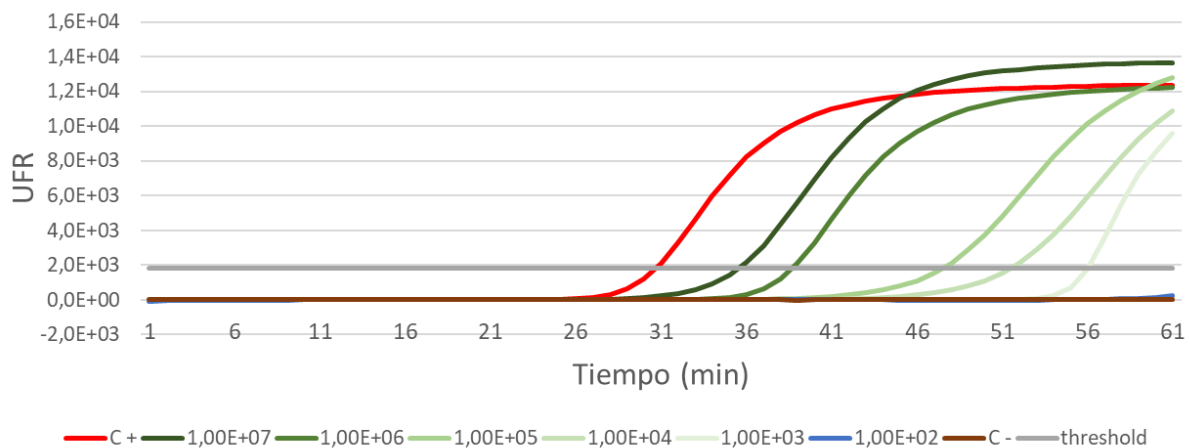


Figura 9: Gráfico prueba diagnóstica LAMP en cebadores *chuA*, ensayo de determinación de punto de corte con diluciones seriadas de material genético equivalente a 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 y 10^2 UFC/mL.

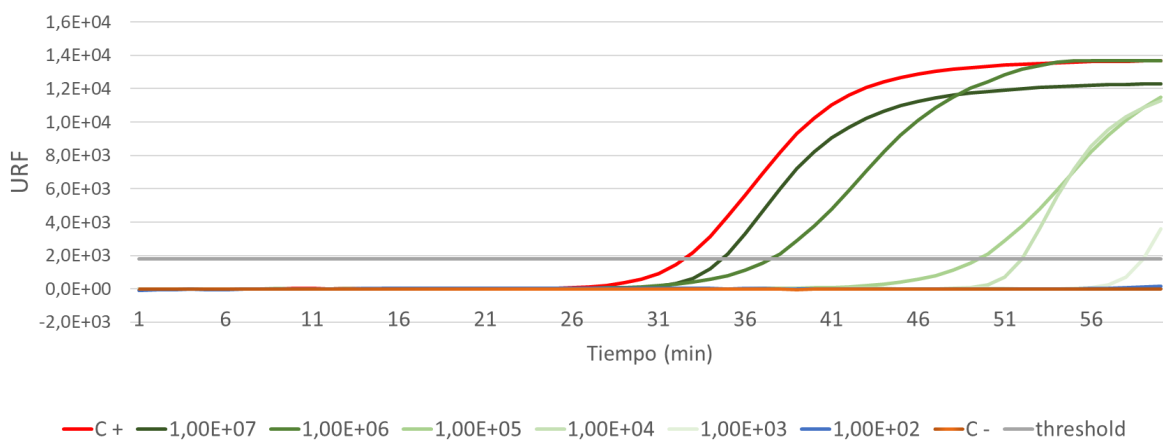


Figura 10: Gráfico prueba diagnóstica LAMP en cebadores *malB*, ensayo de determinación de punto de corte con diluciones seriadas de material genético equivalente a 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 y 10^2 UFC/mL.

Estos resultados muestran dos puntos de corte distintos para los cebadores *chuA* y *malB*. Todas las soluciones que sobrepasan o igualan a la amplificación correspondiente a la solución que contiene la cantidad equivalente de material genético de 10^5 UFC/mL (concentración de corte típica de infección urinaria en urocultivo) se sitúan antes del minuto 47 para *malB*, mientras que para *chuA* en el minuto 46. Por lo tanto se concluye que todas las reacciones para el juego de cebadores *malB* que amplifiquen antes del minuto 47 serán positivas en nuestro test diagnóstico, del mismo modo será para *chuA* en el minuto 46 de reacción.

4.3 Evaluación de la especificidad del test diagnóstico y reactividad cruzada con otros microorganismos uropatógenos.

Para evaluar la especificidad del ensayo, se realizó una prueba de reacciones cruzadas utilizando los microorganismos seleccionados en las etapas anteriores. Se empezó realizando lisados térmicos de suspensiones bacterianas en medio OA de los patógenos elegidos. Estas suspensiones se incubaron por 4 horas hasta que el valor de DO_{600} fue de 0,3 y se le realizó el protocolo de lisado térmico. Se les realizó el test de igual manera que en el ensayo de prueba y sensibilidad. En cada tubo PCR se añadieron 22 μ L de la pre-mezcla de reacción y 3 μ L de cada dilución seriada de la muestra de ADN, con un volumen final de 25 μ L. Luego los tubos fueron llevados al Termociclador, Amplificador de ADN Bio-Rad modelo C1000, en el cual se programó el protocolo de termociclador bajo las condiciones de la tabla 11.

Tabla 11: Nuevas condiciones de amplificación LAMP.

| Etapa | Temperatura (°C) | Tiempo (min) |
|--------------|------------------|--------------|
| EXTENSIÓN | 65 | 50 |
| INACTIVACIÓN | 80 | 10 |
| CONSERVACIÓN | 4 | ∞ |

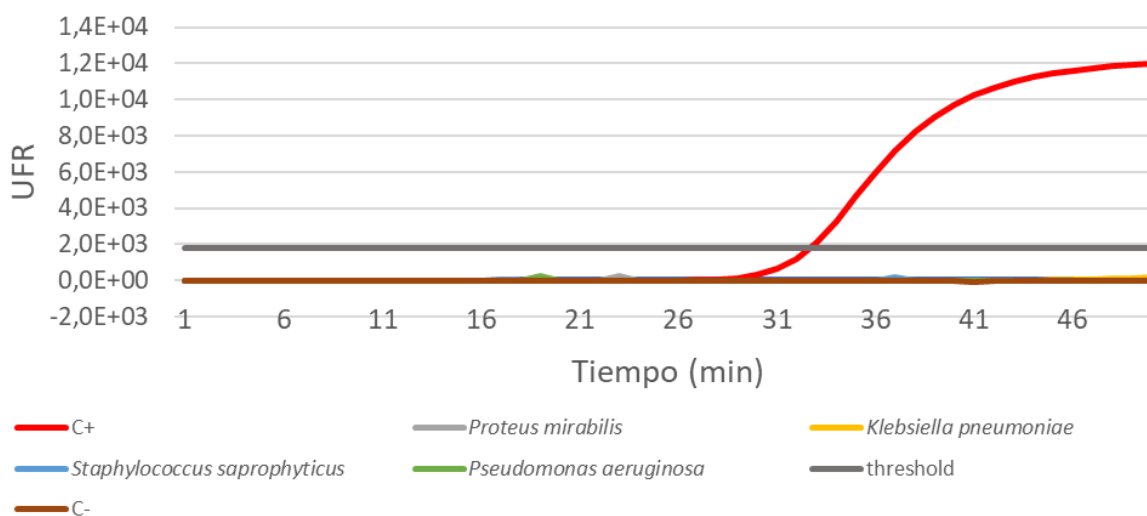


Figura 11: Gráfico prueba diagnóstica LAMP, ensayo de determinación de reactividad cruzada con otros microorganismos uropatógenos con juego de cebadores *chuA*.

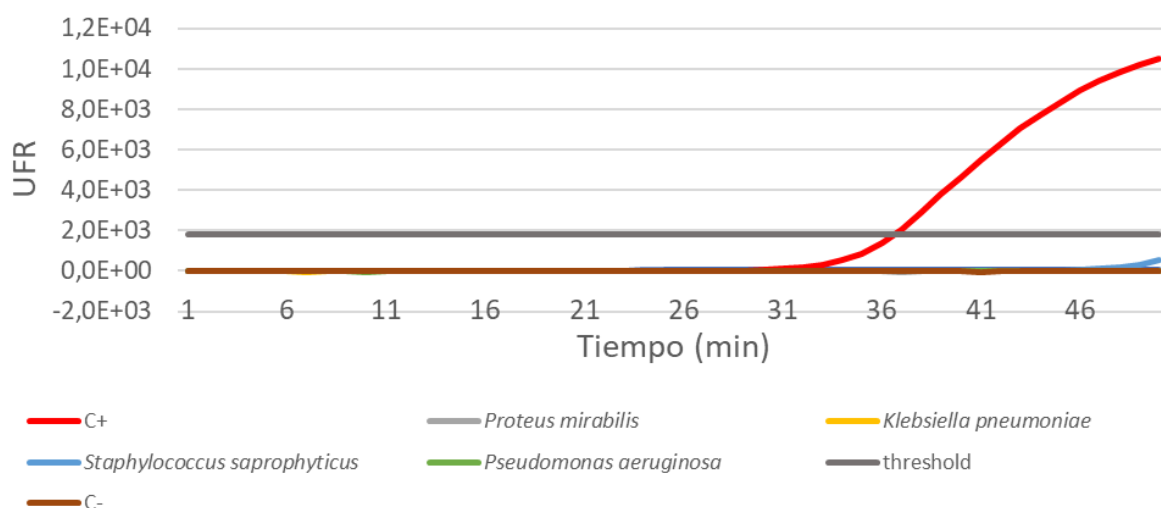


Figura 12: Gráfico prueba diagnóstica LAMP, ensayo de determinación de reactividad cruzada con otros microorganismos uropatógenos con juego de cebadores *malB*.

Estos experimentos determinaron que para ambos juegos de cebadores (*malB* y *chuA*) no amplificaron ninguno de los genes detectados en ninguno de los microorganismos seleccionados para este estudio de reacciones cruzadas. Podemos concluir que en las condiciones evaluadas el los test son específicos.

4.4 Validación con muestras clínicas positivas y negativas comparando con técnica gold standard.

Se estudiaron 30 muestras de orina de pacientes atendidos en el Centro Hospitalario Pereira Rossell con sospecha de ITU, a los cuales se les fue solicitado un urocultivo. Las muestras de orina fueron codificadas con un número que se correlaciona luego con el número del laboratorio clínico, para poder solicitar posteriormente el resultado del urocultivo e identificación bacteriana. Una alícuota de la muestra de orina fue procesada en el Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable utilizando el nuevo test LAMP desarrollado, sin conocer los resultados del laboratorio clínico (ensayo ciego).

El proceso de la muestra consistió una lisis térmica a 95°C por 5 minutos seguido a una centrifugación a 10000 rpm por 5 minutos, el sobrenadante se traslada a un eppendorf esteril el cual se analizó utilizando el protocolo final del test diagnóstico LAMP para *E. coli* UPEC con el juego de cebadores *chuA* y *malB*. Posteriormente que se obtuvieron los resultados del test, se compararon con los resultados obtenidos por el urocultivo realizado por el laboratorio clínico del Centro Hospitalario Pereira Rossell. Estos resultados se muestran en la tabla 12. Se utilizó la tabla de cuatro casillas como lo específica Sarmiento et. al. Los resultados de *chuA* se muestran en la tabla 13 y los de *malB* en la tabla 14 (Sarmiento and Alexander 2018). Solamente se tomaron como positivos los urocultivos que presentan una identificación a *E. coli*.

Tabla 12: Resultados de test diagnóstico LAMP para *chuA*, *malB* y urocultivo con su identificación.

| N° de muestra | Test LAMP con cebadores: | | Urocultivo | |
|---------------|--------------------------|-------------|------------|----------------------------|
| | <i>ChuA</i> | <i>MalB</i> | Resultado | Identificación fenotípica |
| 1 | Positivo | Negativo | Negativo | Negativo |
| 2 | Positivo | Positivo | Positivo | <i>E. coli</i> |
| 3 | Negativo | Negativo | Negativo | <i>Staphylococcus spp.</i> |
| 4 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| 5 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| 6 | Positivo | Positivo | Positivo | <i>E. coli</i> |
| 7 | Positivo | Negativo | Negativo | Negativo |
| 8 | Positivo | Negativo | Positivo | <i>E. coli</i> |
| 9 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| 10 | Negativo | Positivo | Negativo | <i>Klebsiella spp.</i> |
| 11 | Positivo | Positivo | Positivo | <i>E. coli</i> |
| 12 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| 13 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| 14 | Positivo | Positivo | Positivo | <i>E. coli</i> |
| 15 | Negativo | Negativo | Negativo | <i>Proteus spp.</i> |
| 16 | Positivo | Positivo | Positivo | <i>E. coli</i> |
| 17 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| 18 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| 19 | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo |
| 20 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| 21 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| 22 | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo |
| 23 | Positivo | Positivo | Positivo | <i>E. coli</i> |
| 24 | Positivo | Negativo | Positivo | <i>E. coli</i> |
| 25 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| 26 | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo |
| 27 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| 28 | Positivo | Positivo | Positivo | <i>E. coli</i> |
| 29 | Positivo | Positivo | Positivo | <i>E. coli</i> |
| 30 | Positivo | Positivo | Positivo | <i>E. coli</i> |

Tabla 13: Tabla de cuatro casillas, evaluación de los resultados del test diagnóstico con juego de cebadores *chuA*.

| Resultado de la Prueba | | Urocultivo | | Total |
|------------------------|----------|------------|----------|-------|
| | | Positivo | Negativo | |
| LAMP | Positivo | 11 | 2 | 13 |
| | Negativo | 0 | 17 | 17 |
| Total | | 11 | 19 | 30 |

Se detectó mediante la técnica desarrollada todas las muestras que resultaron positivas para *E. coli* en el urocultivo, por lo que la sensibilidad hallada en esta validación es del 100% y la especificidad fue de un 89,47%. El valor predictivo positivo es de 84,62%, el valor predictivo negativo fue de 100% y la precisión del diagnóstico es de un 93,33%.

Utilizando los resultados obtenidos de *malB* se analizaron las mismas 30 muestras que para *chuA* y se compararon los resultados obtenidos en la tabla de cuatro casillas (Tabla 14).

Tabla 14: Tabla de cuatro casillas, evaluación de los resultados del test diagnóstico con juego de cebadores *malB*.

| Resultado de la Prueba | | Urocultivo | | Total |
|------------------------|----------|------------|----------|-------|
| | | Positivo | Negativo | |
| LAMP | Positivo | 9 | 4 | 13 |
| | Negativo | 2 | 15 | 17 |
| Total | | 11 | 19 | 30 |

Para el test diagnóstico empleando el juego de cebadores *malB* la sensibilidad detectada fue del 81,82%, la especificidad de 78,95%, valor predictivo positivo de 69,23%, valor predictivo negativo de 88,24% y la precisión de diagnóstico fue de un 80%.

Tabla 15: Tabla comparativa de performance para test LAMP con juego de cebadores *chuA* y *malB*.

| | <i>chuA</i> | <i>malB</i> |
|----------------------------------|-------------|-------------|
| Sensibilidad | 100% | 81,82% |
| Especificidad | 89,47% | 78,95% |
| Valor predictivo positivo | 84,62% | 69,23% |
| Valor predictivo negativo | 100% | 88,24% |
| Precisión de diagnóstico | 93,33% | 80% |

5. DISCUSIÓN

Desarrollamos y evaluamos un test de diagnóstico rápido para infecciones urinarias causadas por *E. coli*, las cuales comprenden más del 80% de las infecciones urinarias a nivel global. El diagnóstico de ITU a menudo se lleva a cabo mediante síntomas clínicos, exámenes microscópicos, de cultivo y/o test rápidos de *screening* de ITU. El diagnóstico al microscopio directo tiene una alta tasa de error (aproximadamente 31 %) y los métodos basados en cultivos llevan entre 24 y 48 horas (Glissmeyer et al. 2014). Las ventajas de los métodos basados en la amplificación de ácidos nucleicos, como la PCR, son su velocidad y sensibilidad en la detección de patógenos, pero estos ensayos necesitan usuarios capacitados y algunos dispositivos costosos. En cambio a nivel de los laboratorios clínicos utilizan tiras reactivas como método rápido de diagnóstico (para la detección de nitritos y esterasas leucocitarias.). Su desventaja es el no detectar directamente las bacterias en orina y eso causa su baja sensibilidad (41-64% para nitritos y 48-86% para leucocitos) y especificidad (85-98% para nitritos y 82-90% para leucocitos), lo cual conduce en muchos casos a diagnósticos incorrectos (St John et al. 2006; Williams et al. 2010). En cambio en este estudio, se empleó uno de los métodos isotérmicos de amplificación de ácidos nucleicos llamado LAMP para superar los problemas mencionados en los procedimientos de diagnóstico de ITU.

LAMP puede reconocer el gen de interés con 6 cebadores y la amplificación se puede realizar a temperatura constante en 50 min. A diferencia de la PCR, no hay necesidad de termociclador, ni extracción compleja de ácidos nucleicos, ni desnaturalización por calor del ADN de doble cadena en el proceso de amplificación. Hay algunas investigaciones similares en las que el ensayo LAMP se ha dirigido a diferentes genes para detectar varias cepas de *E. coli*, como *stx1*, *stx2* (Wang et al. 2012), *aggR*, *ipaH* (Yokoyama et al. 2010), los genes *heat-labile I (LTI)* y *heat-stable I (STI)* (Yano et al. 2007) y *malB* (Hill et al. 2008). Aunque existen todas estas investigaciones para detectar *E. coli* mediante el método LAMP, no existe ningún informe sobre el empleo de esta técnica para identificar *E. coli uropatogena* en muestras de orina minimizando el paso de extracción del material genético en orina.

A partir del programa de diseño de cebadores PrimerExplorer se seleccionaron dos grupos de 6 secuencias cebadoras para la reacción de amplificación de LAMP. Cabe destacar que el diseño fue realizado en base a las condiciones estándar del programa, con ligeras modificaciones, las cuales se pueden modificar para precisar el diseño de los cebadores.

Se ha informado que LAMP muestra una alta tolerancia a diferentes inhibidores que están naturalmente presentes en varias muestras biológicas (Jevtuševskaja et al. 2016). Esto se ve reflejado en el ensayo de comparación de métodos de extracción del material genético, en donde se observó que en medio LB se comportó de manera muy similar en todas las condiciones estudiadas, menos en la extracción de ADN con kit comercial de *E. coli* en medio LB, que amplifica de manera similar al control positivo. En cambio en orina artificial se observó que la suspensión bacteriana simplemente demoraba la amplificación a tiempos mayores de 1 hora, por lo que se consideró adecuado realizar una extracción térmica simple. Este ensayo confirma la resistencia a inhibiciones presentada por LAMP. Las muestras utilizadas excepto la extracción de ADN por kit comercial se encuentran contaminadas o muy contaminadas según el programa de control de calidad de muestras de ADN y ARN del Banco nacional de ADN Carlos III (Bancoadn 2022).

El método de detección de los productos de amplificación más empleado en todos los casos es la detección visual mediante emisión de fluorescencia tras la adición de SYBR® Green I y posterior electroforesis en gel de agarosa. Este fue utilizado para este test diagnóstico y en todos los casos se observó correlación entre los resultados observados visualmente y los obtenidos tras la electroforesis

(Le et al. 2012). Sin embargo los productos de amplificación mediante LAMP se pueden detectar por diferentes métodos, tales como: turbidez, electroforesis, fluorescencia, centrifugación y por cambio de color; estos últimos permiten la visualización inmediata del resultado una vez finalizada la reacción.

Una de las ventajas de LAMP frente a otras opciones del mercado es su capacidad de hacerse en un tiempo reducido y no necesitando instalaciones sanitarias de cierta complejidad. Esta técnica entra en la categoría denominada en la literatura médica como pruebas diagnósticas en el lugar de atención al paciente o POC. Esto se logra en el test desarrollado al realizarse en 50 minutos, aunque todavía este ensayo se realiza en un equipo de PCR en tiempo real el cual se considera un equipo costoso. Igualmente se podrá validar esta técnica utilizando otro tipo de visualización eliminando la necesidad de este equipo. Esto se puede lograr utilizando termobloques o baños termostáticos y métodos de detección directa de la amplificación como ya han utilizado otros autores (Hatano et al. 2010; Gandelman et al. 2011). Algunos ejemplos de métodos de detección directa de la amplificación son: detección de turbidez utilizando pirofosfato de magnesio (Fischbach et al. 2015; Li et al. 2018), detección de color utilizando un reactivo indicador de pH como Rojo fenol (Baek et al. 2020) o métodos más complejos como el utilizado por Li et al. llamado "Detector" basado en la tecnología CRISPR (Li et al. 2018).

Otra de las razones de la elección de LAMP como método de diagnóstico es su especificidad, esto se demuestra en nuestro ensayo de reacciones cruzadas de LAMP en OA con otras bacterias patógenas. En el cual no resultaron positivas ninguna de las bacterias testeadas. Esto se logra a partir de una buena elección de las secuencias objetivo (*chuA* y *malB*), diseño de los cebadores y puesta a punto de la técnica.

La validación de la técnica contiene un número reducido de muestras por lo que es aconsejable obtener más ensayos pareados para tener un estudio estadísticamente confiable. Sin embargo este estudio logra obtener un resultado alentador para este test, los que se podrán profundizar en un futuro. El juego de cebadores *chuA* es el que muestra resultados más alentadores para un test, obteniendo una precisión de diagnóstico del 93,33% y una sensibilidad del 100% haciéndolo ideal para un test de screening previo a la confirmación con urocultivo. En cuanto al conjunto de cebadores *malB*, se determinó que no tiene la sensibilidad ni especificidad necesaria para este tipo test y la precisión del diagnóstico también fue menor. Podría mejorar, optimizando los cebadores o agregando DMSO o Betaína al mix de reacción LAMP. Estos compuestos podrían aminorar los falsos positivos optimizando la eficiencia de la reacción (Wang et al. 2015; Foo et al. 2020). Wang et al. sostiene que se podría mejorar estos parámetros ajustando también la temperatura de reacción (Wang et al. 2015).

El urocultivo seguirá siendo el *gold standard* debido a su capacidad de diagnóstico, su costo y prevalencia en el sistema de salud. Sabiendo que la *performance* diagnóstica de la tira reactiva es deficiente en comparación con LAMP, esta podría ser potencialmente reemplazada por esta técnica. LAMP presenta ventajas en muchos aspectos, un paciente comúnmente tiene un período de atención y espera de al menos 90 minutos en la clínica de emergencia (Hajzargarbashi et al. 2019). Este tiempo se ajusta perfectamente a los tiempos del test LAMP desarrollado. Podría cubrir el 80% de los casos de ITU reportados, lo que podría mejorar el diagnóstico al ser más sensible y específico que una tira reactiva de diagnóstico rápido.

Por último es posible mejorar esta técnica en gran medida, implementando reacciones en paralelo sobre otros microorganismos y/o evaluación de resistencia a los antibióticos más importantes. Podría mejorar mucho el diagnóstico, precisando el uso de los antibióticos existentes, lo que evitaría en gran medida generar resistencias a antibióticos más importantes en el futuro. Además, de la mejora del

paciente al obtener un diagnóstico más preciso en menor tiempo.

6. CONCLUSIÓN

Los análisis realizados pudieron constatar que la técnica LAMP tuvo altos niveles de especificidad y sensibilidad hacia el gen *chuA*. Los resultados son muy prometedores para su uso como test de screening de infecciones urinarias. Las ventajas que tiene a diferencia con los test rápidos actuales (tiras reactivas) es que se logra detectar directamente las bacterias en la orina y su sensibilidad y especificidad se ven mejoradas. La técnica es totalmente compatible con el urocultivo, siendo este confirmatorio de la infección en curso.

La pureza de la muestra de ADN suele ser un factor clave para garantizar buenos resultados en técnicas de amplificación de ácidos nucleicos como PCR, sin embargo, los resultados de este estudio demostraron que para la técnica LAMP la pureza de la muestra no es un inconveniente para amplificar ADN teniendo alta especificidad y sensibilidad (>99%) para reconocer únicamente la secuencia del gen de interés, incluso cuando la muestra es orina la cual contiene una gran cantidad de sustancias inhibidoras para una PCR convencional.

Usar una temperatura constante para poder amplificar ADN representa una ventaja importante con respecto a otras técnicas que necesitan realizar una desnaturalización inicial con temperaturas altas y luego continuar con temperaturas bajas repitiendo esto en varios ciclos para poder amplificar ADN. Esto permite que se pueda realizar en equipos de fácil acceso como un baño maría o un termobloque, además de mejorar enormemente la rapidez del estudio. Esto lo vuelve en una opción más acorde a los tiempos de una consulta en clínica, en comparación con otras técnicas moleculares.

7. REFERENCIAS

1. Álvarez F. 2010. Uso racional de antibióticos en las infecciones más comunes de los niños. *An Pediatr Contin.* 8(5):221–230. doi:10.1016/s1696-2818(10)70040-8. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1696281810700408>.
2. Andreu A, Cacho J, Coira A, Lepe JA. 2011. Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto urinario. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* 29(1):52–57. doi:10.1016/j.eimc.2010.06.008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2010.06.008>.
3. Baek YH, Um J, Antigua KJC, Park J-H, Kim Y, Oh S, Kim Y-I, Choi W-S, Kim SG, Jeong JH, et al. 2020. Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification as a rapid early-detection method for novel SARS-CoV-2. *Emerg Microbes Infect.* 9(1):998–1007. doi:10.1080/22221751.2020.1756698. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/22221751.2020.1756698>.
4. Bancoadn. 2022. Banco Nacional de ADN. Bancoadn. [accessed 2022 Jul 5]. www.bancoadn.org.
5. Barber AE, Norton JP, Wiles TJ, Mulvey MA. 2016. Strengths and Limitations of Model Systems for the Study of Urinary Tract Infections and Related Pathologies. *Microbiol Mol Biol Rev.* 80(2):351–367. doi:10.1128/MMBR.00067-15. <http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.00067-15>.
6. Barnett BJ, Stephens DS. 1997. Urinary tract infection: An overview. *Am J Med Sci.* 314(4):245–249. doi:10.1016/s0002-9629(15)40208-3. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002962915402083>.
7. Baron EJ. 2015. Specimen collection, transport, and processing: Bacteriology. In: *Manual of Clinical Microbiology.* Washington, DC, USA: ASM Press. p. 270–315. <http://doi.wiley.com/10.1128/9781555817381.ch18>.
8. Boehme CC, Nabeta P, Henostroza G, Raqib R, Rahim Z, Gerhardt M, Sanga E, Hoelscher M, Notomi T, Hase T, et al. 2007. Operational feasibility of using loop-mediated isothermal amplification for diagnosis of pulmonary tuberculosis in microscopy centers of developing countries. *J Clin Microbiol.* 45(6). doi:10.1128/JCM.02352-06. [accessed 2022 Mar 24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17392443/>.
9. Bravo-Grau S, Cruz Q JP. 2015. Estudios de exactitud diagnóstica: Herramientas para su Interpretación. *Rev chil radiol.* 21(4):158–164. doi:10.4067/s0717-93082015000400007. http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-93082015000400007&lng=en&nr m=iso&tlng=en.
10. Brooks T, Keevil CW. 1997. A simple artificial urine for the growth of urinary pathogens. *Lett Appl Microbiol.* 24(3):203–206. doi:10.1046/j.1472-765x.1997.00378.x. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1472-765x.1997.00378.x>.
11. Casellas JM, Visser M, Coco B, Mac Dougall N, Cohen S. H, Soutric J, Arenoso H. 2003. Actividad in vitro de niveles séricos y urinarios de amoxicilina y amoxicilina-sulbactam sobre 820 cepas de *Escherichia coli* aisladas de infecciones urinarias bajas extrahospitalarias: Estudio sudamericano. *Rev Chilena Infectol.* 20(1). doi:10.4067/s0716-10182003000100002. http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182003000100002&lng=en&nr

m=iso&tling=en.

12. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol.* 66(10):4555–4558. doi:10.1128/AEM.66.10.4555-4558.2000. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.66.10.4555-4558.2000>.
13. Fast identification of *Escherichia coli* in urinary tract infections using a virulence gene based PCR approach in a novel thermal cycler. 2020. *J Microbiol Methods.* 169:105799. doi:10.1016/j.mimet.2019.105799. [accessed 2022 Jun 22]. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2019.105799>.
14. Fischbach J, Xander NC, Frohme M, Glöckler JF. 2015. Shining a light on LAMP assays--a comparison of LAMP visualization methods including the novel use of berberine. *Biotechniques.* 58(4):189–194. doi:10.2144/000114275. <http://dx.doi.org/10.2144/000114275>.
15. Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. 2015. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol.* 13(5):269–284. doi:10.1038/nrmicro3432. [accessed 2022 Jun 1]. <https://www.nature.com/articles/nrmicro3432>.
16. Foo PC, Nurul Najian AB, Muhamad NA, Ahamad M, Mohamed M, Yean Yean C, Lim BH. 2020. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) reaction as viable PCR substitute for diagnostic applications: a comparative analysis study of LAMP, conventional PCR, nested PCR (nPCR) and real-time PCR (qPCR) based on *Entamoeba histolytica* DNA derived from faecal sample. *BMC Biotechnol.* 20(1):34. doi:10.1186/s12896-020-00629-8. <http://dx.doi.org/10.1186/s12896-020-00629-8>.
17. Foxman B. 2002. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Am J Med.* 113(1):5–13. doi:10.1016/s0002-9343(02)01054-9. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002934302010549>.
18. Gales AC, Sader HS, Jones RN, SENTRY Participants Group (Latin America). 2002. Urinary tract infection trends in Latin American hospitals: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-2000). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 44(3):289–299. doi:10.1016/s0732-8893(02)00470-4. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0732889302004704>.
19. Gandelman O, Jackson R, Kiddle G, Tisi L. 2011. Loop-mediated amplification accelerated by stem primers. *Int J Mol Sci.* 12(12). doi:10.3390/ijms12129108. [accessed 2022 Mar 24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22272122/>.
20. Gill P, Ghaemi A. 2008. Nucleic acid isothermal amplification technologies: a review. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 27(3):224–243. doi:10.1080/15257770701845204. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15257770701845204>.
21. Glissmeyer EW, Korgenski EK, Wilkes J, Schunk JE, Sheng X, Blaschke AJ, Byington CL. 2014. Dipstick screening for urinary tract infection in febrile infants. *Pediatrics.* 133(5):e1121–7. doi:10.1542/peds.2013-3291. <http://dx.doi.org/10.1542/peds.2013-3291>.
22. Hajzargarbashi E, Rashedi R, Pourafzali S, Esmailian M. 2019. Waiting Time for Specialist Consultation and Visit Requested in the Emergency Department; a Cross-Sectional Study. *Adv*

J Emerg Med. 3(2):e15. doi:10.22114/AJEM.v0i0.136.
<http://dx.doi.org/10.22114/AJEM.v0i0.136>.

23. Hatano B, Maki T, Obara T, Fukumoto H, Hagsawa K, Matsushita Y, Okutani A, Bazartseren B, Inoue S, Sata T, et al. 2010. LAMP using a disposable pocket warmer for anthrax detection, a highly mobile and reliable method for anti-bioterrorism. *Jpn J Infect Dis.* 63(1). [accessed 2022 Mar 24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20093760/>.
24. Hill J, Beriwal S, Chandra I, Paul VK, Kapil A, Singh T, Wadowsky RM, Singh V, Goyal A, Jahnukainen T, et al. 2008. Loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of common strains of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 46(8):2800–2804. doi:10.1128/JCM.00152-08. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00152-08>.
25. Hindiye M, Hillyard DR, Carroll KC. 2001. Evaluation of the Prodesse Hexaplex multiplex PCR assay for direct detection of seven respiratory viruses in clinical specimens. *Am J Clin Pathol.* 116(2):218–224. doi:10.1309/F1R7-XD6T-RN09-1U6L. <https://academic.oup.com/ajcp/article-lookup/doi/10.1309/F1R7-XD6T-RN09-1U6L>.
26. Hoffmann H, Hornef MW, Schubert S, Roggenkamp A. 2001. Distribution of the outer membrane haem receptor protein *ChuA* in environmental and human isolates of *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol.* 291(3):227–230. doi:10.1078/1438-4221-00123. <http://dx.doi.org/10.1078/1438-4221-00123>.
27. Hooton TM. 1990. The epidemiology of urinary tract infection and the concept of significant bacteriuria. *Infection.* 18 Suppl 2:S40–3. doi:10.1007/BF01643424. <http://dx.doi.org/10.1007/BF01643424>.
28. Jevtuševskaja J, Uusna J, Andresen L, Krölov K, Laanpere M, Grellier T, Tulp I, Langel Ü. 2016. Combination with antimicrobial peptide lyses improves loop-mediated isothermal amplification based method for *Chlamydia trachomatis* detection directly in urine sample. *BMC Infect Dis.* 16:329. doi:10.1186/s12879-016-1674-0. <http://dx.doi.org/10.1186/s12879-016-1674-0>.
29. Kaneko H, Kawana T, Fukushima E, Suzutani T. 2007. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. *J Biochem Biophys Methods.* 70(3). doi:10.1016/j.jbbm.2006.08.008. [accessed 2022 Mar 24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17011631/>.
30. Kunin CM. 1994. Urinary tract infections in females. *Clin Infect Dis.* 18(1):1–10; quiz 11–2. doi:10.1093/clinids/18.1.1. <http://dx.doi.org/10.1093/clinids/18.1.1>.
31. Le TH, Nguyen NTB, Truong NH, Van De N. 2012. Development of mitochondrial loop-mediated isothermal amplification for detection of the small liver fluke *Opisthorchis viverrini* (Opisthorchiidae; Trematoda; Platyhelminthes). *J Clin Microbiol.* 50(4):1178–1184. doi:10.1128/JCM.06277-11. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.06277-11>.
32. Li S-Y, Cheng Q-X, Wang J-M, Li X-Y, Zhang Z-L, Gao S, Cao R-B, Zhao G-P, Wang J. 2018. CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid detection. *Cell Discovery.* 4(1):1–4. doi:10.1038/s41421-018-0028-z. [accessed 2022 Jul 11]. <https://www.nature.com/articles/s41421-018-0028-z>.
33. McLellan LK, Hunstad DA. 2016. Urinary Tract Infection: Pathogenesis and Outlook. *Trends*

- Mol Med. 22(11):946–957. doi:10.1016/j.molmed.2016.09.003.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2016.09.003>.
34. Mills M, Payne SM. 1995. Genetics and regulation of heme iron transport in *Shigella dysenteriae* and detection of an analogous system in *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol.* 177(11):3004–3009. doi:10.1128/jb.177.11.3004-3009.1995.
<http://dx.doi.org/10.1128/jb.177.11.3004-3009.1995>.
 35. Mody L, Juthani-Mehta M. 2014. JAMA patient page. Urinary tract infections in older women. *JAMA.* 311(8):874. doi:10.1001/jama.2014.1152. <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2014.1152>.
 36. Morabito S. 2014. Pathogenic *Escherichia Coli*: Molecular and Cellular Microbiology. https://books.google.com/books/about/Pathogenic_Escherichia_Coli.html?hl=&id=e_JsngEACA AJ.
 37. Mullis KB, Faloona FA. 1989. Specific Synthesis of DNA in Vitro via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction. *Recombinant DNA Methodology.*:189–204. doi:10.1016/b978-0-12-765560-4.50015-0.
<http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-765560-4.50015-0>.
 38. Naber KG. 1999. Experience with the new guidelines on evaluation of new anti-infective drugs for the treatment of urinary tract infections. *Int J Antimicrob Agents.* 11(3-4):189–96; discussion 213–6. doi:10.1016/s0924-8579(99)00014-x.
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092485799900014X>.
 39. Nagamine K, Hase T, Notomi T. 2002. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes.* 16(3). doi:10.1006/mcpr.2002.0415. [accessed 2022 Mar 24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12144774/>.
 40. New England Biolabs. WarmStart® LAMP Kit (DNA & RNA). [accessed 2022 Mar 24]. <https://international.neb.com/products/e1700-warmstart-lamp-kit-dna-rna#Product%20Information>.
 41. Nicolle LE. 2002. Resistant pathogens in urinary tract infections. *J Am Geriatr Soc.* 50(7 Suppl):S230–5. doi:10.1046/j.1532-5415.50.7s.3.x.
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1532-5415.50.7s.3.x>.
 42. Nielubowicz GR, Mobley HLT. 2010. Host-pathogen interactions in urinary tract infection. *Nat Rev Urol.* 7(8):430–441. doi:10.1038/nrurol.2010.101.
<http://dx.doi.org/10.1038/nrurol.2010.101>.
 43. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 28(12):E63. doi:10.1093/nar/28.12.e63.
<https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/28.12.e63>.
 44. Ochodo EA, Kakourou A, Mallett S, Deeks JJ. 2018 Nov 29. Point-of-care tests detecting HIV nucleic acids for diagnosis of HIV infection in infants and children aged 18 months or less. *Cochrane Libr.* doi:10.1002/14651858.cd013207.
<https://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD013207>.
 45. Parida M, Sannarangaiah S, Dash PK, Rao PVL, Morita K. 2008. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique;

- perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Rev Med Virol.* 18(6):407. doi:10.1002/rmv.593. [accessed 2022 Mar 24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7169140/>.
46. Pitout JDD. 2012. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: A Combination of Virulence with Antibiotic Resistance. *Front Microbiol.* 3:9. doi:10.3389/fmicb.2012.00009. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2012.00009>.
47. Poon LLM, Chan KH, Wong OK, Yam WC, Yuen KY, Guan Y, Lo YMD, Peiris JSM. 2003. Early diagnosis of SARS coronavirus infection by real time RT-PCR. *J Clin Virol.* 28(3):233–238. doi:10.1016/j.jcv.2003.08.004. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386653203002476>.
48. PrimerExplorer. 2022. PrimerExplorerV4. PrimerExplorerV4. [accessed 2022 Jun 7]. https://primerexplorer.jp/e/v4_manual/pdf/PrimerExplorerV4_Manual_1.pdf.
49. Raibaud O, Roa M, Braun-Breton C, Schwartz M. 1979. Structure of the malB region in *Escherichia coli* K12. I. Genetic map of the malK-lamB operon. *Mol Gen Genet.* 174(3):241–248. doi:10.1007/BF00267796. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00267796>.
50. Ramezani R, Kardoost PZ, Ghorbanmehr N, Mirshafiee H. 2018. Rapid and Simple Detection of *Escherichia coli* by Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay in Urine Specimens. *Avicenna J Med Biotechnol.* 10(4). [accessed 2022 Jun 7]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30555663/>.
51. Robino L, Scavone P, Araujo L, Algorta G, Zunino P, Pérez MC, Vignoli R. 2014. Intracellular bacteria in the pathogenesis of *Escherichia coli* urinary tract infection in children. *Clin Infect Dis.* 59(11):e158–64. doi:10.1093/cid/ciu634. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/ciu634>.
52. Saengsawang N, Ruang-Areerate T, Kesakomol P, Thita T, Mungthin M, Dungchai W. 2021. Development of a fluorescent distance-based paper device using loop-mediated isothermal amplification to detect in urine. *Analyst.* 145(24):8077–8086. doi:10.1039/d0an01306d. <http://dx.doi.org/10.1039/d0an01306d>.
53. Sambrook J. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Vol. 3 / Joseph Sambrook, David W. Russell. https://books.google.com/books/about/Molecular_Cloning.html?hl=&id=9e0WzwEACAAJ.
54. Sánchez E, Nina M, Aguirre P, Arce M, Toro N, Vilela R. 2014. Amplificación isotérmica mediada por LOOP (LAMP) de ácidos nucleicos en el diagnóstico clínico. *RevCsFarm y Bioq.* 2(1):127–140. [accessed 2022 Mar 28]. http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S2310-02652014000100014&lng=es&nrm=iso&tIng=es.
55. Sarmiento R, Alexander D. 2018. Western Blot como método diagnóstico de la hidatidosis humana, utilizando fluido del metacestodo de *Echinococcus* sp. [accessed 2022 Jun 21]. <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/15339>.
56. Silver SA, Baillie L, Simor AE. 2009. Positive urine cultures: A major cause of inappropriate antimicrobial use in hospitals? *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 20(4):107–111. doi:10.1155/2009/702545. <http://dx.doi.org/10.1155/2009/702545>.
57. Sobel JD, Kaye D. 2010. Urinary Tract Infections. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases.*:957–985. doi:10.1016/b978-0-443-06839-3.00069-2.

<http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-443-06839-3.00069-2>.

58. St John A, Boyd JC, Lowes AJ, Price CP. 2006. The use of urinary dipstick tests to exclude urinary tract infection: a systematic review of the literature. *Am J Clin Pathol.* 126(3):428–436. doi:10.1309/C69RW1BT7E4QAFPV. <http://dx.doi.org/10.1309/C69RW1BT7E4QAFPV>.
59. Tice AD. 1999. Short-course therapy of acute cystitis: a brief review of therapeutic strategies. *J Antimicrob Chemother.* 43 Suppl A:85–93. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10225577>.
60. Uhl JR, Adamson SC, Vetter EA, Schleck CD, Harmsen WS, Iverson LK, Santrach PJ, Henry NK, Cockerill FR. 2003. Comparison of LightCycler PCR, rapid antigen immunoassay, and culture for detection of group A streptococci from throat swabs. *J Clin Microbiol.* 41(1):242–249. doi:10.1128/JCM.41.1.242-249.2003. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.1.242-249.2003>.
61. Waller TA, Pantin SAL, Yenior AL, Pujalte GGA. 2018. Urinary Tract Infection Antibiotic Resistance in the United States. *Prim Care.* 45(3):455–466. doi:10.1016/j.pop.2018.05.005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pop.2018.05.005>.
62. Wang D-G, Brewster JD, Paul M, Tomasula PM. 2015. Two methods for increased specificity and sensitivity in loop-mediated isothermal amplification. *Molecules.* 20(4):6048–6059. doi:10.3390/molecules20046048. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules20046048>.
63. Wang F, Jiang L, Ge B. 2012. Loop-mediated isothermal amplification assays for detecting shiga toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef and human stools. *J Clin Microbiol.* 50(1):91–97. doi:10.1128/JCM.05612-11. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.05612-11>.
64. Welzel TM, Miley WJ, Parks TL, Goedert JJ, Whitby D, Ortiz-Conde BA. 2006. Real-time PCR assay for detection and quantification of hepatitis B virus genotypes A to G. *J Clin Microbiol.* 44(9):3325–3333. doi:10.1128/JCM.00024-06. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00024-06>.
65. Williams GJ, Macaskill P, Chan SF, Turner RM, Hodson E, Craig JC. 2010. Absolute and relative accuracy of rapid urine tests for urinary tract infection in children: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 10(4):240–250. doi:10.1016/S1473-3099(10)70031-1. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309910700311>.
66. Yano A, Ishimaru R, Hujikata R. 2007. Rapid and sensitive detection of heat-labile I and heat-stable I enterotoxin genes of enterotoxigenic *Escherichia coli* by Loop-Mediated Isothermal Amplification. *J Microbiol Methods.* 68(2):414–420. doi:10.1016/j.mimet.2006.09.024. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2006.09.024>.
67. Yokoyama E, Uchimura M, Ito K. 2010. Detection of enteroaggregative *Escherichia coli* by loop-mediated isothermal amplification. *J Food Prot.* 73(6):1064–1072. doi:10.4315/0362-028x-73.6.1064. <http://dx.doi.org/10.4315/0362-028x-73.6.1064>.
68. Yoshikawa TT, Norman DC. 2001. *Infectious Disease in the Aging: A Clinical Handbook.* Springer Science & Business Media. https://books.google.com/books/about/Infectious_Disease_in_the_Aging.html?hl=&id=5aVrAAAAMAAJ.
69. Zunino P, Piccini C, Legnani-Fajardo C. 1999. Growth, cellular differentiation and virulence factor expression by *Proteus mirabilis* in vitro and in vivo. *J Med Microbiol.* 48(6):527–534. doi:10.1099/00222615-48-6-527. <http://dx.doi.org/10.1099/00222615-48-6-527>.