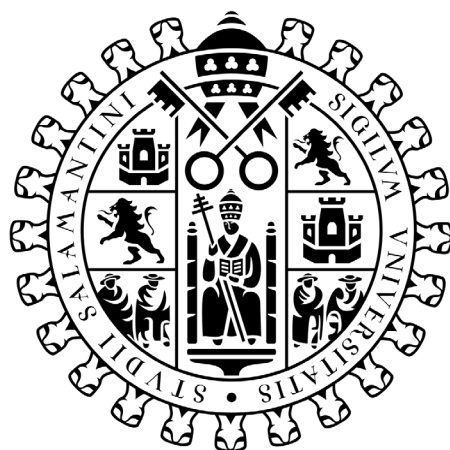


VNIVERSIDAD D SALAMANCA

FACULTAD D FARMACIA

PROGRAMA DE DOCTORADO
-SALUD Y DESARROLLO EN LOS TRÓPICOS-



TESIS DOCTORAL

TECNOLOGÍA LAMP: DIAGNÓSTICO EN DIFERENTES
ESCENARIOS EPIDEMIOLÓGICOS

Departamento de Biología Animal, Parasitología,
Ecología, Edafología y Química Agrícola.
-Área de Parasitología-

Begoña Febrer Sendra

2023

TESIS DOCTORAL POR COMPENDIO DE PUBLICACIONES

Se presenta este documento de Tesis Doctoral en la modalidad de Tesis por compendio de artículos para optar al título de Doctora por la Universidad de Salamanca. Se aportan para su evaluación dos artículos de investigación publicados y un artículo de investigación en proceso de publicación. Los artículos científicos que se presentan han sido publicados en revistas científicas indexadas en el *Journal Citation Reports* dentro del primer (Q1) o el segundo (Q2) cuartil. En conjunto, adquieren una adecuada relevancia, originalidad y excelencia, siendo la doctoranda primera autora de los tres trabajos.

1. Primer artículo de investigación

Título: Colorimetric and Real-Time Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) for Detection of *Loa loa* DNA in Human Blood Samples.

Revista: Diagnostics (Basel)

Año: 2022

Autores: Begoña Febrer-Sendra¹, Pedro Fernández-Soto¹, Beatriz Crego-Vicente¹, Juan García-Bernalt Diego¹, Thuy-Huong Ta-Tang², Pedro Berzosa², Rufino Nguema³, Policarpo Ncogo^{3,4}, María Romay-Barja², Zaida Herrador², Agustín Benito², Antonio Muro¹.

Afiliaciones: ¹Grupo de Investigación en Enfermedades Infecciosas y Tropicales (e-INTRO), Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca-Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (IBSAL-CIETUS), Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, 37007, Salamanca, España. ²Laboratorio de Malaria y Enfermedades Tropicales Desatendidas, Centro Nacional de Medicina Tropical, CIBERINFEC, Instituto de Salud Carlos III, 28029, Madrid, España. ³Programa Nacional de Control de la Oncocercosis y otras Filarias, Ministerio de Sanidad, Malabo, Guinea Ecuatorial. ⁴Fundación Estatal, Salud, Infancia y Bienestar Social, Instituto de Salud Carlos III (CSAI/ISCIII), 28029, Madrid, España.

DOI: <https://doi.org/10.3390/diagnostics12051079>

Indicadores de calidad: Factor de impacto: 3,992. Q2 en Medicina, General e Interna.

2. Segundo artículo de investigación

Título: A Novel RT-LAMP for the Detection of Different Genotypes of Crimean-Congo Haemorrhagic Fever Virus in Patients from Spain.

Revista: International Journal of Molecular Sciences

Año: 2023

Autores: **Begoña Febrer-Sendra**¹, Pedro Fernández-Soto¹, Juan García-Bernalt Diego¹, Beatriz Crego-Vicente¹, Anabel Negrodo², Juan Luis Muñoz-Bellido³, Moncef Belhassen-García⁴, María Paz Sánchez-Seco², Antonio Muro¹.

Afiliaciones: ¹Grupo de Investigación en Enfermedades Infecciosas y Tropicales (e-INTRO), Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca-Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (IBSAL-CIETUS), Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, 37007, Salamanca, España. ²Laboratorio de Arbovirus, Centro Nacional de Microbiología, CIBER de Enfermedades Infecciosas, Instituto de Salud Carlos III, 28222, Madrid, España. ³Servicio de Microbiología y Parasitología, complejo Asistencial Universitario de Salamanca, 37007, Salamanca, España. ⁴Servicio de Medicina Interna, Sección de Enfermedades Infecciosas, Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, 37007, Salamanca, España.

DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms24076411>

Indicadores de calidad: Factor de impacto: 6,208. Q1 en Bioquímica y Biología Molecular.

3. Tercer artículo de investigación

Título: First field and laboratory evaluation of LAMP assay for malaria diagnosis in Cubal, Angola.

Revista: Parasites & Vectors

Año: 2023

Autores: **Begoña Febrer-Sendra**¹, Beatriz Crego-Vicente¹, Arlette Nindia², Joan Martínez-Campreciós^{2,3}, Sandra Aixut², Alejandro Mediavilla⁴, Aroa Silgado⁴, Inés Oliveira-Souto^{3,5}, Fernando Salvador^{3,5}, Israel Molina^{3,5}, Antonio Muro¹, Elena Sulleiro^{4,5}, Pedro Fernández-Soto¹.

Afiliaciones: ¹Grupo de Investigación en Enfermedades Infecciosas y Tropicales (e-INTRO), Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca-Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (IBSAL-CIETUS), Facultad de Farmacia, Universidad de

Salamanca, 37007, Salamanca, España. ²Hospital Nossa Senhora da Paz, Cubal, Angola. ³Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain. ⁴Microbiology Department Vall d'Hebron University Hospital, PROSICS Barcelona, Barcelona, Spain. ⁵International Health Unit Vall d'Hebron-Drassanes, Infectious Diseases Department, Vall d'Hebron University Hospital, PROSICS Barcelona, Barcelona, Spain.

Estatus: Submitted

Indicadores de calidad: Factor de impacto: 4,052. Q1 en Parasitología y Q1 en Medicina Tropical.

CERTIFICACIÓN

Prof. Dr. Antonio Muro Álvarez, Catedrático de Parasitología del Departamento de Biología Animal, Parasitología, Ecología, Edafología y Química Agrícola de la Universidad de Salamanca, y Prof. Dr. Pedro Fernández Soto, Profesor Titular de Parasitología del Departamento de Biología Animal, Parasitología, Ecología, Edafología y Química Agrícola de la Universidad de Salamanca.

Certifican:

*que la Tesis Doctoral “Tecnología LAMP: diagnóstico en diferentes escenarios epidemiológicos”, que se presenta para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca en la **modalidad de Tesis por compendio de publicaciones**, ha sido realizada por **Begoña Febrer Sendra**, Graduada en Biología por la Universidad de Salamanca, bajo nuestra dirección en el Departamento de Biología Animal, Parasitología, Ecología, Edafología y Química Agrícola de la Universidad de Salamanca y en el Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca dentro del programa de doctorado Salud y Desarrollo en los Trópicos. Reúne, a nuestro juicio, originalidad y contenidos suficientes, por lo que autorizamos su presentación para ser evaluada.*

Y para que así conste, a efectos legales, expiden el presente certificado en Salamanca, a 6 de Junio de 2023.

Fdo. Dr. Antonio Muro Álvarez

Fdo. Dr. Pedro Fernández-Soto

A mis abuelos

*El verdadero viaje de descubrimiento no consiste en buscar
nuevos paisajes, sino en mirar con nuevos ojos.*

Marcel Proust

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de esta aventura he contado con la ayuda de muchas personas, a las que debo mi gratitud. En primer lugar, agradecer a mis directores, Pedro y Antonio por darme la oportunidad de iniciarme en el mundo de la investigación. A Pedro, por su gran dedicación y su valiosa orientación durante este largo camino. A Antonio, por su motivación y sus sabios consejos que han contribuido al desarrollo de este trabajo.

Mi más sincero agradecimiento a todo el Área de Parasitología. A mis compañeros de aventura, Bea y Juan, gracias por las horas de trabajo compartidas, por todas las historias vividas, por vuestra ayuda en momentos de desesperación y por celebrar los éxitos como si fueran vuestros. Me llevo de Salamanca dos grandes amigos. A Belén, Carmen, Ana, Marta, Óscar, Julio Abán, Julio Soto, Quina, Xiomara y muchos otros que me han acompañado durante estos largos años, por todo lo compartido, gracias.

Agradecer a las hermanas teresianas de la Misión Católica de Cubal, por abrirme las puertas de vuestra casa. A Arlette, por tu alegría, tu constancia, tus ganas de aprender y de enseñar a partes iguales. A todos los compañeros del laboratorio del Hospital Nossa Senhora da Paz que habéis contribuido en gran parte de este trabajo. A Sandra y Joan, “los papis”, gracias por cuidarme y por vuestra implicación para que todo el trabajo saliera adelante. A todas las personas que han pasado por el quintal y a toda la gente de Cubal, por recibirme con los brazos abiertos, por vuestra generosidad y ganas de ayudar. Ha sido un placer compartir esta experiencia profesional y personal con vosotros. A Elena y Nano, por darme la oportunidad de realizar la estancia en el Hospital Nossa Senhora da Paz y poder vivir una de las experiencias más bonitas de mi vida.

También, me gustaría dar las gracias al Dr. Joaquín Salas-Coronas y su equipo del Hospital de Poniente, con los que he tenido la suerte de poder colaborar a lo largo de estos años.

No podía concluir sin expresar mi agradecimiento a toda mi familia. A mis padres, Charo e Iñaki, quienes siempre han creído en mí, por su sacrificio, por enseñarme a ser constante y no rendirme. A mis hermanos, Paula e Iñaki que, a pesar de la distancia he sentido su apoyo y cariño. A mis sobrinos, Sandra, Chloe y Diego,

por sacarme una sonrisa en los momentos más difíciles de esta aventura. A mis abuelos, allá donde estéis, sé que estaréis orgullosos.

A mi compañero de vida, Daniel, por su incansable apoyo, por esas largas conversaciones en las que intentabas entenderme, por estar a mi lado en esos momentos de incertidumbre y cansancio, por implicarte en este trabajo como si fuera tuyo, sin tu guía no hubiera sido posible.

A todas mis amigas que de una forma u otra han estado a mi lado, en especial a Patri y Silvia, que durante estos años han sido una fuente inagotable de ánimos, consejos y alegrías.

Por último, a mi gran familia de telas aéreas Salamanca, que me han alegrado cada tarde de jueves, consiguiendo que lo que empezó como una pequeña afición se convirtiera en una parte fundamental de esta etapa.

A todos y todas ¡Gracias! ¡Obrigada! ¡Twapandula!

ÍNDICE

Resumen.....	17
Resumo.....	20
Capítulo I: Introducción.....	23
1.1. Introducción.....	25
1.2. LAMP (<i>Loop-mediated isothermal amplification</i>)	28
1.2.1. Mecanismo de funcionamiento	29
1.2.2. Características principales	31
1.2.3. Selección de dianas genómicas y diseño de <i>primers</i>	31
1.2.4. Métodos de detección de los productos de amplificación	32
1.2.4.1. Detección mediante turbidez	33
1.2.4.2. Detección colorimétrica	33
1.2.4.3. Electroforesis en gel de agarosa	34
1.2.4.4. Métodos de detección a tiempo real	34
1.2.5. LAMP-múltiplex (mLAMP)	37
1.2.5.1. Uso de enzimas de restricción	37
1.2.5.2. Combinación mLAMP-ELISA	38
1.2.5.3. Análisis de las curvas de melting	38
1.2.5.4. Utilización de <i>primers</i> marcados con sondas	39
1.3. Aplicación de la tecnología LAMP como diagnóstico <i>point-of-care</i>	40
1.3.1 Procesamiento de muestras clínicas	41
1.3.1.1. Almacenamiento y transporte de muestras clínicas	41
1.3.1.2. Extracción y purificación de ácidos nucleicos	42
1.3.2. Reactivos estabilizados o “listos para su uso”	45
1.3.3. Soportes y dispositivos para la aplicación <i>point-of-care</i> de la técnica LAMP	47
1.3.3.1. Dispositivo NINA (<i>Non-instrumented nucleic acid amplification</i>)	47
1.3.3.2. LAMP y <i>Lateral Flow Assays</i> (LAMP-LFA)	50
1.3.3.3. <i>Chips</i> microfluídicos o “lab-on-a-chip”	53
1.3.3.3.1. <i>Chips</i> microfluídicos clásicos	53
1.3.3.3.2. <i>Chips</i> microfluídicos en papel	54
1.3.3.3.3. <i>Chips</i> microfluídicos digitales	55
1.3.3.4. Telefonía móvil y técnica LAMP	58
1.4. Referencias bibliográficas	62
Capítulo II: Hipótesis y objetivos	79
2.1. Hipótesis	80
2.2. Objetivos	80
Capítulo III: Artículos de investigación	83
3.1. <i>Colorimetric and real-time loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of</i> <i>Loa loa</i> DNA in human blood samples	85
3.2. <i>A novel RT-LAMP for the detection of different genotypes of Crimean-Congo haemorrhagic fever</i> <i>virus in patients from Spain</i>	105

3.3. <i>First field and laboratory evaluation of LAMP assay for malaria diagnosis in Cubal, Angola ...</i>	131
Capítulo IV: Conclusiones.....	151
Conclusiones	153
Conclusões	154
Anexo I: Anexo metodológico	155
AI.1. Muestras clínicas	157
AI.2. Procesamiento de muestras y extracción de ácidos nucleicos	158
AI.2.1 Purificación de ADN de muestras de sangre recogidas en papel de filtro.....	158
AI.2.2. Purificación de ARN viral de muestras de pacientes	159
AI.2.3. Purificación de ADN de muestras de sangre de pacientes	160
AI.3. Selección de secuencias y diseño de <i>primers</i>	160
AI.3.1. Selección y obtención de las secuencias	163
AI.3.1.1. <i>Ensayo in silico de especificidad</i>	167
AI.3.2. Diseño de primers	168
AI.3.2.1. <i>Análisis de los primers obtenidos</i>	170
AI.3.2.2. <i>Primers degenerados</i>	171
AI.4. Examen microscópico	172
AI.5. Técnicas de amplificación de ADN	173
AI.5.1. <i>Nested Polymerase Chain Reaction (Nested-PCR)</i>	173
AI.5.2. <i>Reverse-transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)</i>	174
AI.5.3. LAMP colorimétrico	175
AI.5.4. LAMP a tiempo real	176
AI.5.5. <i>Reverse-transcription-LAMP (RT-LAMP)</i>	176
AI.6. Ensayos de sensibilidad y especificidad	177
AI.6.1. Sensibilidad	177
AI.6.2. Especificidad	177
AI.7. Secuenciación de ADN	178
AI.8. Análisis filogenético	179
AI.9. Análisis estadístico	179
AI.10. Referencias bibliográficas	180
Anexo II. Otras publicaciones científicas, comunicaciones a congresos, publicaciones docentes, premios de investigación y estancias en el extranjero	181
AII.1. Otras publicaciones científicas	183
AII.2. Comunicaciones en congresos	199
AII.3. Publicaciones docentes	217
AII.4. Premios de investigación	223
AII.5. Estancias en el extranjero	225

RESUMEN

La aparición de las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos hace unas décadas permitió perfeccionar la detección de agentes infecciosos y supuso una revolución en el diagnóstico microbiológico. Con la introducción de la PCR y sus distintas variantes surgió definitivamente el concepto de diagnóstico molecular, que ha permitido la detección rápida y sensible de microorganismos mediante la amplificación específica de determinadas regiones de su genoma. Actualmente, su uso ha pasado a ser rutinario para el diagnóstico de las enfermedades más habituales en los laboratorios de referencia, pero no así para un gran número de enfermedades importadas y, mucho menos, para aquellas enfermedades tropicales que ocurren en zonas endémicas de escasos recursos. La elección de la técnica diagnóstica dependerá de las características del laboratorio y el objetivo que persigamos en el diagnóstico. De este modo, un caso importado será generalmente estudiado en un laboratorio de referencia bien equipado y con personal especializado. Sin embargo, la detección de un caso en zona endémica, generalmente en zonas inaccesibles durante estudios de campo, requerirá de una prueba tradicional microscópica o una técnica rápida. En cualquier caso, a una técnica diagnóstica se le debe exigir la máxima especificidad y sensibilidad, reproducibilidad, facilidad de ejecución y un bajo coste. Las técnicas de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos son las que más se acercan a cumplir estos requisitos. Entre ellas, la tecnología de amplificación mediada por bucle (LAMP, del inglés *Loop-mediated isothermal amplification*) es actualmente la más utilizada y sobre la que más se ha trabajado para conseguir acercar el diagnóstico molecular realizado en un laboratorio de referencia a estudios de campo y diagnóstico *point-of-care*. De esta manera, la tecnología LAMP podría utilizarse en diferentes contextos epidemiológicos.

Teniendo en cuenta lo anterior, nos planteamos como **objetivo general** de este trabajo la evaluación de la tecnología LAMP como método diagnóstico en diferentes situaciones epidemiológicas. Para ello, definimos una serie de objetivos específicos encaminados a la aplicación y desarrollo de esta tecnología para abordar nuevos estudios epidemiológicos, ante situaciones de emergencia sanitaria, o como diagnóstico *point-of-care* en áreas endémicas con escasos recursos. Estos objetivos se van presentando y alcanzando en los diferentes artículos de investigación que se presentan en esta Tesis Doctoral.

El **primer objetivo específico** tuvo como finalidad evaluar en el laboratorio la técnica LAMP para la detección de *Loa loa* en muestras de sangre obtenidas en un estudio de campo realizado en Guinea Ecuatorial. Se llevó a cabo el examen microscópico para la búsqueda de microfilarias y parte de esas muestras se almacenaron en papel de filtro (*Dried Blood Spots*; DBS). Se obtuvo el ADN de los DBS utilizando un método de extracción simple y se analizaron mediante técnicas moleculares, incluyendo una PCR anidada y *Loa loa*-LAMP colorimétrico y a tiempo real. Los resultados obtenidos se compararon con la microscopía como método diagnóstico de referencia.

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, se notificaron en España, mayoritariamente en la comunidad de Castilla y León, siete casos de Fiebre Hemorrágica de Crimea-Congo (FHCC) transmitidos por picadura de garrapata. Ante este nuevo escenario, nos planteamos como **segundo objetivo específico** el desarrollo de un ensayo RT-LAMP (*Reverse transcription*-LAMP) para la detección de diferentes genotipos del virus de Crimea-Congo y su evaluación en muestras de plasma y, por primera vez, de orina de pacientes con diagnóstico confirmado por RT-qPCR de referencia.

El **tercer objetivo específico** propuesto tuvo como finalidad aplicar un método LAMP diseñado para la detección de *Plasmodium* spp. en el diagnóstico *point-of-care* de malaria en Cubal, Angola. Evaluamos y comparamos los resultados obtenidos mediante las técnicas de microscopía, pruebas de diagnóstico rápido (PDR) y LAMP en el diagnóstico de la malaria. Posteriormente, analizamos la reproducibilidad del método LAMP colorimétrico y a tiempo real en un laboratorio de referencia.

En **conclusión**, los resultados más relevantes de los distintos trabajos de investigación que se presentan muestran que: *i*) el método *Loa loa*-LAMP presenta un rendimiento diagnóstico mayor que la microscopía y que la técnica de PCR; *ii*) este método presenta mayor sensibilidad que la técnica de PCR en el análisis de muestras de sangre almacenadas como DBS; *iii*) el método RT-LAMP desarrollado para la detección del virus de Crimea-Congo permite el diagnóstico de la infección en muestras clínicas con resultados equiparables a la RT-qPCR de referencia, detectando distintos genotipos circulantes del virus; *iv*) el método LAMP colorimétrico para la

detección de *Plasmodium* spp. presenta mayor sensibilidad que la microscopía y las PDR en condiciones de campo.

RESUMO

O surgimento de técnicas de amplificação de ácidos nucleicos, há algumas décadas, levou a uma melhor detecção de agentes infecciosos e a uma revolução no diagnóstico microbiológico. Com a introdução da PCR e das suas diferentes variantes, surgiu definitivamente o conceito de diagnóstico molecular, que permite a detecção rápida e sensível de microrganismos através da amplificação específica de determinadas regiões do seu genoma. A sua utilização tornou-se rotina para o diagnóstico das doenças mais comuns em laboratórios de referência, mas não para um grande número de doenças importadas, e muito menos para as doenças tropicais que ocorrem em zonas endémicas com poucos recursos. A selecção da técnica de diagnóstico dependerá das características do laboratório e do objectivo do diagnóstico. Assim, um caso importado será geralmente estudado num laboratório de referência bem equipado e com pessoal especializado. No entanto, a detecção de um caso numa área endémica, geralmente em áreas inacessíveis durante os inquéritos de campo, exigirá um teste microscópico tradicional ou uma técnica rápida. Em qualquer caso, uma técnica de diagnóstico deve ter a máxima especificidade e sensibilidade, reprodutibilidade, facilidade de execução e baixo custo. As técnicas de amplificação isotérmica de ácidos nucleicos são as que mais se aproximam destes requisitos. Entre elas, a tecnologia de amplificação isotérmica mediada por laço (LAMP) é actualmente a mais utilizada e aquela em que mais se trabalhou para aproximar os diagnósticos moleculares realizados num laboratório de referência dos estudos de campo ou dos diagnósticos point-of-care. Desta forma, a tecnologia LAMP pode ser utilizada em diferentes contextos epidemiológicos.

Tendo em conta o exposto, o **objectivo geral** deste trabalho é avaliar a tecnologia LAMP como um método de diagnóstico em diferentes situações epidemiológicas. Para isso, definimos uma série de objectivos específicos que visam a aplicação e o desenvolvimento desta tecnologia para abordar novos estudos epidemiológicos, em situações de emergência sanitária, ou como diagnóstico point-of-care em áreas endémicas com recursos escassos. Estes objectivos são apresentados e alcançados nos diferentes artigos de investigação apresentados nesta Tese de Doutoramento.

O **primeiro objectivo específico** era avaliar em laboratório a técnica LAMP para a detecção de *Loa loa* em amostras de sangue obtidas num estudo de campo na Guiné Equatorial. Foi efectuado um exame microscópico para detecção de microfírias e parte destas amostras foi armazenada em papel de filtro (Dried Blood Spots; DBS). O ADN foi obtido a partir das DBS utilizando um método de extracção simples e analisado por técnicas moleculares, incluindo nested PCR e *Loa loa*-LAMP colorimétrico e em tempo real. Os resultados obtidos foram comparados com a microscopia como método de diagnóstico de referência.

*Durante o desenvolvimento desta Tese de Doutoramento, foram notificados sete casos de Febre Hemorrágica da Crimeia-Congo (FHCC) transmitidos pela picada de carraças em Espanha, principalmente na comunidade de Castilla y León. Perante este novo cenário, o nosso **segundo objectivo específico** foi o desenvolvimento de um ensaio RT-LAMP (Reverse transcription-LAMP) para a detecção de diferentes genótipos do vírus da Crimeia-Congo e a sua avaliação em amostras de plasma e, pela primeira vez, em amostras de urina de pacientes com diagnóstico confirmado por RT-qPCR de referência.*

*O **terceiro objectivo específico** proposto visava a aplicação de um método LAMP concebido para a detecção de Plasmodium spp. no diagnóstico point-of-care da malária no Cubal, Angola. Avaliámos e comparámos os resultados obtidos por microscopia, testes rápidos de diagnóstico e técnicas LAMP no diagnóstico da malária. Posteriormente, avaliámos a reprodutibilidade do método colorimétrico e do método LAMP em tempo real num laboratório de referência.*

*Em **conclusão**, os resultados mais relevantes dos diferentes estudos de investigação aqui apresentados mostram que: i) o método Loa loa-LAMP tem um desempenho de diagnóstico mais elevado do que a microscopia e a técnica de PCR; ii) este método é mais sensível do que a técnica PCR na análise de amostras de sangue armazenadas como DBS; iii) o método RT-LAMP desenvolvido para a detecção do vírus da Crimeia-Congo permite o diagnóstico da infecção em amostras clínicas com resultados comparáveis aos da RT-qPCR de referência, detectando diferentes genótipos circulantes do vírus; iv) o método LAMP colorimétrico para a detecção de Plasmodium spp. é mais sensível do que a microscopia e testes rápidos de diagnóstico em condições de campo.*

CAPÍTULO I

Introducción

1.1. Introducción

Las pruebas diagnósticas precisas y de calidad son imprescindibles para determinar la etiología de una enfermedad. Estos métodos son aún más necesarios en el caso de nuevas enfermedades o enfermedades emergentes, así como en áreas geográficas pobres con escasos recursos económicos. Un artículo publicado recientemente en la revista *Lancet*, señala que el 47% de la población mundial tiene limitado el acceso a pruebas diagnósticas (1). Esta restricción se da principalmente en países en vías de desarrollo donde la disponibilidad de un diagnóstico de calidad no alcanza al 20% en los centros de atención primaria básica (2). Ante esta situación, la Organización Mundial de la Salud (OMS) junto con la Fundación para la Obtención de Medios de Diagnóstico Innovadores (FIND) firmaron un acuerdo para poner en marcha un programa de aplicación de técnicas de diagnóstico fiables y de fácil realización en países con bajos recursos (3).

La **microscopía** es la herramienta de diagnóstico más utilizada en países en vías de desarrollo de zonas tropicales y subtropicales debido a su simplicidad y bajo coste. La OMS la sigue considerando como el método “*gold standard*”. Sin embargo, presenta algunos inconvenientes: (i) *para su realización es imprescindible tener una formación especializada*. En un estudio realizado en 2006 para evaluar la variabilidad en el diagnóstico microscópico de la malaria, quedó patente la discrepancia obtenida entre más de una veintena de microscopistas especializados, que llegó a ser hasta del 30% (4). También se observó en el diagnóstico de la leishmaniosis cutánea, oscilando entre un 42% y un 72%, dependiendo de la habilidad del observador (5); (ii) *es un método lento y laborioso*. Requiere de mucho tiempo de observación por parte del microscopista, sobre todo en muestras con baja carga parasitaria (6). Por ejemplo, en el caso de *Plasmodium* spp., antes de notificar un caso como negativo hay que examinar al menos 200 campos con la técnica de la gota gruesa. Esto supone entre 5-10 minutos por muestra, si se trata de un microscopista experimentado (7,8); (iii) *presenta baja sensibilidad*. Diversos estudios así lo demuestran (6,9). Para aumentar la sensibilidad se utilizan técnicas de concentración, como el test de Knott en el caso de las filariosis o métodos de sedimentación/flotación para el diagnóstico de diversas parasitosis intestinales (10); (iv) *requiere de muestras recogidas en días alternos*. Las guías prácticas para laboratorios clínicos recomiendan examinar tres muestras de heces recogidas en días alternos (11). Esto se debe a la baja sensibilidad y a la posibilidad de obtener falsos negativos (12,13); (v) *periodicidad en la recogida de las muestras*. Es bien conocido que

en las infecciones producidas por *Wuchereria bancrofti* y *Brugia malayi* la microfilaremia es de predominio nocturno, por lo que la recogida de las muestras de sangre debe tener lugar entre las 22:00-2:00 h. Las microfilarias de la especie *Loa loa* tienen periodicidad diurna, por lo que la recogida de las muestras se realizará durante la mañana (10); (vi) *puede ser de escasa utilidad dependiendo de la fase de la enfermedad*. Un ejemplo es la enfermedad de Chagas, en la que los niveles de parasitemia disminuyen en su fase crónica y, por tanto, los métodos parasitológicos dejan de tener utilidad. También se han observado niveles indetectables por microscopía en los casos de infección temprana por *Loa loa* de hasta el 80% (14).

Desde hace años, las *técnicas inmunológicas* complementan a la microscopía en el diagnóstico de muchas enfermedades parasitarias. Estos ensayos se basan en la detección de antígenos o anticuerpos específicos en diferentes muestras clínicas (15). La más utilizada es el ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) que se basa en la detección de anticuerpos o antígenos adheridos a una superficie sólida (16). Presenta algunas limitaciones: (i) *baja especificidad* debido a la reactividad cruzada entre antígenos parasitarios comunes (17,18); (ii) *es una técnica laboriosa*, ya que requiere de muchos pasos y tiempos largos de incubación (9); (iii) *requiere de equipos de laboratorio especializados* como lector de placas de ELISA que aumentan su coste y la necesidad de una infraestructura adecuada para llevar a cabo los ensayos (19).

Los ensayos LFA (del inglés, *Lateral Flow Assays*) o pruebas de diagnóstico rápido (PDR) se han usado en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas debido a su potencial uso como diagnóstico *point-of-care* (POC) (9). Han sido muy utilizados en programas de la OMS para la lucha contra enfermedades tropicales. El Programa Mundial para Eliminar la Filariasis Linfática se basa en la interrupción de la propagación de la infección mediante administración masiva de medicamentos (20). En este contexto, las PDR han jugado un papel importante, mediante la detección de antígenos circulantes de *W. bancrofti* como herramienta rápida y sencilla para valorar la eficacia del tratamiento (21,22). En el año 2017 se desarrolló la primera PDR comercial para la detección de *Loa loa* (*Loa Antibody Rapid Test*) con la finalidad de facilitar la toma de decisiones en las campañas de administración masiva para eliminar la loaosis (23). Estas pruebas no están exentas de inconvenientes. Algunos trabajos han demostrado la reactividad cruzada entre *Loa loa* y *W. bancrofti*, constituyendo un obstáculo para su diagnóstico (22,24).

Las PDR son utilizadas de forma rutinaria para el diagnóstico de malaria. En su último informe, la OMS refleja un incremento de las ventas de las pruebas rápidas para malaria a nivel mundial, estimándose ingresos superiores a los 3.500 millones de dólares/año. El 82% de las ventas fueron realizadas en los países del África Subsahariana (25). Estas pruebas tienen la ventaja de ser muy rápidas y de fácil interpretación. Sin embargo, no permiten cuantificar la carga parasitaria, por lo que deben complementarse con los métodos parasitológicos clásicos (26,27). Otro inconveniente es la aparición de falsos negativos debido a la posible heterogeneidad o delección del gen *hrp2* (28). Estos resultados han sido documentados en diversos estudios realizados en países como Etiopía, Sudán, Madagascar y Tanzania (29–33).

Los **métodos moleculares** surgen a principios de la década de los 70' con el desarrollo de las técnicas de clonación y secuenciación de ADN. En 1985, Kary B. Mullis describe la amplificación de los ácidos nucleicos mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR del inglés, *Polymerase Chain Reaction*), descubrimiento que le valió el Premio Nobel de Química en 1993 (34,35). Existen numerosas variantes de la PCR convencional: PCR anidada (*nested-PCR*), que utiliza dos pares de *primers* (dos externos y dos internos) para mejorar la sensibilidad de la técnica (35); PCR con transcripción inversa (*reverse transcription-PCR*, RT-PCR), que es capaz de realizar la transcripción inversa del ARN seguida de la amplificación del ADN, permitiendo la detección sensible y específica del ARN diana (36); PCR múltiple, que permite detectar simultáneamente varias dianas en una misma reacción (37); PCR a tiempo real (*quantitative PCR*, qPCR), que permite la monitorización y cuantificación del producto amplificado a tiempo real mediante la medición de la señal de fluorescencia (38); PCR digital (dPCR), que utiliza un enfoque diferente a la qPCR para cuantificar el número de moléculas de ADN en una muestra (39). Actualmente, disponemos de numerosas pruebas diagnósticas basadas en la PCR para la detección de una gran variedad de patógenos. La mayoría de los métodos aprobados por la FDA (del inglés, *Food and Drug Administration*) se encuentran disponibles en <https://www.fda.gov/medical-devices/in-vitro-diagnostics/nucleic-acid-based-tests>.

Una de las principales limitaciones de los métodos basados en la PCR es la necesidad de un termociclador que proporcione ciclos de temperatura precisos. Son equipos costosos que requieren de una fuente de energía ininterrumpida. Esto hace que los ensayos basados en PCR estén restringidos a laboratorios clínicos o de investigación bien equipados (40). Para solventar estos inconvenientes, en 1990

comienzan a aparecer algunas pruebas de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos que permiten la amplificación a temperatura constante, requieren dispositivos sencillos y de bajo coste y, además, algunas permiten la visualización simple de los resultados mediante un cambio colorimétrico. Precisan de tiempos menores de reacción y de menor procesamiento de las muestras en comparación con la PCR (41). Estas pruebas son cada vez más atractivas y prometedoras para su uso como diagnóstico POC. Entre ellas, destacan: LAMP (*Loop-mediated isothermal AMplification*) (42), NASBA (*Nucleic Acid Sequence-Based AMplification*) (43), SDA (*Strand Displacement AMplification*) (44), HDA (*Helicase-Dependent AMplification*) (45), RPA (*Recombinase Polymerase AMplification*) (46) y EXPAR (*Exponential AMplification Reaction*) (47). Sus principales características se recogen en la **tabla 1**.

Tabla 1. Principales características de las técnicas de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos más utilizadas. Modificado de Zhao y colaboradores (48) y Khan y colaboradores (49).

Técnica	Diana	Tiempo (min)	T _a (°C)	Enzimas ^a	Método de lectura ^b	Referencia
LAMP	ADN/ARN	30-60	60-65	ADN polimerasa	Turbidez, colorimetría, pH, fluorescencia, gel electroforesis, LFD	(42)
NASBA	ADN/ARN	90-120	41	Transcriptasa inversa, ARN polimerasa, ARNasa	Colorimetría, fluorescencia, gel electroforesis, LFD	(43)
SDA	ADN	120	37	ADN polimerasa, NEasa	Fluorescencia, pH	(44)
HDA	ADN	30-120	37-65	ADN polimerasa, helicasa	Fluorescencia, electroquímica, hibridación, gel electroforesis, LFD	(45)
RPA	ADN	30-90	37-42	ADN polimerasa, recombinasa	Fluorescencia, quimioluminiscencia, gel electroforesis, LFD	(46)
EXPAR	ADN/ARN	30	60	ADN polimerasa, NEasa	Fluorescencia, colorimetría, quimioluminiscencia, electroquímica	(47)

^a En algunos casos, se añade una enzima retrotranscriptasa para amplificar ADN a partir de un molde de ARN. ^b LFD: *Lateral Flow Dipstick*, en algunos casos los resultados pueden visualizarse con ensayos de flujo lateral.

1.2. LAMP (*Loop-mediated isothermal amplification*)

La técnica LAMP fue desarrollada en el año 2000 por Notomi y colaboradores (42). Desde entonces se han descrito multitud de aplicaciones de la técnica (50) y ha sido el objetivo de numerosas investigaciones para el diagnóstico de muchas enfermedades infecciosas debido a su rapidez, eficacia y alta especificidad (51,52). Se

basa en la síntesis de ADN por desplazamiento de cadena en condiciones isotérmicas llevada a cabo por la enzima *Bst* polimerasa (*Bacillus stearothermophilus*) (42). También permite la amplificación de una secuencia de ARN diana. En este caso, se puede realizar la amplificación en un solo paso, mediante la adición de una enzima transcriptasa inversa con actividad de desplazamiento de cadena (RT-LAMP, del inglés, *Reverse-Transcriptase Loop-mediated isothermal AMplification*)(53). Requiere de 4-6 *primers* que reconocen específicamente un total de 6-8 secuencias distintas dentro del ADN diana, lo que garantiza una alta especificidad de amplificación (**Figura 1A**): 2 *primers* internos, *Forward Inner Primer* (FIP) que contiene las secuencias F1c-F2 y *Backward Inner Primer* (BIP) que contiene las secuencias B1c-B2, generalmente unidas por un enlace Poly-T; y dos *primers* externos, *Forward Outer Primer* (F3) y *Backward Outer Primer* (B3). Nagamine y colaboradores introdujeron posteriormente dos *loop-primers*, *Loop Forward* (LF) y *Loop Backward* (LB), que permiten la reducción del tiempo de reacción en aproximadamente 30 minutos (54).

1.2.1. Mecanismo de funcionamiento

El proceso de amplificación mediante LAMP se puede dividir en dos fases: una *fase inicial o fase no cíclica* y una *fase cíclica* (**Figura 1B**). La *fase inicial o fase no cíclica* comienza cuando la secuencia F2 del *primer* interno FIP hibrida con F2c de la cadena de ADN molde guiando así la síntesis de la cadena complementaria de ADN gracias a la actividad de desplazamiento de cadena de la *Bst* polimerasa. A continuación, el *primer* externo F3 hibrida con la región F3c de la cadena molde que se sitúa fuera de la unión del FIP y se produce un desplazamiento de la cadena complementaria previamente formada, liberando una hebra de gran longitud con el *primer* FIP en el extremo. Este ADN monocatenario sirve de molde para la síntesis de ADN, ocurriendo una reacción similar a la anterior, con unión de la secuencia B2 y B2c del *primer* interno BIP y posterior elongación e interacción del *primer* B3 con la secuencia B3c. Al replicar de nuevo, el ADN libera una hebra de pequeña longitud que contiene los *primers* FIP y BIP en cada extremo, generando una estructura de bucle o lazo. A partir de este punto, comienza la *fase cíclica*, que presenta un mecanismo complejo en el que sólo intervienen los *primers* internos. La estructura de bucle formada en la primera fase servirá como diana para iniciar esta segunda fase de amplificación exponencial. En este caso, los *primers* FIP y BIP hibridan con las estructuras en bucle formadas e inician la síntesis de la cadena y su posterior desplazamiento, produciendo

una gran cantidad de productos de amplificación de ADN con una secuencia complementaria y una estructura repetida (42,53).

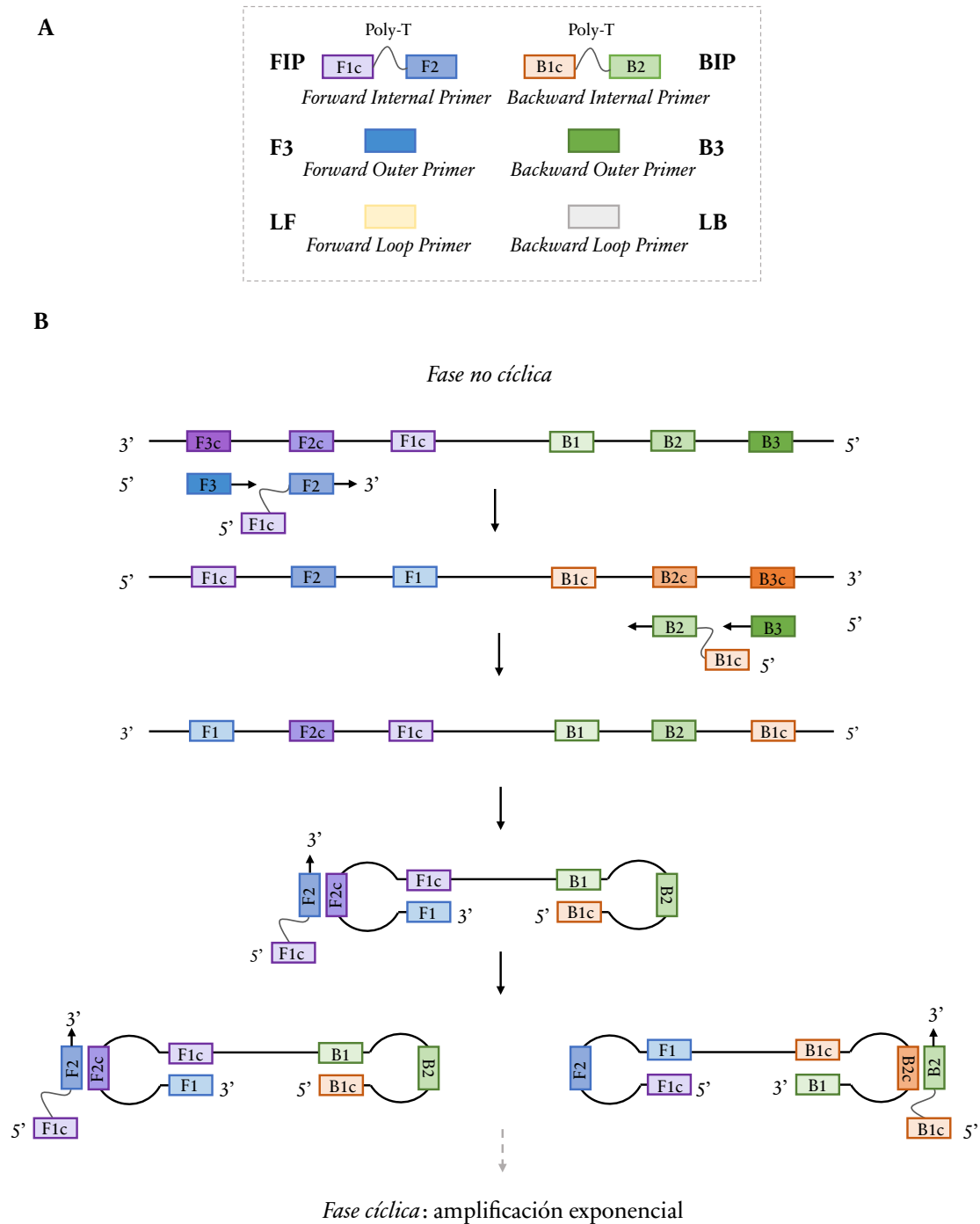


Figura 1. Esquema de *primers* y mecanismo de funcionamiento de la técnica LAMP. **A)** Conjunto de primers utilizados para llevar a cabo la reacción tipo LAMP, formado por dos *primers* internos (FIP y BIP), dos *primers* externos (F3 y B3) y loop *primers* (LF y LB). **B)** Representación esquemática del mecanismo de amplificación LAMP mostrando la fase no cíclica.

1.2.2. Características principales

El LAMP es capaz de amplificar ácidos nucleicos en condiciones isotérmicas en un rango de 60-65°C, por lo que permite el uso de equipos sencillos y económicos como un simple termobloque o baño de agua para mantener la temperatura. Otra característica importante es su eficacia de amplificación generando hasta 10^9 - 10^{10} copias de ADN en unos 15-60 minutos (42,55). También se ha demostrado que es más tolerante a sustancias inhibidoras presentes en las muestras biológicas en comparación con la PCR (51,56). Esta mayor tolerancia puede contribuir al ahorro de tiempo y costes en el procesamiento de muestras e incluso a evitar la extracción previa del ADN para llevar a cabo la amplificación (57,58). Por último, una de las características más importantes es la posibilidad de detectar los productos de amplificación mediante la simple visualización de los resultados, ya sea por turbidez o por cambio colorimétrico (55,59,60). Esto supone una gran ventaja para llevar a cabo un diagnóstico molecular de forma muy sencilla en estudios de campo con escasa infraestructura.

1.2.3. Selección de dianas genómicas y diseño de *primers*

Al igual que en otros métodos de diagnóstico molecular, la selección adecuada de dianas genómicas es imprescindible. Para ello, hay que tener en cuenta el grado de repetición en el genoma, grado de especificidad y grado de conservación. Las dianas más utilizadas en el diagnóstico de enfermedades parasitarias son (61): (i) *secuencias ribosómicas nucleares* que incluyen los espaciadores transcritos internos 1 y 2 (ITS1 e ITS2), el espaciador intergénico (IGS) y los genes del ARNr 18S y 28S. (ii) *secuencias mitocondriales*, como la citocromo c oxidasa subunidad 1 (*cox 1*) y los genes de subunidades 1 y 5 de la NADH deshidrogenasa (*nad1* y *nad2*). Otras secuencias empleadas son los retrotransposones y los genes que codifican proteínas estructurales.

Para llevar a cabo el diseño de los *primers* se requiere la utilización de software específico, como *Primer Biosoft* (<http://www.premierbiosoft.com/isothermal/index.html>) (Primer Biosoft, San Francisco, USA), *Optigene LAMP designer* (<http://www.optigene.co.uk/lamp-designer/>) (Optigene, London, UK), *NEB LAMP primer designer tool* (<https://lamp.neb.com>) (New England Biolabs, Massachusetts, USA) o *Primer Explorer V5* (<https://primerexplorer.jp/e/>) (Eiken Chemical, Tokio, Japón). En los últimos años, se han desarrollado programas como “Script en Python” para diseñar sondas

específicas para la detección de mutaciones cancerígenas (62) o el GLAPD (*Whole Genome Based LAMP Primer Desing*) (63) empleada para la detección de enfermedades bacterianas transmitidas por alimentos, <https://cgm.sjtu.edu.cn/GLAPD/>, <https://github.com/jiqingxiaoxi/GLAPD> y <https://cgm.sjtu.edu.cn/GLAPD/online/>. El *software* más utilizado es *Primer Explorer V5*, disponible *online* de forma gratuita (<https://primerexplorer.jp/e/>). Los principios básicos para el diseño de primers mediante este *software* se encuentran recogidos en la guía “*A Guide to LAMP primer designing*” disponible en la página web del programa *Primer Explorer V5* (64). Un resumen del proceso de diseño se expone en el Anexo metodológico I (pg. 160) de esta Tesis Doctoral.

En el desarrollo de algunos métodos LAMP se ha recurrido al diseño de un conjunto de ‘*primers* degenerados’, los cuales presentan en alguna de sus posiciones varias bases posibles (A, T, G, C) (65). Estos fueron utilizados en un estudio para el diagnóstico mediante RT-LAMP del virus de la fiebre amarilla, donde el uso de *primers* degenerados permitió la detección de diferentes cepas (cepa salvaje africana (Asibi) y cepas brasileñas)(66). Además, se han empleado para la detección de bacterias como *Campylobacter* spp. (67) y *Mycobacterium tuberculosis* (68).

1.2.4. Métodos de detección de los productos de amplificación

Existen diferentes métodos de detección de los productos de amplificación obtenidos en una reacción tipo LAMP: (i) *turbidez*, (ii) *cambio colorimétrico*, (iii) *electroforesis en gel de agarosa* y (iv) *tiempo real*. Los métodos que permiten la visualización simple de los resultados mediante turbidez o cambio colorimétrico favorecen la aplicación de la técnica LAMP en laboratorios de zonas rurales donde los recursos son limitados. Sin embargo, la electroforesis en gel de agarosa y la detección a tiempo real están más restringidos a su uso en un laboratorio de referencia, ya que requieren de equipos complejos (transiluminador, termociclador, etc.). No obstante, la detección a tiempo real podría aplicarse en estudios de campo mediante el uso de dispositivos portátiles autónomos que no dependan de electricidad.

A continuación, se detallan los diferentes métodos de detección.

1.2.4.1. Detección mediante turbidez

Durante el proceso de amplificación LAMP, se generan grandes cantidades de ión pirofosfato ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$). Este se une a los iones de magnesio presentes en la reacción, generando un precipitado de pirofosfato de magnesio ($\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$) que produce turbidez observable a simple vista (55) (**Figura 2A**). La turbidez generada es estable durante un periodo corto de tiempo, por lo que la visualización de los resultados debe realizarse lo más rápidamente posible una vez finalizada la reacción de amplificación (69).

1.2.4.2. Detección colorimétrica

La detección visual de los productos de amplificación también puede realizarse mediante cambios colorimétricos utilizando reactivos intercalantes, no intercalantes o indicadores metálicos e indicadores de pH (**Figura 2B**). (i) *Reactivos intercalantes*: son capaces de interaccionar con el ADN y producir un cambio de color. El más utilizado es el **SYBR[®] Green I** que se añade al final de la reacción y produce un cambio de color naranja (negativo) a verde (positivo) en presencia de ADN amplificado (**Figura 2B. b1**). Este cambio de color también puede apreciarse bajo luz ultravioleta (302 nm)(70). Sin embargo, la necesidad de abrir el tubo para añadir el colorante a término de la reacción puede aumentar el riesgo de contaminación (71). Para solventar esta limitación, algunos autores han desarrollado métodos sencillos de amplificación en ‘tubo cerrado’. Estos consisten en la adición del SYBR[®] Green I en la parte interna de la tapa del tubo utilizando aceite de parafina para evitar la evaporación durante el proceso de incubación o papel de aluminio para separar el SYBR[®] Green I de la mezcla de reacción (72,73). (ii) *Reactivos no intercalantes o indicadores metálicos*: son capaces de producir cambio de color debido a una reacción química. Pueden añadirse al comienzo de la reacción evitando la apertura posterior de los tubos de reacción y disminuyendo así el riesgo de contaminación cruzada. Entre los más utilizados destacan la calceína, el azul de hidroxinaphtol (en inglés, *hidroxinaphtol blue*, HNB) y el verde malaquita. La **calceína**, antes de la amplificación se encuentra combinada con iones manganeso (Mn^{2+}), permaneciendo apagada. A medida que avanza la reacción LAMP, el ion manganeso se separa de la calceína por la presencia de los iones pirofosfato generados ($\text{Mn}_2\text{P}_2\text{O}_7$) y la calceína libre se combina entonces con iones magnesio (Mg^{2+}) presentes en la mezcla de reacción generando fluorescencia (74). Además, esta unión (calceína + Mg^{2+}) provoca un

cambio de color de naranja (negativo) a verde (positivo), que puede observarse a simple vista con luz natural (**Figura 2B. b2**)(75). El **HNB** presenta un color morado (negativo) en presencia de Mg^{2+} ; tras el proceso de amplificación se produce un cambio de color a azul oscuro (positivo) inducido por la quelación de iones Mg^{2+} por los dNTPs (76). A diferencia de la calceína, no presenta capacidad fluorescente, por lo que solo se utiliza para la observación colorimétrica a simple vista con luz natural (75). El indicador metálico **verde malaquita**, produce un color verde/azul tras la amplificación de ADN, mientras que las muestras negativas (sin amplificación) son incoloras (77). (iii) *Indicadores de pH*: se utilizan indicadores sensibles al pH para detectar el cambio significativo desde un pH inicial alcalino a un pH ácido final (**Figura 2B. b3**). Algunos de los indicadores más utilizados son el **phenol red**, que produce un cambio colorimétrico de rosa (negativo) a amarillo (positivo), y el **neutral red**, que produce un cambio de amarillo pardo (negativo) a rosa (positivo) (60).

1.2.4.3. Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis en gel de agarosa permite la separación y el análisis de macromoléculas (ADN, ARN y proteínas) y sus fragmentos en función de su tamaño y carga (71). Para ello, se utiliza un colorante fluorescente capaz de unirse a las moléculas de ADN como, por ejemplo, el bromuro de etidio o SYBR[®] Green I (78). En caso de un resultado positivo, se observa un patrón de bandas en escalera de diferente tamaño (**Figura 2C**) (75). Se ha reportado que el gel de electroforesis es ligeramente más sensible que algunos métodos de detección colorimétrica (71). Sin embargo, para el análisis de los diferentes fragmentos se requiere de la apertura de los tubos aumentando así el riesgo de contaminación (75). Asimismo, requiere de cierta infraestructura (fuente de alimentación, cubetas, transiluminador, etc.), lo que puede limitar su aplicación en zonas con bajos recursos.

1.2.4.4. Métodos de detección a tiempo real

En el año 2004, Mori y colaboradores desarrollaron un método de detección a tiempo real basándose en la turbidez que produce el pirofosfato de magnesio. Para ello, diseñaron un turbidímetro capaz de realizar la reacción LAMP y medir simultáneamente la turbidez de varias muestras (59). Demostraron que el análisis cinético de la reacción LAMP por turbidimetría a tiempo real tenía la capacidad de cuantificar el ADN y que no eran necesarias sondas ni reactivos auxiliares para la

monitorización de la reacción. Sin embargo, la sensibilidad puede verse afectada por la presencia de sustancias opacas en la mezcla de reacción (71).

Otro método de detección a tiempo real es mediante la monitorización de la fluorescencia producida durante la amplificación. Para ello, se utilizan: (i) *colorantes fluorescentes intercalantes*, capaces de unirse a la doble cadena de ADN produciendo un cambio en la señal óptica y emitiendo fluorescencia a medida que se genera la amplificación (**Figura 2D**) (71). Algunos de los más utilizados son SYBR[®] Green I y EvaGreen (52,79). Ambos tienen propiedades de excitación y emisión similares, sin embargo, el EvaGreen ha demostrado tener mejores propiedades de unión al ADN (80). Además, debido al efecto inhibitor sobre la polimerización del ADN a concentraciones altas, el SYBR[®] Green I se utiliza principalmente en la detección de punto final y el EvaGreen en la monitorización de las reacciones LAMP a tiempo real (80). Otro intercalante fluorescente es el SYTO-82, que permite la visualización de los resultados a simple vista bajo luz ultravioleta (81)(82). (ii) *Sondas o primers modificados con colorantes fluorescentes*; el método consiste en el marcaje de sondas o *primers* con fluoróforos que se encuentran apagados cuando están unidos a un atenuador o *quencher* y que emitirán una señal de fluorescencia al separarse. Los más utilizados son: FAM, HEX, ROX, Cy5 y Cy5.5, cuyas señales pueden visualizarse en diferentes canales de emisión (83). La utilización de diferentes fluoróforos es de gran utilidad para la detección simultánea de varias dianas (detección múltiple) en un único ensayo LAMP.

En la **Tabla 2** se muestran los diferentes métodos de detección de los productos de amplificación LAMP y sus principales características.

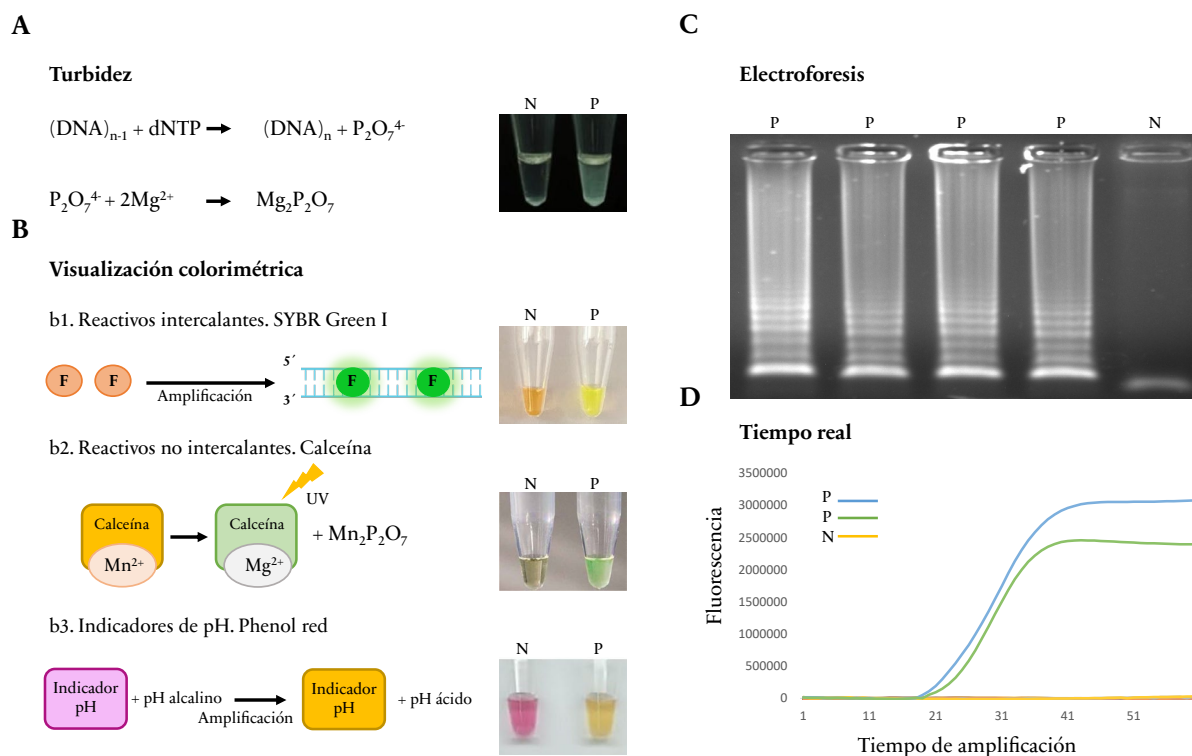


Figura 2. Representación gráfica de diferentes métodos de detección utilizados para la lectura de los resultados obtenidos mediante la técnica LAMP. **A)** Método de detección a término de reacción mediante turbidez por precipitado de $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$. **B)** Visualización de los resultados mediante cambios colorimétricos: reactivos intercalantes, reactivos no intercalantes e indicadores de pH. **C)** Electroforesis en gel de agarosa mostrando el patrón de bandas en escalera. **D)** Detección a tiempo real: gráfico indicando las curvas de amplificación. P, Control Positivo; N, Control Negativo.

Tabla 2. Métodos de detección utilizados para la visualización de los resultados de una reacción tipo LAMP.

	Visualización resultados	Lectura de punto final	Lectura a tiempo real
Precipitado de $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$	Turbidez	✓	✓
SYBR® Green I	Cambio colorimétrico (naranja a verde)	✓	✓
	Fluorescencia bajo luz UV		
Calceína	Cambio colorimétrico (naranja a verde)	✓	✓
	Fluorescencia bajo luz UV		
Hidroxinaphtol Blue	Cambio colorimétrico (morado a azul)	✓	✗
Verde malaquita	Cambio colorimétrico (incoloro a azul)	✓	✗

Phenol red	Cambio colorimétrico (rosa a amarillo)	✓	✗
Neutral red	Cambio colorimétrico (amarillo pardo a rosa)	✓	✗
EvaGreen	Fluorescencia bajo luz UV	✓	✓
SYTO-82	Fluorescencia bajo luz UV	✓	✓

Mg₂P₂O₇: Pirofosfato de magnesio; ✓ Indica: visualización de los resultados a término de reacción/visualización de los resultados a tiempo real. ✗ Indica: no visualización de los resultados a término de reacción/no visualización de los resultados a tiempo real.

1.2.5. LAMP-múltiplex (mLAMP)

En los últimos años, muchos investigadores se han centrado en el desarrollo de un LAMP múltiplex (mLAMP) para la detección de diferentes secuencias de ADN en una misma reacción. El ensayo mLAMP va a permitir diferenciar varias especies de patógenos y/o cepas o especies estrechamente relacionadas entre sí en un único ensayo (84). Debido a la complejidad de los amplicones generados durante una reacción tipo LAMP, el diseño y desarrollo de un mLAMP es complejo y no permite su estandarización. Además, el número de trabajos dedicados a ello es aún muy limitado y no hay ninguna metodología que sobresalga entre las utilizadas actualmente para el desarrollo del mLAMP. Los enfoques metodológicos utilizados incluyen: el uso de enzimas de restricción, la combinación del LAMP con otras técnicas, el análisis de las curvas de *melting* y el uso de *primers* marcados con sondas.

1.2.5.1. Uso de enzimas de restricción

Esta técnica fue utilizada en el desarrollo del primer mLAMP para la diferenciación de especies de *Babesia* spp. (85). Para ello, se modificaron los *primers* internos FIP y BIP insertando la enzima de restricción *EcoRI* entre la secuencia F2-F1c del primer FIP y B1c-B2 del primer BIP. Tras la reacción de LAMP y digestión con *EcoRI*, se obtuvieron diferentes tamaños de bandas específicas para cada especie en un gel de agarosa. Esto permitió la diferenciación de *Babesia bovis*, *B. bigemina* e incluso de una infección mixta por ambas especies (85). Este método también fue utilizado para el desarrollo de un mLAMP para detectar genes de resistencia a las sulfonamidas utilizando la enzima *HinfI* (86). Los análisis de los amplicones con enzimas de restricción son métodos lentos y laboriosos, ya que el proceso de digestión puede

tardar hasta 60 minutos y se requiere de la electroforesis en gel de agarosa para la visualización de los resultados (85,87).

1.2.5.2. Combinación mLAMP-ELISA

Para detectar la amplificación en un ensayo mLAMP también se puede utilizar la técnica ELISA. La combinación de mLAMP-dotELISA se ha utilizado para la identificación diferencial de *Taenia solium*, *T. saginata* y *T. asiatica*, utilizando como diana el gen *cox1* (88). Para ello, se marcó el *primer* interno FIP de cada una de las especies con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (*T. solium*), digoxigenina (DIG) (*T. saginata*) y tetrametilrhodamina (TAMRA) (*T. asiatica*). Los *primers* BIP se marcaron con biotina. Los productos de amplificación del ensayo mLAMP fueron capturados por los anticuerpos específicos para FITC, DIG y TAMRA en una membrana de nitrocelulosa y el resultado dot-ELISA positivo se caracterizó por un punto de color visible en la membrana.

1.2.5.3. Análisis de las curvas de melting

El análisis de la curva de *melting* (T_m) o curva de fusión, investiga el perfil de disociación de la hélice del ADN de doble cadena recién formado tras su exposición a temperaturas gradualmente crecientes (89). Se detectan así las diferencias entre los amplicones basadas en su longitud, composición de bases e interacción entre ellas (90).

El ensayo LAMP combinado con el análisis de la curva de *melting* es un método simple en tubo cerrado que no requiere de electroforesis, reduciendo el riesgo de contaminación (91). Esta combinación se ha utilizado para la detección simultánea de *Salmonella* spp. y *Vibrio parahaemolyticus* en una sola reacción (92). En este estudio, tras realizar el LAMP a tiempo real (65°C durante 60 min), los productos amplificados se diferenciaron mediante el análisis de las diferentes T_m . También se ha utilizado este método para la diferenciación de *Leishmania donovani* y *Mycobacterium leprae* con una sensibilidad del 100% y 95%, respectivamente (93). Sin embargo, hay dos factores que influyen en las T_m de los productos del LAMP: (i) la concentración de Mg^{2+} ; esta varía entre diferentes mezclas de reacción por la precipitación de $Mg_2P_2O_7$ que se produce como subproducto de la reacción; (ii) los valores de T_m de los productos LAMP; éstos están estrechamente relacionados con el contenido GC (91), lo que limita su uso para la detección múltiple de diferentes patógenos.

1.2.5.4. Utilización de primers marcados con sondas

Existen varias técnicas que utilizan sondas marcadas con fluoróforos que permiten diseñar un ensayo tipo mLAMP. Entre ellas, se incluyen: FLOS-LAMP (*Fluorescence of Loop primer upon Self Dequenching-LAMP*); DARQ (*Detection of Amplification by Release of Quenching*) y QUASR (*Quenching of Unincorporated Amplification Signal Reporters*). En la técnica **FLOS-LAMP** se marca con un fluoróforo el *loop primer*, manteniéndose libre y apagado en la solución. Durante la amplificación, el *primer* se une a su diana (amplicón) provocando la emisión de fluorescencia. Esta técnica fue optimizada para la detección a tiempo real del virus de la varicela-zóster (VVZ) con un límite de detección de 500 copias por reacción y una sensibilidad y especificidad del 96,8% y el 100%, respectivamente (94). La posibilidad de utilizar diferentes fluoróforos (por ej., FAM, JOE, ROX) mejora la versatilidad de este sistema y su aplicación para la detección múltiple a tiempo real de diferentes patógenos en una misma reacción (94). Esta técnica se evaluó en la identificación de *Trialeurodes vaporariorum* y *Bemisia tabaci* (MEAM1 y MED) (95).

La técnica **DARQ** fue descrita por Tanner y colaboradores en el año 2012 (96). Consiste en la modificación del *primer* interno FIP, al que se añade un *quencher* (o atenuador) en el extremo 5', y la adición de un *primer* complementario a FIP marcado con un fluoróforo en el extremo 3' (Fd). La señal de fluorescencia se produce cuando Fd es desplazado durante el proceso de amplificación del LAMP, produciéndose la separación del *primer* FIP y liberándose así del *quencher*. La funcionalidad de este ensayo mLAMP fue probada para la detección simultánea de hasta 4 dianas (bacteriófago λ , *Caenorhabditis elegans*, *Escherichia coli* y HeLa (BRCA1) distintas a tiempo real en una misma reacción (96). Esta técnica también se ha aplicado para la detección de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (97).

La técnica **QUASR** está especialmente diseñada para la detección múltiple a término de reacción (*end point* LAMP). Utiliza un *primer* modificado con un fluoróforo en su extremo 5' y una sonda marcada con un *quencher* (7-13bp) en el extremo 3', que es complementaria al extremo 5' del *primer* (98). La temperatura de fusión del dímero formado por el *primer* marcado y la sonda *quencher* debe ser inferior a la temperatura de la reacción LAMP (<65°C). La reacción se lleva a cabo posteriormente a 65°C y, si existe amplificación, se une el *primer* marcado con los amplicones produciendo una señal fluorescente que se observa a simple vista bajo luz

UV. Finalizada la reacción, y tras el enfriamiento a temperatura ambiente, si no existe amplificación, el *primer* marcado hibrida con la sonda *quencher*, por lo que no se produce señal de fluorescencia. La puesta a punto de esta técnica se llevó a cabo mediante la detección simultánea del virus del Nilo Occidental y el virus Chikungunya (98). Se ha descrito también su aplicación técnica para la detección simultánea del virus del Zika, Dengue y Chikungunya mediante el uso de dispositivos inteligentes, utilizando la cámara CMOS integrada en un *smartphone* para el análisis de las señales QUASR generadas durante la técnica RT-LAMP (99).

1.3. Aplicación de la tecnología LAMP como diagnóstico *point-of-care*

Las pruebas de diagnóstico *point-of-care* (POC) son pruebas que se realizan en el momento y el lugar donde se encuentra el paciente, permitiendo un diagnóstico precoz y decisiones médicas rápidas (100). En el año 2003, el Programa Especial de la OMS para la Investigación y Formación en Enfermedades Tropicales estableció el acrónimo ASSURED; *Affordable* (asequible), *Sensitive* (sensible), *Specific* (específico), *User-friendly* (fácil de usar), *Rapid and Robust* (rápido y robusto), *Equipment-free* (sin equipamiento), *Delivered* (disponible para quien lo necesite), como un conjunto de criterios que debe cumplir cualquier método de diagnóstico para ser considerado una prueba POC en entornos de bajos recursos (101). Recientemente, debido a los avances tecnológicos, este acrónimo se ha actualizado como REASSURED, incluyendo: *Real-time connectivity* (conectividad a tiempo real), *Ease of specimen Collection* (facilidad de recogida de muestras) y *Environmental friendliness* (respetuoso con el medio ambiente) (102). Desafortunadamente, es complicado que una prueba diagnóstica cumpla todas estas características y, generalmente, tratar de conseguir una de ellas conlleva a incumplir otra. Las pruebas serológicas de diagnóstico rápido son muy utilizadas para un diagnóstico POC y se ajustan al término REASSURED, sin embargo, presentan valores de sensibilidad y especificidad muy limitados (103). Las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos presentan valores altos de sensibilidad y especificidad, aunque algunas de ellas no cumplen algunas de las directrices del término REASSURED en términos de asequibilidad, rapidez y ausencia de equipamiento especial. La técnica LAMP está considerada como una de las mejores candidatas para el cumplimiento de todos los criterios requeridos (61,103). Hasta la fecha, numerosos estudios se han centrado en el desarrollo de nuevas estrategias que permitan la implementación de la tecnología LAMP en zonas tropicales y

subtropicales con bajos recursos y el cumplimiento de las directrices REASSURED, con el fin de demostrar su potencial uso como diagnóstico POC.

1.3.1. Procesamiento de muestras clínicas

El diagnóstico y los estudios epidemiológicos de las enfermedades tropicales a menudo se ven obstaculizados por las dificultades en la recogida, almacenamiento y transporte de muestras frescas, además de las complicaciones asociadas a los métodos de extracción y purificación de ADN y/o ARN. A continuación, se describen varias alternativas que surgen para solventar estos problemas, como el uso de papel de filtro o los protocolos simples de extracción como el calentamiento previo de las muestras.

1.3.1.1. Almacenamiento y transporte de muestras clínicas

El uso del papel de filtro permite la recogida, almacenamiento y el transporte de diferentes tipos de muestras biológicas: sangre (104), fluidos bucales (105), orina (106,107) y heces (108,109). Además, se ha demostrado que la conservación de las muestras en papel de filtro retrasa los procesos de degradación que pueden experimentar los analitos presentes en las muestras clínicas (110).

La recogida de sangre en papel de filtro, conocida como DBS (del inglés, *Dried Blood Spot*), es un método muy utilizado para la obtención, el transporte a temperatura ambiente y almacenamiento a largo plazo de las muestras (104). Esto supone una gran ventaja para la realización de estudios en países en vías de desarrollo donde no existen equipos para el procesamiento o almacenamiento en frío de las muestras de sangre. Además, hoy en día, los DBSs se consideran ‘material no infeccioso’ según un informe aprobado por la OMS y la Asociación Internacional de Transporte Aéreo (IATA) (111), lo que supone un gran avance para el transporte de muestras desde áreas rurales hasta laboratorios de referencia para su posterior análisis.

Numerosos estudios demuestran la eficacia del uso de los DBSs en el diagnóstico de agentes infecciosos como virus, bacterias y parásitos (104), en estudios de genotipado (112), en cuantificación de carga viral (113) y en monitorización terapéutica de medicamentos (114). Asimismo, los DBSs han sido utilizados con éxito en estudios de campo para la detección de *Plasmodium* spp. mediante LAMP llevados a cabo en Brasil, Zanzíbar y Gambia (115–117). También se ha demostrado su eficacia en el almacenamiento a largo plazo en un estudio dirigido a la detección mediante

LAMP de *T. brucei rhodesiense/gambiense*, en el que se obtuvieron porcentajes de sensibilidad del 93,8% utilizando DBSs que llevaban almacenados 1 año a 4°C (118).

1.3.1.2. Extracción y purificación de ácidos nucleicos

Actualmente, el proceso de purificación de ácidos nucleicos se considera el principal cuello de botella que impide el acercamiento real de las técnicas moleculares a los lugares donde los recursos son limitados y los laboratorios no están equipados. Como se ha comentado anteriormente, la tecnología LAMP es menos susceptible a las posibles sustancias inhibidoras presentes en algunas muestras clínicas. En este sentido, el LAMP puede combinarse con métodos de extracción simple, desde métodos clásicos hasta el uso de *kits* extracción rápida (**Tabla 3**).

Un método clásico ampliamente utilizado en biología molecular es la extracción con **fenol-cloroformo** (119). Brevemente, se añade un tampón de lisis a la muestra y se centrifuga. A continuación, se añade fenol-cloroformo y se produce una separación de fases según la densidad (fase acuosa y fase orgánica). Por último, se realiza una precipitación con isopropanol para la recuperación de los ácidos nucleicos. Este método fue utilizado en un estudio de campo llevado a cabo por nuestro grupo de investigación en Umbuzeiro, Brasil, para la detección mediante la técnica LAMP de *Schistosoma mansoni* a partir de muestras de heces (120).

La extracción simple con **metanol y calor** también se ha empleado junto con la técnica LAMP en un estudio llevado a cabo en Gambia para la detección de ADN de *Plasmodium falciparum* a partir de los DBSs (117). Brevemente, se perforaron 3 mm de los DBSs, se añadió metanol y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente, se eliminó el metanol y se dejó secar antes de la adición de agua destilada. Finalmente, los discos perforados se trituraron y se calentaron a 95°C durante 10 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo para ser utilizado como molde en la amplificación.

Los **métodos simples de calentamiento de la muestra** son los más utilizados en la técnica LAMP. El método “**Boil and Spin**” consiste en añadir un tampón de lisis (400mM NaCl, 40 mM Tris pH 6,5 y 0,4% SDS) a la muestra, calentar a 95°C durante 5 min y centrifugar a 10.000 g durante 3 min (58). Finalmente, el sobrenadante obtenido se transfiere a un tubo de elución que contiene agua ultrapura. Este método ha sido utilizado en numerosos estudios de campo para la detección de

Plasmodium spp. en zonas endémicas de malaria como el Amazonas Peruano, Uganda, Zanzíbar y Brasil (58,115,121–123). También se ha usado para la detección de *Onchocerca volvulus* en moscas *Simulium* spp. (124). **La extracción con resina Chelex-100** es un método sencillo, rápido y económico. No existe un protocolo estándar; algunos autores añaden a la muestra Chelex-100 al 20% e incuban a 56°C durante 20 min seguido de otra incubación a 100°C durante 10 min (125). Otros autores añaden Chelex-100 al 5% y realizan la incubación a 90°C durante 30 min (118). Tras las incubaciones, generalmente se centrifuga a 13.000 rpm durante 10 min y se transfiere el sobrenadante a un tubo limpio. Lim y colaboradores desarrollaron un método de ebullición con Chelex-100 al 10% para la extracción de ADN de *Candida* spp. en muestras de sangre (126). Una vez añadido el Chelex-100 al 10%, se incubó a 100°C durante 10 min y esta mezcla se filtró a través de una membrana de polycarbonato de 3 µm dispuesta en un tubo SEPARA® (GVS, Bolonia, Italia) para retener la resina Chelex-100. En este estudio se obtuvieron resultados de sensibilidad y especificidad del 100%. Este método simple también ha sido utilizado para la extracción de ARN de muestras de aspirados nasofaríngeos para el diagnóstico de la tos ferina (125), muestras cervicales para la detección de hasta 7 subtipos diferentes del virus del papiloma humano (VPH) (127) y muestras de sangre recogidas en los DBSs para la detección de *Trypanosoma brucei rhodesiense/gambiense* (118). El **método de lisis alcalina** consiste en la adición a la muestra de NaOH seguida de una incubación a 99°C durante 10 min. Se ha utilizado en estudios de campo realizados en Kenia para la extracción de ADN de quistes de *Echinococcus granulosus* (128), huevos de *Trichuris trichiura* (129) y huevos de *Ascaris lumbricoides* (130). Su funcionalidad también se ha probado para la extracción de ADN de gusanos adultos de *Taenia* spp. (131).

Entre los métodos simples de calentamiento de la muestra, destacamos el método “**Rapid-Heat LAMPellet**” (RHE-LAMP) utilizado por nuestro grupo de investigación para la detección de ADN de *S. haematobium* mediante LAMP en muestras clínicas de orina (132). En el estudio, las muestras de orina se calentaron durante 15 minutos a 95°C sin añadir ningún reactivo previo. Con este procedimiento se llegó a obtener un límite de detección de 1fg/µL. La funcionalidad de este método de extracción se comprobó en condiciones de campo en una zona rural de Cubal (Angola) para el diagnóstico mediante LAMP de la esquistosomosis urogenital. La prevalencia obtenida por LAMP fue significativamente mayor que la obtenida por microscopía (63,4% vs. 50,6%)(133).

Por último, existen *kits* comerciales que permiten la extracción y purificación de ácidos nucleicos a partir de todo tipo de muestras clínicas. Estos *kits* son muy utilizados en laboratorios de referencia. Sin embargo, su elevado coste y la necesidad de cierta infraestructura (p.ej., centrifugas) dificulta su uso en países con bajos recursos. La empresa Eiken Chemical (Eiken Chemical Co., Ltd., Tokio, Japón), desarrolló el **kit de extracción simple LoopAmp™ PURE-DNA** para su uso combinado con la técnica LAMP. Este kit comercial solo requiere de un termobloque o incubadora, evitando el uso de centrifugas. Los detalles del contenido del *kit* y los procedimientos se encuentran disponibles en https://www.eiken.co.jp/uploads/IFU/380237-C_en_20220301.pdf. Su funcionalidad ha sido validada con éxito para la extracción de ADN a partir de DBSs (134), de muestras de sangre total (122) y de muestras de orina en papel de filtro (107). Además, se ha utilizado en estudios llevados a cabo en zonas rurales con bajos recursos como Uganda y Ghana para la detección de *P. falciparum* (122) y *Schistosoma haematobium*/*S. mansoni* (107).

Tabla 3. Métodos simples de extracción y purificación de ADN y/o ARN combinados con la tecnología LAMP utilizados en diferentes estudios.

Método de extracción	Patógeno detectado	Tipo de muestra	Sensibilidad/ límite detección	Muestras clínicas	Estudio de campo	Ref.
Fenol-cloroformo	<i>S. mansoni</i>	Heces	92,86 %	✓	✓ Brasil	(120)
	<i>T. brucei</i>	ADN genómico	0,01 pg/ µL	✗	✗	(135)
	<i>Cryptosporidium</i> spp.	Ooquistes	0,02 ng/ µL	✓	✗	(136)
Metanol y calor	<i>P. falciparum</i>	DBS	92 %	✓	✓ Gambia	(117)
Boil and Spin	<i>Plasmodium</i> spp. y <i>P. falciparum</i>	Sangre	91,8 %	✓	✓ Amazonas Peruano	(58)
	<i>P. falciparum</i>	Sangre	93,9 %	✓	✓ Uganda	(122)
	<i>P. falciparum</i> y <i>P. vivax</i>	Sangre	<i>P. falciparum</i> : 100 % <i>P. vivax</i> : 99,4 %	✓	✓ Amazonas Peruano	(121)
	<i>Plasmodium</i> spp.	Sangre	83,8 %	✓	✓ Zanzíbar	(123)

	<i>Plasmodium</i> spp., <i>P. falciparum</i> y <i>P. vivax</i>	DBS	94,1 %	✓	✓ Brasil	(115)
	<i>P. ovale</i>	Sangre	100 %	✓	✗	(137)
	<i>O. volvulus</i>	Mosca negra	0,01 ng/100 moscas	✗	✗	(124)
	<i>Candida</i> spp.	Sangre	100 %	✓	✗	(126)
Chelex-100	Virus del papiloma humano	Tejido cervical	100 %	✓	✗	(127)
	<i>Bordetella pertusis</i> (tos ferina)	Aspirado nasofaríngeo	92,59 %	✓	✗	(125)
	<i>T. brucei rhodesiense/gambiense</i>	DBS	SRA-LAMP: 93,8 % RIME-LAMP: 95,3 %	✓	✗	(118)
	<i>E. granulosus</i>	Quistes	95,2 %	✓	✓ Kenia	(128)
Lisis alcalina	<i>T. trichiura</i>	Huevos	77 %	✓	✓ Kenia	(129)
	<i>A. lumbricoides</i>	Huevos	10.8 ng/μL	✓	✓ Kenia	(130)
	<i>Taenia</i> spp.	Gusano adulto	NT	✓	✗	(131)
	<i>S. haematobium</i>	Orina	100 %	✓	✓ Angola	(133)
LoopAmp™ PURE-DNA	<i>Plasmodium</i> spp. y <i>P. falciparum</i>	DBS	<i>Plasmodium</i> spp.: 96,96 % <i>P. falciparum</i> : 97,82 %	✓	✗	(134)
	<i>P. falciparum</i>	Sangre	93,3 %	✓	✓ Uganda	(122)
	<i>S. haematobium</i> <i>S. mansoni</i>	Orina en papel de filtro	<i>S. haematobium</i> : 100 % <i>S. mansoni</i> : 99 %	✓	✓ Ghana	(107)

DBS, Dried Blood Spot; RHE-LAMP, Rapid-Heat LAMPellet method. ^bNT, No Testado. ✓ Indica: estudio realizado en condiciones de campo/probada su funcionalidad en muestras clínicas; ✗ Indica: estudio no realizado en condiciones de campo/no probada su funcionalidad en muestras clínicas.

1.3.2. Reactivos estabilizados o “listos para su uso”

El mantenimiento de la cadena de frío para preservar los reactivos de LAMP es uno de los principales obstáculos para su aplicación en condiciones de campo. Por

ello, uno de los aspectos en los que se está trabajando actualmente es el desarrollo de mezclas de reacción que contengan los reactivos en un formato “listo para su uso”, estables a temperatura ambiente para una aplicación rápida y sencilla. Los dos procedimientos más comúnmente utilizados para la estabilización de los reactivos LAMP son el secado al vacío -con o sin sustancias crioprotectoras- (138) y la liofilización (139). Numerosas casas comerciales ya han diseñado *kits* “listos para su uso” que incorporan los reactivos necesarios (a excepción de los *primers* específicos) para llevar a cabo una reacción LAMP. Los más utilizados en los distintos estudios son: “*WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix*” (New England Biolabs, Massachusetts, Estados Unidos) y *LoopAmp™ kit* (Eiken Chemical Co., Ltd., Tokio, Japón). Estos *kits* facilitan que personal no especializado pueda realizar fácilmente un diagnóstico mediante LAMP, cumpliendo así con el criterio “*User-Friendly*”.

El “*WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix*” kit contiene *phenol red* como indicador de pH, que produce un cambio colorimétrico de rosa (negativo) a amarillo (positivo) permitiendo la interpretación sencilla de los resultados. Su funcionalidad ha sido evaluada para la detección de *Plasmodium* spp. utilizando muestras de sangre fresca (140), de *Mycobacterium tuberculosis* utilizando muestras de esputo (141) y de *Cryptosporidium* spp. en muestras ambientales (136). Esta misma empresa dispone del kit *SARS-CoV-2 Rapid Colorimetric LAMP assay kit* (New England Biolabs, Massachusetts, Estados Unidos) para la detección rápida (30 min) y simple del virus SARS-CoV-2 (142).

El *LoopAmp™ kit* (Eiken Chemical Co., Ltd., Japón) está aprobado por la Fundación para la Obtención de Medios de Diagnóstico Innovadores (FIND). El *kit* contiene una mezcla de reacción estándar (sin *primers*) para llevar a cabo una reacción LAMP. Algunos *kits*, incorporan los *primers* específicos, como es el caso del *LoopAmp™ malaria detection kit* y *LoopAmp™ MTBC detection kit*, para la detección de *Plasmodium* spp. y *Mycobacterium tuberculosis*, respectivamente. La visualización de los resultados es a simple vista mediante turbidez o indicadores metálicos como la calceína (143). Se han validado utilizando muestras de sangre fresca para la detección de *Trypanosoma brucei* (144), *Trypanosoma cruzi* (145,146) y *Plasmodium* spp. (58,137,147), DBSs para la detección de *Loa loa* (148) y *Plasmodium* spp. (134), y en muestras de esputo para detectar *Mycobacterium tuberculosis* (149). Además, su funcionamiento se ha evaluado utilizando métodos simples y económicos de extracción y purificación de ADN como el “*Boil and Spin*” comentado anteriormente (58,137). Cabe mencionar que ha sido

recomendado por la OMS para el diagnóstico de la tuberculosis (150) y de la leishmaniosis visceral (151).

Nuestro grupo de investigación desarrolló un protocolo sencillo y rápido (30 min) de secado al vacío para la estabilización de mezclas de reacción LAMP utilizando trehalosa como crioprotector que fue evaluado en la amplificación de ADN de *Schistosoma mansoni* (152). Este protocolo de estabilización permitió almacenar los reactivos sin pérdida de funcionalidad durante 3 semanas a temperatura ambiente y hasta 5 meses a 4°C. En un estudio posterior, se consiguió mejorar el proceso de estabilización realizando el proceso de secado en la tapa y en el fondo del tubo de reacción (153). Este procedimiento se evaluó en la detección de ARN de SARS-CoV-2, observándose además que el proceso de retrotranscripción previo a la amplificación LAMP no se vio afectado por la estabilización previa de los reactivos. Más recientemente, este proceso de estabilización se ha aplicado con éxito en un ensayo DARQ-LAMP dúplex para la detección simultánea de ADN de *S. mansoni* y *Strongyloides* spp. (154).

1.3.3. Soportes y dispositivos para la aplicación *point-of-care* de la técnica LAMP

La tecnología LAMP no es completamente “*Equipment-free*”, pero si puede reducir mucho el uso de equipos sofisticados. Numerosos investigadores se han centrado en los últimos años en el desarrollo de soportes y dispositivos independientes de la electricidad, portátiles y sencillos de utilizar para facilitar la aplicación del LAMP como método de diagnóstico POC.

1.3.3.1. NINA (*Non-instrumented nucleic acid amplification*)

En el año 2010, el Programa de Tecnología Sanitaria Apropriada (PATH) (Seattle, USA) desarrolló el primer prototipo de dispositivo NINA (*Non-instrumented nucleic acid amplification*) para la amplificación isotérmica de ácidos nucleicos (155). Este dispositivo no requiere electricidad ya que la generación de calor se produce gracias a una reacción química exotérmica. Además, la ejecución de la reacción LAMP en un dispositivo NINA es rápida, no requiere personal técnico especializado y la interpretación de los resultados se lleva a cabo mediante turbidez, fluorescencia o cambio colorimétrico. Este prototipo se evaluó con distintas diluciones de ADN genómico de *P. falciparum* para su validación en el diagnóstico de la malaria (155,156).

Se obtuvieron límites de detección de 1 pg/ μ L en tan solo 41 min de reacción y se demostró la fácil interpretación de los resultados mediante turbidez y fluorescencia (155,156).

Desde su desarrollo, esta plataforma ha sido probada con éxito para la detección de diferentes especies de filarias como *Brugia malayi*, *Onchocerca volvulus* y *Wuchereria bancrofti* (157). Además, se ha probado su funcionalidad utilizando métodos simples de purificación de ADN como el “*Boil and Spin*” (158,159). Sin embargo, hasta la fecha, solo hay descrito un estudio que utilice un dispositivo NINA en un entorno de escasos recursos. Este estudio fue llevado a cabo en Etiopía para la detección de *Plasmodium* spp. en muestras de sangre (158). Además, los ensayos de validación en muestras clínicas todavía son muy limitados.

En la **tabla 4** se muestran los estudios que han utilizado una plataforma NINA para la amplificación isotérmica de ácidos nucleicos mediante la técnica LAMP. Se indican algunos aspectos relevantes de cada estudio, incluyendo el parásito que detectan, el tipo de muestra empleado, el método de extracción de ADN, el mecanismo de detección de los productos amplificados, el método de visualización de los resultados, el tiempo de duración, el límite de detección, validación en muestras clínicas y su utilización en condiciones de campo.

Tabla 4. Estudios que utilizan dispositivos NINA (*Non-instrumented nucleic acid amplification*) para la detección de diferentes especies de parásitos.

Parásito	Tipo muestra	Extracción ADN	Mecanismo de detección	Visualización resultados	Tiempo (min) ^a	Límite de detección	Estudio de campo	Muestras clínicas	Estudio
<i>P. falciparum</i>	ADN genómico	Sin extracción	Precipitado de magnesio Reactivo no intercalante (Calceína)	Turbidez Fluorescencia	41	1 pg/μL	✗	✗	(155,156)
<i>Plasmodium</i> spp. y <i>P. falciparum</i>	Sangre	<i>Boil and Spin</i>	Precipitado de magnesio	Turbidez	40	NA	✓ Etiopía	✓	(158)
<i>Plasmodium</i> spp.	Sangre	<i>Boil and Spin</i>	Precipitado de magnesio	Turbidez	40	NA	✗	✓	(159)
<i>B. malayi</i>	Mosquito, <i>Aedes albopictus</i>	Kit comercial	Indicador de pH (<i>phenol red/neutral red</i>)	Cambio colorimétrico	40	1 pg/μL	✗	✗	
<i>O. volvulus</i>	Mosca negra <i>S. squamosum</i>	Kit comercial	Indicador de pH (<i>phenol red/neutral red</i>)	Cambio colorimétrico	70	0,01 ng/μL	✗	✗	(157)
<i>W. bancrofti</i>	ADN genómico	Kit comercial	Indicador de pH (<i>phenol red/neutral red</i>)	Cambio colorimétrico	40	0,1 pg/μL	✗	✗	

^a Tiempo empleado de reacción LAMP en un dispositivo NINA, sin incluir el proceso previo de extracción de ADN. ✓ Indica: estudio realizado en condiciones de campo/probada su funcionalidad en muestras clínicas; ✗ Indica: estudio no realizado en condiciones de campo/no probada su funcionalidad en muestras clínicas.

1.3.3.2. LAMP y Lateral Flow assay (LFA)

La técnica LAMP-LFA es una combinación de un ensayo LAMP y una prueba inmunocromatográfica, sencilla y fácil de utilizar. En la **figura 3A** se muestra un esquema de su funcionamiento. En esta técnica, los *primers* para realizar el LAMP son modificados generalmente con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y biotina (78). La tira inmunocromatográfica consta de una almohadilla de conjugación con anticuerpos-FITC marcados con nanopartículas de oro (Anti-FITC-AuNP), una línea de prueba con anti-biotina (estreptavidina) y una línea de control con anticuerpos frente a anti-FITC. Tras la reacción de LAMP, la mezcla se deposita en la almohadilla de conjugación y cuando los amplicones generados avanzan por capilaridad, éstos se unen a los Anti-FITC-AuNP, resultando el complejo capturado por la biotina en la línea de prueba para generar un resultado legible mediante las nanopartículas. Si no se generan amplicones, los Anti-FITC-AuNP se capturan en la línea de control por el anticuerpo anti-FITC (78,100). Esta prueba ha sido validada para la detección de diferentes especies de parásitos (ver **tabla 5**), como *Plasmodium* spp., *P. falciparum*, *P. vivax* y *P. knowlesi* (160), *Trypanosoma brucei* (161), *Toxoplasma gondi* (162), *Paragonimus westermani* (163), *Echinococcus granulosus* (128), *Babesia bovis* y *B. bigemina* (164) y *Cryptosporidium* spp. (165). También para la detección de virus, como el virus del Nilo occidental (166).

Además, se han llevado a cabo estudios de detección múltiple (**Figura 3B** y **tabla 5**). En un estudio se diseñó un LAMP-LFA múltiple para la detección simultánea de *Salmonella* spp., *Cronobacter* spp. y *Staphylococcus aureus* (167). Para ello, se modificaron los *primers* BIP de las tres especies con FITC y el *primer* FIP de cada una de las especies con biotina (*Salmonella* spp.), digoxina (*Cronobacter* spp.) y Texas Red (*S. aureus*). La amplificación se produjo cuando los Anti-FITC-AuNP se unieron al amplicón. Este fue capturado secuencialmente por las líneas de prueba recubiertas con estreptavidina, anticuerpo anti-digoxina y anticuerpo anti-Texas Red, visualizando la línea roja gracias a las nanopartículas. Todo el proceso de amplificación y posterior visualización de los resultados se llevó a cabo en 1 hora. Se obtuvieron límites de detección para *Salmonella* spp., *Cronobacter* spp. y *S. aureus* de 4,2, 2,6 y 3,4 cfu/g, respectivamente (167). Este tipo de detección múltiple se ha probado también con éxito para la detección simultánea de *E. histolytica* y *E. dispar/moshkovskii* (168).

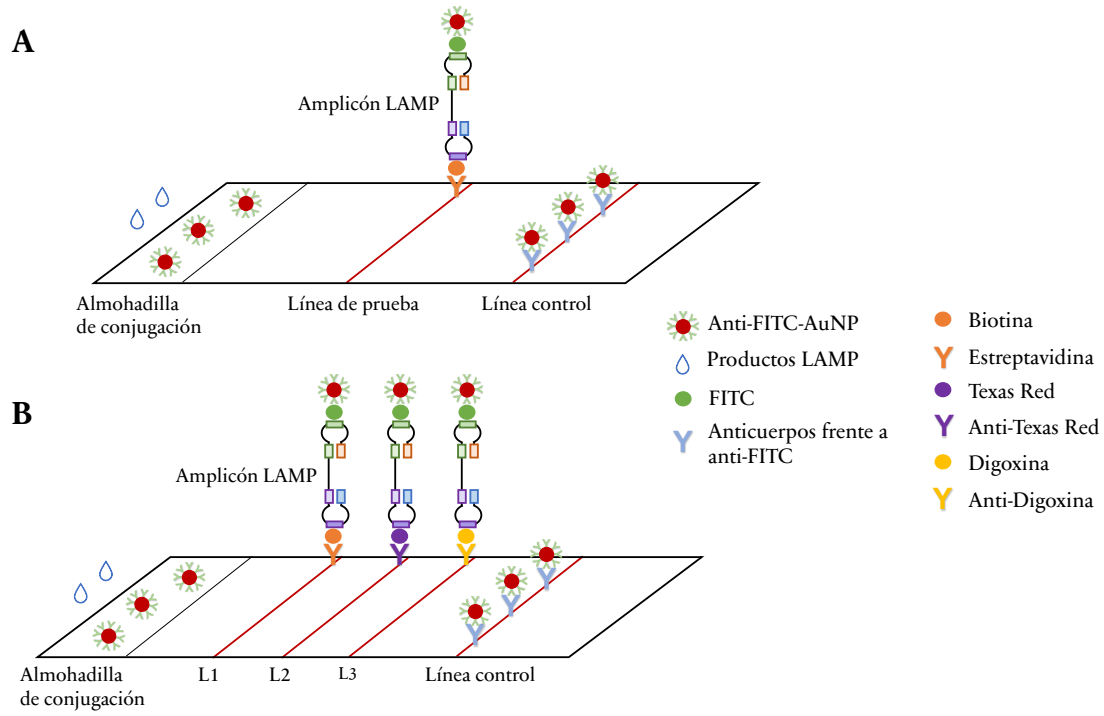


Figura 3. Representación gráfica del mecanismo de funcionamiento de la técnica LAMP-LFA. **A)** Detección visual simple de los productos LAMP. **B)** Detección visual múltiple de los productos LAMP. FITC: isotiocianato de fluoresceína; Anti-FITC-AuNP: anticuerpos-FITC marcados con nanopartículas de oro; L1, L2, L3: Líneas de prueba.

Tabla 5. Estudios que utilizan la técnica LAMP en combinación con *Lateral Flow Assays* (LFA).

Patógeno	Tipo muestra	Extracción ADN	Marcaje de primers	Visualización resultados	Tiempo (min) ^b	Límite de detección	Estudio de campo	Muestras clínicas	Estudio
<i>Plasmodium</i> spp. <i>P. falciparum</i> , <i>P. vivax</i>	DBS	Kit comercial	FITC y Biotina	Banda roja	42	0,01 pg/μL	✗	✓	(160)
<i>T. brucei</i>	Médula ósea y LCR	Kit comercial	FITC y Biotina	Banda roja	48	0,01 tryps/mL	✗	✓	(161)
<i>T. gondi</i>	Sangre	Kit comercial	FITC y Biotina	Banda roja	65	1 fg/μL	✗	✓	(162)
<i>P. westermani</i>	Sangre	Kit comercial	FITC y Biotina	Banda roja	90	2,7 fg/μL	✗	✓	(163)
<i>B. bovis</i> y <i>B. bigemina</i>	ADN genómico	Kit comercial	FITC y Biotina	Banda roja	70	<i>B. bovis</i> 0,14 fg/ μL y <i>B. bigemina</i> 0,85 fg/μL	✗	✓	(164)
<i>E. granulosus</i>	Quistes hidatídicos	Lisis alcalina	FITC y Biotina	Banda roja	45	10 fg/μL	✓ Kenia	✓	(128)
<i>Cryptosporidium</i> spp.	Heces	Kit comercial	FITC y Biotina	Banda roja	75	100 ooquistes/mL	✓ Nairobi	✓	(165)
Virus del Nilo Occidental	Suero y plasma	Kit comercial	FAM y Biotina	Banda roja	45	10 copias ARN	✗	✓	(166)
<i>E. histolytica</i> y <i>E. dispar/moshkovskii</i> ^a	ADN genómico Heces	Kit comercial	FITC, Biotina, y Texas Red	Bandas rojas	70	10 trofozoítos	✗	✓	(168)
<i>Salmonella</i> spp., <i>Cronobacter</i> spp., <i>S. aureus</i> ^a	Cultivo	Kit comercial	FITC, Biotina, Digoxina y Texas Red	Bandas rojas	60	<i>Salmonella</i> : 4,2 cfu/g; <i>Cronobacter</i> : 2,6 cfu/g; <i>S. aureus</i> : 3,4 cfu/g	✗	✗	(167)

DBS: *Dried Blood Spot*; LCR: Líquido Cefalorraquídeo; FITC: Isotiocianato de Fluoresceína. ^a Estudios donde desarrollan un LAMP-LFA múltiple. ^b Tiempo empleado para llevar a cabo una reacción LAMP y la visualización de la banda, no incluye el proceso previo de extracción de ADN/ARN. ✓ Indica: estudio realizado en condiciones de campo/probada su funcionalidad en muestras clínicas; ✗ Indica: estudio no realizado en condiciones de campo/no probada su funcionalidad en muestras clínicas.

1.3.3.3. Chips microfluídicos o “lab-on-a-chip”

En los últimos años, los sistemas microfluídicos o “lab-on-a-chip” en combinación con la tecnología LAMP han cobrado gran relevancia como método de diagnóstico POC. En estos sistemas, la reacción tiene lugar en una microcámara o microcanal y la temperatura constante puede ser proporcionada por un calentador de película delgada y controlada por un termopar (sensor de temperatura) (169). Además, pueden integrar desde la purificación de los ácidos nucleicos hasta el proceso de amplificación en un solo semiconductor con múltiples circuitos integrados o ‘chip’ (170). Presentan ventajas como la miniaturización, la disminución del consumo de reactivos, la portabilidad y la detección rápida del patógeno de interés (170). Existen distintos tipos de chips microfluídicos que se han utilizado en la detección de patógenos: clásicos, en papel y digitales. En la **tabla 6** se muestran algunos estudios que utilizan este tipo de chips microfluídicos. Se indican algunos aspectos relevantes como el patógeno que detectan, el tipo de muestra, la extracción de ADN y/o ARN, el método de detección de los productos de amplificación, la visualización de los resultados, el tiempo total, el límite de detección y, por último, si se han validado utilizando muestras clínicas.

1.3.3.3.1 Chips microfluídicos clásicos

Los chips microfluídicos clásicos basados en el uso de polimetacrilato de metilo (PMMA) y polidimetilsiloxano (PDMS) son los más comunes (100). El chip de PMMA ha sido utilizado para la detección simultánea de *P. falciparum*, *P. vivax* y cuatro especies de vectores transmisores (*Anopheles sinensis*, *An. lesteri*, *An. dirus* y *An. minimus*) (171). Este sistema se compone de un canal de inyección, un orificio de ventilación y 8 pocillos de reacción. Cada pocillo contiene un juego de primers fijados para cada una de las especies. La mezcla de reacción se introdujo en el canal de inyección y se selló con una membrana de presión. Posteriormente, tras el proceso de incubación, los resultados se observaron a simple vista mediante cambio colorimétrico gracias a la adición previa de HNB a la mezcla de reacción. Para la puesta a punto se utilizó ADN genómico de las especies indicadas y se obtuvo un límite de detección de 1pg/μL. Además, se evaluó su precisión mediante el análisis de 48 muestras de ADN de *Anopheles* spp., de las cuales 30 resultaron positivas.

Por otro lado, estos *chips* también se han desarrollado para la detección de algunos virus como el SARS-CoV-2. Es el caso del *chip* microfluídico de PMMA compuesto por 9 cámaras (una cámara de carga de muestra, siete de lavado y una de detección) (172) que integra la extracción de ARN con microesferas magnéticas. Para ello, se utilizó un imán de neodimio-hierro-boro que proporcionó una fuerza magnética capaz de arrastrar las microesferas magnéticas unidas al ARN. Estas fueron arrastradas por las diferentes cámaras de lavado hasta la cámara de detección, donde se llevó a cabo la reacción. Su funcionalidad se probó utilizando muestras de esputo artificialmente contaminadas con ARN genómico del virus. Los resultados se detectaron a simple vista mediante cambio colorimétrico utilizando un indicador de pH y se obtuvieron límites de detección de 470 copias/mL en un tiempo total de 60 min.

1.3.3.3.2 *Chips microfluídicos basados en papel*

Como se ha mencionado anteriormente, el uso del papel de filtro tiene numerosas ventajas debido a su utilidad en la recogida, almacenamiento y transporte de muestras clínicas, y su capacidad de capturar y aislar el ADN (ver “1.3.1.1. Almacenamiento y transporte de muestras clínicas”). Estas ventajas han llevado a un creciente interés en el desarrollo de sistemas LAMP en *chips* microfluídicos basados en papel. Los tipos de papel más utilizados son los de nitrocelulosa FTA (del inglés, *Flinders Technology Associates*) o los de fibra de vidrio (Zhang et al., 2019).

Un ejemplo de este tipo de *chip* es el diseñado para la detección de ADN de *Schistosoma mansoni* en suero y plasma de ratones infectados experimentalmente en el laboratorio (174). Este *chip* está formado por tres cámaras de amplificación que contienen en su extremo un papel de membrana de sílice para la unión de los ácidos nucleicos. Brevemente, se añadieron las muestras de suero y plasma junto con un *buffer* de lavado. Los ácidos nucleicos se unieron a la membrana de sílice debido a la presencia de sales caotrópicas presentes en el *buffer*. A continuación, se introdujeron en la cámara de amplificación las mezclas maestras para llevar a cabo la reacción LAMP. El *chip* se colocó en un dispositivo portátil personalizado que llevaba acoplado un sistema de calentamiento y un microscopio USB portátil de fluorescencia conectado a un ordenador. Las imágenes obtenidas se procesaron en el ordenador y se obtuvo una señal de fluorescencia de cada imagen, generando así una curva típica

de amplificación a tiempo real. Se observaron límites de detección de 0.5 fg/ μ L de ADN genómico de *S. mansoni*.

Los *chips* microfluídicos basados en papel también han sido utilizados para la detección de ARN del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en muestras de saliva, como el *chip* desarrollado por Liu y colaboradores compuesto por una sola cámara de reacción con una membrana integrada de FTA (175). Este se coloca en un soporte equipado con un calentador de lámina delgada y un termopar. Para llevar a cabo el proceso de extracción y amplificación, se añadió la muestra y se filtró a través de la membrana FTA, capaz de aislar y concentrar las moléculas de ARN de la muestra. A continuación, la membrana FTA se lavó dos veces y se dejó secar. Por último, se añadió la mezcla maestra del LAMP en la cámara de reacción para realizar la amplificación. Para la visualización de los resultados se utilizó un detector óptico portátil y compacto ESE (Fluo Sens SD 003, ESE GmbH, Stockack, Alemania) situado en el soporte del chip, que detectó la señal de fluorescencia y permitió su lectura a tiempo real. Se obtuvieron límites de detección inferiores a 10 partículas de VIH por reacción en menos de 40 min.

1.3.3.3 Chips microfluídicos digitales

La microfluídica digital es una tecnología de manejo de líquidos que permite el control individual de microgotas en una matriz abierta de electrodos (176). Un ejemplo de esta tecnología es el *chip* digital diseñado para la detección mediante LAMP de *Trypanosoma brucei* utilizando sondas de baliza molecular (177). Este sistema digital microfluídico está formado por 8 pocillos de reacción y consta de un soporte para el chip con un calentador cerámico y un módulo generador de señales para el transporte de las gotas. Dispone de un microscopio de fluorescencia para monitorizar las señales producidas por el intercalante SYBR[®] Green I a tiempo real. La especificidad se confirma mediante el análisis de la curva de *melting* utilizando una sonda de baliza molecular de baja T_m. El sistema permitió realizar el LAMP en tan solo 1 μ L de volumen de reacción con un límite de detección de ADN genómico de *T. brucei* de 10 copias/reacción.

Dos años después se diseñó el *LampPort*, un dispositivo microfluídico digital portátil para la amplificación isotérmica de *T. brucei* (178). El dispositivo *LampPort* está formado por un *chip* con 6 pocillos de reacción, una placa control montada junto

con el soporte del *chip* y un módulo generador de señales. Además, lleva insertado un termopar para controlar y estabilizar la temperatura a 65°C. Para su puesta a punto, se utilizó un volumen de mezcla de reacción de 2 µL y la visualización de los resultados se realizó a simple vista mediante la adición de una gota de SYBR® Green I a término de la reacción, favoreciendo así su uso como dispositivo POC. Se obtuvo un límite de detección de 40 copias de ADN genómico de *T. brucei*.

En resumen, aunque los nuevos sistemas microfluídicos muestran resultados prometedores en cuanto a portabilidad, disminución del consumo de reactivos, independencia de electricidad y alta sensibilidad para su uso como diagnóstico POC, se requieren más estudios que validen su funcionalidad en muestras clínicas. Además, es importante destacar que no se han utilizado en zonas endémicas.

Tabla 6. Estudios que emplean *chips* microfluídicos clásicos, en papel o digitales.

Tipo	Patógeno	Muestra	Extracción ADN/ARN	Método de detección	Visualización resultados	Tiempo (min) ^a	Límite de detección	Muestras clínicas	Estudio
Clásico	<i>P. falciparum</i> , <i>P. vivax</i> , <i>Anopheles spp.</i>	ADN genómico	Método de extracción simple	Reactivo no intercalante (HNB)	Cambio colorimétrico	45	1 pg/μL	✓	(171)
	SARS-CoV-2	Espuito	En el <i>chip</i>	Indicador de pH (<i>phenol red</i>)	Cambio colorimétrico	60	470 copias/mL	✗	(172)
En papel	<i>S. mansoni</i>	Suero y plasma	En el <i>chip</i>	Reactivo intercalante (EvaGreen)	Fluorescencia a tiempo real y a término de reacción	58	0,5 fg/μL	✗	(174)
	VIH	Saliva	En el <i>chip</i>	Reactivo intercalante (SYTO-9 Green)	Fluorescencia a tiempo real	40	10 copias/reacción	✗	(175)
Digital	<i>T. brucei</i>	ADN genómico	Kit comercial	Reactivo intercalante (SYBR Green) Baliza molecular	Fluorescencia a tiempo real y a término de reacción	40	10 copias/reacción	✗	(177)
	<i>T. brucei</i>	ADN genómico	Método tradicional	Reactivo intercalante (SYBR Green)	Cambio colorimétrico	60	40 copias/reacción	✗	(178)

^a Cuando la extracción de ADN/ARN tiene lugar en el propio chip, el tiempo corresponde al tiempo total de extracción y reacción LAMP. ✓ Indica: estudio realizado en condiciones de campo/probada su funcionalidad en muestras clínicas; ✗ Indica: estudio no realizado en condiciones de campo/no probada su funcionalidad en muestras clínicas.

1.3.3.4. Telefonía móvil y técnica LAMP

El uso de la telefonía móvil está en constante crecimiento a nivel mundial. En el año 2020, el 67% de la población mundial disponía de un teléfono móvil (179), alcanzando hasta un 55% en África Subsahariana (180). Por ello, un enfoque aún más reciente es la combinación de un diagnóstico POC con la denominada ‘salud móvil’ o mHealth (del inglés, *movil health*) para la mejora de las estrategias de diagnóstico y control de las enfermedades infecciosas en zonas remotas. Según la OMS, el término *mHealth* puede definirse como “la práctica médica y sanitaria con ayuda de dispositivos móviles como *smartphones*, dispositivos de monitorización de pacientes, asistentes digitales personales y otros dispositivos inalámbricos” (181). En la actualidad, ya se han desarrollado pruebas diagnósticas basadas en aplicaciones de *smartphones* para el diagnóstico de enfermedades parasitarias. Algunas de ellas están basadas en la microscopía automatizada como, por ejemplo, el dispositivo *CellScope* para la cuantificación de microfilarias de *Loa loa* en sangre, que permite obtener los resultados en menos de 2 min (182). Los *smartphones* han sido también utilizados para la detección de huevos de *S. haematobium* (183), para la cuantificación de ADN de *T. cruzi* (184), la detección de quistes de *G. lamblia* mediante microscopía de fluorescencia (185) y para la detección de *P. falciparum* en frotis sanguíneos (186).

Por otro lado, existen dispositivos *mHealth* desarrollados para utilizar con la tecnología LAMP (Tabla 7). La mayoría combinan una plataforma integrada para realizar el LAMP (generalmente un *chip* microfluídico) y un *smartphone* para la visualización de los resultados. La combinación de difusometría de partículas junto con un dispositivo *smartphone* se ha empleado para la detección de bajos niveles de parasitemia asociados a malaria asintomática (187). Para ello, se utilizaron muestras de sangre total calentada a 65°C para producir la lisis de los glóbulos rojos e iniciar la reacción LAMP. Tras la reacción, los amplicones se combinaron con nanopartículas fluorescentes y se añadió la mezcla a un *chip* microfluídico que se acopló en un *smartphone* para leer los resultados. El *smartphone* tomó imágenes del movimiento browniano de las partículas fluorescentes durante un vídeo de 30 segundos. Las partículas mostraron un movimiento más rápido en ausencia de amplicones y más lento en presencia de amplicones (que obstaculizan el movimiento de las partículas). Se obtuvo un límite de detección de 3 parásitos/μL de sangre en 45 min sin extracción previa de ADN.

En otro estudio se diseñó un *chip* microfluídico desechable, económico y fácil de usar para la identificación molecular de dos especies de mosquitos transmisores de la malaria (*Anopheles gambiae* y *A. arabiensis*) (188). Este *chip* está formado por tres cámaras de amplificación, cada una de ellas con un disco de FTA para el aislamiento del ADN. Brevemente, se añadió un *buffer* de lisis a través de los puertos de entrada de cada cámara, se incubó a temperatura ambiente y, posteriormente, se realizaron dos lavados con etanol para limpiar los discos. A continuación, se añadieron los reactivos del LAMP en cada cámara de amplificación. Los productos de amplificación se detectaron al finalizar la reacción mediante SYTO-9 Green y una luz LED azul con una longitud de onda de excitación de 470 nm. Se utilizó un *smartphone* para la toma de imágenes, el registro de los resultados y la ubicación geográfica de la prueba.

Esta tecnología también se ha utilizado para la detección múltiple de diferentes patógenos en una misma reacción. Un ejemplo es la plataforma modular inalámbrica “*LAMP box*” para el análisis simultáneo mediante RT-LAMP de los virus Zika, Dengue y Chikungunya (99) utilizando la técnica QUASR (98). Esta plataforma está formada por un calentador isotérmico, varios pocillos para colocar los tubos, una fuente de excitación de luz LED y un receptor *Bluetooth* para el control de la reacción mediante un *smartphone* con cámara CMOS para adquirir y analizar las imágenes de las señales generadas en el ensayo.

Por último, en un trabajo llevado a cabo por nuestro grupo de investigación, se desarrolló y patentó un ‘dispositivo de diagnóstico de enfermedades tropicales desatendidas (SMART-LAMP)’ para la amplificación isotérmica de ácidos nucleicos a tiempo real, basado en mediciones colorimétricas sencillas (valores RGB) y controlado por *Bluetooth* mediante el uso de una aplicación (App) móvil (189). El SMART-LAMP ha sido recientemente validado para el diagnóstico de diferentes enfermedades infecciosas, incluyendo esquistosomosis, estrongiloidosis y COVID-19. Además, se comprobó su aplicación y funcionalidad combinado con el uso de mezclas LAMP “listas para su uso” estabilizadas mediante secado simple en presencia de trehalosa a temperatura ambiente. La estabilización de los reactivos se mantuvo funcional durante varios meses, lo que favorece su potencial aplicación como diagnóstico POC en entornos con infraestructuras limitadas.

Como resumen general, en este apartado quedan expuestos los avances en el diagnóstico rápido y sensible de diferentes enfermedades infecciosas mediante la

tecnología LAMP, así como el intento para su acercamiento a zonas de escasos recursos. Muchos de los ensayos LAMP descritos cumplen teóricamente con los requisitos incluidos en el criterio REASURED, favoreciendo su aplicación como diagnóstico POC. Sin embargo, la aplicación de esta tecnología sigue siendo infrecuente como diagnóstico de rutina en la práctica clínica. Por ello, siguen siendo necesarios más estudios en distintos escenarios y situaciones epidemiológicas con la finalidad de implementarla no solo en zonas de escasos recursos, sino también como herramienta de diagnóstico molecular en laboratorios de referencia.

Tabla 7. Estudios que utilizan telefonía móvil en combinación con un método LAMP para la detección de diferentes organismos.

Plataforma LAMP	Especie	Muestra	Extracción ADN/ARN	Método de detección	Visualización resultados	Tiempo (min) ^a	Límite de detección	Estudio campo	Muestras clínicas	Estudios
Termociclador	<i>P. falciparum</i>	Sangre	No extracción	Nanopartículas fluorescentes	Fluorescencia	45	3 parásitos/μL	✗	✓	(187)
Chip microfluídico basado en papel	<i>Anopheles</i> spp.	Mosquito	En el chip	Reactivo intercalante (SYTO-9 Green)	Fluorescencia a término de reacción	60	NT	✗	✗	(188)
Dispositivo portátil SMART-LAMP	<i>S. mansoni</i> / <i>S. haematobium</i> / <i>Strongyloides</i> spp. / SARS-CoV-2	Gusanos adultos/ hisopo nasofaríngeo	Kit comercial	Reactivo no intercalante (Verde malaquita)	Tiempo real (monitorización valores RGB) / Cambio colorimétrico	40-60	1pg/ 0,1 pg/ 0,01 ng/ 2x10 ² copias/ reacción	✗	✓	(189)
LAMP box	Zika, Dengue y Chikungunya	Sangre, orina y saliva	Kit comercial	FAM, Cy5, SYTO 9	Fluorescencia a término de reacción	40	Zika: 100 PFU/mL	✗	✗	(99)

NT: No testado. ^a En el caso de la extracción de ADN en el propio chip, el tiempo corresponde al tiempo total de extracción de ARN y reacción LAMP. ✓ Indica: estudio realizado en condiciones de campo/probada su funcionalidad en muestras clínicas; ✗ Indica: estudio no realizado en condiciones de campo/no probada su funcionalidad en muestras clínicas.

1.4. Referencias

1. Fleming KA, Horton S, Wilson ML, Atun R, DeStigter K, Flanigan J, et al. The Lancet Commission on diagnostics: transforming access to diagnostics. *Lancet*. 2021;398(10315):1997–2050.
2. Yadav H, Shah D, Sayed S, Horton S, Schroeder LF. Availability of essential diagnostics in ten low-income and middle-income countries: results from national health facility surveys. *Lancet Glob Heal*. 2021 Nov;9(11):e1553–60.
3. World Health Organization (WHO). World Health Organization. 2020 [cited 2023 Feb 1]. Available from: <https://www.who.int/es/news/item/10-02-2020-who-and-find-formalize-strategic-collaboration-to-drive-universal-access-to-essential-diagnostics>
4. O’Meara WP, Barcus M, Wongsrichanalai C, Muth S, Maguire JD, Jordan RG, et al. Reader technique as a source of variability in determining malaria parasite density by microscopy. *Malar J*. 2006;5:1–7.
5. Rasti S, Ghorbanzadeh B, Kheirandish F, Mousavi SG, Pirozmand A, Hooshyar H, et al. Comparison of Molecular, Microscopic, and Culture Methods for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. *J Clin Lab Anal*. 2016;30(5):610–5.
6. Momčilović S, Cantacessi C, Arsić-Arsenijević V, Otranto D, Tasić-Otašević S. Rapid diagnosis of parasitic diseases: current scenario and future needs. *Clin Microbiol Infect*. 2019;25(3):290–309.
7. Reilly JT, Bain BJ, Amos R, Cavill I, Chapman C, England JM, et al. The laboratory diagnosis of malaria. *Clin Lab Haematol*. 1997;19(3):165–70.
8. Ohrt C, O’Meara WP, Remich S, McEvoy P, Ogutu B, Mtalib R, et al. Pilot assessment of the sensitivity of the malaria thin film. *Malar J*. 2008;7:1–9.
9. Ricciardi A, Ndao M. Diagnosis of parasitic infections: What’s going on? *J Biomol Screen*. 2015;20(1):6–21.
10. Schmitt BH, Rosenblatt JE, Pritt BS. Laboratory Diagnosis of Tropical Infections. *Infect Dis Clin North Am*. 2012;26(2):513–54.
11. Garcia LS, Arrowood M, Kokoskin E, Paltridge GP, Pillai DR, Procop GW, et al. Practical Guidance for Clinical Microbiology Laboratories: Laboratory Diagnosis of Parasites from the Gastrointestinal Tract. *Clin Microbiol Rev*. 2018 Jan;31(1).
12. Danciger M, Lopez M. Numbers of Giardia in the Feces of Infected Children *. *Am J Trop Med Hyg*. 1975 Mar 1;24(2):237–42.
13. Uchôa FFD, Sudré AP, Macieira D de B, Almosny NRP. The influence of serial fecal sampling on the diagnosis of giardiasis in humans, dogs, and cats. *Rev Inst Med Trop*

- Sao Paulo. 2017;59(May):2–7.
14. Gobbi F, Tamarozzi F, Buonfrate D, Rodari P, Tais S, Bisoffi Z. Laboratory parameters after treatment for *Loa loa* and *Mansonella perstans*: The experience of a single referral center for tropical diseases in a non-endemic area. *Am J Trop Med Hyg*. 2019;100(4):914–20.
 15. García-bermejo I, Ory D. Diagnóstico rápido en serología. 2017;35(4):246–54.
 16. Hnasko R. ELISA. Methods and Protocols. Hnasko R, editor. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.). New York, NY: Springer New York; 2015. 215–25 p. (Methods in Molecular Biology; vol. 1318).
 17. Shah K, Maghsoudlou P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): The basics. *Br J Hosp Med*. 2016;77(7):C98–101.
 18. Hayrapetyan H, Tran T, Tellez-Corrales E, Madiraju C. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: Types and Applications. In: *ELISA Methods in Molecular Biology*. 2023. p. 1–17.
 19. Balsam J, Ossandon M, Bruck HA, Lubensky I, Rasooly A. Low-cost technologies for medical diagnostics in low-resource settings. *Expert Opin Med Diagn*. 2013;7(3):243–55.
 20. World Health Organization (WHO). World Health Organization. Lymphatic filariasis 2022 [cited 2023 Feb 10]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/lymphatic-filariasis>.
 21. Taylor MJ, Hoerauf A, Bockarie M. Lymphatic filariasis and onchocerciasis. *Lancet*. 2010;376(9747):1175–85.
 22. Pion SD, Montavon C, Chesnais CB, Kamgno J, Wanji S, Klion AD, et al. Positivity of antigen tests used for diagnosis of lymphatic filariasis in individuals without *Wuchereria bancrofti* infection but with high *loa loa* microfilaremia. *Am J Trop Med Hyg*. 2016;95(6):1417–23.
 23. Pedram B, Pasquetto V, Drame PM, Ji Y, Gonzalez-Moa MJ, Baldwin RK, et al. A novel rapid test for detecting antibody responses to *Loa loa* infections. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(7):1–14.
 24. Hertz MI, Nana-Djeunga H, Kamgno J, Jelil Njouendou A, Chawa Chunda V, Wanji S, et al. Identification and characterization of *Loa loa* antigens responsible for cross-reactivity with rapid diagnostic tests for lymphatic filariasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12(11):1–18.
 25. World Health Organization (WHO). World malaria report 2022. 2022 [cited 2023 Mar 1]. p. 1–372. Available from: <https://www.who.int/teams/global-malaria->

- pprogramme/reports/world-malaria-report-2022.
26. Fitri LE, Widaningrum T, Endharti AT, Prabowo MH, Winaris N, Nugraha RYB. Malaria diagnostic update: From conventional to advanced method. J Clin Lab Anal. 2022;36(4):1–14.
 27. Varo R, Balanza N, Mayor A, Bassat Q. Diagnosis of clinical malaria in endemic settings. Expert Rev Anti Infect Ther. 2021;19(1):79–92.
 28. Mukkala AN, Kwan J, Lau R, Harris D, Kain D, Boggild AK. An Update on Malaria Rapid Diagnostic Tests. Curr Infect Dis Rep. 2018;20(12).
 29. Golassa L, Messele A, Amambua-Ngwa A, Swedberg G. High prevalence and extended deletions in *Plasmodium falciparum* *hrp2/3* genomic loci in Ethiopia. PLoS One. 2020;15(11):1–11.
 30. Molina - de la Fuente I, Yimar M, García L, González V, Amor A, Anegagrie M, et al. Deletion patterns, genetic variability and protein structure of *pfhrp2* and *pfhrp3*: implications for malaria rapid diagnostic test in Amhara region, Ethiopia. Malar J. 2022;21(1):1–17.
 31. Prosser C, Gresty K, Ellis J, Meyer W, Anderson K, Lee R, et al. Gene Deletions in Strains from. 2021;27(2):471–9.
 32. Rogier E, McCaffery JN, Nace D, Svigel SS, Assefa A, Hwang J, et al. *Plasmodium falciparum* *pfhrp2* and *pfhrp3* Gene Deletions from Persons with Symptomatic Malaria Infection in Ethiopia, Kenya, Madagascar, and Rwanda. Emerg Infect Dis. 2022;28(3):608–16.
 33. Kaaya RD, Kavishe RA, Tenu FF, Matowo JJ, Mosha FW, Drakeley C, et al. Deletions of the *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2/3 genes are common in field isolates from north-eastern Tanzania. Sci Rep. 2022;12(1):1–8.
 34. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al. Enzymatic Amplification of β -Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sick Cell Anemia. Science (80-). 1985 Dec 20;230(4732):1350–4.
 35. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. In: Methods in Enzymology. 1987. p. 335–50.
 36. Rappolee DA, Mark D, Banda MJ, Werb Z. Wound Macrophages Express TGF- α and Other Growth Factors in Vivo: Analysis by mRNA Phenotyping. Science (80-). 1988 Aug 5;241(4866):708–12.
 37. Chamberlain JS, Gibbs RA, Rainer JE, Nguyen PN, Thomas C. Deletion screening of the duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. Nucleic Acids Res. 1988;16(23):11141–56.

38. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous Amplification and Detection of Specific DNA Sequences. *Bio/Technology*. 1992 Apr;10(4):413–7.
39. Vogelstein B, Kinzler KW. Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(16):9236–41.
40. Ballard Z, Ozcan A. Nucleic acid quantification in the field. *Nat Biomed Eng*. 2018;2(9):629–30.
41. Becherer L, Borst N, Bakheit M, Frischmann S, Zengerle R, Von Stetten F. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)-review and classification of methods for sequence-specific detection. *Anal Methods*. 2020;12(6):717–46.
42. Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. 2000 Jun 15;28(12):63e – 63.
43. Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature*. 1991 Mar;350(6313):91–2.
44. Walker GT, Little MC, Nadeau JG, Shank DD. Isothermal in vitro amplification of DNA by a restriction enzyme/DNA polymerase system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(1):392–6.
45. Vincent M, Xu Y, Kong H. Helicase-dependent isothermal DNA amplification. *EMBO Rep*. 2004;5(8):795–800.
46. Piepenburg O, Williams CH, Stemple DL, Armes NA. DNA detection using recombination proteins. *PLoS Biol*. 2006;4(7):1115–21.
47. Van Ness J, Van Ness LK, Galas DJ. Isothermal reactions for the amplification of oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(8):4504–9.
48. Zhao Y, Chen F, Li Q, Wang L, Fan C. Isothermal Amplification of Nucleic Acids. *Chem Rev*. 2015;115(22):12491–545.
49. Khan P, Aufdembrink LM, Engelhart AE. Isothermal SARS-CoV-2 diagnostics: Tools for enabling distributed pandemic testing as a means of supporting safe reopenings. *ACS Synth Biol*. 2020;9(11):2861–80.
50. Fu S, Qu G, Guo S, Ma L, Zhang N, Zhang S, et al. Applications of loop-mediated isothermal DNA amplification. *Appl Biochem Biotechnol*. 2011;163(7):845–50.
51. Mori Y, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *J Infect Chemother*. 2009;15(2):62–9.
52. Wong YP, Othman S, Lau YL, Radu S, Chee HY. Loop-mediated isothermal

- amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. *J Appl Microbiol.* 2018;124(3):626–43.
53. Notomi T, Mori Y, Tomita N, Kanda H. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *J Microbiol.* 2015;53(1):1–5.
54. Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes.* 2002;16(3):223–9.
55. Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;289(1):150–4.
56. Kaneko H, Kawana T, Fukushima E, Suzutani T. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. *J Biochem Biophys Methods.* 2007;70(3):499–501.
57. Modak SS, Barber CA, Geva E, Abrams WR, Malamud D, Ongagna YSY. Rapid Point-of-Care Isothermal Amplification Assay for the Detection of Malaria without Nucleic Acid Purification. *Infect Dis Res Treat.* 2016;9:IDRT.S32162.
58. Serra-Casas E, Manrique P, Ding XC, Carrasco-Escobar G, Alava F, Gave A, et al. Loop-mediated isothermal DNA amplification for asymptomatic malaria detection in challenging field settings: Technical performance and pilot implementation in the Peruvian Amazon. *PLoS One.* 2017;12(10):1–19.
59. Mori Y, Kitao M, Tomita N, Notomi T. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *J Biochem Biophys Methods.* 2004;59(2):145–57.
60. Tanner NA, Zhang Y, Evans TC. Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes. *Biotechniques.* 2015;58(2):59–68.
61. García-Bernalt Diego J, Fernández-Soto P, Muro A. Lamp in neglected tropical diseases: A focus on parasites. *Diagnostics.* 2021;11(3).
62. Zhang J, Alexandrou G, Toumazou C, Kalofonou M. Automating the Design of Cancer Specific DNA Probes Using Computational Algorithms. In: 2021 43rd Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine & Biology Society (EMBC). IEEE; 2021. p. 1852–6.
63. Jia B, Li X, Liu W, Lu C, Lu X, Ma L, et al. GLAPD: Whole Genome Based LAMP Primer Design for a Set of Target Genomes. *Front Microbiol.* 2019;10(December):1–9.
64. Eiken Chemical Co. A Guide to LAMP primer designing (PrimerExplorer V5). A Guid to LAMP Prim Des (PrimerExplorer V5). 2014;1–18. Available from: available: http://primerexplorer.jp/e/v4_manual/pdf/PrimerExplorerV4_Manual_1.pdf.

65. Kwok S, Chang SY, Sninsky JJ, Wang A. A guide to the design and use of mismatched and degenerate primers. *Genome Res.* 1994;3(4).
66. Nunes MRT, Vianez JL, Nunes KNB, da Silva SP, Lima CPS, Guzman H, et al. Analysis of a Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) for yellow fever diagnostic. *J Virol Methods.* 2015;226:40–51.
67. Babu US, Harrison LM, Mammel MK, Bigley EC, Hiett KL, Balan K V. A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the consensus detection of human pathogenic *Campylobacter* species. *J Microbiol Methods.* 2020;176(June).
68. Lapierre SG, Drancourt M. *rpoB* targeted loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for consensus detection of mycobacteria associated with pulmonary infections. *Front Med.* 2018;5(NOV).
69. Amin Almasi M. Development of Colorimetric Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid Detection of the Tomato Yellow Leaf Curl Virus. *J Plant Pathol Microbiol.* 2012;04(01):1–6.
70. Parida M, Sannarangaiah S, Dash PK, Rao PVL, Morita K. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Rev Med Virol.* 2008 Nov;18(6):407–21.
71. Zhang X, Lowe SB, Gooding JJ. Brief review of monitoring methods for loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Biosens Bioelectron.* 2014 Nov;61:491–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566314003728>
72. Peng J, Zhang J, Xia Z, Li Y, Huang J, Fan Z. Rapid and sensitive detection of Banana bunchy top virus by loop-mediated isothermal amplification. *J Virol Methods.* 2012;185(2):254–8.
73. Hong M, Zha L, Fu W, Zou M, Li W, Xu D. A modified visual loop-mediated isothermal amplification method for diagnosis and differentiation of main pathogens from *Mycobacterium tuberculosis* complex. *World J Microbiol Biotechnol.* 2012;28(2):523–31.
74. Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nat Protoc.* 2008;3(5):877–82.
75. Wong YP, Othman S, Lau YL, Radu S, Chee HY. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. *J Appl Microbiol.* 2018;124(3):626–43.
76. Goto M, Honda E, Ogura A, Nomoto A, Hanaki KI. Colorimetric detection of loop-

- mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *Biotechniques*. 2009;46(3):167–72.
77. Lucchi NW, Ljolje D, Silva-Flannery L, Udhayakumar V. Use of malachite green-loop mediated isothermal amplification for detection of *Plasmodium* spp. parasites. *PLoS One*. 2016;11(3):1–9.
78. Park JW. Principles and Applications of Loop-Mediated Isothermal Amplification to Point-of-Care Tests. *Biosensors*. 2022;12(10).
79. Yang J, Chen H, Wang Z, Yu X, Niu X, Tang Y, et al. Development of a quantitative loop-mediated isothermal amplification assay for the rapid detection of novel goose parvovirus. *Front Microbiol*. 2017;8:1–7.
80. Fischbach J, Xander NC, Frohme M, Glökler JF. Shining a light on LAMP assays- a comparison of LAMP visualization methods including the novel use of berberine. *Biotechniques*. 2015;58(4):189–94.
81. Ostorbin IP, Belousova EA, Zakabunin AI, Boyarskikh UA, Filipenko ML. Comparison of fluorescent intercalating dyes for quantitative loop-mediated isothermal amplification (qLAMP). *Biotechniques*. 2016;61(1):20–5.
82. Watts MR, James G, Sultana Y, Ginn AN, Outhred AC, Kong F, et al. A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for *Strongyloides stercoralis* in stool that uses a visual detection method with SYTO-82 fluorescent dye. *Am J Trop Med Hyg*. 2014;90(2):306–11.
83. Tanner NA, Evans TC. Loop-mediated isothermal amplification for detection of nucleic acids. *Curr Protoc Mol Biol*. 2013;(SUPPL.105):1–14.
84. Garg N, Ahmad FJ, Kar S. Recent advances in loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid and efficient detection of pathogens. *Curr Res Microb Sci*. 2022;3:100120.
85. Iseki H, Alhassan A, Ohta N, Thekisoe OMM, Yokoyama N, Inoue N, et al. Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification (mLAMP) method for the simultaneous detection of bovine *Babesia* parasites. *J Microbiol Methods*. 2007;71(3):281–7.
86. Gong J, Zhuang L, Zhang D, Zhang P, Dou X, Wang C. Establishment of a Multiplex Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid Detection of Sulfonamide Resistance Genes (sul1, sul2, sul3) in Clinical Enterobacteriaceae Isolates from Poultry. *Foodborne Pathog Dis*. 2018;15(7):413–9.
87. Shao Y, Zhu S, Jin C, Chen F. Development of multiplex loop-mediated isothermal amplification-RFLP (mLAMP-RFLP) to detect *Salmonella* spp. and *Shigella* spp. in

- p>
milk. Int J Food Microbiol. 2011;148(2):75–9.
88. Nkouawa A, Sako Y, Okamoto M, Ito A. Simple identification of human *taenia* species by multiplex loop-mediated isothermal amplification in combination with dot enzyme-linked immunosorbent assay. Am J Trop Med Hyg. 2016;94(6):1318–23.
89. Danielson PB, McKiernan HE, Legg KM. Integrated Polymerase Chain Reaction Technologies (Sample-to-Answer Technologies). Molecular Diagnostics: Third Edition. Elsevier Ltd; 2017. 59–78 p.
90. Kalthoff D, Beer M, Hoffmann B. High resolution melting analysis: Rapid and precise characterisation of recombinant influenza A genomes. Virol J. 2013;10(1):1.
91. Tone K, Fujisaki R, Yamazaki T, Makimura K. Enhancing melting curve analysis for the discrimination of loop-mediated isothermal amplification products from four pathogenic molds: Use of inorganic pyrophosphatase and its effect in reducing the variance in melting temperature values. J Microbiol Methods. 2017;132:41–5.
92. Liu N, Zou D, Dong D, Yang Z, Ao D, Liu W, et al. Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification method for the simultaneous detection of *Salmonella* spp. and *Vibrio parahaemolyticus*. Sci Rep. 2017;7:1–7.
93. Joshi S, Dixit KK, Sharma V, Ramesh V, Singh R, Salotra P. Rapid Multiplex Loop-Mediated Isothermal Amplification (m-LAMP) Assay for Differential Diagnosis of Leprosy and Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg. 2021;104(6):2085–90.
94. Gadkar VJ, Goldfarb DM, Gantt S, Tilley PAG. Real-time Detection and Monitoring of Loop Mediated Amplification (LAMP) Reaction Using Self-quenching and De-quenching Fluorogenic Probes. Sci Rep. 2018;8(1):2–11.
95. Suzuki R, Tanaka H, Suzuki K, Fukuta S, Kato S, Ohno T. Multiplex loop-mediated isothermal amplification assay for the identification of three major whitefly species in the greenhouse. J Appl Entomol. 2018;142(8):745–54.
96. Tanner NA, Zhang Y, Evans TC. Simultaneous multiple target detection in real-time loop-mediated isothermal amplification. Biotechniques. 2012;53(2):81–9.
97. Nanayakkara IA, White IM. Demonstration of a quantitative triplex LAMP assay with an improved probe-based readout for the detection of MRSA. Analyst. 2019;144(12):3878–85.
98. Ball CS, Light YK, Koh CY, Wheeler SS, Coffey LL, Meagher RJ. Quenching of Unincorporated Amplification Signal Reporters in Reverse-Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Enabling Bright, Single-Step, Closed-Tube, and Multiplexed Detection of RNA Viruses. Anal Chem. 2016;88(7):3562–8.

99. Priye A, Bird SW, Light YK, Ball CS, Negrete OA, Meagher RJ. A smartphone-based diagnostic platform for rapid detection of Zika, chikungunya, and dengue viruses. *Sci Rep*. 2017;7:1–11.
100. Das D, Lin CW, Chuang HS. LAMP-Based Point-of-Care Biosensors for Rapid Pathogen Detection. *Biosensors*. 2022;12(12):1–39.
101. Kettler H, White K, Hawkes S. Mapping the landscape of diagnostics for sexually transmitted infections: Key findings and recommendations. *Unicef/Undp/World Bank/Who*. 2004;1–44.
102. Land KJ, Boeras DI, Chen XS, Ramsay AR, Peeling RW. REASSURED diagnostics to inform disease control strategies, strengthen health systems and improve patient outcomes. *Nat Microbiol*. 2019;4(1):46–54.
103. Njiru ZK. Loop-mediated isothermal amplification technology: Towards point of care diagnostics. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(6):1–4.
104. Smit PW, Elliott I, Peeling RW, Mabey D, Newton PN. Review article: An overview of the clinical use of filter paper in the diagnosis of tropical diseases. *Am J Trop Med Hyg*. 2014;90(2):195–210.
105. Jamjoom M, Sultan AH. Diagnosis of clinical samples spotted on FTA cards using PCR-based methods. *J Egypt Soc Parasitol*. 2009 Apr;39(1):227–46.
106. Forman M, Valsamakis A, Arav-Boger R. Dried urine spots for detection and quantification of cytomegalovirus in newborns. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012;73(4):326–9.
107. Lodh N, Mikita K, Bosompem KM, Anyan WK, Quartey JK, Otchere J, et al. Point of care diagnosis of multiple *Schistosoma* parasites: Species-specific DNA detection in urine by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Acta Trop*. 2017;173:125–9.
108. Seyer A, Karasartova D, Ruh E, Güreser AS, Imir T, Taylan-Ozkan A. Is “dried stool spots on filter paper method (DSSFP)” more sensitive and effective for detecting *Blastocystis* spp. and their subtypes by PCR and sequencing? *Parasitol Res*. 2016;115(12):4449–55.
109. Cevallos W, Fernández-Soto P, Calvopiña M, Buendía-Sánchez M, López-Abán J, Vicente B, et al. Diagnosis of amphiheriasis by LAMP *Phimerus* assay in human stool samples long-Term storage onto filter paper. *PLoS One*. 2018;13(2):1–11.
110. Hernández Redondo A, Körber C, König S, Längin A, Al-Ahmad A, Weinmann W. Inhibition of bacterial degradation of EtG by collection as dried urine spots (DUS). *Anal Bioanal Chem*. 2012;402(7):2417–24.

111. World Health Organization (WHO). Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances the Transport of Infectious Substances. 2021. Available from: <https://www.visavet.es/bovinetuberculosis/data/WHO-Guidance-regulations-Transport-Infectious-Substances-2021-2022.pdf>
112. Greenman J, Roberts T, Cohn J, Messac L. Dried blood spot in the genotyping, quantification and storage of HCV RNA: A systematic literature review. *J Viral Hepat.* 2015;22(4):353–61.
113. Vojnov L, Carmona S, Zeh C, Markby J, Boeras D, Prescott MR, et al. The performance of using dried blood spot specimens for HIV-1 viral load testing: A systematic review and meta-analysis. Vol. 19, *PLoS Medicine*. 2022.
114. H. Vu D, W.C. Alffenaar J, M. Edelbroek P, R.B.J. Brouwers J, R.A. Uges D. Dried Blood Spots: A New Tool for Tuberculosis Treatment Optimization. *Curr Pharm Des.* 2012;17(27):2931–9.
115. Maria G, Viana R, Silva-flannery L, Regina D, Barbosa L, Lucchi N, et al. Field evaluation of a real time loop-mediated isothermal amplification assay (RealAmp) for malaria diagnosis in Cruzeiro do Sul , Acre , Brazil. 2018;1–11.
116. Schmidt B, Xu W, González IJ, Polley SD, Bell D, Shakely D, et al. Loop mediated isothermal amplification (LAMP) accurately detects malaria DNA from filter paper blood samples of low density parasitaemias. *PLoS One*. 2014;9(8):1–9.
117. Oriero EC, Okebe J, Jacobs J, Van Geertruyden JP, Nwakanma D, D'Alessandro U. Diagnostic performance of a novel loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay targeting the apicoplast genome for malaria diagnosis in a field setting in sub-Saharan Africa. *Malar J.* 2015;14(1):1–6.
118. Matovu E, Kuepfer I, Boobo A, Kibona S, Burri C. Comparative detection of trypanosomal DNA by loop-mediated isothermal amplification and PCR from flinders technology associates cards spotted with patient blood. *J Clin Microbiol.* 2010;48(6):2087–90.
119. Köchl S, Niederstätter H, Parson W. DNA Extraction and Quantitation of Forensic Samples Using the Phenol–Chloroform Method and Real-Time PCR. In: *Forensic DNA Typing Protocols*. New Jersey: Humana Press; 2005. p. 013–30.
120. Gandasegui J, Fernández-Soto P, Muro A, Simões Barbosa C, Lopes de Melo F, Loyo R, et al. A field survey using LAMP assay for detection of *Schistosoma mansoni* in a low-transmission area of schistosomiasis in Umbuzeiro, Brazil: Assessment in human and snail samples. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12(3):1–16.
121. Barazorda KA, Salas CJ, Braga G, Ricopa L, Ampuero JS, Siles C, et al. Validation study of Boil & Spin Malachite Green Loop Mediated Isothermal Amplification (B&S MG-

- LAMP) versus microscopy for malaria detection in the Peruvian Amazon. PLoS One. 2021;16:1–15.
122. Hopkins H, González IJ, Polley SD, Angutoko P, Ategeka J, Asiimwe C, et al. Highly sensitive detection of malaria parasitemia in a malaria-endemic setting: Performance of a new loop-mediated isothermal amplification kit in a remote clinic in Uganda. J Infect Dis. 2013;208(4):645–52.
 123. Cook J, Aydin-Schmidt B, González IJ, Bell D, Edlund E, Nassor MH, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for point-of-care detection of asymptomatic low-density malaria parasite carriers in Zanzibar. Malar J. 2015;14(1):1–6.
 124. Alhassan A, Makepeace BL, Lacourse EJ, Osei-Atweneboana MY, Carlow CKS. A simple isothermal DNA amplification method to screen black flies for *Onchocerca volvulus* infection. PLoS One. 2014;9(10):118323.
 125. Brotons P, De Paz HD, Esteva C, Latorre I, Muñoz-Almagro C. Validation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid diagnosis of pertussis infection in nasopharyngeal samples. Expert Rev Mol Diagn. 2016;16(1):125–30.
 126. Lim DH, Jee H, Moon KC, Lim CS, Jang WS. Development of a Simple DNA Extraction Method and Candida Pan Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Diagnosis of Candidemia. Pathogens. 2022;11(2).
 127. Xi X, Cao W, Yao X, Chen J, Huang D, Yang T, et al. Rapid diagnosis of seven high-risk human papillomavirus subtypes by a novel loop-mediated isothermal amplification method. Mol Cell Probes. 2022;61:101787.
 128. Badoul NA, Kagira J, Ng'Ong'A F, Dinka H. Development of Loop-Mediated Isothermal Amplification Combined with Lateral Flow Dipstick Assay for a Rapid and Sensitive Detection of Cystic Echinococcosis in Livestock in Kenya. J Trop Med. 2022;2022.
 129. Ngari MG, Mwangi IN, Njoroge MP, Kinyua J, Osuna FA, Kimeu BM, et al. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) diagnostic test for detection of whipworm, *Trichuris trichiura*, in faecal samples. J Helminthol. 2020;
 130. Shiraho EA, Eric AL, Mwangi IN, Maina GM, Kinuthia JM, Mutuku MW, et al. Development of a Loop Mediated Isothermal Amplification for Diagnosis of *Ascaris lumbricoides* in Fecal Samples. J Parasitol Res. 2016;2016.
 131. Nkouawa A, Sako Y, Li T, Chen X, Nakao M, Yanagida T, et al. A loop-mediated isothermal amplification method for a differential identification of *Taenia* tapeworms from human: Application to a field survey. Parasitol Int. 2012;61(4):723–5. Available

- from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2012.06.001>
132. Gandasegui J, Fernández-Soto P, Carranza-Rodríguez C, Pérez-Arellano JL, Vicente B, López-Abán J, et al. The rapid-heat LAMPellet method: A potential diagnostic method for human urogenital schistosomiasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(7):1–23.
 133. Gandasegui J, Fernández-Soto P, Dacal E, Rodríguez E, Saugar JM, Yepes E, et al. Field and laboratory comparative evaluation of a LAMP assay for the diagnosis of urogenital schistosomiasis in Cubal, Central Angola. *Trop Med Int Heal*. 2018;23(9):992–1001.
 134. Vincent JP, Komaki-Yasuda K, Iwagami M, Kawai S, Kano S. Combination of PURE-DNA extraction and LAMP-DNA amplification methods for accurate malaria diagnosis on dried blood spots. *Malar J*. 2018 Dec 22;17(1):373.
 135. Thekisoe OMM, Bazie RSB, Coronel-Servian AM, Sugimoto C, Kawazu S ichiro, Inoue N. Stability of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) reagents and its amplification efficiency on crude *Trypanosome* DNA templates. *J Vet Med Sci*. 2009;71(4):471–5.
 136. Mthethwa NP, Amoah ID, Reddy P, Bux F, Kumari S. Fluorescence and colorimetric LAMP-based real-time detection of human pathogenic *Cryptosporidium* spp. from environmental samples. *Acta Trop*. 2022;235(July):106606.
 137. Cuadros J, Martin Ramírez A, González IJ, Ding XC, Perez Tanoira R, Rojo-Marcos G, et al. LAMP kit for diagnosis of non-*falciparum* malaria in *Plasmodium ovale* infected patients. *Malar J*. 2017;16(1):1–5.
 138. Hayashida K, Kajino K, Hachaambwa L, Namangala B, Sugimoto C. Direct Blood Dry LAMP: A Rapid, Stable, and Easy Diagnostic Tool for Human African Trypanosomiasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(3):1–14.
 139. Carter C, Akrami K, Hall D, Smith D, Aronoff-Spencer E. Lyophilized visually readable loop-mediated isothermal reverse transcriptase nucleic acid amplification test for detection Ebola Zaire RNA. *J Virol Methods*. 2017 Jun;244(5):32–8.
 140. Lai MY, Ooi CH, Jaimin JJ, Lau YL. Evaluation of WarmStart colorimetric loop-mediated isothermal amplification assay for diagnosis of Malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 2020;102(6):1370–2.
 141. Ağel E, Sağcan H, Ceyhan İ, Durmaz R. Optimization of isothermal amplification method for *Mycobacterium tuberculosis* detection and visualization method for fieldwork. *Turkish J Med Sci*. 2020;50(4):1069–75.
 142. Song X, Coulter FJ, Yang M, Smith JL, Tafesse FG, Messer WB, et al. A lyophilized colorimetric RT-LAMP test kit for rapid, low-cost, at-home molecular testing of SARS-CoV-2 and other pathogens. *Sci Rep*. 2022;12(1):1–11.

143. Polley SD, González IJ, Mohamed D, Daly R, Bowers K, Watson J, et al. Clinical evaluation of a loop-mediated amplification kit for diagnosis of imported malaria. *J Infect Dis.* 2013;208(4):637–44.
144. Mitashi P, Hasker E, Ngoyi DM, Pyana PP, Lejon V, Van der Veken W, et al. Diagnostic Accuracy of Loopamp *Trypanosoma brucei* Detection Kit for Diagnosis of Human African Trypanosomiasis in Clinical Samples. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(10):1–5.
145. Besuschio SA, Picado A, Muñoz-Calderón A, Wehrendt DP, Fernández M, Benatarid A, et al. *Trypanosoma cruzi* loop-mediated isothermal amplification (*Trypanosoma cruzi* loopamp) kit for detection of congenital, acute and chagas disease reactivation. *PLoS Negl Trop Dis.* 2020;14(8):1–17.
146. Flores-Chavez MD, Abras A, Ballart C, Perez II, Perez-Gordillo P, Gállego M, et al. Evaluation of the performance of the loopamp *Trypanosoma cruzi* detection kit for the diagnosis of chagas disease in an area where it is not endemic, Spain. *J Clin Microbiol.* 2021;59(5):1–12.
147. Piera KA, Aziz A, William T, Bell D, González IJ, Barber BE, et al. Detection of *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) in a co-endemic area in Malaysia. *Malar J.* 2017;16(1):1–5.
148. Drame PM, Fink DL, Kamgno J, Herrick JA, Nutman TB. Loop-mediated isothermal amplification for rapid and semiquantitative detection of *loa loa* infection. *J Clin Microbiol.* 2014;52(6):2071–7.
149. Cheng S, Pheng SH, Heng S, Marks GB, Bañuls AL, Mao TE, et al. Evaluation of Loopamp Assay for the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in Cambodia. *Biomed Res Int.* 2020;2020.
150. World Health Organization (WHO). The use of loop-mediated isothermal amplification (TB-LAMP) for the diagnosis of pulmonary tuberculosis 2016. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/249154%0A>
151. World Health Organization (WHO). Report of the first meeting of the WHO Diagnostic Technical Advisory Group for Neglected Tropical Diseases, Geneva, Switzerland, 30–31 October 2019. 2019. 30–31 p. Available from: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331954/9789240003590-eng.pdf?ua=1>
152. García-Bernalt Diego J, Fernández-Soto P, Crego-Vicente B, Alonso-Castrillejo S, Febrer-Sendra B, Gómez-Sánchez A, et al. Progress in loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Schistosoma mansoni* DNA: towards a ready-to-use test. *Sci Rep.* 2019 Oct 14;9(1):14744.

153. García-Bernalt Diego J, Fernández-Soto P, Domínguez-Gil M, Belhassen-García M, Bellido JLM, Muro A. A Simple, Affordable, Rapid, Stabilized, Colorimetric, Versatile RT-LAMP Assay to Detect SARS-CoV-2. 2021; 11(3):438.
154. Crego-Vicente B, Fernández-Soto P, García-Bernalt Diego J, Febrer-Sendra B, Muro A. Development of a Duplex LAMP Assay with Probe-Based Readout for Simultaneous Real-Time Detection of *Schistosoma mansoni* and *Strongyloides* spp. -A Laboratory Approach to Point-Of-Care. Int J Mol Sci. 2023;24(1).
155. LaBarre P, Gerlach J, Wilmoth J, Beddoe A, Singleton J, Weigl B. Non-instrumented nucleic acid amplification (NINA): Instrument-free molecular malaria diagnostics for low-resource settings. 2010 Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc EMBC'10. 2010;1097–9.
156. LaBarre P, Hawkins KR, Gerlach J, Wilmoth J, Beddoe A, Singleton J, et al. A simple, inexpensive device for nucleic acid amplification without electricity-toward instrument-free molecular diagnostics in low-resource settings. PLoS One. 2011;6(5).
157. Poole CB, Li Z, Alhassan A, Guelig D, Diesburg S, Tanner NA, et al. Colorimetric tests for diagnosis of filarial infection and vector surveillance using noninstrumented Nucleic acid loop-mediated isothermal amplification (NINA-LAMP). PLoS One. 2017;12(2).
158. Sema M, Alemu A, Bayih AG, Getie S, Getnet G, Guelig D, et al. Evaluation of non-instrumented nucleic acid amplification by loop-mediated isothermal amplification (NINA-LAMP) for the diagnosis of malaria in Northwest Ethiopia. Malar J. 2015;14(1):1–9.
159. Mohon AN, Lee LDY, Bayih AG, Folefoc A, Guelig D, Burton RA, et al. NINA-LAMP compared to microscopy, RDT, and nested PCR for the detection of imported malaria. Diagn Microbiol Infect Dis. 2016;85(2):149–53.
160. Mallepaddi PC, Lai MY, Podha S, Ooi CH, Liew JWK, Polavarapu R, et al. Development of loop-mediated isothermal amplification-based lateral flow device method for the detection of malaria. Am J Trop Med Hyg. 2018;99(3):704–8.
161. Njiru ZK. Rapid and sensitive detection of human African trypanosomiasis by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral-flow dipstick. Diagn Microbiol Infect Dis. 2011;69(2):205–9.
162. Xue Y, Kong Q, Ding H, Xie C, Zheng B, Zhuo X, et al. A novel loop-mediated isothermal amplification-lateral-flow-dipstick (LAMP-LFD) device for rapid detection of *Toxoplasma gondii* in the blood of stray cats and dogs. Parasite. 2021;28.
163. Xunhui Z, Qingming K, Qunbo T, Haojie D, Lesheng Z, Di L, et al. DNA detection of *Paragonimus westermani*: Diagnostic validity of a new assay based on loop-mediated

- p>isothermal amplification (LAMP) combined with a lateral flow dipstick.
- Acta Trop.*
- 2019;200.
164. Yang Y, Li Q, Wang S, Chen X, Du A. Rapid and sensitive detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *Vet Parasitol.* 2016;219:71–6.
 165. Mamba TS, Mbae CK, Kinyua J, Mulinge E, Mburugu GN, Njiru ZK. Lateral Flow Loop-Mediated Isothermal Amplification Test with Stem Primers: Detection of *Cryptosporidium* Species in Kenyan Children Presenting with Diarrhea. *J Trop Med.* 2018;2018.
 166. Tomar PS, Patel S, Dash PK, Kumar JS. Simple and field amenable loop-mediated isothermal amplification-lateral flow dipstick assay for detection of west Nile virus in human clinical samples. *J Appl Microbiol.* 2022;133(6):3512–22.
 167. Jiang Y, Chen S, Zhao Y, Yang X, Fu S, McKillip JL, et al. Multiplex loop-mediated isothermal amplification-based lateral flow dipstick for simultaneous detection of 3 food-borne pathogens in powdered infant formula. *J Dairy Sci.* 2020;103(5):4002–12.
 168. Foo PC, Chan YY, Mohamed M, Wong WK, Nurul Najian AB, Lim BH. Development of a thermostabilised triplex LAMP assay with dry-reagent four target lateral flow dipstick for detection of *Entamoeba histolytica* and non-pathogenic *Entamoeba* spp. *Anal Chim Acta.* 2017;966:71–80.
 169. Asiello PJ, Baeumner AJ. Miniaturized isothermal nucleic acid amplification, a review. *Lab Chip.* 2011;11(8):1420–30.
 170. Foudeh AM, Fatanat Didar T, Veres T, Tabrizian M. Microfluidic designs and techniques using lab-on-a-chip devices for pathogen detection for point-of-care diagnostics. *Lab Chip.* 2012;12(18):3249.
 171. Mao R, Ge G, Wang Z, Hao R, Zhang G, Yang Z, et al. A multiplex microfluidic loop-mediated isothermal amplification array for detection of malaria-related parasites and vectors. *Acta Trop.* 2018;178(1):86–92.
 172. Rodriguez-Mateos P, Ngamsom B, Walter C, Dyer CE, Gitaka J, Iles A, et al. A lab-on-a-chip platform for integrated extraction and detection of SARS-CoV-2 RNA in resource-limited settings. *Anal Chim Acta.* 2021;1177:338758.
 173. Zhang H, Xu Y, Fohlerova Z, Chang H, Iliescu C, Neuzil P. LAMP-on-a-chip: Revising microfluidic platforms for loop-mediated DNA amplification. *TrAC - Trends Anal Chem.* 2019;113:44–53.
 174. Song J, Liu C, Bais S, Mauk MG, Bau HH, Greenberg RM. Molecular Detection of *Schistosoma* Infections with a Disposable Microfluidic Cassette. *PLoS Negl Trop Dis.*

- 2015;9(12):1–18.
175. Liu C, Geva E, Mauk M, Qiu X, Abrams WR, Malamud D, et al. An isothermal amplification reactor with an integrated isolation membrane for point-of-care detection of infectious diseases. *Analyst*. 2011;136(10):2069–76.
176. Choi K, Ng AHC, Fobel R, Wheeler AR. Digital microfluidics. *Annu Rev Anal Chem*. 2012;5:413–40.
177. Wan L, Chen T, Gao J, Dong C, Wong AHH, Jia Y, et al. A digital microfluidic system for loop-mediated isothermal amplification and sequence specific pathogen detection. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–11.
178. Wan L, Gao J, Chen T, Dong C, Li H, Wen YZ, et al. LampPort: a handheld digital microfluidic device for loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Biomed Microdevices*. 2019;21(1).
179. GSM Association. Mobile economy. Gsma [Internet]. 2020;2–62. Available from: https://www.gsma.com/mobileeconomy/wp-content/uploads/2020/03/GSMA_MobileEconomy2020_Global.pdf
180. Wood CS, Thomas MR, Budd J, Mashamba-TP, Herbst K, Pillay D, et al. Europe PMC Funders Group Taking connected mobile-health diagnostics of infectious diseases to the field. 2019;566(7745):467–74.
181. Ali EE, Chew L, Yap KYL. Evolution and current status of mhealth research: A systematic review. *BMJ Innov*. 2016;2(1):33–40.
182. D'Ambrosio M V., Bakalar M, Bennuru S, Reber C, Skandarajah A, Nilsson L, et al. Point-of-care quantification of blood-borne filarial parasites with a mobile phone microscope. *Sci Transl Med*. 2015;7(286).
183. Linder E, Grote A, Varjo S, Linder N, Lebbad M, Lundin M, et al. On-Chip Imaging of *Schistosoma haematobium* Eggs in Urine for Diagnosis by Computer Vision. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(12):1–9.
184. Walker FM, Ahmad KM, Eisenstein M, Soh HT. Transformation of Personal Computers and Mobile Phones into Genetic Diagnostic Systems. 2014;
185. Koydemir HC, Gorocs Z, Tseng D, Cortazar B, Feng S, Chan RYL, et al. Rapid imaging, detection and quantification of *Giardia lamblia* cysts using mobile-phone based fluorescent microscopy and machine learning. *Lab Chip*. 2015;15(5):1284–93.
186. Rosado L, Da Costa JMC, Elias D, Cardoso JS. Automated Detection of Malaria Parasites on Thick Blood Smears via Mobile Devices. *Procedia Comput Sci*. 2016;90(July):138–44.

187. Colbert AJ, Co K, Lima-Cooper G, Lee DH, Clayton KN, Wereley ST, et al. Towards the use of a smartphone imaging-based tool for point-of-care detection of asymptomatic low-density malaria parasitaemia. *Malar J* [Internet]. 2021;20(1):1–13.
188. Liu C, Mauk MG, Hart R, Bonizzoni M, Yan G, Bau HH. A low-cost microfluidic chip for rapid genotyping of malaria-transmitting mosquitoes. *PLoS One*. 2012;7(8):1–7.
189. García-Bernalt Diego J, Fernández-Soto P, Márquez-Sánchez S, Santos DS, Febrer-Sendra B, Crego-Vicente B, et al. SMART-LAMP: A Smartphone-Operated Handheld Device for Real-Time Colorimetric Point-of-Care Diagnosis of Infectious Diseases via Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Biosensors*. 2022;12(6)

CAPÍTULO II

Hipótesis y objetivos

2.1. Hipótesis

El diseño y desarrollo de métodos LAMP para la detección de múltiples patógenos ya ha sido ensayado principalmente en laboratorios de referencia y, en menor medida, en condiciones de campo. Sin embargo, existen escenarios epidemiológicos donde esta técnica puede ser una herramienta diagnóstica de gran utilidad.

La infección por *Loa loa* queda circunscrita a regiones concretas del continente africano. Los métodos tradicionales de diagnóstico directo presentan una gran limitación debido a su baja sensibilidad. En los últimos años se han llevado a cabo programas de administración masiva de fármacos para el control de filariasis en zonas endémicas, pero su eficacia no ha sido suficientemente establecida. La técnica LAMP podría ser de gran utilidad tanto para el diagnóstico POC en zona endémica como para el seguimiento epidemiológico de estos programas en laboratorios de referencia.

Ante la reciente aparición en España de casos de FHCC y la necesidad de una detección precoz para el diagnóstico de esta enfermedad, la técnica LAMP podría ser una herramienta de alta eficacia para establecer su evolución y prevenir la transmisión.

Por otra parte, existen diferentes estudios de aplicación de la técnica LAMP para el diagnóstico de malaria en zonas endémicas. Sin embargo, en algunas áreas de alta endemicidad, como por ejemplo Angola, no se han realizado estudios moleculares utilizando la tecnología LAMP.

2.2. Objetivos

Estos diferentes escenarios nos conducen a plantear los objetivos de este trabajo. Así, **el objetivo general** de la Tesis Doctoral es evaluar la eficacia de la tecnología LAMP como método de diagnóstico en diferentes contextos epidemiológicos.

Los **objetivos específicos** planteados se dirigen al desarrollo y aplicación de esta tecnología como herramienta diagnóstica para nuevos estudios epidemiológicos, ante situaciones de emergencia sanitaria o como diagnóstico POC en áreas endémicas de enfermedad con escasos recursos.

- 1) Evaluar la técnica LAMP para la detección de *Loa loa* en muestras procedentes de zona endémica.
- 2) Desarrollar un método RT-LAMP para el diagnóstico de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo.
- 3) Aplicar el LAMP para la detección POC de *Plasmodium* spp. en una zona endémica de malaria y evaluar su reproducibilidad en un laboratorio de referencia.

CAPÍTULO III

Artículos de investigación

3.1

Colorimetric and real-time loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of Loa loa DNA in human blood samples

Begoña Febrer-Sendra, Pedro Fernández-Soto, Beatriz Crego-Vicente, Juan García-Bernalt Diego, Thuy-Huong Ta-Tang, Pedro Berzosa, Rufino Nguema, Policarpo Ncogo, María Romay-Barja, Zaida Herrador, Agustín Benito, Antonio Muro.

***Diagnostics (Basel).* 2022; 12(5):1079**

RESUMEN

La loaosis es una filariosis causada por el nematodo *Loa loa* que afecta entre 3 y 13 millones de personas en regiones del oeste y centro de África. Aunque no está incluida en el listado de las Enfermedades Tropicales Desatendidas (del inglés, NTDs: *Neglected Tropical Diseases*) figura en el programa OMS-ESPEN o ‘Proyecto Especial Ampliado para la Eliminación de las NTDs’.

El diagnóstico de referencia es la detección microscópica de microfilarias (mf) en sangre, sin embargo, es un diagnóstico de escasa sensibilidad, sobre todo en infecciones tempranas y/o con baja parasitemia. Por otro lado, la serología tiene un valor muy limitado y presenta reacciones cruzadas con otros helmintos. Las técnicas moleculares, como la PCR, tienen gran sensibilidad y especificidad, pero son caras, técnicamente complejas y requieren infraestructura no disponible en zonas endémicas. La tecnología LAMP presenta ventajas sobre la PCR, como mayor sensibilidad y especificidad, rapidez, escaso equipamiento, es más tolerante a posibles inhibidores presentes en las muestras y los resultados pueden observarse colorimétricamente. Además, la combinación con métodos fáciles de recogida, almacenamiento y transporte, así como con métodos de extracción simple de ADN de las muestras, potencia su aplicación como diagnóstico POC. Su uso en laboratorios de referencia sería también de gran utilidad para realizar estudios epidemiológicos.

En un trabajo previo, nuestro grupo de investigación desarrolló un método LAMP colorimétrico altamente sensible y específico para la detección de ADN de *Loa loa* (*Loa loa*-LAMP). Hasta la fecha, no se había evaluado su eficacia en muestras clínicas. En este trabajo se evaluaron muestras almacenadas en papel de filtro procedentes de un estudio epidemiológico realizado en Guinea Ecuatorial.

Considerando la microscopía como diagnóstico de referencia, el *Loa loa*-LAMP presentó una mayor sensibilidad que la microscopía y que la PCR en la detección del parásito. Además, los ensayos a tiempo real evidenciaron tiempos de positividad (Tp) más cortos para muestras con mayor microfilaremia.

De este estudio podemos concluir que: *i*) es posible la extracción simple y económica de ADN a partir de DBS para el diagnóstico molecular de la loaosis, lo que facilita la obtención de las muestras, su transporte y su almacenamiento eficaz durante largos periodos de tiempo; *ii*) en combinación con la extracción simple de ADN, el

Loa loa-LAMP colorimétrico podría ser una herramienta molecular muy prometedora para el cribado fácil, rápido, sensible y específico de la loaosis en zonas endémicas.

Article

Colorimetric and Real-Time Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) for Detection of *Loa loa* DNA in Human Blood Samples

Begoña Febrer-Sendra ¹ , Pedro Fernández-Soto ^{1,*} , Beatriz Crego-Vicente ¹, Juan García-Bernalt Diego ¹ , Thuy-Huong Ta-Tang ², Pedro Berzosa ², Rufino Nguema ³, Policarpo Ncogo ^{3,4}, María Romay-Barja ² , Zaida Herrador ² , Agustín Benito ² and Antonio Muro ¹ 

- ¹ Infectious and Tropical Diseases Research Group (e-INTRO), Biomedical Research Institute of Salamanca-Research Centre for Tropical Diseases at the University of Salamanca (IBSAL-CIETUS), Faculty of Pharmacy, University of Salamanca, 37008 Salamanca, Spain; begofebrer@usal.es (B.F.-S.); beatrizcregovic@usal.es (B.C.-V.); juanbernal95@usal.es (J.G.-B.D.); ama@usal.es (A.M.)
 - ² Malaria and Neglected Tropical Diseases Laboratory, National Centre of Tropical Medicine, CIBERINFEC, Institute of Health Carlos III, 28029 Madrid, Spain; tta@isciii.es (T.-H.T.-T.); pberzosa@isciii.es (P.B.); mromay@isciii.es (M.R.-B.); zherrador@isciii.es (Z.H.); abenito@isciii.es (A.B.)
 - ³ National Control Programme of Onchocerciasis and Other Filariasis, Ministry of Health, Malabo, Equatorial Guinea; rufonguema@yahoo.es (R.N.); pncogo@psglobal.es (P.N.)
 - ⁴ Fundación Estatal, Salud, Infancia y Bienestar Social, Institute of Health Carlos III (CSAI/ISCIII), 28029 Madrid, Spain
- * Correspondence: pfsoto@usal.es



Citation: Febrer-Sendra, B.; Fernández-Soto, P.; Crego-Vicente, B.; Diego, J.G.-B.; Ta-Tang, T.-H.; Berzosa, P.; Nguema, R.; Ncogo, P.; Romay-Barja, M.; Herrador, Z.; et al. Colorimetric and Real-Time Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) for Detection of *Loa loa* DNA in Human Blood Samples. *Diagnostics* **2022**, *12*, 1079. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12051079>

Academic Editor: Franco Falcone

Received: 28 March 2022

Accepted: 23 April 2022

Published: 25 April 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Loiasis, caused by the filarial nematode *Loa loa*, is endemic in Central and West Africa. *Loa loa* has been associated with severe adverse reactions in high *Loa*-infected individuals receiving ivermectin during mass drug administration programs for the control of onchocerciasis and lymphatic filariasis. Diagnosis of loiasis still depends on microscopy in blood samples, but this is not effective for large-scale surveys. New diagnostics methods for loiasis are urgently needed. Previously, we developed a colorimetric high-sensitive and species-specific LAMP for *Loa loa* DNA detection. Here, we evaluate it in a set of 100 field-collected clinical samples stored as dried blood spots. In addition, *Loa loa*-LAMP was also evaluated in real-time testing and compared with microscopy and a specific PCR/nested PCR. A simple saponin/Chelex-based method was used to extract DNA. Colorimetric and real-time LAMP assays detected more samples with microscopy-confirmed *Loa loa* and *Loa loa*/*Mansonella perstans* mixed infections than PCR/nested-PCR. Samples with the highest *Loa loa* microfilariae counts were amplified faster in real-time LAMP assays. Our *Loa loa*-LAMP could be a promising molecular tool for the easy, rapid and accurate screening of patients for loiasis in endemic areas with low-resource settings. The real-time testing (feasible in a handheld device) could be very useful to rule out high-microfilariae loads in infected patients.

Keywords: *Loa loa*; loiasis; colorimetric LAMP; real-time LAMP; PCR; nested-PCR; dried blood spots; saponin/Chelex; microscopy; molecular diagnosis

1. Introduction

Loa loa is a parasitic nematode that causes loiasis (commonly known as African eye worm). The parasite is transmitted to humans by Tabanid flies of the genus *Chrysops* and affects between 3 and 13 million people in the west and central regions of Africa [1]. Human loiasis is known to be endemic in eleven countries, including Angola, Chad, the Democratic Republic of the Congo, Cameroon, the Central African Republic, Equatorial Guinea, Ethiopia, Gabon, Nigeria, Republic of Congo and Sudan [2]. The main specific clinical manifestations include subcutaneous edema (Calabar swelling) and pruritus. Additionally, the ocular passage of the adult worm under the conjunctiva may be noticed. However,

patients are usually asymptomatic or present nonspecific manifestations. Rarely, loiasis can cause damage in other organs [3]; although, a high *Loa loa* microfilaremia has been recently associated with an increased mortality risk [4]. Despite this, loiasis has been largely neglected as a public health problem in Africa and, even to date, the disease does not appear on the World Health Organization's (WHO) list of neglected tropical diseases (NTD) [2]. Loiasis actually appear in the WHO-ESPEN (Expanded Special Project for Elimination of NTDs) program [5]. In addition, in some parts of sub-Saharan Africa, co-infections of *Loa loa* with other filarial species such as *Mansonella perstans* are possible [6,7]. *M. perstans* is considered the most common of the mansonellosis parasites (tiny fly-borne filarial nematodes), affecting probably more than 100 million people and with 600 million people living at risk of infection in Africa alone [8–10]. The clinical manifestations of mansonellosis are highly non-specific and shared with other co-infections in affected people, often making its diagnosis go unnoticed [8].

In loiasis-endemic areas, the only diagnostic method is a microscopic examination of a mid-day capillary blood sample for morphological identification of the *Loa loa* parasite. Microscopy is time-consuming, labor-intensive, requires skilled laboratory personnel and examines a small amount of blood, making it variable in terms of sensitivity and impractical for mass screening [6]. In an attempt to overcome the problems of traditional microscopy, the LoaScope, a smartphone-based video-microscope has been extensively validated to quantify *Loa loa* mf in fingerstick blood without the need for sample processing or staining [11–15]. However, LoaScope is calibrated to detect high-density *Loa loa* microfilaremia, and values under 150 mf/mL are considered unreliable [13,15]. In addition, the specificity on other filariae such as *Mansonella* spp. have not been well studied, and because it detects moving parasites, it can only be performed with fresh blood samples. Thus, it is considered a useful tool to support mapping projects for ivermectin-based Mass Drug Administration (MDA) programs, not as a diagnostic method. An alternative is serological testing, but it has low specificity due to cross-reactivity in patients with other filarial or helminthic infections and does not differentiate between past and current infection or quantify microfilaremia [16,17]. More recently, a *Loa* Antibody Rapid Test, commercially available as a lateral flow assay (LFA) platform, has been evaluated for epidemiological studies and to support mapping projects for ivermectin-based MDA programs to eliminate onchocerciasis and lymphatic filariasis. Nevertheless, the test has not been approved for use in individual case management [18].

In the last years, a series of polymerase chain reaction (PCR)-based molecular methods, such as conventional PCR, nested-PCR, and real-time quantitative PCR (qPCR), have been developed to detect *Loa loa* DNA with high accuracy and more sensitivity than parasitological and serological methods [19–21]. However, these technologies are not generally available in low-resource clinical settings due to their technical complexity. A number of alternative isothermal amplification methods targeting nucleic acids have been developed that offer significant improvements over PCR-based methods [22]. One of the most widely adopted is the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay [23]. LAMP works under isothermal conditions (demanding minimal infrastructure) and amplifies the target nucleic acid using DNA polymerases with strand-displacement activity using a minimum of four, and up to six, specially designed primers [23]. This unique method of nucleic acid amplification makes the LAMP technology, compared to PCR-based methods, more sensitive, more specific, faster, more cost-effective and permits easy end-product visualization of the reaction in the diagnostic scenario [24–26]. To date, LAMP technology has been described for the detection of several filarial parasites, including *Loa loa* [27–29], *Wuchereria bancrofti* [30], *Brugia* spp. [31], *Onchocerca volvulus* [32,33], and *Mansonella perstans/ozzardi* [34].

On the other hand, it is important to note that venous blood sample collection for molecular analysis usually requires the support of health services and electricity for freeze-storage and delivery to laboratories, and this is particularly lacking in low-resource loiasis endemic areas. Capillary blood collection onto filter paper, known as dried blood spots (DBS), is a cheaper, more practical and convenient method to overcome these limitations [35]

and makes it attractive for sample collection, storage and transportation from field settings [36]. It would be also desirable if these practical advantages could be accompanied by a reliable, sensitive and cost-effective method of nucleic acid extraction [37]. Several studies have already demonstrated the efficacy of using PCR-based methods and LAMP assays for the detection of infectious agents—including parasites, viruses and bacteria—in combination with simple DNA extraction methods from DBS [35,38,39]. Regarding this, Chelex-100 resin-based DNA extraction methods are among the most widely used because these procedures are simple, rapid, economic, involve no organic solvents and do not require multiple tube transfers avoiding excessive handling [2,38,40–43].

In a previous work, we developed an in-house high-sensitive and species-specific colorimetric LAMP assay for *Loa loa* DNA detection. This LAMP was successfully evaluated in the laboratory in human venous blood samples artificially contaminated with genomic DNA extracted from a *Loa loa* adult worm [27]. Here, for the first time, we evaluate our *Loa loa*-LAMP in a set of field-collected clinical samples, long-term stored as DBS. Additionally, it was the first time that the *Loa loa*-LAMP has been evaluated in real-time testing. The efficacy of both *Loa loa*-LAMP assays was compared with microscopy, as a reference diagnostic method, and with a specific PCR/nested-PCR assay [44].

2. Materials and Methods

2.1. Ethics Statement

Samples were obtained from the Laboratory of the National Centre of Tropical Medicine's repository (Collection number C.0005278/ISCIII/Spain), Institute of Health Carlos III, Madrid, Spain, and registered according to the Spanish Law RD 1716/2011; article 22.1. Samples belonged to the malaria project PREMAVAL, to provide baseline data on malaria prevalence in Equatorial Guinea. The study was approved at the time by the Minister of Health and Social Welfare of Equatorial Guinea (MINSABS) and the Ethics Committee of the Spanish National Health Institute, Carlos III (CEI PI 22_2013-v3). The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. Informed consent was obtained from caregivers interviewed, the heads of the households and all subjects involved in the study.

2.2. Samples Obtaining and Selection

A set of 100 clinical samples were selected from a collection of DBS collected 7-years ago in a field survey carried out in Equatorial Guinea. The samples were stored at the Laboratory of the National Centre of Tropical Medicine, Institute of Health Carlos III, Madrid, Spain. When these samples were collected, thick (20 µL) and thin (5 µL) blood smears were first stained with 10% Giemsa solution and examined by experienced microscopists for the morphological identification of microfilariae (mf) according to published guidelines [45]. Microfilaremia was expressed as microfilariae per milliliter of blood (mf/mL) under 10× magnification and to determine the filarial species at 100× magnification with immersion oil. All fields were examined before declaring a slide negative. Mf densities were the average value found between the thick and thin slides by microscopic examination. A blood finger prick from each microscopically analyzed patient was spotted onto Whatman 903TM paper (GE Healthcare Bio-Sciences Corp, Piscataway, NJ, USA) and stored in double zip-lock plastic bags with silica gel absorbent at −20 °C until analysis. The selected set of 100 DBS for this work (numbered from 1 to 100) was divided into 4 groups on basis of the microscopy findings, as follows: group 1 ($n = 13$) *Loa loa*-positive; group 2 ($n = 11$), *M. perstans*-positive; group 3 ($n = 3$), *Loa loa* and *M. perstans* mixed-positive; group 4 ($n = 73$), both *Loa loa* and *M. perstans*-negative. Table 1 shows the selected groups of DBS samples included in this study indicating mf counts.

Table 1. Dried blood samples included in this study. Sample groups (G1, G2, G3, and G4), parasitological findings based on microscopy of thick and thin blood smears with Giemsa stain, sample numbers and microfilariae counts (expressed as microfilariae per milliliter of blood; mf/mL) are indicated. PCR/nested-PCR, colorimetric and real-time LAMP results obtained in this study are also included.

Sample Groups	Parasitological Finding	Sample Number	mf/mL	PCR/ Nested-PCR	Colorimetric LAMP	Real-Time LAMP
G1 (n = 13)	<i>Loa loa</i>	18	1100	+	+	+
		19	300	+	+	+
		21	500	+	+	+
		32	2200	+	-	-
		39	3600	+	+	+
		48	12,200	+	+	+
		51	400	-	+	+
		53	500	-	+	+
		62	2000	+	+	+
		69	11,600	+	+	+
		75	450	-	+	+
		76	5600	+	+	+
		82	1900	+	+	+
G2 (n = 11)	<i>Mansonella perstans</i>	24	200	-	+	-
		44	600	-	-	-
		49	800	-	+	-
		50	100	-	-	-
		52	100	-	+	+
		54	1300	-	-	-
		77	3200	-	-	-
		78	100	-	-	-
		79	400	-	+	+
		83	1000	-	-	-
		91	1000	-	+	+
G3 (n = 3)	<i>Loa loa/M. perstans</i>	55	200/200	-	+	+
		70	200/200	+	+	+
		81	6000/1500	+	+	+
G4 (n = 73)	No findings	20		-	+	-
		42		-	+	-
		43		-	+	+
		45		-	+	+
		47		-	+	+
		68		-	+	-
		74		-	+	-
		Remaining nos. up to 100		-	-66	-70

2.3. DNA Extraction from Dried Blood Spots

DNA was extracted at the Laboratory of the National Centre of Tropical Medicine (CNMT, in Spanish), Institute of Health Carlos III, Madrid, Spain, via the Chelex-based method in combination with saponin following the protocol previously described by Plowe et al. [46] with slight modifications. Briefly, two filter paper discs of 5 mm in diameter were punched from each DBS using a handheld paper punch and placed into a 1.5 mL tube. Subsequently, 1 mL of 0.5% saponin (Fluka Biochemika, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Darmstadt, Germany) in autoclaved phosphate-buffered saline (PBS) 1× was added, mixed thoroughly, and incubated overnight at 4 °C or 37 °C for 1 h. After incubation, the brown solutions formed were aspirated and replaced with 1 mL of PBS 1×, and the tubes were incubated at 4 °C for an additional 30 min. Meanwhile, 100 mL of 5% Chelex 100 solution (Bio Rad, Richmond, CA, USA) in water was heated at 100 °C in a magnetic stirrer. The PBS was removed from tubes and 200 µL of heated 5% Chelex 100 were added to the paper discs, vortexed for 30 s, and placed in a heat-block at 98 °C for 10 min for incubation. After centrifugation at 13,000 rpm for 2 min, supernatants were recovered and centrifuged once again to remove any remaining Chelex 100 chelating resin before collection into clean tubes. Those extracted DNA samples were stored at −20 °C until further molecular analysis by PCR/nested-PCR at the laboratory of NCTM. Aliquots of 10 µL of each extracted DNA sample were sent frozen to the Center for Research in Tropical Diseases at the University of Salamanca (CIETUS), Salamanca, Spain, to perform molecular analysis by *Loa loa*-LAMP assay.

2.4. Molecular Analysis

The 100 DBS selected in this study based on the microscopy results were analyzed in parallel for the species-specific molecular detection of *Loa loa* by a PCR/nested-PCR and both colorimetric and real-time LAMP assays following the methodology described below.

2.4.1. PCR/Nested-PCR Assay

A nested-PCR based on sequences of the repeat 3 region (15r3) of the gene encoding a *Loa loa* 15-kD protein was performed at Malaria and NTDs Laboratory-CNMT, Madrid, Spain, following the methodology described by Touré et al. (1998) [44] with slight modifications. Briefly, for initial PCR, 5 µL of template were amplified, and 2 µL of the first amplification product was used for the nested PCR. Amplification for initial PCR (product of 396 bp) was carried out using an Applied Biosystems GeneAmp® PCR System 2700 for 30 cycles at 94 °C for 1 min (denaturation), 65 °C for 1 min (annealing), and 72 °C for 2 min (extension). For nested-PCR (product of 366 bp), amplification was carried out under the same conditions, but for 25 cycles. PCR products were analyzed by a QIAxcel Advanced automatic multicapillary electrophoresis system (QIAGEN GMBH, Hilden, Germany). For PCR reactions, positive controls consisted of *Loa loa*-microscopy positive clinical samples—first tested by filarial-real time qPCR and verified by sequencing following the methodology described by Ta-Tang et al. [21]. Negative controls consisted of filarial-microscopy negative clinical samples and *M. perstans*-microscopy positive samples from the CNMT collection. All positive results were confirmed in duplicates.

2.4.2. Colorimetric LAMP Assay

LAMP assay based on an 839 bp *Loa loa*-specific repetitive DNA sequence (GenBank accession no.M34259.1) was performed at CIETUS, Salamanca, Spain, using the set of primers and reaction conditions previously described elsewhere by our group [27]. Briefly, LAMP reactions were carried out with a total of 15 µL reaction mixture containing 40 pmol of each FIP and BIP primers, 5 pmol of each F3 and B3 primers and 0.57 µL of *Bst* 2.0 Warm Start DNA polymerase (New England Biolabs Ltd., Hitchin, UK) with 1 µL of extracted DNA as a template. Reactions were incubated at 65 °C for 50 min in a heating block followed by heated at 80 °C for 5–10 min to stop the reaction. LAMP results were visually detected by color change (green: positive; orange: negative) by adding 1 µL of 1:10 diluted

10,000× concentration SYBR Green I (Invitrogen, Waltham, MA, USA) to the reaction tubes. When required, LAMP products were monitored using 1.5 % agarose gel electrophoresis and visualized under UV light in a transilluminator (UVP BioDoc-It² Imager, Analytik Jena).

2.4.3. Real-Time LAMP Assay

Real-time LAMP was performed with the same set of primers and reagents as the colorimetric LAMP, but with the addition of 0.24 µL/well of the DNA-binding dye EvaGreen 20× (BIOTIUM, San Francisco, CA, USA) to monitor the fluorescence in an Eco48 real-time PCR system (PCRmax, Beacon Road, Stone, Staffordshire, UK) programmed at 65 °C for 60 min followed by 10 min at 80 °C to stop the reaction by enzyme inactivation.

Genomic DNA (gDNA) from a *Loa loa* adult worm (0.5 ng/µL), and ultrapure water instead of the DNA template, were used as positive and negative controls, respectively, in all LAMP trials. All positive results were confirmed in duplicates.

2.5. Statistics

To estimate the accuracy of the molecular methods as diagnostic tests, the percentages of sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV) and kappa index for each molecular technique in comparison to microscopy as a reference diagnostic method were calculated using the free software WinEpi 2.0 [47]. The confidence intervals (CI) were established at 95%. To estimate and analyze the correlation between time to positivity (Tp) value in real-time LAMP positive assays and mf/mL a Pearson correlation test in R statistical software 3.6.3 version was used, creating a scatter plot using “ggplot2”, “ggpubr” and “ggrepel” packages.

3. Results

3.1. Application of Molecular Methods on Dried Blood Samples

3.1.1. PCR/Nested-PCR Assay

Amplification products of the expected size (396 bp for initial PCR and/or 366 bp for nested-PCR) were obtained in 10/13 (76.92%) *Loa loa* microscopy-positive samples, and also in 2/3 (66.66%) *Loa loa* and *M. perstans* mixed-microscopy positive samples. No *M. perstans*-microscopy positive samples resulted positive for *Loa loa*. All *Loa loa* and *M. perstans*-negative samples resulted negative for *Loa loa* in PCR assays. Overall, 12/100 (12%) DBS were positive (see Table 1).

3.1.2. Colorimetric LAMP Assay

Visual detection of LAMP results in testing DBS using the SYBR Green I dye-based method is shown in Figure 1. LAMP detected 12/13 (92.31%) *Loa loa*-microscopy positive samples (Figure 1a). Only one sample (no. 32) was missed. In addition, 3/3 (100%) *Loa loa* and *M. perstans*-microscopy positive mixed samples and 7/73 (9.58%) microscopy negative samples resulted LAMP-positive (Figure 1b). Surprisingly, up to 5/11 (45.45%) *M. perstans*-microscopy positive samples resulted LAMP-positive for *Loa loa* (Figure 1c). In all, 27/100 (27%) DBS were LAMP-positive (see Table 1).

3.1.3. Real-Time LAMP Assay

Detection of *Loa loa* in DBS by real-time LAMP is shown in Figure 2. A positive result was obtained in the same 12/13 (92.31%) *Loa loa*-microscopy positive samples than with the colorimetric LAMP assay (Figure 2a). As for visual LAMP detection, sample no. 32 was also missed by real-time LAMP. Moreover, 3/3 (100%) *Loa loa* and *M. perstans*-microscopy positive mixed samples (Figure 2b) and 3/73 (4.11%) microscopy negative samples resulted real-time LAMP positive (Figure 2c). Regarding the *M. perstans*-microscopy positive samples, 3/11 (27.27%) resulted positive (Figure 2d). In all, 21/27 (77.77%) DBS resulted in real-time LAMP positive (see Table 1). In addition, for the 16 samples *Loa loa*-microscopy positive (those included in group 1, except for sample no. 32, and those included in group 3) a relationship between Tp and mf/mL values was established. The samples with the

highest mf counts of *Loa loa* in microscopic examination (nos. 48, 69 and 81) were amplified with the shortest Tp values (Figure 3).

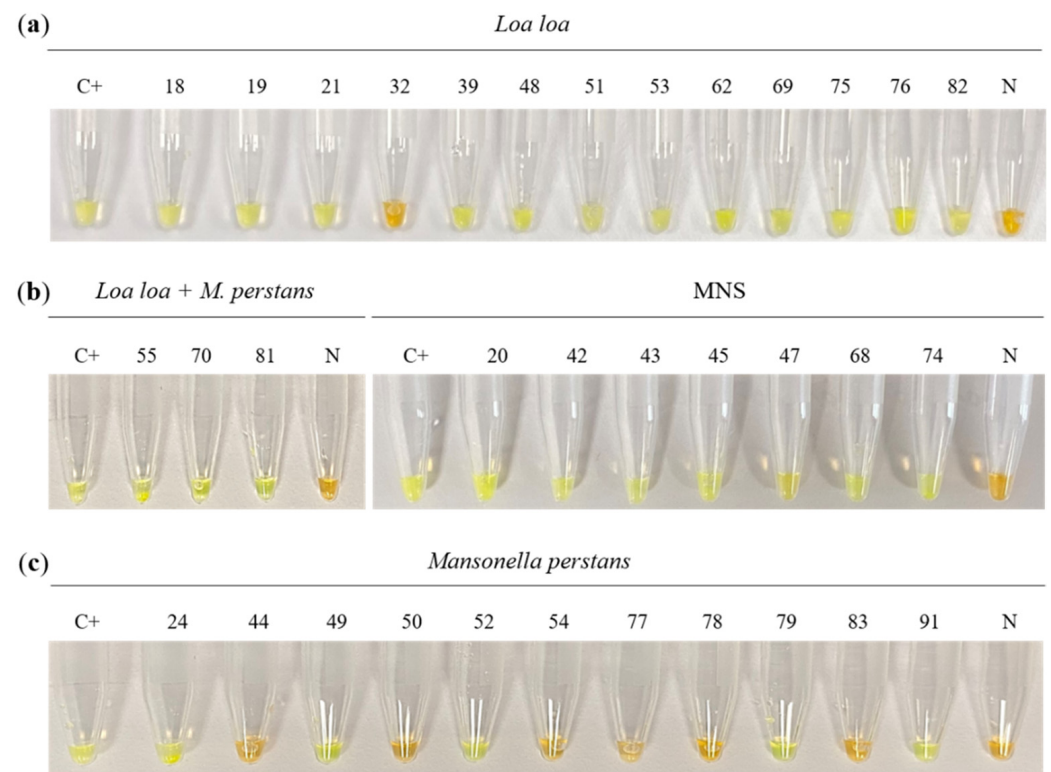


Figure 1. Examination of dried blood samples by conventional colorimetric *Loa loa*-LAMP. The figure shows the colorimetric visual detection of LAMP results in testing DBS using the SYBR Green I dye-based method: **(a)** *Loa loa*, *Loa loa*-microscopy positive samples. **(b)** *Loa loa* + *M. perstans*, *Loa loa* and *Mansonella perstans*-microscopy positive mixed samples; MNS, microscopy negative samples. **(c)** *Mansonella perstans*, *M. perstans*-microscopy positive samples. C+, *Loa loa* positive control (genomic DNA; 0.5 ng/μL); N, negative control (ultrapure water instead DNA template).

The results of PCR/nested-PCR, colorimetric LAMP and real-time LAMP assays were compared with microscopy as the reference diagnostic method and the overlaps are shown using Venn diagrams in Figure 4. Up to 11 of the 16 DBS samples (68.75%) with microscopy-positive results were positive by the three molecular tests (Figure 4a). On the other hand, up to 72 of the 84 DBS samples (85.71%) with microscopy-negative were negative for all detection tests performed (Figure 4b). The estimation of the accuracy of the molecular methods applied as diagnostic tests for *Loa loa* detection is shown in Table 2. In summary, LAMP assays showed the highest sensitivity (94.1%) and the PCR/nested-PCR showed the best specificity (100%).

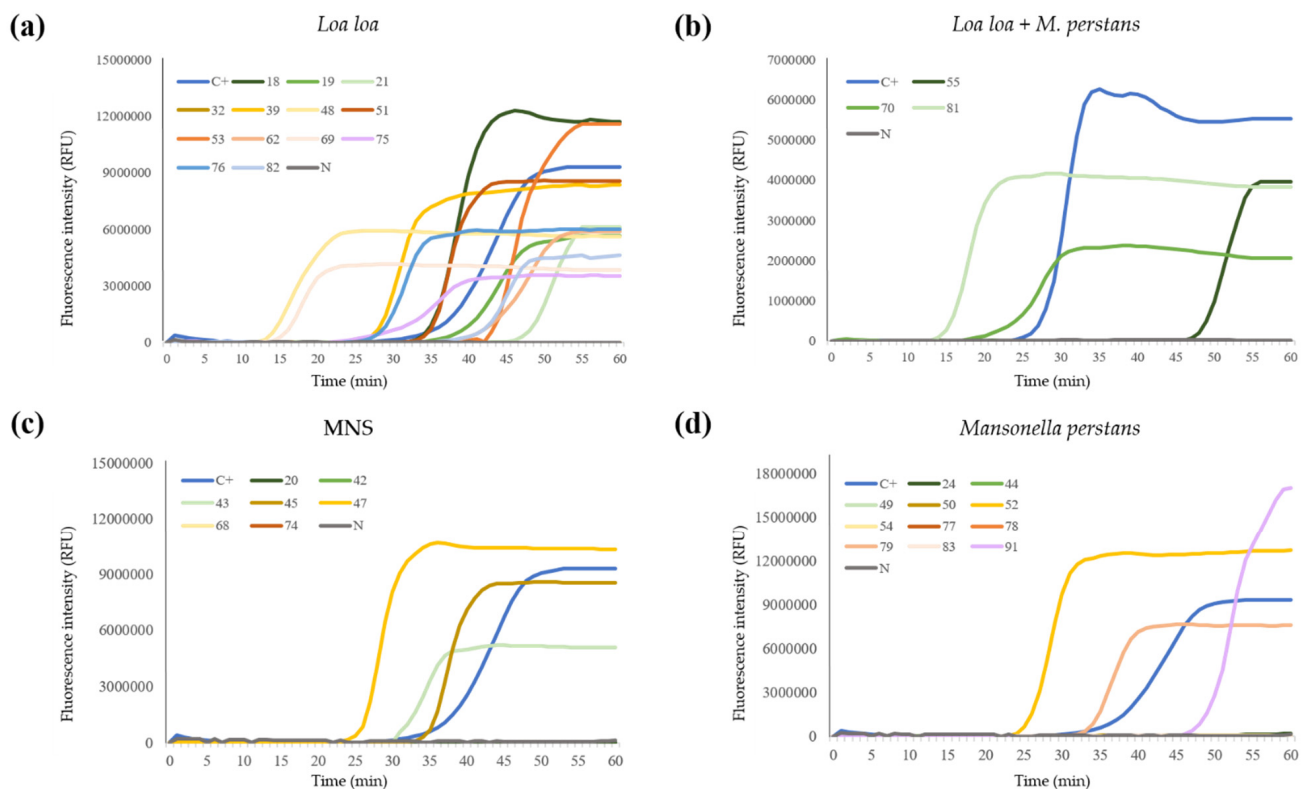


Figure 2. Detection of *Loa loa* in dried blood samples by real-time LAMP. The figure shows the results detected by fluorescence measured in relative fluorescence units (RFU) in a PCRmax Eco 48 Real-Time qPCR System: (a) *Loa loa*, *Loa loa*-microscopy positive samples. (b) *Loa loa* + *M. perstans*, *Loa loa* and *Mansonella perstans*-microscopy positive mixed samples. (c) MNS, microscopy negative samples. (d) *Mansonella perstans*, *M. perstans*-microscopy positive samples. C+, *Loa loa* positive control (genomic DNA; 0.5 ng/μL); N, negative control (ultrapure water).

Table 2. Estimation of the accuracy of the molecular methods applied as diagnostic tests for *Loa loa*. Estimation of sensitivity, specificity, positive and negative predictive values and Kappa index by DNA amplification tests (colorimetric LAMP, real-time LAMP and PCR/nested-PCR) against microscopy as reference diagnostic method for current study for identifying *Loa loa* infection in the 100 patients' dried blood samples analyzed. PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value; CI, confidence intervals; Kappa, Kappa index.

	Colorimetric LAMP	Real-Time LAMP	PCR/Nested-PCR
Sensitivity (95% CI)	94.1% (81.9–105.6%)	94.1% (82.9–105.3%)	75.0% (53.8–96.2%)
Specificity (95% CI)	87.5% (78.5–93.3%)	93.3% (88.2–98.5%)	100.0% (100.0–100.0%)
PPV (95% CI)	57.1% (36.8–74.3%)	72.7% (54.1–91.3%)	100.0% (100.0–100.0%)
NPV (95% CI)	98.8% (96.0–101.3%)	98.8% (96.5–101.1%)	95.5% (91.1–99.8%)
Kappa (95% CI)	62.2% (43.6–80.7%) **	76.9% (57.6–96.2%) **	83.4% (67.5–99.3%) ***

** good agreement; *** excellent agreement.

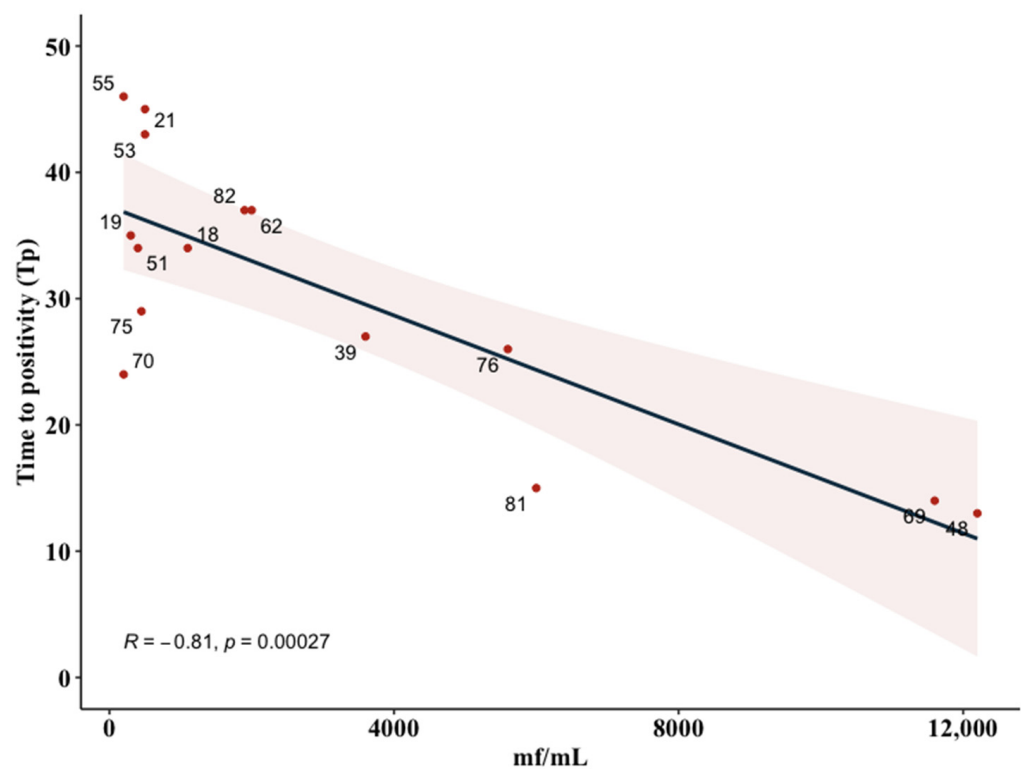


Figure 3. Correlation chart showing the relationship between time to positivity (Tp) values and microfilariae per milliliter (mf/mL) for the 16 samples microscopically positive for *Loa loa* that also tested positive for *Loa loa* in real-time LAMP assays. The numbers associated with the red dots indicate the number of the samples analyzed.

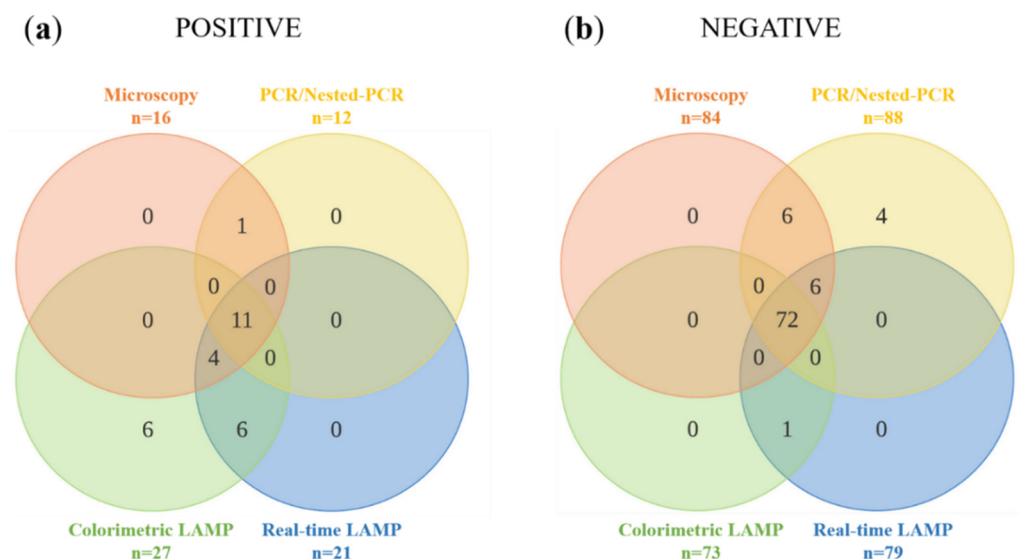


Figure 4. Venn diagrams for four-way comparison of microscopy, colorimetric LAMP, real-time LAMP and PCR/nested-PCR results in specific *Loa loa* detection: (a) Distribution of the samples with a *Loa loa* positive results for at least one test. (b) Distribution of the samples with a *Loa loa* negative result for at least one test.

4. Discussion

Routine clinical diagnosis of human loiasis and mansonellosis depends on the detection of mf on Giemsa-stained thick and thin blood slides by microscopy based on morphological identification [6]. However, the efficacy of microscopic detection of mf is diminished by long pre-patency, periodicity in the case of *Loa loa*, and mild or occult infection without microfilaremia [48]. To solve these drawbacks, a number of molecular assays, both PCR-based and LAMP-based methods, have emerged in the last years to provide an accurate alternative for the identification and detection of filarial parasites. PCR-based methods, mainly real-time qPCR, are generally used in laboratories in developed countries, while LAMP-based methods are a cheaper and easy molecular option for low-income countries and have the potential for near point-of-care (POC) application [6].

In a previous work, our group developed an in-house colorimetric LAMP-based method for the specific detection of *Loa loa* DNA. This *Loa loa*-LAMP achieved a very high level of sensitivity, detecting up to 0.5 attograms (ag) of genomic DNA (which is equivalent to 1/1,000,000th of a mf) in fresh human venous blood samples artificially enriched with *Loa loa* DNA [27]. Now, in this work, we evaluate for the first time, our *Loa loa*-LAMP, both colorimetric and real-time testing, in a set of 100 clinical samples collected in a loiasis-endemic area long-term stored as DBS. The saponin/Chelex-based method was used to extract DNA from DBS for molecular analysis. This simple chelating resin-based procedure for DNA extraction was tried because it is cheap, fast and does not require multiple tube transfers, which avoids potential contamination when numerous samples need to be analyzed [40,49]. For example, the saponin/Chelex-100 DNA extraction method has already been widely and successfully used for the isolation of malaria parasite DNA from DBS for molecular analysis by PCR [42,43,50,51].

When analyzing DNA extracted from DBS, we obtained more LAMP-positive colorimetric and real-time results than PCR/nested-PCR results in samples from a group of patients with microscopy-confirmed infection by *Loa loa* (12/13; 92.30% vs. 10/13; 76.92%) and by *Loa loa* and *M. perstans* mixed infection (3/3; 100% vs. 2/3; 66.66%), respectively. Therefore, by using a simple method involving a chelating resin in combination with a highly sensitive molecular method, either a PCR-based or LAMP-based method, it is possible to detect *Loa loa* in DBS as a DNA source. However, LAMP assays showed a higher sensitivity than PCR/nested-PCR, as seems to be demonstrated by the fact that LAMP amplified all five *Loa loa*-positive samples with a lowest-microfilariae count between 300 and 500 mf/mL (nos. 19, 21, 51, 53 and 75) while PCR/nested-PCR only achieved amplification in two of these five samples (nos. 19 and 21). Unexpectedly, both colorimetric and real-time LAMP assays failed to amplify 1/13 samples (no. 32) with microscopy-confirmed infection by *Loa loa* (with a high count of 2200 mf/mL), which was amplified by PCR/nested-PCR. Honestly, we do not know what could have caused this failure. A possible explanation for this could be associated with improper sample storage, repeated freezing and thawing cycles for different assays, or simple sample handling errors.

Furthermore, we obtained colorimetric LAMP-positive results for *Loa loa* in 5/11 (45.45%) samples (nos. 24, 49, 52, 79 and 91) with only microscopy-confirmed *M. perstans* infection. However, when performing the real-time LAMP assay, only 3/11 (27.27%) of those samples (nos. 52, 79 and 91) also resulted positive, but in two of them (nos. 24 and 49) no amplification was achieved. Interestingly, we also obtained colorimetric LAMP-positive results for *Loa loa* in 7/73 (9.58%) samples (nos. 20, 42, 43, 45, 47, 68 and 74) with microscopy-negative findings, but only 3/73 (4.11%) of those samples (nos. 43, 45 and 47) resulted positive by real-time LAMP assay. We sincerely believe that those colorimetric LAMP-positive results obtained for *Loa loa* in both *M. perstans* microscopy-positive samples and in samples with microscopy-negative findings could be true DNA *Loa loa* detection, since coinfections with *M. perstans* in co-endemic areas are very common [6,52], and it is also possible that they may have gone undetected under microscopy due to their well-known limited sensitivity for *Loa loa* [53]. Moreover, the higher sensitivity of our in-house LAMP over PCR/nested-PCR could also explain these positive results. The fact that in

these two groups of samples (*M. perstans* microscopy-positive and microscopy-negative findings), up to six samples resulted positive by conventional colorimetric *Loa loa*-LAMP but not in real-time settings, could be explained because of the pre-amplified EvaGreen fluorescent dye in the reaction mixes for real-time monitoring. It has been demonstrated that EvaGreen is able to partially inhibit LAMP reactions by reducing both the rate and final levels of amplification [54]. On the other hand, it might be thought that the amplification of these samples by conventional colorimetric *Loa loa*-LAMP could have been non-specific amplification or post-amplification contamination by opening the tubes and adding SYBR Green I at the end of the reaction. However, we honestly believe that the specificity demonstrated by our *Loa loa*-LAMP in its previous development and setup (with no cross-reaction with *M. perstans* or *Brugia pahangi*, a filaria closely related to *Loa loa*) [27], the gentle handling of the tubes in a laminar flow hood, and the duplicate confirmation of positive results, rule out those possibilities.

Very interestingly, those samples with the highest mf counts of *Loa loa* on microscopic examination, including samples no. 48 (12,200 mf/mL) and no. 69 (11,600 mf/mL) in Group 1 (*Loa loa* microscopy-positive), and also sample no. 81 (6000 mf/mL) in Group 3 (*Loa loa* and *M. perstans* mixed infection), amplified with the shortest time to positivity (Tp) values when performing the real-time LAMP assay: 13, 14 and 15 min, respectively. Since serious adverse events can occur in individuals with high *Loa loa* mf loads due to ivermectin administration in onchocerciasis control and elimination programmes in Central Africa, and that the risk increases significantly when *Loa loa* loads exceed 8000 mf/mL [55], real-time *Loa loa*-LAMP could be very useful as a diagnostic tool to detect high mf loads (which would correlate to shorter Tp values) in infected individuals to prevent the risk of serious reactions. Considering that real-time *Loa loa*-LAMP can also be easily performed on a battery-powered handheld device for outdoor use (i.e., Genie III platform), and the simplicity of the saponin/Chelex-based DNA extraction from a small quantity of finger-prick blood samples stored as DBS, make this combination highly desirable as a promising tool applicable as a POC test for molecular diagnosis of loiasis in endemic areas with resource-limited settings.

Finally, the LAMP-positive results detected in samples with negative microscopy results reinforce the idea that the sensitivity of our in-house *Loa loa*-LAMP assay (both the colorimetric and real-time) is also higher than that of microscopy for the detection of natural *Loa loa* infections in clinical samples. In this sense, our results are consistent with those obtained in a recent study in which LAMP is also found to be more sensitive than microscopy for the detection of experimental and natural *Loa loa* infections in *Chrysops* vectors [56]. Overall, statistically, the conventional colorimetric *Loa loa*-LAMP and real-time *Loa loa*-LAMP showed the highest sensitivity (94.1%) compared to microscopy; although, PPV for colorimetric *Loa loa*-LAMP was low (57.1%). In our experience in the development and application of LAMP technology for the diagnosis of parasitic infections, these statistical results (a high sensitivity and a low PPV) are also consistent with other studies comparing the accuracy of the LAMP assay with microscopy as a gold standard in different types of clinical specimens, either in urine (e.g., for urinary schistosomiasis diagnosis) [57] or feces (e.g., for amphiheriasis diagnosis) [58].

5. Conclusions

Considering the results obtained in this study when analyzing DBS samples, we can conclude that our conventional colorimetric in-house *Loa loa*-LAMP assay could be a promising molecular diagnostic tool for the easy, rapid, sensible and specific screening of patients for loiasis in endemic areas with low-resource settings. Moreover, the real-time *Loa loa*-LAMP testing (that can be easily performed in a handheld device with no electricity requirement), could be very useful to detect people with high mf loads to define more precisely which individuals and which communities are eligible to receive ivermectin in MDA against onchocerciasis and lymphatic filariasis in overlapping areas with *Loa loa*, thus reducing possible life-threatening complications. Further research would be desirable to

further increase specificity (e.g., by including loop primers in the LAMP design, exploring other potential target *Loa loa*-specific DNA sequences) and develop a multiplex-LAMP that would allow for simultaneous detection of different filarial species in a single patient sample, especially in areas where loiasis is co-endemic with other filariasis.

Author Contributions: Conceptualization, B.F.-S., P.F.-S., A.B. and A.M.; methodology, B.F.-S., P.F.-S., B.C.-V., J.G.-B.D. and T.-H.T.-T.; validation, B.F.-S., T.-H.T.-T. and P.F.-S.; formal analysis, B.F.-S., T.-H.T.-T. and P.F.-S.; investigation, B.F.-S., P.F.-S., P.B., T.-H.T.-T., B.C.-V. and J.G.-B.D.; resources, P.B., Z.H. and M.R.-B.; data curation, B.F.-S. and P.F.-S.; writing—original draft preparation, B.F.-S. and P.F.-S.; writing—review and editing, B.F.-S., P.F.-S., A.B., P.B., T.-H.T.-T., R.N., P.N., Z.H., M.R.-B., B.C.-V., J.G.-B.D. and A.M.; visualization, B.F.-S. and P.F.-S.; supervision, P.F.-S. and A.M.; project administration, P.B., A.B., P.F.-S. and A.M.; funding acquisition, A.M., A.B., P.N. and P.F.-S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Institute of Health Carlos III, ISCIII, Spain (www.isciii.es), grants: RICET RD16/0027/0018 (A.M.), RD16/0027/0000 (A.B.), FCSAI-ISCIII (P.N.) and PI19/01727 (P.F.-S.), European Union co-financing by FEDER (Fondo Europeo de Desarrollo Regional) ‘Una manera de hacer Europa’. We also acknowledge support by the Predoctoral Fellowship Program of Junta de Castilla y León co-financing by Fondo Social Europeo (BDNS (Identif.): 422058 and BDNS (Identif.): 487971), by the ISCIII-Sara Borrell contract CD17CIII/00018 financed by the Institute of Health Carlos III and Predoctoral Fellowship Program of University of Salamanca, and co-financing by Santander Bank.

Institutional Review Board Statement: Samples were obtained from the Laboratory of the National Centre of Tropical Medicine’s repository (Collection number C.0005278/ISCIII/Spain), which is registered according to the Spanish Law RD 1716/2011; article 22.1. Samples belonged to the malaria project PREMAVAL, to provide baseline data on malaria prevalence in Equatorial Guinea. The study was approved at the time by the Minister of Health and Social Welfare of Equatorial Guinea (MINSABS) and the Ethics Committee of the Spanish National Health Institute, Carlos III (CEI PI 22_2013-v3). The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from caregivers interviewed, the heads of the households and all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: All data generated or analyzed during this study are included in this manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Boussinesq, M. Loiasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **2006**, *8*, 715–731. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Metzger, W.G.; Mordmüller, B. *Loa loa*-does it deserve to be neglected? *Lancet Infect. Dis.* **2014**, *14*, 353–357. [[CrossRef](#)]
3. Gobbi, F.; Bottieau, E.; Bouchaud, O.; Buonfrate, D.; Salvador, F.; Rojo-Marcos, G.; Rodari, P.; Clerinx, J.; Treviño, B.; Herrera-Ávila, J.P.; et al. Comparison of different drug regimens for the treatment of loiasis—A TropNet retrospective study. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2018**, *12*, e0006917. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Eyebe, S.; Sabbagh, A.; Pion, S.D.; Nana-Djeunga, H.C.; Kamgno, J.; Boussinesq, M.; Chesnais, C.B. Familial aggregation and heritability of *loa loa* microfilaremia. *Clin. Infect. Dis.* **2018**, *66*, 751–757. [[CrossRef](#)]
5. Expanded Special Project for Elimination of NTDs. Available online: <https://espen.afro.who.int/> (accessed on 23 November 2021).
6. Mathison, B.A.; Couturier, M.R.; Pritt, B.S. Diagnostic identification and differentiation of microfilariae. *J. Clin. Microbiol.* **2019**, *57*, e00706-19. [[CrossRef](#)]
7. Ojurongbe, O.; Akindele, A.A.; Adeleke, M.A.; Oyedele, M.O.; Adedokun, S.A.; Ojo, J.F.; Akinleye, C.A.; Bolaji, O.S.; Adefioye, O.A.; Adeyeba, O.A. Co-endemicity of Loiasis and Onchocerciasis in Rain Forest Communities in Southwestern Nigeria. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2015**, *9*, e0003633. [[CrossRef](#)]
8. Simonsen, P.E.; Onapa, A.W.; Asio, S.M. *Mansonella perstans* filariasis in Africa. *Acta Trop.* **2011**, *120*, S109–S120. [[CrossRef](#)]
9. Ta-Tang, T.-H.; Crainey, J.; Post, R.J.; Luz, S.L.; Rubio, J. Mansonellosis: Current perspectives. *Res. Rep. Trop. Med.* **2018**, *9*, 9–24. [[CrossRef](#)]
10. Puente, S.; Lago, M.; Subirats, M.; Sanz-Esteban, I.; Arsuaga, M.; Vicente, B.; Alonso-Sardon, M.; Bellhassen-Garcia, M.; Muro, A. Imported *Mansonella perstans* infection in Spain. *Infect. Dis. Poverty* **2020**, *9*, 105. [[CrossRef](#)]

11. D'Ambrosio, M.V.; Bakalar, M.; Bennuru, S.; Reber, C.; Skandarajah, A.; Nilsson, L.; Switz, N.; Kamgno, J.; Pion, S.; Boussinesq, M.; et al. Point-of-care quantification of blood-borne filarial parasites with a mobile phone microscope. *Sci. Transl. Med.* **2015**, *7*, 286re4. [[CrossRef](#)]
12. Kamgno, J.; Pion, S.D.; Chesnais, C.B.; Bakalar, M.H.; D'Ambrosio, M.V.; Mackenzie, C.D.; Nana-Djeunga, H.C.; Gounoue-Kamkumo, R.; Njitchouang, G.-R.; Nwane, P.; et al. A Test-and-Not-Treat Strategy for Onchocerciasis in *Loa loa*-Endemic Areas. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *377*, 2044–2052. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Emukah, E.; Rakers, L.J.; Kahansim, B.; Miri, E.S.; Nwoke, B.E.B.; Griswold, E.; Saka, Y.; Anagbogu, I.; Davies, E.; Ityonzughul, C.; et al. In Southern Nigeria *Loa loa* Blood Microfilaria Density is Very Low even in Areas with High Prevalence of Loiasis: Results of a Survey Using the New LoaScope Technology. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2018**, *99*, 116–123. [[CrossRef](#)]
14. Pion, S.D.; Nana-Djeunga, H.; Niamsi-Emalio, Y.; Chesnais, C.B.; Deléglise, H.; Mackenzie, C.; Stolk, W.; Fletcher, D.A.; Klion, A.D.; Nutman, T.B.; et al. Implications for annual retesting after a test-and-not-treat strategy for onchocerciasis elimination in areas co-endemic with *Loa loa* infection: An observational cohort study. *Lancet Infect. Dis.* **2020**, *20*, 102–109. [[CrossRef](#)]
15. Johnson, O.; Giorgi, E.; Fronterre, C.; Amoah, B.; Atsame, J.; Ella, S.N.; Biamonte, M.; Ogoussan, K.; Hundley, L.; Gass, K.; et al. Geostatistical modelling enables efficient safety assessment for mass drug administration with ivermectin in *Loa loa* endemic areas through a combined antibody and LoaScope testing strategy for elimination of onchocerciasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2022**, *16*, e0010189. [[CrossRef](#)]
16. Burbelo, P.D.; Ramanathan, R.; Klion, A.D.; Iadarola, M.J.; Nutman, T.B. Rapid, novel, specific, high-throughput assay for diagnosis of *Loa loa* infection. *J. Clin. Microbiol.* **2008**, *46*, 2298–2304. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Wanji, S.; Amvongo-Adjia, N.; Koudou, B.; Njouendou, A.J.; Chounna Ndongmo, P.W.; Kengne-Ouafo, J.A.; Datchoua-Poutcheu, F.R.; Fovenso, B.A.; Tayong, D.B.; Fombad, F.F.; et al. Cross-Reactivity of Filariasis ICT Cards in Areas of Contrasting Endemicity of *Loa loa* and *Mansonella perstans* in Cameroon: Implications for Shrinking of the Lymphatic Filariasis Map in the Central African Region. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2015**, *9*, e0004184. [[CrossRef](#)]
18. Pedram, B.; Pasquetto, V.; Drame, P.M.; Ji, Y.; Gonzalez-Moa, M.J.; Baldwin, R.K.; Nutman, T.B.; Biamonte, M.A. A novel rapid test for detecting antibody responses to *Loa loa* infections. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2017**, *11*, e0005741. [[CrossRef](#)]
19. Touré, F.S.; Bain, O.; Nerrienet, E.; Millet, P.; Wahl, G.; Toure, Y.; Doumbo, O.; Nicolas, L.; Georges, A.J.; McReynolds, L.A.; et al. Detection of *Loa loa*-specific DNA in blood from occult-infected individuals. *Exp. Parasitol.* **1997**, *86*, 163–170. [[CrossRef](#)]
20. Fink, D.L.; Kamgno, J.; Nutman, T.B. Rapid molecular assays for specific detection and quantitation of *Loa loa* microfilaremia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2011**, *5*, e1299. [[CrossRef](#)]
21. Ta-Tang, T.H.; Moya, L.; Nguema, J.; Aparicio, P.; Miguel-Oteo, M.; Cenxual, G.; Canorea, I.; Lanza, M.; Benito, A.; Crainey, J.L.; et al. Geographical distribution and species identification of human filariasis and onchocerciasis in Bioko Island, Equatorial Guinea. *Acta Trop.* **2018**, *180*, 12–17. [[CrossRef](#)]
22. Alhassan, A.; Li, Z.; Poole, C.B.; Carlow, C.K.S. Expanding the MDx toolbox for filarial diagnosis and surveillance. *Trends Parasitol.* **2015**, *31*, 391–400. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Notomi, T.; Okayama, H.; Masubuchi, H.; Yonekawa, T.; Watanabe, K.; Amino, N.; Hase, T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, e63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Notomi, T.; Mori, Y.; Tomita, N.; Kanda, H. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): Principle, features, and future prospects. *J. Microbiol.* **2015**, *53*, 1–5. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Mori, Y.; Nagamine, K.; Tomita, N.; Notomi, T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *289*, 150–154. [[CrossRef](#)]
26. Tomita, N.; Mori, Y.; Kanda, H.; Notomi, T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 877–882. [[CrossRef](#)]
27. Fernández-Soto, P.; Mvoulouga, P.O.; Akue, J.P.; Abán, J.L.; Santiago, B.V.; Sánchez, M.C.; Muro, A. Development of a highly sensitive Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) method for the detection of *Loa loa*. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e94664. [[CrossRef](#)]
28. Drame, P.M.; Fink, D.L.; Kamgno, J.; Herrick, J.A.; Nutman, T.B. Loop-mediated isothermal amplification for rapid and semiquantitative detection of *loa loa* infection. *J. Clin. Microbiol.* **2014**, *52*, 2071–2077. [[CrossRef](#)]
29. Poole, C.B.; Ettwiller, L.; Tanner, N.A.; Evans, T.C.; Wanji, S.; Carlow, C.K.S. Genome filtering for new DNA biomarkers of *Loa loa* infection suitable for loop-mediated isothermal amplification. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0139286. [[CrossRef](#)]
30. Takagi, H.; Itoh, M.; Kasai, S.; Yahathugoda, T.C.; Weerasooriya, M.V.; Kimura, E. Development of loop-mediated isothermal amplification method for detecting *Wuchereria bancrofti* DNA in human blood and vector mosquitoes. *Parasitol. Int.* **2011**, *60*, 493–497. [[CrossRef](#)]
31. Poole, C.B.; Tanner, N.A.; Zhang, Y.; Evans, T.C.; Carlow, C.K.S. Diagnosis of Brugian Filariasis by Loop-Mediated Isothermal Amplification. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2012**, *6*, e1948. [[CrossRef](#)]
32. Alhassan, A.; Makepeace, B.L.; Lacourse, E.J.; Osei-Atweneboana, M.Y.; Carlow, C.K.S. A simple isothermal DNA amplification method to screen black flies for *Onchocerca volvulus* infection. *PLoS ONE* **2014**, *9*, 118323. [[CrossRef](#)]
33. Lagatie, O.; Merino, M.; Batsa Debrah, L.; Debrah, A.Y.; Stuyver, L.J. An isothermal DNA amplification method for detection of *Onchocerca volvulus* infection in skin biopsies. *Parasites Vectors* **2016**, *9*, 624. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

34. Poole, C.B.; Sinha, A.; Ettwiller, L.; Apone, L.; McKay, K.; Panchapakesa, V.; Lima, N.F.; Ferreira, M.U.; Wanji, S.; Carlow, C.K.S. In Silico Identification of Novel Biomarkers and Development of New Rapid Diagnostic Tests for the Filarial Parasites *Mansonella perstans* and *Mansonella ozzardi*. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 10275. [CrossRef] [PubMed]
35. Smit, P.W.; Elliott, I.; Peeling, R.W.; Mabey, D.; Newton, P.N. Review article: An overview of the clinical use of filter paper in the diagnosis of tropical diseases. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2014**, *90*, 195–210. [CrossRef]
36. Simon, N.; Shallat, J.; Williams Wietzikoski, C.; Harrington, W.E. Optimization of Chelex 100 resin-based extraction of genomic DNA from dried blood spots. *Biol. Methods Protoc.* **2020**, *5*, bpaa009. [CrossRef] [PubMed]
37. Bereczky, S.; Mårtensson, A.; Gil, J.P.; Färnert, A. Short report: Rapid DNA extraction from archive blood spots on filter paper for genotyping of *Plasmodium falciparum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2005**, *72*, 249–251. [CrossRef]
38. Schmidt, B.; Xu, W.; González, I.J.; Polley, S.D.; Bell, D.; Shakely, D.; Msellem, M.I.; Björkman, A.; Mårtensson, A. Loop mediated isothermal amplification (LAMP) accurately detects malaria DNA from filter paper blood samples of low density parasitaemias. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e103905. [CrossRef]
39. Vincent, J.P.; Komaki-Yasuda, K.; Iwagami, M.; Kawai, S.; Kano, S. Combination of PURE-DNA extraction and LAMP-DNA amplification methods for accurate malaria diagnosis on dried blood spots 11 Medical and Health Sciences 1108 Medical Microbiology. *Malar. J.* **2018**, *17*, 373. [CrossRef]
40. Willard, J.M.; Lee, D.A.; Holland, M.M. Recovery of DNA for PCR amplification from blood and forensic samples using a chelating resin. *Methods Mol. Biol.* **1998**, *98*, 9–18. [CrossRef]
41. Rubio, J.M.; Post, R.J.; Van Leeuwen, W.M.D.; Henry, M.C.; Lindergard, G.; Hommel, M. Alternative polymerase chain reaction method to identify *Plasmodium* species in human blood samples: The semi-nested multiplex malaria PCR (SnM-PCR). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2002**, *96*, S199. [CrossRef]
42. Hwang, J.; Jaroensuk, J.; Leimanis, M.L.; Russell, B.; McGready, R.; Day, N.; Snounou, G.; Nosten, F.; Imwong, M. Long-term storage limits PCR-based analyses of malaria parasites in archival dried blood spots. *Malar. J.* **2012**, *11*, 1. [CrossRef] [PubMed]
43. Schwartz, A.; Baidjoe, A.; Rosenthal, P.J.; Dorsey, G.; Bousema, T.; Greenhouse, B. The effect of storage and extraction methods on amplification of *plasmodium falciparum* DNA from dried blood spots. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2015**, *92*, 922–925. [CrossRef] [PubMed]
44. Touré, F.S.; Kassambara, L.; Williams, T.; Millet, P.; Bain, O.; Georges, A.J.; Egwang, T.G. Human occult loiasis: Improvement in diagnostic sensitivity by the use of a nested polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1998**, *59*, 144–149. [CrossRef] [PubMed]
45. Eberhard, M.L.; Lammie, P.J. Laboratory diagnosis of filariasis. *Clin. Lab. Med.* **1991**, *4*, 977–1010. [CrossRef]
46. Plowe, C.V.; Djimde, A.; Bouare, M.; Doumbo, O.; Wellems, T.E. Pyrimethamine and proguanil resistance-conferring mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase: Polymerase chain reaction methods for surveillance in Africa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1995**, *52*, 565–568. [CrossRef]
47. Blas, I.; Ruiz-Zarzuela, I.; Vallejo, A. WinEpi: Working in Epidemiology. An Online Epidemiological Tool. ISVEE 11: Proceedings of the 11th Symposium of the International Society for Veterinary Epi-Demiology and Economics, Cairns (Australia). Theme 4-Tools & Training for Epidemiologists: Poste. Available online: <http://winepi.net/> (accessed on 4 May 2021).
48. Walther, M.; Muller, R. Diagnosis of human filariases (except onchocerciasis). *Adv. Parasitol.* **2003**, *53*, 149–193.
49. Walsh, P.S.; Metzger, D.A.; Higuchi, R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* **2013**, *54*, 506–513. [CrossRef]
50. Chaorattanakawee, S.; Natalang, O.; Hananantachai, H.; Nacher, M.; Brockman, A.; Krudsood, S.; Looareesuwan, S.; Patarapotikul, J. Storage duration and polymerase chain reaction detection of *Plasmodium falciparum* from blood spots on filter paper. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2003**, *69*, 42–44. [CrossRef]
51. Hsiang, M.S.; Lin, M.; Dokomajilar, C.; Kemere, J.; Pilcher, C.D.; Dorsey, G.; Greenhouse, B. PCR-based pooling of dried blood spots for detection of malaria parasites: Optimization and application to a cohort of Ugandan children. *J. Clin. Microbiol.* **2010**, *48*, 3539–3543. [CrossRef]
52. Bouyou Akotet, M.K.; Owono-Medang, M.; Mawili-Mboumba, D.P.; Moussavou-Boussougou, M.N.; Nzenze Afène, S.; Kendjo, E.; Kombila, M. The relationship between microfilaraemic and amicrofilaraemic loiasis involving co-infection with *Mansonella perstans* and clinical symptoms in an exposed population from Gabon. *J. Helminthol.* **2016**, *90*, 469–475. [CrossRef]
53. Whittaker, C.; Walker, M.; Pion, S.D.S.; Chesnais, C.B.; Boussinesq, M.; Basáñez, M.G. The Population Biology and Transmission Dynamics of *Loa loa*. *Trends Parasitol.* **2018**, *34*, 335–350. [CrossRef] [PubMed]
54. Sun, Y.; Quyen, T.L.; Hung, T.Q.; Chin, W.H.; Wolff, A.; Bang, D.D. A lab-on-a-chip system with integrated sample preparation and loop-mediated isothermal amplification for rapid and quantitative detection of *Salmonella* spp. in food samples. *Lab Chip* **2015**, *15*, 1898–1904. [CrossRef] [PubMed]
55. Wanji, S.; Eyong, E.E.J.; Tendongfor, N.; Ngwa, C.J.; Esuka, E.N.; Kengne-Ouafo, A.J.; Datchoua-Poutcheu, F.R.; Enyong, P.; Agnew, D.; Eversole, R.R.; et al. Ivermectin treatment of *Loa loa* hyper-microfilaraemic baboons (*Papio anubis*): Assessment of microfilarial load reduction, haematological and biochemical parameters and histopathological changes following treatment. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2017**, *11*, e0005576. [CrossRef] [PubMed]
56. Amambo, G.N.; Abong, R.A.; Fombad, F.F.; Njouendou, A.J.; Nietcho, F.; Beng, A.A.; Ritter, M.; Esum, M.E.; Deribe, K.; Cho, J.F.; et al. Validation of Loop Mediated Isothermal Amplification for the Detection of *Loa loa* Infection in Chrysops sp in Experimental and Natural Field Conditions. *Parasit. Vectors* **2020**, *14*, 19. [CrossRef]

-
57. Gandasegui, J.; Fernández-Soto, P.; Dacal, E.; Rodríguez, E.; Saugar, J.M.; Yepes, E.; Aznar-Ruiz-de-Alegría, M.L.; Espasa, M.; Ninda, A.; Bocanegra, C.; et al. Field and laboratory comparative evaluation of a LAMP assay for the diagnosis of urogenital schistosomiasis in Cubal, Central Angola. *Trop. Med. Int. Health* **2018**, *23*, 992–1001. [[CrossRef](#)]
 58. Cevallos, W.; Fernández-Soto, P.; Calvopiña, M.; Buendía-Sánchez, M.; López-Abán, J.; Vicente, B.; Muro, A. Diagnosis of amphimeriasis by LAMPhimerus assay in human stool samples long-Term storage onto filter paper. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0192637. [[CrossRef](#)]

3.2

A novel RT-LAMP for the detection of different genotypes of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus in patients from Spain

Begoña Febrer-Sendra, Pedro Fernández-Soto, Juan García-Bernalt Diego, Beatriz Crego-Vicente, Anabel Negredo, Juan Luis Muñoz-Bellido, Moncef Belhassen-García, María Paz Sánchez-Seco, Antonio Muro

International Journal of Molecular Sciences. 2023; 24(7):6411

RESUMEN

La Fiebre Hemorrágica de Crimea-Congo (FHCC) es una enfermedad vírica causada por el virus de Crimea-Congo (género *Orthobunyavirus*, Familia *Nairoviridae*), transmitido principalmente por picaduras de garrapatas infectadas del género *Hyalomma*. En personas, el curso clínico de la FHCC varía desde casos asintomáticos hasta casos hemorrágicos graves, con tasas de mortalidad elevadas. Es una de las enfermedades víricas transmitidas por garrapatas con mayor extensión mundial y se considera una enfermedad emergente en Europa occidental. En España, recientemente, se han notificado 12 casos, 4 de ellos con desenlace fatal.

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, se notificaron hasta 7 casos de FHCC en la Comunidad de Castilla y León. Ante la dificultad del diagnóstico microbiológico debido al requerimiento de bioseguridad nivel 4 para gestionar las muestras, los métodos serológicos han sido los más utilizados. No obstante, presentan limitaciones por su baja disponibilidad comercial y por ofrecer resultados falsos negativos en la fase aguda de la enfermedad. Por ello, se prefieren los métodos moleculares. Éstos suelen ser complejos y sólo disponibles en centros de referencia.

Ante esta situación, nos propusimos el desarrollo de un RT-LAMP útil para la detección precoz del virus de Crimea-Congo y capaz de detectar el mayor número posible de genotipos. Para ello, el diseño *in silico* del RT-LAMP se basó en un sistema de oligonucleótidos degenerados. Se comprobó su sensibilidad y especificidad utilizando otros virus hemorrágicos y respiratorios. Su eficacia quedó demostrada con el análisis de 5 casos de FHCC notificados en Castilla y León durante los años 2020-2021 y confirmados por RT-PCR en el laboratorio de referencia del Centro Nacional de Microbiología del ISCIII. Además, se realizó el seguimiento de un paciente con FHCC ingresado en el Hospital Universitario de Salamanca utilizando muestras de plasma y orina. El ensayo RT-LAMP resultó más eficaz que la RT-qPCR en el seguimiento de la infección. La secuenciación y análisis filogenético de las muestras clínicas amplificadas mediante el RT-LAMP, confirmó la capacidad de detección de diferentes genotipos del virus.

Así, de este trabajo podemos concluir que: *i*) se ha desarrollado un método RT-LAMP para la detección colorimétrica y a tiempo real de ARN del virus de Crimea-Congo; *ii*) el RT-LAMP ha resultado eficaz en la detección del virus en muestras

clínicas de plasma y, por primera vez, de orina; *iii*) el método RT-LAMP ha permitido la detección de diferentes genotipos del virus circulantes en España.

No obstante, sería necesario comprobar la eficacia del RT-LAMP desarrollado en un mayor número de muestras clínicas, así como llevar a cabo estudios en reservorios animales y vectores.



Article

A Novel RT-LAMP for the Detection of Different Genotypes of Crimean–Congo Haemorrhagic Fever Virus in Patients from Spain

Begoña Febrer-Sendra ¹, Pedro Fernández-Soto ^{1,*}, Juan García-Bernalt Diego ¹, Beatriz Crego-Vicente ¹, Anabel Negrodo ², Juan Luis Muñoz-Bellido ³, Moncef Belhassen-García ⁴, María Paz Sánchez-Seco ² and Antonio Muro ¹

- ¹ Infectious and Tropical Diseases Research Group (e-INTRO), Biomedical Research Institute of Salamanca-Research Centre for Tropical Diseases at the University of Salamanca (IBSAL-CIETUS), Faculty of Pharmacy, University of Salamanca, 37007 Salamanca, Spain
- ² Laboratorio de Arbovirus, Centro Nacional de Microbiología, CIBER de Enfermedades Infecciosas (Instituto de Salud Carlos III), 28222 Madrid, Spain
- ³ Microbiology and Parasitology Service, Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, University of Salamanca, 37007 Salamanca, Spain
- ⁴ Internal Medicine Service, Infectious Diseases Section, Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, University of Salamanca, 37007 Salamanca, Spain
- * Correspondence: pfsoto@usal.es

Abstract: Crimean–Congo haemorrhagic fever (CCHF) is a potentially lethal tick-borne viral disease with a wide distribution. In Spain, 12 human cases of CCHF have been confirmed, with four deaths. The diagnosis of CCHF is hampered by the nonspecific symptoms, the high genetic diversity of CCHFV, and the biosafety requirements to manage the virus. RT-qPCR and serological tests are used for diagnosis with limitations. Reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) could be an effective alternative in the diagnosis of the disease. However, none of the few RT-LAMP assays developed to date has detected different CCHFV genotypes. Here, we designed a RT-LAMP using a degenerate primer set to compensate for the variability of the CCHFV target sequence. RT-LAMP was performed in colorimetric and real-time tests on RT-qPCR-confirmed CCHF patient samples notified in Spain in 2020 and 2021. Urine from an inpatient was analysed by RT-LAMP for the first time and compared with RT-qPCR. The amplicons obtained by RT-qPCR were sequenced and African III and European V genotypes were identified. RT-LAMP amplified both genotypes and was more sensitive than RT-qPCR in urine samples. We have developed a novel, rapid, specific, and sensitive RT-LAMP test that allows the detection of different CCHFV genotypes in clinical samples. This pan-CCHFV RT-LAMP detected viral RNA for the first time in urine samples. It can be easily performed as a single-tube isothermal colorimetric method on a portable platform in real time and without the need for expensive equipment, thus bringing molecular diagnostics closer to rural or resource-poor areas, where CCHF usually occurs.

Keywords: Crimean–Congo haemorrhagic fever virus; CCHFV; RT-LAMP; genotypes; Spain



Citation: Febrer-Sendra, B.; Fernández-Soto, P.; García-Bernalt Diego, J.; Crego-Vicente, B.; Negrodo, A.; Muñoz-Bellido, J.L.; Belhassen-García, M.; Sánchez-Seco, M.P.; Muro, A. A Novel RT-LAMP for the Detection of Different Genotypes of Crimean–Congo Haemorrhagic Fever Virus in Patients from Spain. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 6411. <https://doi.org/10.3390/ijms24076411>

Academic Editors: Elisabetta Tanzi and Marta Canuti

Received: 9 February 2023

Revised: 25 March 2023

Accepted: 27 March 2023

Published: 29 March 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Crimean–Congo haemorrhagic fever (CCHF) is a tick-borne viral haemorrhagic disease caused by Crimean–Congo haemorrhagic fever virus (CCHFV) belonging to the genus *Orthonairovirus*, family *Nairoviridae* [1]. The virus is widely distributed and maintained in a natural zoonotic cycle among ticks and a wide range of birds, and wild and domestic animals. Humans become infected by bites of CCHFV-infected Ixodid ticks, mainly species of the genus *Hyalomma*, and/or by direct contact with blood, body fluids, or tissues of both viraemic patients or animals [2,3]. Nosocomial outbreaks, including via aerosol generation, have also been reported [4,5]. In humans, the clinical course of the CCHF varies from asymptomatic to severe haemorrhagic and fatal cases, with a very high mortality rate

ranging between 5% and 30%, and up to 40% or even more, depending on reports of cases from different countries [1,6,7].

CCHFV is an enveloped, negative-sense, single-stranded RNA virus with a trisegmented genome consisting of small (S), medium (M) and large (L) segments encapsidated by the nucleoprotein (NP), plus the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), to initiate transcription and genome replication in the host cell. In these three segments, sequence divergence among different viral strains was found to be 20%, 31% and 22%, respectively: this represents the highest degree of sequence diversity of any arthropod-borne virus [2,8]. According to phylogenetic analysis of complete and partial S segment sequences, seven lineages of CCHFV have been distinguished and correlated with the geographical site of virus isolation: Africa 1 (genotype I), Africa 2 (genotype II) and Africa 3 (genotype III); Asia 1 (genotype IVa) and Asia 2 (genotype IVb); Europe 1 (genotype V) and Europe 2 (genotype VI) [9].

CCHFV is the most geographically widespread tick-borne virus affecting humans, having been reported in Africa, Asia (particularly the Middle East), and southeast Europe. In recent years, this area has expanded to southwest Europe, including France, Portugal and Spain [2,10]. In Spain, CCHFV was first detected in 2010 in *Hyalomma lusitanicum* ticks collected from red deer in Cáceres province: a small amplified region of the genome within the S segment showed 98% similarity with sequences recorded for CCHFV in Mauritania and Senegal, on the western coast of Africa [11]. Later studies in the same geographical area detected the CCHFV again in *Hyalomma* spp. ticks collected from ruminants [12,13] and the phylogenetic studies of the isolates revealed a close relationship with African genotype III identified in West Africa. Recently, a survey carried out in 20 locations throughout southwestern Spain detected CCHFV in both *H. lusitanicum* and *Dermacentor marginatus* ticks collected from red deer and wild boar. Viral RNA isolates grouped with genotypes IV (Africa III clade) and V (Europe I clade) [14]. More recently, a comprehensive survey in five regions in central and southwestern Spain in ticks—mostly in *Hyalomma lusitanicum*—detected the circulation of several CCHFV genotypes, including viruses belonging to genotype III (Africa III clade), genotype I (Africa I clade) and the newly proposed Africa IV clade [15].

The aforementioned studies carried out in Spain draw attention to the importance of *Hyalomma* ticks and wild ruminants in the circulation of CCHFV, the presence of different viral genotypes, the possibility of new reassortments, as well as the potential risk of transmission to the human population. Considering that CCHFV causes a potentially lethal disease in humans, and the recent marked increase in the incidence and geographical range of CCHF in southern European countries [1], particularly in new areas such as Spain [10], CCHF is considered a major infectious disease threat spreading in Europe. Thus, CCHFV was listed as a priority pathogen for research and development by the WHO [16].

In Spain, from 2013 to 2022, 12 human cases of CCHF were confirmed, with four deaths. The first case was retrospectively confirmed by PCR in a woman who developed symptoms in 2013 [17]. In 2016, the first two autochthonous CCHF cases were reported: a patient referring with tick bite (who died on the ninth day of illness) and a secondary case in a health-care worker who had close contact with the former during hospital admission [10]. By 2021, 10 more cases with three deaths were notified [15] and two additional cases (one lethal) were recently documented in 2022 [18]. In human cases where complete sequence information on CCHFV is available, it has been detected that African genotype III is distributed in Africa [8], a virus with genetic reassortment because of L and M segments group within African genotype III, and the S segment has shown homology with African genotype IV [19] and European genotype V [20]. Thus, data on viral strains identified from human cases and tick species in Spain show high genetic variability, suggesting repeated introductions from different origins, including Africa and Eastern Europe [20].

The diagnosis of CCHF is hampered by the nonspecific symptoms, the high genetic diversity of CCHFV, and the biosafety requirements to manage a virus of high biological

risk. A number of laboratory assays exist, and the choice of one of them depends on the stage of the disease, the specimens available, and the validity of the test for the CCHFV strains circulating in the suspected region of exposure [21,22]. Serological methods are most likely to be useful after the first week of illness and they are less impacted by minor genomic variations. However, false-negative results in serological tests are likely during the early acute phase of the disease, so molecular methods are preferred [23].

Actually, a number of nested reverse-transcription polymerase chain reaction (nested RT-PCR) and real-time quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) for CCHFV RNA detection have been described [10,24–32]. However, RT-qPCR platforms and associated PCR commercial kits are still expensive and technically complex, thus limiting their use for point-of-care diagnosis. To overcome such drawbacks, isothermal nucleic acid amplification assays have been widely developed and improved for use, such as point-of-care testing [33,34], specially loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay [35]. In combination with a reverse transcriptase, LAMP can also be used for RNA amplification (RT-LAMP) [36]. RT-LAMP has several advantages making it attractive for diagnosis of infectious diseases, such as rapidity, high specificity and sensitivity. The effectiveness of this method has already been demonstrated for the detection of a variety of pathogenic RNA viruses, for example, swine flu H1N1 [37], chikungunya virus [38,39], West Nile virus [40,41], and Japanese encephalitis virus [42], as well as those causing haemorrhagic fevers such as dengue virus [43–45], Ebola virus [46,47], Rift Valley virus [48–50], and yellow fever virus [51]. Regarding CCHFV detection, some RT-LAMP assays have also been developed [52–54]. However, none of these RT-LAMP assays has been able to detect different CCHFV genotypes.

In the present study, we developed a novel RT-LAMP assay for colorimetric and real-time potential detection of different CCHFV genotypes. We evaluated RT-LAMP in clinical samples from patients with CCHF notified in Spain in 2020 and 2021. Additionally, for the first time, RT-LAMP was tested and compared with RT-qPCR in the detection of CCHFV RNA in plasma and urine samples.

2. Results

2.1. RT-PCR F3-B3 Verification of Target and Sensitivity

The expected RT-PCR 212 bp product from CCHFV RNA was successfully obtained using outer primers F3 and B3. Regarding the sensitivity, the minimum amount of CCHFV RNA detectable by one-step RT-PCR F3-B3 was 50 pg/ μ L (Figure 1A). Subsequent sequencing results of the 212 bp amplicon showed partial 98.08% identity with Daral 2012 strain (GenBank KF793333) of African origin (Mali) belonging to African genotype III (Figure 1B).

2.2. Establishing the RT-LAMP Assay: Sensitivity and Specificity

Colorimetric RT-LAMP. Visual detection of RT-LAMP assays is shown in Figure 2A. The complete set of six primers designed for RT-LAMP worked well using the reaction conditions tested, and the successful amplification of CCHFV RNA could be clearly visualised by the naked eye by inspecting the colour change: positive results turned green, whereas non-template control remained orange as negative. The sensitivity of colorimetric RT-LAMP was 50 fg/ μ L, 10^3 times more sensitive than the RT-PCR using outer primers F3-B3 (Figure 2(A1)). Regarding the specificity, only CCHFV RNA was amplified (green tubes) and RNA samples from other viruses tested were never amplified (orange tubes), demonstrating no cross-amplification (Figure 2(A2)).

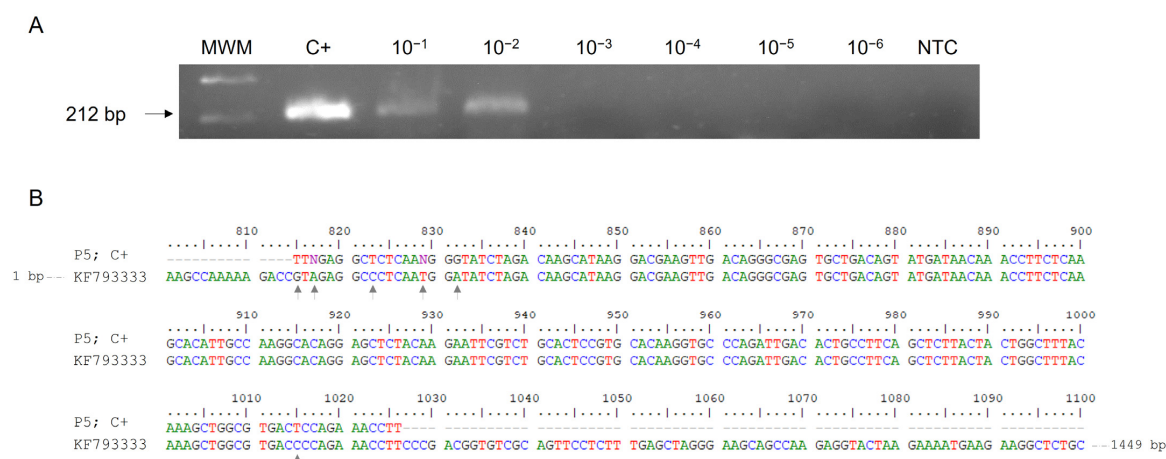


Figure 1. RT-PCR verification, sensitivity and sequencing using outer primers F3 and B3 for CCHFV RNA amplification. **(A)** Verification and detection limit of RT-PCR F3-B3. Lane MWM, molecular weight marker (100 bp Plus Blue DNA Ladder); lane C+, RNA isolate from patient P5 used as positive control; lanes 10⁻¹–10⁻⁶, 10-fold serial dilutions of C+; lane NTC, non-template control (RNase-free water instead of RNA). **(B)** Comparison of 212 bp amplicon obtained (P5; C+) with partial sequence of Daral 2012 strain (GenBank KF793333). Grey arrows indicate different nucleotides in the sequence.

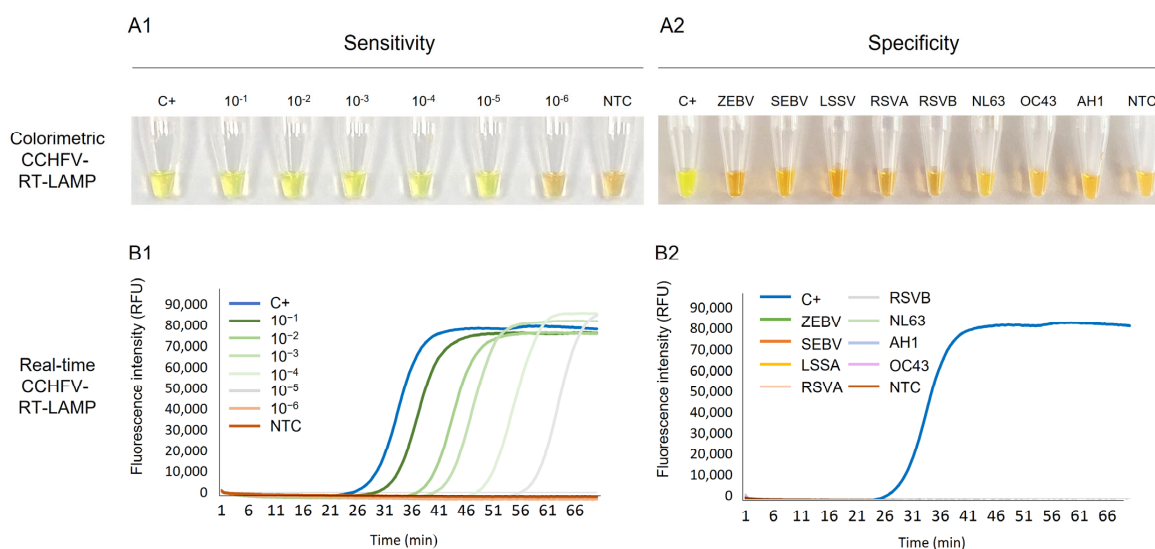


Figure 2. Establishing the RT-LAMP assay: sensitivity and specificity assessments for CCHFV RNA detection. **(A1)** Colorimetric RT-LAMP verification and sensitivity assessment. Lane C+, RNA-positive control (5 ng/μL); Lanes 10⁻¹ to 10⁻⁶: 10-fold dilutions of CCHFV RNA sample used as positive control (C+); lane NTC, non-template control (ultra-pure water as template). **(A2)** Specificity assessment of colorimetric RT-LAMP. Lane C+, RNA-positive control; lanes ZEBV, SEBV, LSSV, RSVA, RSVB, NL63, OC43 and AH1: RNA from haemorrhagic viruses (Zaire Ebola virus, Sudan Ebola virus, Lassa virus) and other respiratory viruses (respiratory syncytial virus A, respiratory syncytial virus B, coronavirus NL63, coronavirus OC43 and influenza A H1, respectively). Lane NTC, non-template control (ultra-pure water as template). **(B1)** Real-time RT-LAMP verification and sensitivity assessment. Lane C+, RNA-positive control (5 ng/μL); Lanes 10⁻¹ to 10⁻⁶: 10-fold dilutions of CCHFV RNA sample used as positive control (C+); lane NTC, non-template control (ultra-pure water as template). **(B2)** Specificity assessment of real-time RT-LAMP. Lane C+, RNA-positive control; lanes ZEBV, SEBV, LSSV, RSVA, RSVB, NL63, OC43 and AH1: RNA from haemorrhagic viruses (Zaire Ebola virus, Sudan Ebola virus, Lassa virus) and other respiratory viruses (respiratory syncytial virus A, respiratory syncytial virus B, coronavirus NL63, coronavirus OC43 and influenza A H1, respectively). Lane NTC, non-template control (ultra-pure water as template). RFU, relative fluorescence units.

Real-time RT-LAMP. Detection of CCHFV RNA by real-time RT-LAMP is shown in Figure 2B. We also obtained amplification of CCHFV RNA, as for colorimetric RT-LAMP, with a time to positivity (Tp) at 24 min. When testing 10-fold serial dilutions of the RNA sample used as C+, the analytical sensitivity was 50 fg/ μ L, identical to that obtained in colorimetric RT-LAMP assay. As can be observed, the higher the RNA dilution, the longer the amplification time (Figure 2(B1)). Furthermore, no RNA isolates from other viruses were amplified, thus indicating the high specificity of the established RT-LAMP assay (Figure 2(B2)).

2.3. Clinical Sample Testing by CCHFV-RT-LAMP

Figure 3 shows the detection of CCHFV RNA in clinical samples by colorimetric (Figure 3A) and real-time CCHFV-RT-LAMP (Figure 3B). A positive result was obtained in all samples tested; negative control (NTC) did not amplify. The RNA isolate used as positive control (P5; C+) was amplified with identical Tp value as in the set-up test (24 min) and with the same relative fluorescence units (RFU) values (approx. 75,000 RFU) in fluorescence intensity measurements. Real-time RT-LAMP detected CCHFV RNA in patients' samples with the following Tp and RFU values, respectively: P1 (29 min; 90,000 RFU); P2 (38 min; 80,000 RFU); P3 (18 min; 50,000 RFU); P4 (41 min; 50,000 RFU).

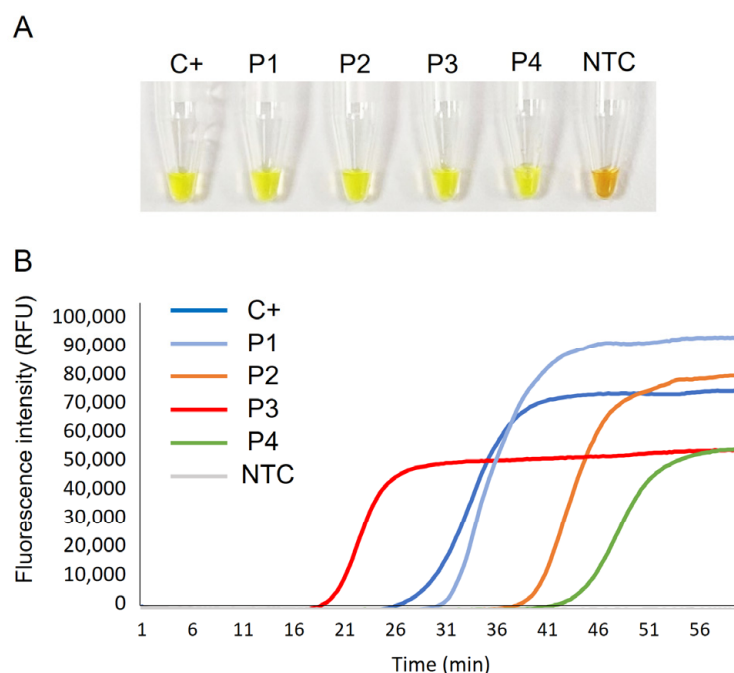


Figure 3. Clinical sample testing by CCHFV-RT-LAMP. (A) Colorimetric RT-LAMP results by SYBR green end-point addition. (B) Real-time RT-LAMP results showing EvaGreen 20 $\times$ fluorescence signal over time. C+, RNA isolate from an infected patient used as positive control (P5); P1–P4, RNA isolates from patients with CCHF; NTC, non-template control. RFU, relative fluorescence units.

In addition, plasma and urine samples from patient P4 were analysed by both RT-qPCR and colorimetric RT-LAMP over several days (days 1, 3, 6, 8 and 13) during the patient's admission at Hospital Universitario de Salamanca (HUS), Salamanca, Spain (Figure 4). In plasma samples, RT-qPCR positive results were obtained at days 1 and 3, whereas colorimetric RT-LAMP was able to detect CCHFV RNA at days 1, 3, 6 and 8 (Figure 4A). In urine samples, only an RT-qPCR result was obtained at day 3, whereas colorimetric RT-LAMP detected CCHFV RNA at days 8 and 13 of convalescence (Figure 4B).

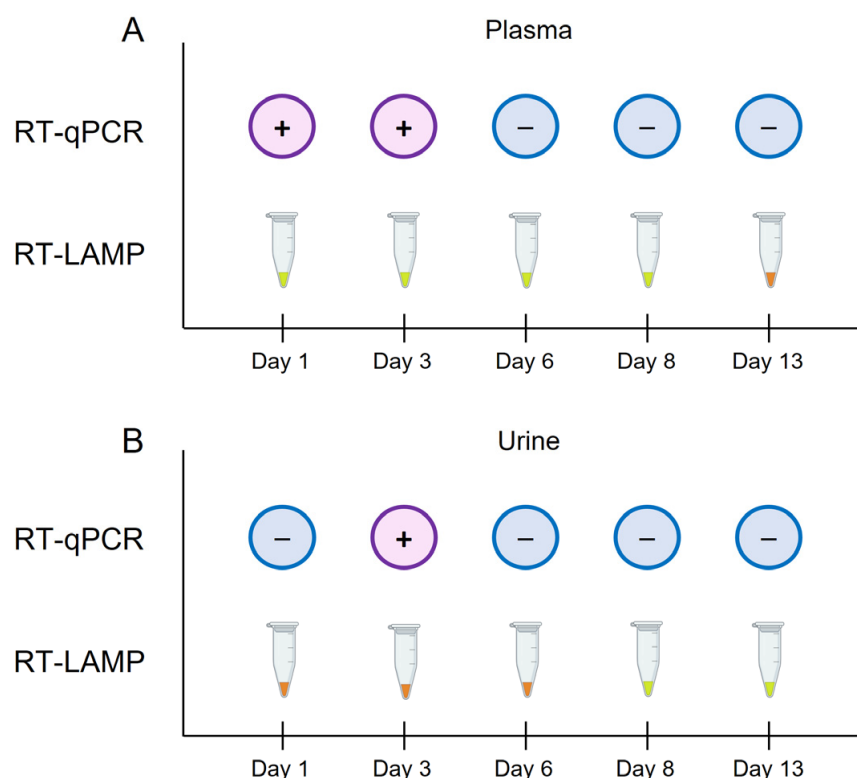


Figure 4. Schematic representation of the comparison of the results obtained by RT-qPCR and colorimetric RT-LAMP in plasma and urine samples from patient P4 over days 1, 3, 6, 8 and 13, during the patient's admission at hospital. (A) Results obtained by RT-qPCR vs. RT-LAMP in plasma samples. (B) Results obtained by RT-qPCR vs. RT-LAMP in urine samples. For RT-qPCR, the + symbol in a purple circle indicates a positive result; the – symbol in a blue circle indicates a negative result. For colorimetric RT-LAMP, the results were visually detected by colour change: green/positive; orange/negative.

2.4. DNA Sequencing and Phylogenetic Analysis

The CCHFV S-segment sequences obtained from patients P1 (219 bp), P2 (220 bp) and P3 (202 bp) showed 98%, 99% and 99% identity, respectively, with sequence HQ378179 (Sudan AB1-2009 strain) from Sudan. The three sequences fall in reported African III genotype. The CCHFV S-segment obtained from patient P4 (204 bp) showed 98% identity with sequence DK133507 (Kosovo Hoti strain) from Kosovo. The phylogenetic analysis grouped this sequence in the European V genotype. As mentioned above, S-segment sequence of 212 bp from patient P5 showed partial 98.08% identity with Daral 2012 strain (GenBank KF793333) of African origin (Mali) belonging to African genotype III. All the sequences obtained in this study were deposited in GenBank under the following accession numbers: P1, OP776634; P2, OP776632; P3, OP776631; P4, OP776633; P5, OP889253. The phylogenetic analysis of CCHFV S-segment sequences is shown in Figure 5.

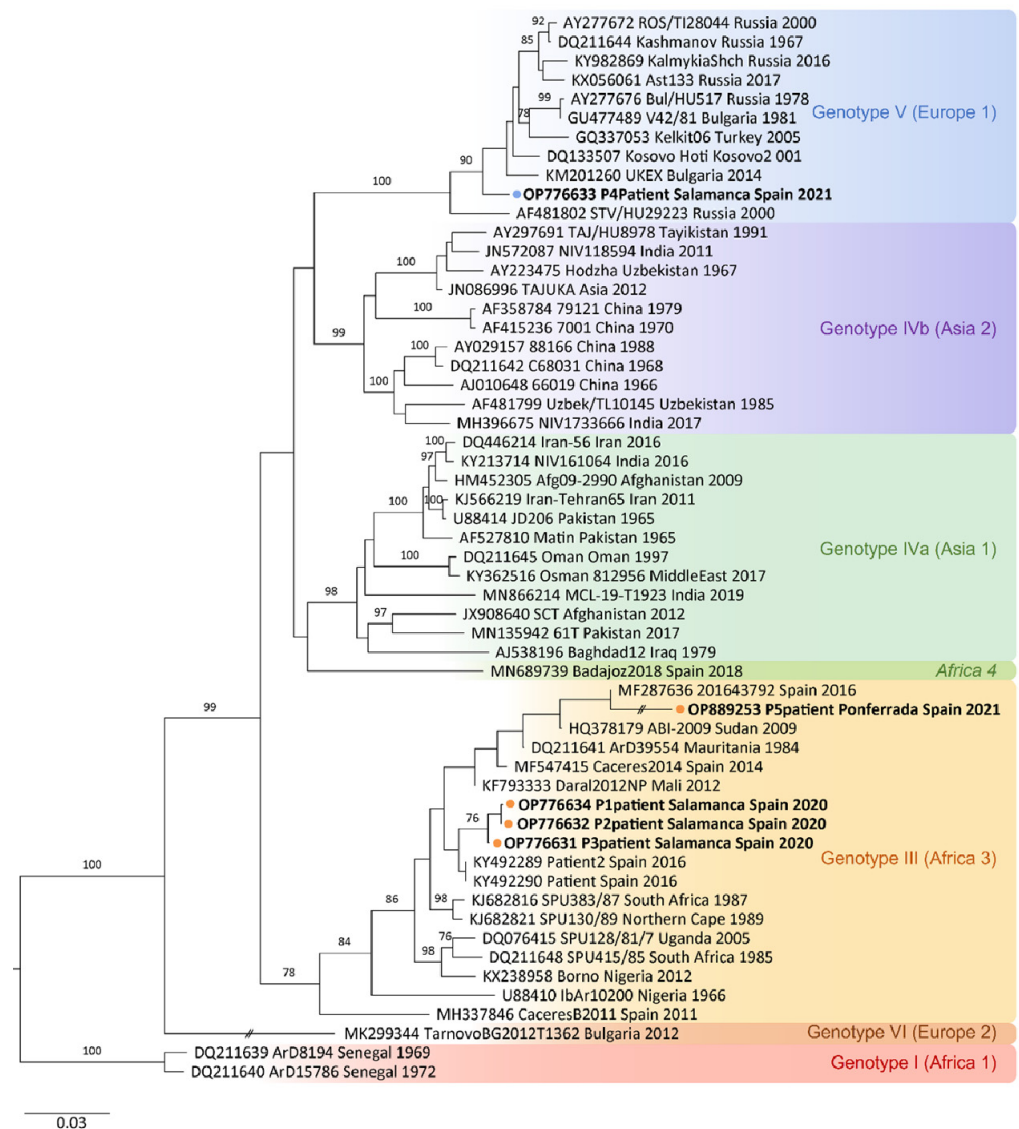


Figure 5. Phylogenetic tree showing the positions of the 51 S-segment sequences used for the CCHFV-RT-LAMP design and the newly identified CCHFV RNA sequences from patients' samples included in this study. Phylogenetic tree constructed using the neighbour-joining method based on partial (200 nt) sequences of the virus small segment. Numbers in branches indicate bootstrap values for the groups; values < 75 are not shown. An interrupted branch (//) indicates its length has been reduced to half. Dots (orange for P1, P2, P3 and P5; blue for P4) and bold letters indicate patients analysed in this study and named by GenBank accession number, locality sampling site, geographic origin, and sampling year; other sequences are indicated by GenBank accession number, strain, geographic origin, and sampling year. Genotypes are indicated by roman numerals and clade nomenclature indicated in brackets, using nomenclature published by Carrol et al. [9] and Chamberlain et al. [55]: I, West Africa (Africa 1); III, South and West Africa (Africa 3); IV, Middle East/Asia, divided in two groups corresponding to groups Asia1 y Asia 2; V, Europe/Turkey (Europe 1); VI, Greece (Europe 2). Italics indicate new lineage, Africa 4 described by Negredo et al. [19]. Scale bar indicates nucleotide substitution per site.

3. Discussion

At present, CCHFV has been detected circulating in tick species and animals in western, southern, and central areas of Spain, showing an increasing spread of the virus to south-western Europe and, consequently, an increase in the risk of cases of CCHF. In recent years, 12 autochthonous cases have been reported in Spain, including four fatal cases. The

absence of effective treatments and vaccines against CCHF, together with the wide spread of the virus, the mode of transmission and the severity of the disease, make CCHF a major threat to global health [56]. Because of this, a rapid and sensitive diagnosis of the disease is essential. Nucleic acid amplification tests (mainly RT-qPCR) combined with serological methods are the most applied for diagnosis of CCHF in reference laboratories [57,58]. However, due to the high genetic diversity of CCHFV, more studies are needed to evaluate the sensitivity of serological methods and the capability of RT-qPCR protocols to detect all known virus lineages [32]. Despite there being several commercial tests for PCR and serology available, most international labs use in-house assays, probably due to an investment in tests developed from regional CCHFV strains and because commercial tests are expensive or not available to international customers [58]. Moreover, RT-qPCR methods have the disadvantages of requiring very expensive reagents and equipment and technically qualified personnel to operate them. Therefore, the use of a rapid, sensitive and easy-to-perform isothermal molecular test such as RT-LAMP would be very useful in low-resource settings or field diagnostics in rural and remote regions affected by CCHFV.

Considering the high genetic variability and reassortment due to the trisegmented genome (S, M, L) of CCHFV, primer design for molecular detection of CCHFV becomes a challenge. RT-PCR assays tend to be lineage-specific for regional circulating strains, so there is an urgent need for pan-lineage sensitive diagnostics [56]. Hence, in our study, with the aim of improving molecular diagnostics of CCHF, a novel RT-LAMP assay was developed to detect RNA from all potential lineages of CCHFV. Furthermore, its performance was evaluated in clinical samples from patients with CCHF and compared with that of RT-qPCR in plasma and urine samples.

To design the set of primers for our RT-LAMP, a total of 51 available sequences of the S segment of the CCHFV genome from diverse virus strains or isolates with different geographical origin were retrieved from databases. We used this target because it is the most conserved region of the CCHFV genome across geographical isolates [58]. A consecutive multiple 'intra and inter-geographical' alignment of the selected sequences generated a 1672 bp global consensus sequence that showed 92.8% identity with the sequence of the S segment of CCHFV strain C-68031 (GenBank DQ211642), with origin in China [59]. This global consensus sequence was selected *in silico* to design a set of primers, and a refinement strategy with 'wobble' bases was applied to compensate for target global consensus sequence variability in order to detect the highest number of CCHFV variants. For previous RT-LAMP primer designs to target the S segment, other authors used only S-segment sequences specific for regional circulating strains from Sudan [52] or Russia [53], thus theoretically reducing the possibility of detecting other likely circulating genotypes.

Initially, we tried to establish the proper operation, sensitivity, and specificity of both RT-PCR (using the outer primers F3-B3) and colorimetric RT-LAMP assay (using the set of four primers) in targeting CCHFV RNA of a patient isolate used as amplification control (P5; C+). RT-PCR F3-B3 yielded the expected 212 bp in length fragment, thus confirming the correct target, and both molecular assays were specific for CCHFV because no cross-reactivity was observed when RNA from other viruses, including haemorrhagic viruses such as Zaire Ebola virus, Sudan Ebola virus and Lassa virus were used as template.

Regarding sensitivity, the limit of detection using colorimetric RT-LAMP (50 fg/ μ L) resulted up to 10^3 times lower than that obtained by RT-PCR F3-B3 (50 pg/ μ L). The higher sensitivity usually obtained by LAMP assays compared to PCR reactions is well known [60]. Furthermore, these results are in line with those of Osman et al. [52] in the development of RT-LAMP for the detection of CCHFV, in which the sensitivity obtained by RT-PCR using the outer primers was 100 times lower than that obtained by RT-LAMP using the set of four primers. It should be noted that the sensitivity of our RT-LAMP was lower than that obtained by Osman et al. [52] for Sudanese strains of CCHFV. This may be due to the fact that our RT-LAMP design was based on degenerate primers, which could potentially decrease the sensitivity of the assay by forming mismatches with templates. The major challenge for virus detection by LAMP is the high genetic diversity of some

viral genomes, which exist in the forms of genotypes, subtypes, strains, and/or quasi-species [61–63]. Although a strategy of combining multiple degenerate primers together has been developed for broad-spectrum detection of various genotypes of genetically diverse viruses (e.g., DENV, HIV-1, influenza A enteroviruses), the low detection efficiency of LAMP for several viral variants remains unresolved [64]. As it is virtually impossible to detect all variants in one LAMP assay, underestimation of viral load may occur using the RT-LAMP method, especially for highly variable RNA viruses [64,65]. Increasing degeneracy raises the possibility of decreasing efficiency, but increases the likelihood of finding unknown divergent variants of a sequence family. This dual behaviour must be taken into account, and the design of degenerate primers must be a compromise between specificity and coverage (sensitivity). With this in mind, our RT-LAMP to detect CCHFV achieved very satisfactory sensitivity (50 fg/ μ L) while potentially allowing the detection of a larger number of viral variants. It is important to note here that the sensitivity of the assay could possibly have been increased if a temperature gradient had been tested in our RT-LAMP. Future trials will be directed towards such tests.

The sensitivity and specificity of colorimetric RT-LAMP were corroborated in real-time testing by performing the assay on a portable device with fluorescence readout. Subsequently, the efficacy of both assays was evaluated using RNA isolates from CCHF patients confirmed by RT-qPCR. All samples were successfully amplified showing different time to positivity (Tp) and relative fluorescence unit (RFU) values. Unfortunately, as we did not know the cycle threshold (Ct) values of RT-qPCR and did not have a standard RNA quantification to use in the RT-LAMP assay, it was not possible to perform a comparison of speed and sensitivity between RT-qPCR and RT-LAMP in the analysis of patient samples. Most authors use as threshold in LAMP assays the Tp value to indicate the occurrence of a positive or negative result by similarity, although not exactly, to the Ct of a qPCR. It has been reported that RT-qPCR amplification Ct values and RT-LAMP amplification Tp values are equivalent for a given amplified viral RNA concentration [66]. In RT-qPCR studies, a correlation between CCHFV RNA load and disease progression has been reported, with a worse clinical outcome in patients with a high viral load and viral clearance being considered the most important indicator of survival in cases of CCHF [57,67,68]. Interestingly, in our study, the only patient with a fatal outcome (patient P3) showed the shortest time to positivity (Tp = 18 min) in real-time RT-LAMP, so it was probably the sample with the highest viral load. In our previous experience working on RT-LAMP amplification of RNA viruses, such as SARS-CoV-2, the Tp values in positive samples were even lower than the Ct values obtained in RT-qPCR, clearly indicating the high efficiency of the RT-LAMP assay in viral RNA amplification [69]. Notwithstanding the above, we are aware of the limitation in this study of not having real-time PCR Ct values available, so it was not possible to calculate the corresponding standard lines for the calculation of RNA in copies per reaction.

Regarding genetic variability, sequencing of amplicons obtained by RT-qPCR from patients P1, P2, P3, and P4 enabled us to identify different genotypes on the basis of their S-segment sequences. On one hand, S-segment sequences from patients P1, P2 and P3 were found to belong to the African III genotype. In Spain, it is supposed that the African III genotype was introduced by migratory birds from West Africa [70] and it has been demonstrated as the most common genotype circulating in ticks [11–14]. Of interest, genotype III was also demonstrated in the first autochthonous CCHF case reported in Spain [10]. On the other hand, the phylogenetic analysis grouped the CCHFV S-segment sequence obtained from patient P4 with viruses of the European V genotype, a recently described genotype in ticks in Spain [14] and more recently in a retrospective case of a Spanish patient with CCHF, suggesting that CCHFV is an identifiable cause of febrile illness of unknown origin and a possible establishment of a transmission cycle of CCHFV genotype V in this country [20]. The S-segment sequence of 212 bp obtained from patient P5 (C+) by conventional RT-PCR using outer primers F3-B3 was also found to belong to African genotype III. Therefore, according to the sequencing results, our RT-LAMP allowed for the amplification of two different CCHFV genotypes in patients' samples: the African

III genotype and the European V genotype. This is evidence that RT-LAMP based on degenerated primers is well designed to detect different CCHFV genotypes circulating in Spain.

With regard to specimens for molecular detection of CCHFV, the available data are limited to a small number of patients and detailed comparisons of sensitivity between molecular methods for diagnosis in different sample types are not possible, in particular of urine versus blood samples (serum, plasma or whole blood). In our study, we had the opportunity to compare RT-qPCR and colorimetric RT-LAMP analysis of plasma and urine samples from patient P4 collected at days 1 to 13 during admission at the University Hospital of Salamanca. In plasma samples, RT-qPCR was positive on the first and third days, whereas RT-LAMP remained positive up to day 8. It has been reported that CCHFV RNA can be detected by RT-qPCR up to the 18th day of illness in serum samples, with most successful results during the first 5 days after onset of symptoms [32]. In some cases, it has even been detected up to 36 days of infection [71]. However, to date, no results have been reported for the molecular detection of CCHFV RNA in plasma samples during the course of infection. According to our results, RT-LAMP should be more sensitive than RT-qPCR in detecting viral RNA in plasma samples from CCHFV patients. In urine samples, only an RT-qPCR result was obtained at day after patient admission; however, our RT-LAMP detected CCHFV RNA at day 8 and day 13 of convalescence. Previous studies have also reported the persistence of viral RNA in urine samples despite serum clearance [71,72] and that viral loads in urine samples are similar to those encountered in blood [73]. To our knowledge, our work is the first report of detection of CCHFV RNA by RT-LAMP in urine of a patient. As highlighted in other studies, the presence of CCHFV RNA in urine is an important observation for viral pathogenesis and transmission and may have implications for public health. In addition to standard precautions, additional contact precautions for CCHF inpatients may be considered, even when haemorrhage is not present [71,72]. Nonetheless, further studies are needed to determine the diagnostic applicability of urine, the frequency of urinary excretion and its duration during convalescence. The limited number of cases of CCHFV in Spain and the difficulty in obtaining more clinical samples for the study should be highlighted. In addition, it should be noted that better access to clinical samples of CCHFV patients for diagnostic validation would help to accelerate the development of new tests.

4. Materials and Methods

4.1. Ethics Statement

The study protocol was approved by the Clinical Research Ethics Committee of Investigation with Drugs of Hospital Universitario de Salamanca (HUS), Salamanca, Spain (CEIMC PI 9109/2017). All procedures described were carried out in accordance with the ethical standards described in the Revised Declaration of Helsinki of 2013. All data from patients were anonymised.

4.2. CCHFV RNA-Positive Control and Patients' RNA Samples

In this study, five RNA samples obtained from five patients diagnosed with CCHF in Spain were used. Four cases (patients P1, P2, P3, and P4) were diagnosed at Hospital Universitario de Salamanca (HUS), Salamanca, Spain in 2020 to 2021. Another case (P5) was diagnosed at Hospital del Bierzo (Ponferrada, León, Spain) in June 2021. At the time, the diagnosis of the five CCHF cases was confirmed by PCR methods designed to amplify two different targets of the CCHF viral genome at the Arbovirus Laboratory, National Microbiology Center, Institute of Health Carlos III, Madrid, Spain, as described by Negro et al. [10]. The main data of patients included in the study are shown in Table 1.

Table 1. Main data of Crimean–Congo haemorrhagic fever patients included in this study. P1–P5, patient samples; C+, positive control.

	P1	P2	P3	P4	P5 (C+)
Sex	Male	Male	Male	Male	Female
Age (years)	70	54	69	59	30
Date	June 2020	July 2020	August 2020	April 2021	June 2021
Tick bite	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Habitat	Rural	Rural	Rural	Rural	Rural
Fever	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Any bleeding symptomatology	Yes	No	Yes	No	Yes
<i>Exitus letalis</i>	No	No	Yes	No	No

The availability of clinical samples of patients diagnosed of CCHF is very limited. Thus, the first RNA isolate we had access to was from P5, so it was this sample that we used to assess the operation of the RT-LAMP method for amplification of CCHFV RNA (hereafter, positive control; C+). RNA was measured by using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, NC, USA) and then diluted with RNase-free water to a final concentration of 5 ng/μL. Serial 10-fold dilutions of the C+ in RNase-free water (ranging from $1 \times$ to 10^{-6}) were prepared and stored at -80°C until use. The RNA sample thus prepared was used as C+ in all amplification reactions and for assessing sensitivity of molecular assays.

Later, we were also provided with RNA samples from patients P1–P4 and they were then included in the study. Additionally, from P4 we were provided with RNA from both plasma and urine samples collected on days 1, 3, 6, 8 and 13 during their admission to the HUS. In this case, plasma and urine samples were handled and inactivated in biosafety level 3 (BSL-3) laboratory (I + D + I Building Facilities, University of Salamanca) so that they could then be handled at lab under BSL-1 conditions. Subsequent RNA extraction was carried out using the NZY Viral RNA Isolation Kit (NZYTECH, Lisbon, Portugal) following manufacturer instructions. All RNA samples were kept at -80°C until further analysis.

4.3. Design of Reverse-Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay (RT-LAMP) for CCHFV

Sequence Selection and Primer Design for CCHFV-RT-LAMP

Sequence selection. Segment S of CCHFV was preferred as the amplification target for the primer design because it is the one on which most phylogenetic analysis studies have focused. A total of 51 sequences corresponding to a linear single-strand RNA complete or partial sequence in the CCHFV segment S were selected and retrieved from GenBank to be used for the design of primers. The 51 sequences were divided into three groups according to the geographic origin of the isolates, as follows: Africa ($n = 11$), Asia ($n = 24$) and Europe ($n = 16$) (see Table 2). Subsequently, a multiple alignment using ClustalW [74] into each group resulted in a consensus sequence, thus obtaining three different ‘geographical’ consensus sequences referred to as ‘African consensus’ (AFC), ‘Asian consensus’ (ASC) and ‘European consensus’ (EUC). Next, the AFC, ASC and EUC sequences were aligned with each other using ClustalW and a 1672 base pair (bp) global consensus (GC) sequence was generated. A scheme of the process of obtaining the GC sequence is shown in Figure 6A. Finally, a BLASTN search and alignment analysis [75] on the NCBI database resulted in a final GC sequence with 92.8% similarity to the sequence reported for the S segment for the CCHFV strain C-68031 (GenBank DQ211642). In addition, no regions of similarity between this GC sequence and other sequences reported for humans or possible human pathogens were detected.

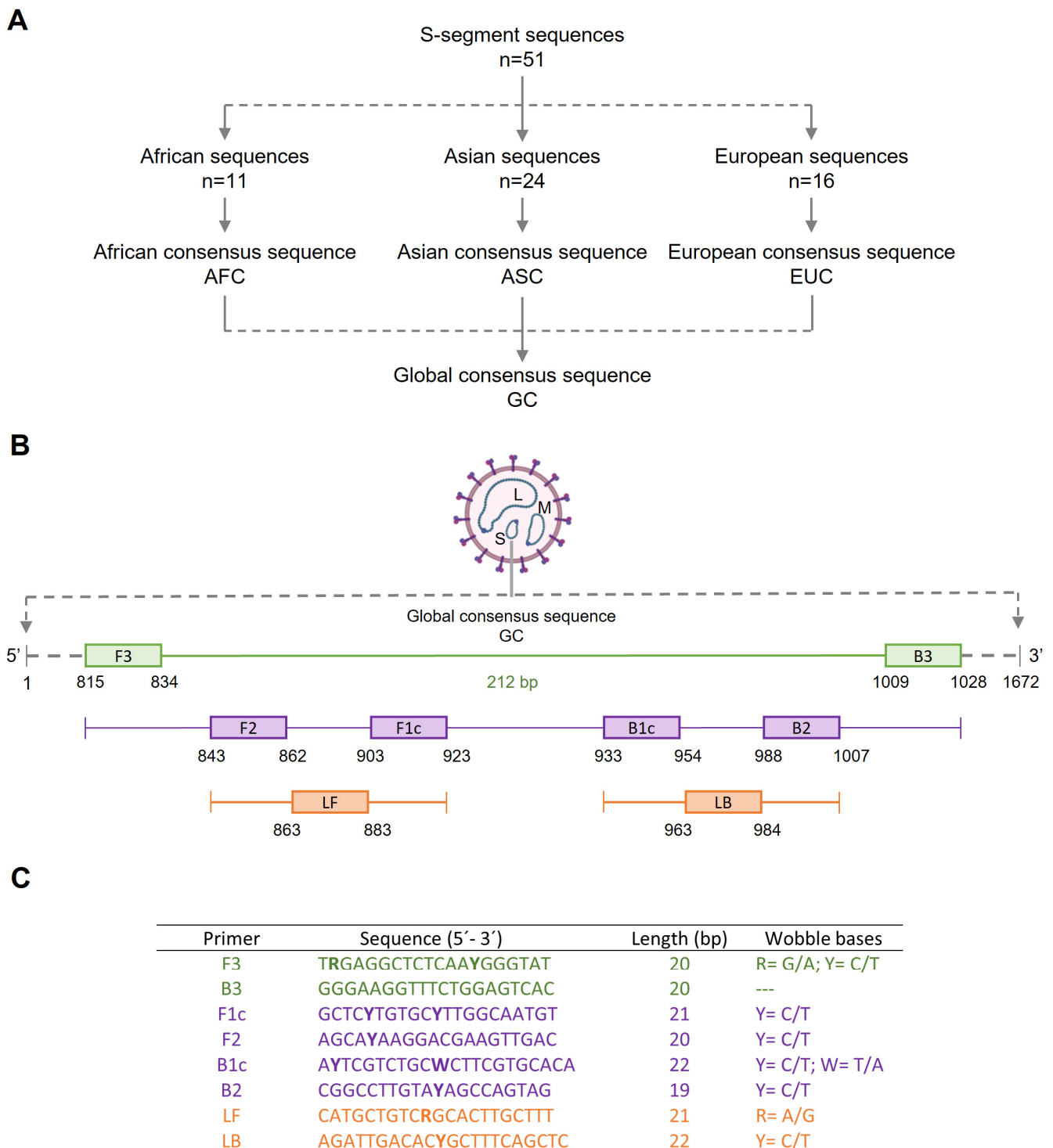


Figure 6. Schematic representation of the process for the design of reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification assay (RT-LAMP) for CCHFV. (A) Outline for global consensus (GC) sequence selection based on several linear single-strand RNA S-segments from CCHFV. (B) Outline of location of set of primers in the partial GC sequence used as target. (C). Sequences of the RT-LAMP primers finally selected. F3, forward primer; B3, backward primer; F1c + F2 sequences: FIP, forward inner primer; B1c + B2 sequences: BIP, backward inner primer; LF, loop forward primer; LB, loop backward primer. Bold letter codes (R, Y or W) are used to represent the combination of two different nucleotide phosphoramidites blended at equimolar ratios prior to coupling at that position in the sequence.

Primer design. RT-LAMP primers to amplify RNA of CCHFV were designed based on the 1672 bp GC sequence using the PrimerExplorer V5 software program (<https://primerexplorer.jp/e/>, accessed on 20 January 2022). A number of potential LAMP primer sets were generated and further refinement in design was manually developed following the instructions described in “A guide to LAMP primer designing” [76]. The locations and target sequence are shown in Figure 6B. When comparing multiple sequences in generating the GC sequence, we found that the alignment sometimes revealed insufficient consensus to accommodate a single oligonucleotide for use as a primer. Occasionally, only one or two nucleotides did not match. To design primers for these regions, we opted to introduce a degenerate site, or ‘wobble’, to compensate for target sequence variability. The set of primers finally selected with their corresponding wobble bases is indicated in Figure 6C.

Table 2. Crimean–Congo haemorrhagic fever virus S-segment sequences retrieved from GenBank used in this study grouped by geographical origin of the strains/isolates to obtain a global consensus sequence for designing a set of primers for reverse-transcription loop-mediated isothermal assay for the detection of Crimean–Congo haemorrhagic virus RNA. NA, not available. “*” means: Not identified.

Origin (n)	Genbank Accession	Strain/Isolate	Location, Isolation Year	Source of Isolate	Reference
African sequences (n = 11)	DQ076415	SPU128/81/7	Uganda (Semunya)	Tick *	[55]
	DQ211639	ArD8194	Senegal, 1969	<i>H. truncatum</i>	[59]
	DQ211640	ArD15786	Senegal, 1972	Goat	[59]
	DQ211641	ArD39554	Mauritania, 1984	<i>H. marginatum</i>	[59]
	DQ211648	SPU415/85	South Africa, 1985	Human	[59]
	HQ378179	AB1-2009	Sudan (Abyei), 2009	Human	[23]
	KF793333	Daral 2012 NP	Mali (Daral), 2012	<i>Hyalomma</i>	[77]
	KJ682816	SPU383/87	South Africa, 1987	Human	[78]
	KJ682821	SPU130/89	Northern Cape, 1989	Human	[78]
	KX238958	NA	Nigeria (Borno), 2012	Human	NA
	U88410	IbAr10200	Nigeria, 1966	NA	NA
Asian Sequences (n = 24)	AF358784	79121	China, 1979	NA	NA
	AF415236	7001	China, 1970	NA	NA
	AF481799	Uzbek/TI10145	Uzbekistan, 1985	Human	[79]
	AF527810	Matin	Pakistan, 1965	NA	NA
	AJ010648	66019	China, 1966	NA	[80]
	AJ538196	Baghdad-12	Iraq, 1979	Human	[80]
	AY029157	88166	China, 1988	NA	NA
	AY223475	Hodzha	Uzbekistan, 1967	Human	[80]
	AY297691	TAJ/HU8978	Tajikistan, 1991	Human	[81]
	DQ211642	C-68031	China, 1968	Sheep	[59]
	DQ211645	Oman	Oman, 1997	Human	[59]
	DQ446214	Iran-56	Iran, 2017	Human	NA
	GQ337053	Turkey-Kelkit06	Turkey, 2005	Human	[82]
	HM452305	Afg09-2990	Afghanistan, 2009	Human	[83]
	JN086996	TAJUK	Asia, 2012	NA	[28]
	JN572087	NIV118594	India, 2011	<i>H. antolicum</i>	[84]
	JX908640	SCT	Afghanistan, 2012	Human	[85]
	KJ566219	Iran-Tehran65	Iran, 2011	Human	[86]
	KY213714	NIV161064	India, 2016	Human	[87]
	KY362516	Oman 812956	Middle Eastern, 2017	Human	NA
	MH396675	NIV1733666	India	Human	NA
	MN135942	61T/Pakistan	Pakistan, 2017	Tick	[88]
	U88414	JD 206	Pakistan, 1965	NA	NA
	MN866214	MCL-19-T-1923	India, 2019	Human	[89]

Table 2. Cont.

Origin (n)	Genbank Accession	Strain/Isolate	Location, Isolation Year	Source of Isolate	Reference
European sequences (n = 16)	MH337846	Cáceres/B 2011	Spain, 2011	<i>H. lusitanicum</i>	[13]
	KX056061	Ast133	Russia, 2017	Human	NA
	KY982869	Kalmykia_Shch_2_2016	Russia, 2016	Human	[90]
	MK299344	Malko Tarnovo-BG2012-T1362	Bulgaria, 2012	<i>R. bursa</i>	[91]
	MN689739	Badajoz 2018	Spain, 2018	Human	NA
	MF547415	Cáceres 2014	Spain, 2014	<i>H. lusitanicum</i>	[12]
	DQ133507	Kosovo Hoti	Kosovo, 2001	Human	[26]
	KM201260	UK ex	Bulgaria, 2014	Human	[92]
	GU477489	V42/81	Bulgaria, 1981	Human	[93]
	AY277676	NA	Russia	Human	NA
	AY277672	ROS/TI28044	Russia, 2000	<i>H. marginatum</i>	NA
	DQ211644	Kashmanov	Russia, 1967	Human	[59]
	AF481802	STV/HU29223	Russia, 2000	Human	[79]
	KY492290	patient1	Spain, 2016	Human	[10]
	KY492289	patient2	Spain, 2016	Human	[10]
	MF287636	201643792	Spain, 2016	Human	[8]

4.4. RT-PCR Using Outer Primers F3 and B3

The outer RT-LAMP primers F3 and B3 were firstly tested for the detection of CCHFV RNA by RT-qPCR to verify whether the expected in silico 212 bp GC sequence was amplified. For RT-qPCR, the one-step NZY RT-qPCR green kit ROX (NZYtech, Lda., Lisbon, Portugal) was used following manufacturer instructions. The reactions were carried out in 20 µL reaction mixture containing 10 µL of ROX master mix (2x), 0.8 µL 10 µM forward primer (F3) and 10 µM reverse primer (B3), 0.8 µL NZYRT mix, 2.6 µL nuclease-free water and 5 µL purified RNA template (P5; C+). The cycling parameters were as follows: reverse transcription for 20 min at 50 °C, for 15 min at 95 °C as polymerase activation, 40 cycles of 15 s of denaturation at 95 °C, for 1 min at 60 °C as annealing/extension. The reactions were performed in a PCRmax Eco48 real-time PCR system (PCRmax, Beacon Road, Stone, Staffordshire, UK). Subsequently, 3–5 µL of RT-qPCR amplicons was subjected to 1.5% agarose gel electrophoresis using gel loading buffer with GreenSafe Premium DNA stain (NZYtech, Lda., Lisbon, Portugal; MB13201) and visualised under UV light. Negative controls (RNase-free water instead RNA template) were included in all trials.

The sensitivity of the RT-qPCR using the outer primers F3 and B3 was also assayed to establish the detection limit of CCHFV RNA using those 10-fold serial dilutions of C+ prepared mentioned above.

4.5. Establishing the RT-LAMP Assay for CCHFV Detection

4.5.1. Conventional Colorimetric CCHFV-RT-LAMP

The set of primers designed was first evaluated for colorimetric visualisation in RT-LAMP reactions mixtures (25 µL) containing: 1.6 µM FIP/BIP primers, 0.2 µM F3/B3 primers, 0.4 µM LF/LB primers, 0.4 µM of dNTPs, 6 mM MgSO₄, 1X Isothermal Amplification Buffer, 1 µL *Bst* polymerase 2.0 WarmStart (New England Biolabs Ltd., Ipswich, MA, USA) and 0.5 µL RTx Reverse Transcriptase (New England Biolabs Ltd., Ipswich, MA, USA), with 3 µL of template RNA (C+, for positive control; RNase-free water instead RNA for negative control). The RT-LAMP reactions were performed in 0.5-mL micro-centrifuge tubes by incubation in a heating block at 63 °C for 60 min followed at 80 °C for 10 min to stop the reaction. The RT-LAMP amplification results were visually inspected by adding 2 µL of 1:10 diluted 10,000× g concentration fluorescent dye SYBR Green I (Invitrogen, Waltham, MA, USA), in each reaction tube. Green fluorescence was observed in the successful RT-LAMP reaction and original orange in the negative reaction. The tubes were briefly centrifuged and carefully opened before adding the dye to avoid possible cross-contamination with amplified products.

4.5.2. Real-Time CCHFV-RT-LAMP

Real-time CCHFV-RT-LAMP was also attempted in a one-step RT-LAMP reaction using the same set of primers and mixtures as the conventional colorimetric assay, but in this case, with the addition of 0.40 μ L/tube of EvaGreen 20 $\times$ in water (Biotium, San Francisco, CA, USA) to the reaction mix before the reaction started to monitor the fluorescence over time. The RT-LAMP was carried out in 8-tube Genie Strips on a portable Genie III instrument (OPTIGENE Ltd., Horsham, UK) at 63 °C for 70–80 min followed by 10 min at 80 °C to stop the reaction. RT-LAMP assays were also performed with an initial step at 50 °C for 15 min to facilitate the reverse transcription followed by 50 min at 63 °C, and then heated at 80 °C for 10 min to stop the reaction.

4.5.3. Sensitivity and Specificity of CCHFV-RT-LAMP

Sensitivity and specificity were assessed in both colorimetric and real-time CCHFV-RT-LAMP. The analytical sensitivity of the set of primers in the detection of CCHFV was evaluated using the 10-fold serial dilutions of the C+ mentioned above. To determine the specificity, a BLAST local search and alignment analysis was carried out firstly in silico in GenBank online database (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>, accessed on 1 March 2022) against nucleotide sequences for other human-infecting viruses, such as Zaire Ebola virus (taxid 186538), Sudan Ebola virus (taxid 186540), Lassa mammarenavirus (taxid 11620), Marburg Marburgvirus (taxid 11269), yellow fever virus (taxid 11089), Rift Valley fever virus (taxid 11588), West Nile virus (taxid 11082), dengue virus (taxid 12637) and chikungunya virus (taxid 37124). In addition, the set of primers designed were cross-tested for specificity in both colorimetric and real time CCHFV RT-LAMP assays against a panel of 8 RNA isolates of several other viruses, including haemorrhagic viruses: Zaire Ebola virus (ZEBOV), Sudan Ebola virus (SEBOV) and Lassa virus (LSSV) (kindly provided by the National Center of Microbiology, Institute of Health Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain), and also respiratory RNA viruses: respiratory syncytial virus A (RSVA), respiratory syncytial virus B (RSVB), coronavirus NL63 (NL63), coronavirus OC43 (OC43) and influenza A H1 (AH1) (kindly provided by the Laboratory of the National Influenza Centre of Valladolid, University Clinical Hospital of Valladolid, Valladolid, Castilla y León, Spain).

4.5.4. Clinical Samples Testing by CCHFV-RT-LAMP

Based on the analysis with RT-qPCR, the RNA isolates from CCHF patients P1, P2, P3 and P4, were analysed by colorimetric and real-time CCHFV-RT-LAMP assays. Additionally, RNA isolates from plasma and urine samples from patient P4 were analysed by colorimetric CCHFV-RT-LAMP.

4.6. DNA Sequencing

An aliquot of each RNA isolates stored at -80 °C obtained from plasma samples from patients P1–P4 were sent to DNA Sequencing Service (NUCLEUS), University of Salamanca, Salamanca, Spain, for sequencing. A nested reverse-transcription PCR (nested RT-PCR) was performed as described elsewhere to amplify the 123–764 region in the first amplification and the 450–674 region in the second amplification in the S segment of CCHFV [10]. Subsequently, DNA amplified was purified and the double-stranded DNA was directly sequenced with the same second primers set used in nested RT-PCR by the Sanger chain-termination method and the 3500 Series Genetic Analyzer (Applied Biosystems; ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Consensus sequences of each segment were assembled and analysed using BioEdit 7.2 Sequence Alignment Editor software [94]. The sequences obtained in this study were deposited to GenBank and an accession number was provided for all submitted sequences.

The 212 bp amplicon obtained from RNA-positive control (P5; C+) in RT-PCR using the outer primers F3-B3 designed in this study was purified using NZY Gelpure (Nzytech, Lisbon, Portugal) according to the manufacturer protocol and sent refrigerated for bidirectional Sanger sequencing to DNA Sequencing Service (NUCLEUS), University of Salamanca,

Salamanca, Spain, to verify target amplification. For sequencing, the same outer F3-B3 primers were used. The sequence obtained was subsequently examined using BioEdit Sequence Alignment Editor software [94] and a BLASTN was performed to compare the sequence with those available in GenBank nucleotide database. The sequence obtained was also deposited to GenBank.

4.7. Phylogenetic Analysis

The phylogenetic analysis was carried out using ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>, accessed on 21 October 2022) to align the sequences of the CCHFV S segment obtained from patients' samples in this study and those sequences available in GenBank for comparison. A Tamura–Nei parameter model was selected to construct the phylogenetic tree based on the 51 S-fragment sequences of CCHFV selected from the database. A phylogenetic tree was generated by the neighbour-joining method using Geneious Tree Builder software 2022 [95] with 1000 replicates bootstrap testing and was edited using Adobe® Illustrator CS4.

5. Conclusions

In summary, we have developed a novel, rapid, specific and sensitive RT-LAMP test that allows the detection of different CCHFV genotypes in clinical samples. This pan-CCHFV RT-LAMP has proven to be effective in detecting viral RNA in plasma and urine samples. Moreover, it can be simply performed as a single-tube isothermal colorimetric method without any expensive equipment requirement and in a real-time portable platform, thus bringing molecular diagnostics closer to rural or resource-poor areas. As more and more samples are obtained from ticks, animals and humans in endemic regions and the virus continues to evolve over time, our new pan-CCHFV RT-LAMP could be a promising molecular tool to detect as many CCHFV variants as possible. However, more research is needed for validation of the pan-CCHFV RT-LAMP assay using a larger number of samples and evaluation of more genotypes. The use of environmental samples, such as the detection of CCHFV in ticks, would be useful to fully validate the RT-LAMP assay. Further work is needed to develop new, efficient and easily applicable molecular methods to diagnose CCHF.

Author Contributions: Conceptualisation, B.F.-S., A.M., M.B.-G. and P.F.-S.; methodology, B.F.-S., J.G.-B.D., B.C.-V. and P.F.-S.; validation, B.F.-S. and P.F.-S.; formal analysis, B.F.-S., P.F.-S. and A.M.; investigation, B.F.-S., J.G.-B.D., B.C.-V. and P.F.-S.; resources, A.N., M.P.S.-S., J.L.M.-B., M.B.-G., P.F.-S. and A.M.; data curation, B.F.-S., A.M. and P.F.-S.; writing—original draft preparation, B.F.-S. and P.F.-S.; writing—review and editing, B.F.-S., A.M., M.P.S.-S., J.L.M.-B. and P.F.-S.; visualisation, B.F.-S. and P.F.-S.; supervision, P.F.-S. and A.M.; project administration, P.F.-S.; funding acquisition, P.F.-S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The work was supported by the Institute of Health Carlos III, ISCIII, Spain (www.isciii.es, grant PI22/01721), with European Union co-financing by FEDER (Fondo Europeo de Desarrollo Regional) Una manera de hacer Europa. We also acknowledge support by the Predoctoral Fellowship Program of University of Salamanca and co-financing by Santander Bank (J.G.-B.S.) and the Predoctoral Fellowship Program of Junta de Castilla y León, co-funded by Fondo Social Europeo (BDNS; 422058 to B.F.-S. and 487971 to B.C.-V.).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Revised Declaration of Helsinki 2013 and approved by the Clinical Research Ethics Committee of Investigation with Drugs of Hospital Universitario de Salamanca (HUS), Salamanca, Spain (CEIMC PI 9109/2017).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study. All data from patients were anonymised.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We thank María Jara Acevedo, from the DNA Sequencing Service (NUCLEUS), University of Salamanca, Salamanca, Spain for technical support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

- Portillo, A.; Palomar, A.M.; Santibáñez, P.; Oteo, J.A. Epidemiological aspects of crimean-congo hemorrhagic fever in western europe: What about the future? *Microorganisms* **2021**, *9*, 649. [CrossRef]
- Bente, D.A.; Forrester, N.L.; Watts, D.M.; McAuley, A.J.; Whitehouse, C.A.; Bray, M. Crimean-Congo hemorrhagic fever: History, epidemiology, pathogenesis, clinical syndrome and genetic diversity. *Antiviral Res.* **2013**, *100*, 159–189. [CrossRef]
- Papa, A.; Tsergouli, K.; Tsioka, K.; Mirazimi, A. Crimean-Congo hemorrhagic fever: Tick-host-virus interactions. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2017**, *7*, 213. [CrossRef]
- Tsergouli, K.; Karampatakis, T.; Haidich, A.B.; Metallidis, S.; Papa, A. Nosocomial infections caused by Crimean-Congo haemorrhagic fever virus. *J. Hosp. Infect.* **2020**, *105*, 43–52. [CrossRef] [PubMed]
- Pshenichnaya, N.Y.; Nenadskaya, S.A. Probable Crimean-Congo hemorrhagic fever virus transmission occurred after aerosol-generating medical procedures in Russia: Nosocomial cluster. *Int. J. Infect. Dis.* **2015**, *33*, 120–122. [CrossRef] [PubMed]
- Shahhosseini, N.; Wong, G.; Babuadze, G.; Camp, J.V.; Ergonul, O.; Kobinger, G.P.; Chinikar, S.; Nowotny, N. Crimean-congo hemorrhagic fever virus in asia, africa and europe. *Microorganisms* **2021**, *9*, 1907. [CrossRef] [PubMed]
- Farooq, H.; Beveridge, N.; Fletcher, T.; Ghani, E.; Jamil, B.; Hasan, Z.; Ikram, A.; Safdar, R.M.; Salman, M.; Umair, M.; et al. A systematic review on the incidence and mortality of Crimean-Congo Haemorrhagic Fever (CCHF) in Pakistan. *Int. J. Infect. Dis.* **2020**, *101*, 250. [CrossRef]
- Arellano, E.R.; Hernández, L.; Goyanes, M.J.; Arsuaga, M.; Cruz, A.F.; Negrodo, A.; Sánchez-Seco, M.P. Phylogenetic Characterization of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* **2017**, *23*, 2078–2080. [CrossRef]
- Carroll, S.A.; Bird, B.H.; Rollin, P.E.; Nichol, S.T. Ancient common ancestry of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Mol. Phylogenet. Evol.* **2010**, *55*, 1103–1110. [CrossRef] [PubMed]
- Negrodo, A.; de la Calle-Prieto, F.; Palencia-Herrejón, E.; Mora-Rillo, M.; Astray-Mochales, J.; Sánchez-Seco, M.P.; Bermejo Lopez, E.; Menárguez, J.; Fernández-Cruz, A.; Sánchez-Artola, B.; et al. Autochthonous Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in Spain. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *377*, 154–161. [CrossRef] [PubMed]
- Estrada-Peña, A.; Palomar, A.M.; Santibáñez, P.; Sánchez, N.; Habela, M.A.; Portillo, A.; Romero, L.; Oteo, J.A. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in Ticks, Southwestern Europe, 2010. *BMC Infect. Dis.* **2012**, *18*, 179. [CrossRef] [PubMed]
- Cajimat, M.N.B.; Rodriguez, S.E.; Schuster, I.U.E.; Swetnam, D.M.; Ksiazek, T.G.; Habela, M.A.; Negrodo, A.I.; Estrada-Peña, A.; Barrett, A.D.T.; Bente, D.A. Genomic Characterization of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in *Hyalomma* Tick from Spain, 2014. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2017**, *17*, 714–719. [CrossRef] [PubMed]
- Negrodo, A.; Habela, M.Á.; Ramírez de Arellano, E.; Díez, F.; Lasala, F.; López, P.; Sarriá, A.; Labiod, N.; Calero-Bernal, R.; Arenas, M.; et al. Survey of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Enzootic Focus, Spain, 2011–2015. *Emerg. Infect. Dis.* **2019**, *25*, 1177–1184. [CrossRef] [PubMed]
- Moraga-Fernández, A.; Ruiz-Fons, F.; Habela, M.A.; Royo-Hernández, L.; Calero-Bernal, R.; Gortazar, C.; de la Fuente, J.; Fernández de Mera, I.G. Detection of new Crimean-Congo haemorrhagic fever virus genotypes in ticks feeding on deer and wild boar, Spain. *Transbound. Emerg. Dis.* **2020**, *1944*, 993–1000. [CrossRef]
- Sánchez-Seco, M.P.; Sierra, M.J.; Estrada-Peña, A.; Valcárcel, F.; Molina, R.; De Arellano, E.R.; Olmeda, A.S.; Miguel, L.G.S.; Jiménez, M.; Romero, L.J.; et al. Widespread Detection of Multiple Strains of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in Ticks, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* **2022**, *28*, 394–402. [CrossRef]
- World Health Organization (WHO). Annual Review of Diseases Prioritized under the Research and Development Blueprint. Meeting Report. 2017. Available online: <https://www.who.int/blueprint/what/research-development/2017-Prioritization-Long-Report.pdf?ua=1> (accessed on 23 July 2022).
- Negrodo, A.; Sánchez-Ledesma, M.; Llorente, F.; Pérez-Olmeda, M.; Belhassen-García, M.; González-Calle, D.; Sánchez-Seco, M.P.; Jiménez-Clavero, M.Á. Retrospective Identification of Early Autochthonous Case of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever, Spain, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* **2021**, *27*, 1754–1756. [CrossRef]
- (ECDC), E.C. for D.C. Communicable Disease Threats Report. 2022. Available online: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Communicable-disease-threats-report-13-aug-2022-all-users.pdf> (accessed on 13 February 2022).
- Negrodo, A.; Sánchez-Arroyo, R.; Díez-Fuertes, F.; De Ory, F.; Budiño, M.A.; Vázquez, A.; Garcinuño, Á.; Hernández, L.; de la Hoz González, C.; Gutiérrez-Arroyo, A.; et al. Fatal case of crimean-congo hemorrhagic fever caused by reassortant virus, Spain, 2018. *Emerg. Infect. Dis.* **2021**, *27*, 1211–1215. [CrossRef]
- Monsalve Arteaga, L.; Muñoz Bellido, J.L.; Negrodo, A.I.; García Criado, J.; Vieira Lista, M.C.; Sánchez Serrano, J.Á.; Vicente Santiago, M.B.; López Bernús, A.; de Ory Manchón, F.; Sánchez Seco, M.P.; et al. New circulation of genotype V of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus in humans from Spain. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2021**, *15*, e0009197. [CrossRef]

21. Bartolini, B.; Gruber, C.E.M.; Koopmans, M.; Avšič, T.; Bino, S.; Christova, I.; Grunow, R.; Hewson, R.; Korukluoglu, G.; Lemos, C.M.; et al. Laboratory management of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus infections: Perspectives from two European networks. *Eurosurveillance* **2019**, *24*, 1800093. [\[CrossRef\]](#)
22. Raabe, V.N. Diagnostic Testing for Crimean-Congo Hemorrhagic Fever. *J. Clin. Microbiol.* **2020**, *58*, e01580-19. [\[CrossRef\]](#)
23. Aradaib, I.E.; Erickson, B.R.; Karsany, M.S.; Khristova, M.L.; Elageb, R.M.; Mohamed, M.E.H.; Nichol, S.T. Multiple Crimean-Congo hemorrhagic fever virus strains are associated with disease outbreaks in Sudan, 2008–2009. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2011**, *5*, e1159. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Drosten, C.; Götting, S.; Schilling, S.; Asper, M.; Panning, M.; Schmitz, H.; Günther, S. Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* **2002**, *40*, 2323–2330. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Yapar, M.; Aydogan, H.; Pahsa, A.; Besirbellioglu, B.A.; Bodour, H.; Basustaoglu, A.C.; Guney, C.; Avci, I.Y.; Sener, K.; Sette, M.H.A.; et al. Rapid and quantitative detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus by one-step real-time reverse transcriptase-PCR. *Jpn. J. Infect. Dis.* **2005**, *58*, 358–362. [\[PubMed\]](#)
26. Duh, D.; Saksida, A.; Petrovec, M.; Dedushaj, I.; Avšič-Županc, T. Novel one-step real-time RT-PCR assay for rapid and specific diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic fever encountered in the Balkans. *J. Virol. Methods* **2006**, *133*, 175–179. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Wölfel, R.; Paweska, J.T.; Petersen, N.; Grobbelaar, A.A.; Leman, P.A.; Hewson, R.; Georges-Courbot, M.C.; Papa, A.; Günther, S.; Drosten, C. Virus detection and monitoring of viral load in Crimean-Congo hemorrhagic fever virus patients. *Emerg. Infect. Dis.* **2007**, *13*, 1097–1100. [\[CrossRef\]](#)
28. Atkinson, B.; Chamberlain, J.; Logue, C.H.; Cook, N.; Bruce, C.; Dowall, S.D.; Hewson, R. Development of a real-time RT-PCR assay for the detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2012**, *12*, 786–793. [\[CrossRef\]](#)
29. Zahraei, B.H.; Zadeh, M.S.H.; Asl, M.N.; Yeganeh, S.Z.; Tat, M.; Metanat, M.; Rad, N.S.; Nejad, B.K.; Zafari, E.; Sharti, M.; et al. Novel, in-house, sybr green based one-step rRT-PCR: Rapid and accurate diagnosis of crimean-congo hemorrhagic fever virus in suspected patients from Iran. *Jundishapur J. Microbiol.* **2015**, *9*, 2–6. [\[CrossRef\]](#)
30. Koehler, J.W.; Delp, K.L.; Hall, A.T.; Olschner, S.P.; Kearney, B.J.; Garrison, A.R.; Altamura, L.A.; Rossi, C.A.; Minogue, T.D. Sequence optimized real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay for detection of crimean-congo hemorrhagic fever virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2018**, *98*, 211–215. [\[CrossRef\]](#)
31. Sas, M.A.; Vina-Rodriguez, A.; Mertens, M.; Eiden, M.; Emmerich, P.; Chaintoutis, S.C.; Mirazimi, A.; Groschup, M.H. A one-step multiplex real-time RT-PCR for the universal detection of all currently known CCHFV genotypes. *J. Virol. Methods* **2018**, *255*, 38–43. [\[CrossRef\]](#)
32. Papa, A. Diagnostic approaches for crimean-congo hemorrhagic fever virus. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2019**, *19*, 531–536. [\[CrossRef\]](#)
33. Notomi, T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, e63. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Niemz, A.; Ferguson, T.M.; Boyle, D.S. Point-of-care nucleic acid testing for infectious diseases. *Trends Biotechnol.* **2011**, *29*, 240–250. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Moehling, T.J.; Choi, G.; Dugan, L.C.; Salit, M.; Meagher, R.J. LAMP Diagnostics at the Point-of-Care: Emerging Trends and Perspectives for the Developer Community. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2021**, *21*, 43–61. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Parida, M.; Posadas, G.; Inoue, S.; Hasebe, F.; Morita, K. Real-Time Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification for Rapid Detection of West Nile Virus. *J. Clin. Microbiol.* **2004**, *42*, 257–263. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Parida, M.; Shukla, J.; Sharma, S.; Santhosh, S.R.; Ravi, V.; Mani, R.; Thomas, M.; Khare, S.; Rai, A.; Ratho, R.K.; et al. Development and evaluation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and real-time detection of the swine-origin influenza A H1N1 virus. *J. Mol. Diagn.* **2011**, *13*, 100–107. [\[CrossRef\]](#)
38. Parida, M.M.; Santhosh, S.R.; Dash, P.K.; Tripathi, N.K.; Lakshmi, V.; Mamidi, N.; Shrivastva, A.; Gupta, N.; Saxena, P.; Pradeep Babu, J.; et al. Rapid and real-time detection of Chikungunya virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *J. Clin. Microbiol.* **2007**, *45*, 351–357. [\[CrossRef\]](#)
39. Lopez-Jimena, B.; Wehner, S.; Harold, G.; Bakheit, M.; Frischmann, S.; Bekaert, M.; Faye, O.; Sall, A.A.; Weidmann, M. Development of a single-tube one-step RT-LAMP assay to detect the Chikungunya virus genome. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2018**, *12*, e0006448. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
40. Cao, Z.; Wang, H.; Wang, L.; Li, L.; Jin, H.; Xu, C.; Feng, N.; Wang, J.; Li, Q.; Zhao, Y.; et al. Visual detection of West Nile virus using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a vertical flow visualization strip. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 554. [\[CrossRef\]](#)
41. Kumar, J.S.; Saxena, D.; Parida, M.; Rathinam, S. Evaluation of real-time reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification assay for clinical diagnosis of west Nile virus in patients. *Indian J. Med. Res.* **2018**, *147*, 293–298. [\[CrossRef\]](#)
42. Liu, H.; Liu, Z.J.; Jing, J.; Ren, J.Q.; Liu, Y.Y.; Guo, H.H.; Fan, M.; Lu, H.J.; Jin, N.Y. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of Japanese encephalitis virus in swine and mosquitoes. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2012**, *12*, 1042–1052. [\[CrossRef\]](#)
43. Parida, M.; Horioka, K.; Ishida, H.; Dash, P.K.; Saxena, P.; Jana, A.M.; Islam, M.A.; Inoue, S.; Hosaka, N.; Morita, K. Rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes by a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. *J. Clin. Microbiol.* **2005**, *43*, 2895–2903. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

44. Hu, S.F.; Li, M.; Zhong, L.L.; Lu, S.M.; Liu, Z.X.; Pu, J.Y.; Wen, J.S.; Xi, H. Development of reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes 1-4. *BMC Microbiol.* **2015**, *15*, 265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Lau, Y.L.; Lai, M.Y.; Teoh, B.T.; Abd-Jamil, J.; Johari, J.; Sam, S.S.; Tan, K.K.; AbuBakar, S. Colorimetric detection of dengue by single tube reverse-transcription-loop-mediated isothermal amplification. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0138694. [[CrossRef](#)]
46. Oloniniyi, O.K.; Kurosaki, Y.; Miyamoto, H.; Takada, A.; Yasuda, J. Rapid detection of all known ebolavirus species by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *J. Virol. Methods* **2017**, *246*, 8–14. [[CrossRef](#)]
47. Bonney, L.C.; Watson, R.J.; Slack, G.S.; Bosworth, A.; Vasileva Wand, N.I.; Hewson, R. A flexible format lamp assay for rapid detection of ebola virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2020**, *14*, e0008496. [[CrossRef](#)]
48. Peyrefitte, C.N.; Boubis, L.; Coudrier, D.; Bouloy, M.; Grandadam, M.; Tolou, H.J.; Plumet, S. Real-time reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of Rift Valley fever virus. *J. Clin. Microbiol.* **2008**, *46*, 3653–3659. [[CrossRef](#)]
49. Le Roux, C.A.; Kubo, T.; Grobbelaar, A.A.; Van Vuren, P.J.; Weyer, J.; Nel, L.H.; Swanepoel, R.; Morita, K.; Paweska, J.T. Development and evaluation of a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of rift valley fever virus in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **2009**, *47*, 645–651. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Han, Q.; Zhang, S.; Liu, D.; Yan, F.; Wang, H.; Huang, P.; Bi, J.; Jin, H.; Feng, N.; Cao, Z.; et al. Development of a Visible Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for the Detection of Rift Valley Fever Virus. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 590732. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. ole Kwallah, A.; Inoue, S.; Muigai, A.W.T.; Kubo, T.; Sang, R.; Morita, K.; Mwau, M. A real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for the rapid detection of yellow fever virus. *J. Virol. Methods* **2013**, *193*, 23–27. [[CrossRef](#)]
52. Osman, H.A.M.; Eltom, K.H.; Musa, N.O.; Bilal, N.M.; Elbashir, M.I.; Aradaib, I.E. Development and evaluation of loop-mediated isothermal amplification assay for detection of Crimean Congo hemorrhagic fever virus in Sudan. *J. Virol. Methods* **2013**, *190*, 4–10. [[CrossRef](#)]
53. Ternovoi, V.A.; Kononova, Y.V.; Zaykovskaya, A.V.; Chub, E.V.; Volynkina, A.S.; Mikryukova, T.P.; Kotenev, E.S.; Pyankov, O.V.; Sementsova, A.O.; Loktev, V.B. Development and assessment of a reagent kit for rna detection of crimean-congo hemorrhagic fever virus with using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method. *Russ. Clin. Lab. Diagnostics* **2019**, *64*, 571–577. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Kumar, J.S.; Parida, M.; Shete, A.M.; Majumdar, T.; Patil, S.; Yadav, P.D.; Dash, P.K. Development of a Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification [RT-LAMP] as a early rapid detection assay for Crimean Congo Hemorrhagic Fever virus. *Acta Trop.* **2022**, *231*, 106435. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Chamberlain, J.; Cook, N.; Lloyd, G.; Mioulet, V.; Tolley, H.; Hewson, R. Co-evolutionary patterns of variation in small and large RNA segments of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *J. Gen. Virol.* **2005**, *86*, 3337–3341. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Nasirian, H. New aspects about Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) cases and associated fatality trends: A global systematic review and meta-analysis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2020**, *69*, 101429. [[CrossRef](#)]
57. Tezer, H.; Polat, M. Diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **2015**, *13*, 555–566. [[CrossRef](#)]
58. Mazzola, L.T.; Kelly-Cirino, C. Diagnostic tests for Crimean-Congo haemorrhagic fever: A widespread tickborne disease. *BMJ Glob. Health* **2019**, *4*, e001114. [[CrossRef](#)]
59. Deyde, V.M.; Khristova, M.L.; Rollin, P.E.; Ksiazek, T.G.; Nichol, S.T. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Genomics and Global Diversity. *J. Virol.* **2006**, *80*, 8834–8842. [[CrossRef](#)]
60. Parida, M.; Sannarangaiah, S.; Dash, P.K.; Rao, P.V.L.; Morita, K. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): A new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Rev. Med. Virol.* **2008**, *18*, 407–421. [[CrossRef](#)]
61. Sanjuán, R.; Nebot, M.R.; Chirico, N.; Mansky, L.M.; Belshaw, R. Viral Mutation Rates. *J. Virol.* **2010**, *84*, 9733–9748. [[CrossRef](#)]
62. Domingo, E.; Perales, C. Quasispecies and virus. *Eur. Biophys. J.* **2018**, *47*, 443–457. [[CrossRef](#)]
63. Domingo, E.; Perales, C. Viral quasispecies. *PLoS Genet.* **2019**, *15*, e1008271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Zhou, Y.; Wan, Z.; Yang, S.; Li, Y.; Li, M.; Wang, B.; Hu, Y.; Xia, X.; Jin, X.; Yu, N.; et al. A mismatch-tolerant reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method and its application on simultaneous detection of all four serotype of dengue viruses. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1056. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Li, Y.; Zhou, Y.; Ma, Y.; Xu, R.; Jin, X.; Zhang, C. A Mismatch-tolerant RT-LAMP Method for Molecular Diagnosis of Highly Variable Viruses. *Bio-Protocol.* **2019**, *9*, e3415. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Waters, R.A.; Fowler, V.L.; Armson, B.; Nelson, N.; Gloster, J.; Paton, D.J.; King, D.P. Preliminary validation of direct detection of foot-and-mouth disease virus within clinical samples using reverse transcription Loop-mediated isothermal amplification coupled with a simple lateral flow device for detection. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e105630. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Hasanoglu, I.; Guner, R.; Carhan, A.; Tufan, Z.K.; Caglayik, D.Y.; Yilmaz, G.R.; Tasyaran, M.A. Dynamics of viral load in Crimean Congo hemorrhagic fever. *J. Med. Virol.* **2018**, *90*, 639–643. [[CrossRef](#)]
68. Saksida, A.; Duh, D.; Wraber, B.; Dedushaj, I.; Ahmeti, S.; Avšič-Županc, T. Interacting roles of immune mechanisms and viral load in the pathogenesis of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Clin. Vaccine Immunol.* **2010**, *17*, 1086–1093. [[CrossRef](#)]
69. García-Bernalt Diego, J.G.; Fernández-Soto, P.; Domínguez-Gil, M.; Belhassen-García, M.; Bellido, J.L.M.; Muro, A. A Simple, Affordable, Rapid, Stabilized, Colorimetric, Versatile RT-LAMP Assay to Detect SARS-CoV-2. *Diagnostics* **2021**, *11*, 438. [[CrossRef](#)]

70. Palomar, A.M.; Portillo, A.; Santibáñez, P.; Mazuelas, D.; Arizaga, J.; Crespo, A.; Gutiérrez, Ó.; Cuadrado, J.F.; Oteo, J.A. Crimean-congo hemorrhagic fever virus in ticks from migratory birds, Morocco. *Emerg. Infect. Dis.* **2013**, *19*, 260–263. [CrossRef]
71. Thomas, S.; Thomson, G.; Dowall, S.; Bruce, C.; Cook, N.; Easterbrook, L.; O'Donoghue, L.; Summers, S.; Ajazaj, L.; Hewson, R.; et al. Review of Crimean Congo hemorrhagic fever infection in kosova in 2008 and 2009: Prolonged viremias and virus detected in urine by PCR. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2012**, *12*, 800–804. [CrossRef]
72. Yagci-Caglayik, D.; Kayaaslan, B.; Yapar, D.; Kocagul-Celikbas, A.; Ozkaya-Parlakay, A.; Emek, M.; Baykam, N.; Tezer, H.; Korukluoglu, G.; Ozkul, A. Monitoring Crimean-Congo haemorrhagic fever virus RNA shedding in body secretions and serological status in hospitalised patients, Turkey, 2015. *Eurosurveillance* **2020**, *25*, 1900284. [CrossRef]
73. Bodur, H.; Akinci, E.; Öngürü, P.; Carhan, A.; Uyar, Y.; Tanrici, A.; Cataloluk, O.; Kubar, A. Detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus genome in saliva and urine. *Int. J. Infect. Dis.* **2010**, *14*, 2009–2011. [CrossRef] [PubMed]
74. Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 4673–4680. [CrossRef] [PubMed]
75. Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **1990**, *215*, 403–410. [CrossRef] [PubMed]
76. Eiken Chemical Co., Ltd. A Guide to LAMP primer designing (PrimerExplorer V5). *PrimerExplorer V5* **2019**, 1–18. Available online: https://primerexplorer.jp/e/v5_manual/pdf/PrimerExplorerV5_Manual_1.pdf (accessed on 20 January 2022).
77. Zivcec, M.; Maïga, O.; Kelly, A.; Feldmann, F.; Sogoba, N.; Schwan, T.G.; Feldmann, H.; Safronetz, D. Unique strain of crimean-congo hemorrhagic fever virus, Mali. *Emerg. Infect. Dis.* **2014**, *20*, 911–913. [CrossRef] [PubMed]
78. Goedhals, D.; Bester, P.A.; Paweska, J.T.; Swanepoel, R.; Burt, F.J. Next-generation sequencing of southern African Crimean-Congo haemorrhagic fever virus isolates reveals a high frequency of M segment reassortment. *Epidemiol. Infect.* **2014**, *142*, 1952–1962. [CrossRef]
79. Petrova, I.D.; Seregin, S.V.; Petrov, V.S.; Vyshemirski, O.I.; Kuzina, I.I.; L'vov, D.K.; Samokhvalov, E.I.; Tyunikov, G.I.; Gutorov, V.V.; Yashina, L.N.; et al. Genetic characteristics of the S-segment of RNA from two strains of the Crimean-Congo hemorrhagic fever virus isolated in the south of Russia and in Uzbekistan. *Vopr Virusol* **2003**, *48*, 8–11.
80. Hewson, R.; Gmyl, A.; Gmyl, L.; Smirnova, S.E.; Karganova, G.; Jamil, B.; Hasan, R.; Chamberlain, J.; Clegg, C. Evidence of segment reassortment in Crimean-Congo haemorrhagic fever virus. *J. Gen. Virol.* **2004**, *85*, 3059–3070. [CrossRef]
81. Seregin, S.V.; Tumanova, I.Y.; Vyshemirski, O.I.; Petrova, I.D.; Lvov, D.K.; Gromashevski, V.L.; Samokhvalov, E.I.; Tiunnikov, G.I.; Gutorov, V.V.; Tishkova, F.H.; et al. Study of the genetic variability of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in Central Asia. *Dokl. Biochem. Biophys.* **2004**, *398*, 313–315. [CrossRef]
82. Özdarendeli, A.; Çanakoğlu, N.; Berber, E.; Aydin, K.; Tonbak, Ş.; Ertek, M.; Buzgan, T.; Bolat, Y.; Aktaş, M.; Kalkan, A. The complete genome analysis of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus isolated in Turkey. *Virus Res.* **2010**, *147*, 288–293. [CrossRef]
83. Ölschläger, S.; Gabriel, M.; Schmidt-Chanasit, J.; Meyer, M.; Osborn, E.; Conger, N.G.; Allan, P.F.; Günther, S. Complete sequence and phylogenetic characterisation of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus from Afghanistan. *J. Clin. Virol.* **2011**, *50*, 90–92. [CrossRef] [PubMed]
84. Yadav, P.D.; Cherian, S.S.; Zavar, D.; Kokate, P.; Gunjkar, R.; Jadhav, S.; Mishra, A.C.; Mourya, D.T. Genetic characterization and molecular clock analyses of the Crimean-Congo hemorrhagic fever virus from human and ticks in India, 2010–2011. *Infect. Genet. Evol.* **2013**, *14*, 223–231. [CrossRef] [PubMed]
85. Chamberlain, J.; Atkinson, B.; Logue, C.H.; Latham, J.; Newman, E.N.C.; Hewson, R. Genome sequence of ex-Afghanistan Crimean-Congo hemorrhagic fever virus SCT strain, from an imported United Kingdom case in October 2012. *Genome Announc.* **2013**, *1*, 2012–2013. [CrossRef] [PubMed]
86. Chinikar, S.; Shah-Hosseini, N.; Bouzari, S.; Shokrgozar, M.A.; Mostafavi, E.; Jalali, T.; Khakifirouz, S.; Groschup, M.H.; Niedrig, M. Assessment of recombination in the s-segment genome of crimean-congo hemorrhagic fever virus in iran. *J. Arthropod. Borne. Dis.* **2016**, *10*, 12–23.
87. Yadav, P.D.; Thacker, S.; Patil, D.Y.; Jain, R.; Mourya, D.T. Crimean-congo hemorrhagic fever in migrant worker returning from Oman to India, 2016. *Emerg. Infect. Dis.* **2017**, *23*, 1005–1008. [CrossRef]
88. Zohaib, A.; Saqib, M.; Athar, M.A.; Hussain, M.H.; Sial, A.; Tayyab, M.H.; Batool, M.; Sadia, H.; Taj, Z.; Tahir, U.; et al. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in Humans and Livestock, Pakistan, 2015–2017. *Emerg. Infect. Dis.* **2020**, *26*, 773–777. [CrossRef]
89. Sahay, R.R.; Dhandore, S.; Yadav, P.D.; Chauhan, A.; Bhatt, L.; Garg, V.; Gupta, N.; Nyayanit, D.A.; Shete, A.M.; Singh, R.; et al. Detection of African genotype in Hyalomma tick pools during Crimean Congo hemorrhagic fever outbreak, Rajasthan, India, 2019. *Virus Res.* **2020**, *286*, 198046. [CrossRef]
90. Dedkov, V.G.; Shchelkanov, M.Y.; Bushkueva, B.T.; Rudenko, T.A.; Kurdyukova, O.V.; Galkina, I.V.; Sapotsky, M.V.; Blinova, E.A.; Dzhambinov, S.D.; Shipulin, G.A. A neonatal death associated with Crimean-Congo hemorrhagic fever (Republic of Kalmykia, Russia, June 2016). *Antiviral Res.* **2017**, *146*, 146–148. [CrossRef]
91. Hua, B.L.; Scholte, F.E.M.; Ohlendorf, V.; Kopp, A.; Marklewitz, M.; Drosten, C.; Nichol, S.T.; Spiropoulou, C.F.; Junglen, S.; Bergeron, É. A single mutation in crimean-congo hemorrhagic fever virus discovered in ticks impairs infectivity in human cells. *eLife* **2020**, *9*, e50999. [CrossRef]

92. Lumley, S.; Atkinson, B.; Dowall, S.D.; Pitman, J.K.; Staplehurst, S.; Busuttil, J.; Simpson, A.J.; Aarons, E.J.; Petridou, C.; Nijjar, N.; et al. Non-fatal case of Crimean-Congo haemorrhagic fever imported into the United Kingdom (ex Bulgaria), June 2014. *Euro Surveill* **2014**, *19*, 20864. [[CrossRef](#)]
93. Papa, A.; Papadimitriou, E.; Christova, I. The Bulgarian vaccine Crimean-Congo haemorrhagic fever virus strain. *Scand. J. Infect. Dis.* **2011**, *43*, 225–229. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Hall, T.A. Bioedit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **1999**, *41*, 95–98.
95. Kearse, M.; Moir, R.; Wilson, A.; Stones-Havas, S.; Cheung, M.; Sturrock, S.; Buxton, S.; Cooper, A.; Markowitz, S.; Duran, C.; et al. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* **2012**, *28*, 1647–1649. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

3.3

First field and laboratory evaluation of LAMP assay for malaria diagnosis in Cubal, Angola

Begoña Febrer-Sendra, Beatriz Crego-Vicente, Arlette Nindia, Joan Martínez-Camprecios, Sandra Aixut, Alejandro Mediavilla, Aroa Silgado, Inés Oliveira-Souto, Fernando Salvador, Israel Molina, Antonio Muro, Elena Sulleiro, Pedro Fernández-Soto

Parasites & Vectors. Submitted, 2023

RESUMEN

Según los datos facilitados por la OMS en el ‘Informe Mundial sobre la Malaria del año 2022’, África registró el 95% de todos los casos a nivel mundial. Angola es uno de los países con mayor endemidad. El diagnóstico de la malaria se realiza habitualmente mediante microscopía y pruebas de diagnóstico rápido (PDR). Sin embargo, estos métodos pueden carecer de sensibilidad en determinadas situaciones. Los métodos moleculares como la PCR podrían superar estos inconvenientes, pero no son factibles en zonas endémicas de escasos recursos. La tecnología LAMP, que requiere de una menor infraestructura, podría ser una excelente alternativa.

Hasta la fecha, se han desarrollado varios ensayos LAMP para la detección de diferentes especies de *Plasmodium* spp. Sin embargo, en Angola no se han realizado estudios de la aplicación del LAMP para el diagnóstico de malaria. Por ello, nos planteamos un estudio en el Hospital Nossa Senhora da Paz (HNSP), Cubal, Angola, en colaboración con el Hospital Universitario Vall d’Hebrón de Barcelona para evaluar la tecnología LAMP como método de diagnóstico de malaria, comparando los resultados con la microscopía y las PDR que se utilizan habitualmente para su diagnóstico.

Una primera parte del trabajo se llevó a cabo en el HNSP en los meses de mayo a julio de 2022, durante una estancia de investigación. Se reclutaron 200 pacientes a los que se realizó microscopía, PDR y LAMP colorimétrico. Los análisis en campo mostraron un 33,5% de muestras positivas por microscopía, 49% por PDR y 56% por LAMP. Considerando la microscopía como referencia, el ensayo LAMP colorimétrico detectó un mayor número de muestras positivas que las PDR.

La segunda parte del trabajo fue dirigida a comprobar la reproducibilidad del ensayo LAMP en un laboratorio de investigación (CIETUS). Se reanalizaron las muestras de ADN tanto por LAMP colorimétrico como a tiempo real en un dispositivo de lectura de fluorescencia. La reproducibilidad fue del 84,5%.

De este estudio podemos concluir que: *i)* se ha utilizado, por primera vez, la tecnología LAMP para la detección de *Plasmodium* spp. en una zona endémica de malaria en Angola; *ii)* que la tecnología LAMP ha demostrado ser más sensible que la microscopía y que las PDR para el diagnóstico de la malaria; *iii)* la facilidad de uso y viabilidad del ensayo LAMP en condiciones de campo y su reproducibilidad en un

laboratorio de investigación respaldan el uso del LAMP como prueba eficaz para el diagnóstico molecular POC de la malaria en laboratorios de zonas endémicas.

CAPÍTULO IV

Conclusiones

Primera. Se ha comprobado que el método *Loa loa*-LAMP tiene mayor rendimiento diagnóstico que la microscopía.

Segunda. El método *Loa loa*-LAMP presenta mayor sensibilidad que la técnica de PCR en el análisis de muestras de sangre almacenadas en papel de filtro.

Tercera. Se ha desarrollado un nuevo método RT-LAMP para la detección colorimétrica y a tiempo real de diferentes genotipos del virus de Crimea-Congo.

Cuarta. Se ha evaluado su utilidad diagnóstica en pacientes con FHCC con resultados comparables a los obtenidos con la técnica RT-qPCR de referencia.

Quinta. La aplicación de la técnica LAMP en Angola para la detección de *Plasmodium* spp. es más útil que la microscopía y las pruebas de diagnóstico rápido en condiciones de campo.

Sexta. La técnica LAMP para el diagnóstico de malaria en condiciones de campo ha resultado equiparable a su uso en un laboratorio de referencia.

Primeiro. Foi comprovado que o método *Loa loa*-LAMP tem um rendimento de diagnóstico mais elevado do que a microscopia.

Segundo. O método *Loa loa*-LAMP é mais sensível do que a técnica PCR na análise de amostras de sangue armazenadas em papel de filtro.

Terceiro. Foi desenvolvido um novo método RT-LAMP para a detecção colorimétrica e em tempo real de diferentes genótipos do vírus da Crimeia-Congo.

Quarto. A sua utilidade diagnóstica foi avaliada em doentes com FHCC com resultados comparáveis aos obtidos com a técnica de referência RT-qPCR.

Quinta. A aplicação da técnica LAMP em Angola para a detecção de *Plasmodium* spp. é mais útil do que a microscopia e os testes de diagnóstico rápido em condições de campo.

Sexto. A técnica LAMP para o diagnóstico da malária em condições de campo provou ser comparável à sua utilização num laboratório de referência.

ANEXO I

Anexo metodológico

AI.1. Muestras clínicas

En cada uno de los artículos de investigación recogidos en este trabajo se utilizaron distintas muestras clínicas de origen humano.

En el **primer artículo de investigación** (*Colorimetric and real-time Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of Loa loa DNA in human blood samples*), se utilizaron muestras de sangre en papel de filtro procedentes de un proyecto de malaria PREMAVAL llevado a cabo en Guinea Ecuatorial. Este estudio fue aprobado en su momento por el Ministerio de Sanidad y Bienestar Social de Guinea Ecuatorial (MINSABS) y el Comité Ético del Instituto Nacional de la Salud Carlos III (CEI PI 22_2013-v3). Los protocolos incluidos en el estudio se realizaron de acuerdo con los estándares descritos en la Declaración de Helsinki revisada en 2013. Estas muestras fueron cedidas por el laboratorio del Centro Nacional de Medicina Tropical, Instituto de Salud Carlos III (Madrid, España).

En el **segundo artículo de investigación** (*A novel RT-LAMP for the detection of different genotypes of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus in patients from Spain*), se utilizaron cinco muestras de pacientes diagnosticados con Fiebre Hemorrágica de Crimea Congo (FHCC): Cuatro de ellos, en el Hospital Universitario de Salamanca (Salamanca, España) y otro en el Hospital del Bierzo (Ponferrada, León, España). Este estudio fue aprobado por el comité ético de investigación clínica con fármacos del Hospital Universitario de Salamanca (CEIMC PI 9109/2017). Todos los procedimientos descritos se llevaron a cabo de acuerdo con las normas éticas descritas en la Declaración Helsinki revisada en 2013. Los datos de los pacientes se anonimizaron.

En el **tercer artículo de investigación** (*First field and laboratory evaluation of LAMP assay for malaria diagnosis in Cubal, Angola*). Se utilizaron 200 muestras de sangre recogidas en Cubal, Angola, durante un estudio de malaria llevado a cabo durante el periodo de estancia de investigación en el Hospital Nossa Senhora da Paz. Para este estudio se solicitó y se obtuvo permiso del comité de ética del Ministerio de Salud de Angola (39 C.E/MINSA.INIS/2022). La participación en el estudio fue voluntaria y se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los voluntarios y de los padres o tutores legales de todos los menores que participaron. Los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con los estándares éticos descritos en la Declaración Helsinki revisada en 2013. Los datos clínicos y epidemiológicos se anonimizaron.

AI.2. Procesamiento de muestras y extracción de ácidos nucleicos

Para la realización de estos trabajos se han utilizado diferentes *kits* comerciales o métodos *in house* para la extracción de ácidos nucleicos (ADN o ARN) en diferentes tipos de muestras (**Tabla 1**).

Tabla 1. Diferentes tipos de muestra y métodos de extracción de ácidos nucleicos.

Tipo de muestra	Ácido nucleico	Kit de extracción/Método <i>in house</i>
Sangre en papel de filtro	ADN	Método Saponina/Chelex
Plasma	ARN	<i>NZY Viral RNA Isolation kit</i> (NZYTECH, Lisboa, Portugal.
Orina	ARN	<i>NZY Viral RNA Isolation kit</i> (NZYTECH, Lisboa, Portugal.
Sangre total	ADN	<i>NZY Tissue gDNA Isolation kit</i> (NZYTECH, Lisboa, Portugal.

A continuación, se describen de manera detallada los diferentes protocolos utilizados para la extracción de ácidos nucleicos.

AI.2.1. Purificación de ADN de muestras de sangre recogidas en papel de filtro

Las muestras de sangre recogidas en papel de filtro fueron utilizadas para llevar a cabo el **primer artículo de investigación**. La purificación de ADN se llevó a cabo en las instalaciones del Centro Nacional de Medicina Tropical, Instituto de Salud Carlos III (Madrid, España) utilizando un método de extracción Saponina/Chelex siguiendo la metodología descrita en Plowe y colaboradores (1) con algunas modificaciones:

- Se perforaron 5 mm de diámetro de los discos de papel de filtro impregnados con sangre y se colocaron en un tubo de 1,5 mL.
- Se añadió 1 mL de Saponina al 0,5% (Fluka Biochemika, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Darmstadt, Alemania) en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se incubó toda la noche a 4°C o a 37°C durante 1 h.
- Después de la incubación, la solución marrón que se formaba se decantó y se añadió 1 mL PBS. Se incubó a 4°C durante 30 minutos.
- Durante estos 30 minutos se preparó la solución Chelex 100: se añadieron 100 mL de 5% Chelex 100 (bio Rad, Richmond, CA, USA) en agua y se calentó a 100°C en un agitador magnético.

- e. Posteriormente, se retiró el PBS de los tubos y se añadieron 200 μ L del 5% Chelex 100 preparado en el apartado d. Se mezcló mediante vórtex 30 segundos y se colocó en un termobloque a 98°C durante 10 minutos.
- f. Tras la incubación, se centrifugó a 13.000 rpm durante 2 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó una vez más para eliminar los restos de la resina Chelex 100. El ADN extraído se añadió a unos tubos limpios y se guardó a -20°C hasta su uso en los ensayos moleculares.

AI.2.2. Purificación de ARN viral de muestras de pacientes

El ARN viral obtenido de las muestras de plasma y orina utilizadas en el **segundo artículo de investigación** fueron manipuladas e inactivadas previamente en un laboratorio de nivel de bioseguridad 3 (BSL-3) situado en las instalaciones del Edificio I+D+I, Universidad de Salamanca. Para ello, se utilizó el *kit NZY Viral RNA Isolation* (NYZTECH, Lisboa, Portugal) y se siguieron los siguientes pasos:

- a. Para la inactivación del virus, a 200 μ L de muestra se le añadían 350 μ L de *buffer* NVL y se mezclaba mediante un vórtex. Después se dejaba incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- b. Tras la incubación, se añadían 350 μ L de etanol absoluto (96%) y se mezclaba mediante pipeteo. En este paso es importante mezclar bien la muestra con etanol para obtener una solución homogénea.

Una vez inactivadas, se continuó con el protocolo de extracción de ARN en el laboratorio de Parasitología, CIETUS, Universidad de Salamanca, mediante el siguiente protocolo:

- a. Se añadieron 700 μ L de la muestra inactivada en una columna de purificación colocada en un tubo de recolección de 2 mL. Se centrifugó a 8.000 x g durante un minuto. Este proceso se repetía hasta que el volumen completo de muestra se había añadido a la columna.
- b. Después, se añadieron 200 μ L de *buffer* NV a la columna y se centrifugó a 8.000 x g durante 1 minuto y se descartó el eluido.
- c. Posteriormente, se realizaron dos lavados con el *buffer* NVW, uno con 600 μ L y otro con 300 μ L. Después de añadir el *buffer* en las dos ocasiones se realizaba una centrifugación durante 1 minuto a 8.000 x g y se descartaba el eluido.

- d. Tras los lavados se secó la membrana de la columna mediante una nueva centrifugación a 8.000 x g durante 2 minutos.
- e. Finalmente, se eluía el ARN purificado en 50 µL de agua libre de RNasas y se almacenaba a -80°C hasta su uso en los ensayos moleculares.

AI.2.3. Purificación de ADN de muestras de sangre de pacientes

La extracción de ADN de las muestras de sangre utilizadas en el **tercer artículo de investigación** se llevó a cabo durante la estancia de investigación en el Hospital Nossa Senhora da Paz, Cubal, Angola, utilizando el *kit NZY Tissue gDNA Isolation* (NZYTECH, Lisboa, Portugal) mediante el siguiente protocolo:

- a. Se añadieron 25 µL de Proteinasa K y 200 µL de *buffer* NL a 200 µL de muestra de sangre total y se mezcló mediante vórtex.
- b. Posteriormente se incubó a 56°C durante 10-15 minutos.
- c. Después de la incubación, se añadieron 210 µL de etanol al 100% y se mezcló mediante vórtex.
- d. La mezcla se transfirió a una columna situada en un tubo de recolección de 2 mL y se centrifugó durante 1 minuto a 11.000 x g. Se descartó el eluido.
- e. A continuación, se llevaron a cabo los lavados, uno con 500 µL del *buffer* NW1 y otro con 600 µL del *buffer* NW2. En ambos lavados, después de añadir el *buffer* se realizaba una centrifugación durante 1 minuto a 11.000 x g y se descartaba el eluido.
- f. Tras los lavados se dejaba secar la membrana de la columna mediante una nueva centrifugación a 11.000 x g durante 2 minutos.
- g. Finalmente, se eluía el ADN purificado en 100 µL del *buffer* NE y se almacenaba a -20°C hasta su uso en los ensayos moleculares.

AI.3. Selección de secuencias y diseño de *primers*

En los trabajos presentados en la Tesis Doctoral, se han llevado a cabo ensayos LAMP para la detección de *Loa loa*, VFHCC y *Plasmodium* spp. Para ello, se han utilizado tanto *primers* diseñados por nuestro grupo como otros utilizados por otros autores. Los diferentes *primers* utilizados y su longitud en pares de bases (pb) se recogen en la **tabla 2**.

Tabla 2. *Primers* utilizados en los estudios realizados durante la Tesis Doctoral.

Diana	Primer	Secuencia	Pares de bases (pb)	Referencia
Secuencia repetitiva de <i>Loa loa</i>	F3	TCAGCATTTATAACAAGAAGCA	22	(2)
	B3	GAATTACTGTGATGGATTACTACA	24	
	FIP	CAGCTCCTCACTGTGGCATG- CCAAAAACACCGATGGATG	40	
	BIP	TTAAGCGACTTCGTGCTGCTAC- TCAGAAAACAACACTGTATCC	43	
Segmento S del VFHCC*	F3	TRGAGGCTCTCAAYGGGTAT	20	(3)
	B3	GGGAAGGTTTCTGGAGTCAC	20	
	FIP	GCTCYTGTGCTTGGCAATGT- AGCAYAAGGACGAAGTTGAC	41	
	BIP	AYTCGTCTGCWCTTCGTGCACA- CGGCCTTGTAAGCCAGTAG	41	
	LF	CATGCTGTCRGCACCTTGCTTT	21	
	LB	AGATTGACACYGCTTTCAGCTC	22	
ADN mitocondrial de <i>Plasmodium</i> spp.	F3	TGTCAACTACCATGTTACGAC	21	(4)
	B3	AACGGTCCTAAGGTAGCAA	19	
	FIP	TACGGCCCGACGGTAAGATCG TAACCATGCCAACAC	36	
	BIP	AGGAGTCTCAGCTAGCGACA AAATTCCTTGTCGGGTAATCTC	44	
	LF	CTGAGCACCTTAACCTCCCTAA	22	
	LB	TACACCGTTCATGCAGGAC	19	

*Las pares de bases en negrita corresponden a las bases degeneradas “wobble bases”: **R**=G/A, **Y**=C/T, **W**= T/A.

La selección de secuencias y diseño de *primers* para la técnica LAMP es uno de los puntos más críticos, ya que va a determinar la sensibilidad y la especificidad final. Hay que tener en cuenta numerosos factores que influyen tanto en la selección de las secuencias como en el diseño de los *primers*. En el caso de la selección de las secuencias los principales factores son los siguientes (5):

- Grado de repetición en el genoma: las probabilidades de detección de una secuencia aumentan cuanto mayor es su grado de repetición en el genoma.
- Grado de especificidad: es muy importante realizar un estudio valorando la reactividad cruzada de una secuencia con otras secuencias de especies afines.
- Grado de conservación: es importante que la secuencia esté conservada en el genoma y no presente muchas variaciones entre cepas.
- Grado de estudio de la secuencia: la secuencia utilizada debe ser profundamente conocida y haberse corregido su composición nucleotídica varias veces.

Para el diseño de los *primers*, es importante considerar numerosos factores, todos ellos recogidos en la guía “A guide to LAMP primer designing” disponible en el programa *online* Primer Explorer V5 (<https://primerexplorer.jp/e/>) (6):

- La secuencia diana seleccionada debe tener una longitud de 200-2000 pb.
- Contenido de GC: en secuencias ricas en GC, el contenido GC de los *primers* deber ser aproximadamente de 50-60 % y, en el caso de secuencias ricas en AT, el contenido GC de los *primers* debe estar entre 40-50%.
- La temperatura de anillamiento (T_m , del inglés *melting temperature*) debe ser entre 60-65°C en secuencias ricas en GC y de 55-60°C en secuencias ricas en AT. Además, las T_m de las distintas secuencias de los *primers* han de ser:
 - F1c y B1c: 64°C-66°C
 - F2 y B2: 59°C-61°C
 - F3 y B3: 64°C y 66°C
- El extremo 3' no debe ser rico en AT ni complementario a otros *primers* con el fin de evitar la formación de estructuras secundarias.
- Estabilidad del extremo terminal de los *primers*: el final de cada cebador sirve como punto de partida para la síntesis de una nueva hebra de ADN. Por ello es importante que los extremos 3' de F2/B2, F3/B3 y LF/LB y el 5' de F1c/B1c sean lo más estables posibles. Esta estabilidad se mide a través del incremento de energía libre de Gibbs (ΔG). Esta debe ser inferior a -4 kcal/mol.
- Distancia entre *primers*: entre el extremo 5' de F2 y B2 la distancia debe ser de 120-180 pb, entre F2-F1/B1-B2 de 40-60 bp, y entre F2-F3/B2-B3 de 0-20 pb (Figura 1).

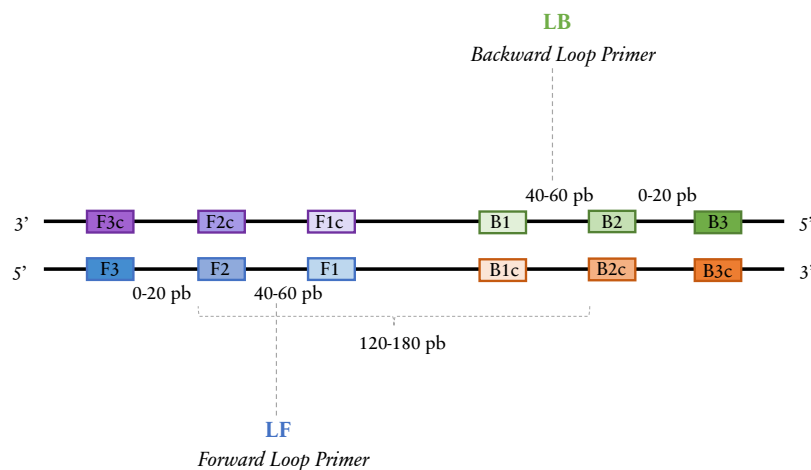


Figura 1. Representación gráfica de la localización de los *primers* en las 6 regiones de una secuencia ADN diana. Se muestran las tres regiones de los *forward primers* (F1, F2 y F3) y las tres regiones de los

backward primers (B1, B2 y B3) junto con sus regiones complementarias en la cadena opuesta (F1c, F2c y F3c; B1c, B2c y B3c). Se indican las distancias (en pares de bases; pb) que deben cumplir los *primers* para el diseño correcto de los mismos.

Teniendo en cuenta todas estas características, se diseñaron los *primers* utilizados en el **segundo artículo de investigación**. El procedimiento seguido para su diseño se muestra a continuación.

AI.3.1 Selección y obtención de las secuencias

El Virus de la Fiebre Hemorrágica de Crimea-Congo (VFHCC) presenta un genoma trisegmentado (segmento S, segmento M y segmento L) por lo que su variabilidad genética es muy elevada. Teniendo en cuenta que el segmento S es el segmento más conservado en el genoma, se realizó una revisión bibliográfica en *PubMed* para la búsqueda de secuencias del segmento S del VFHCC. Con el fin de detectar el mayor número de cepas posibles, se seleccionaron un total de 51 secuencias de las cuales se obtuvo el número de *GenBank*. A continuación, como se indica en la **figura 2**, se descargaron en la página web del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para ello, seleccionamos la base de datos *Nucleotide* e introducimos el código de *GenBank* en la barra de búsqueda.

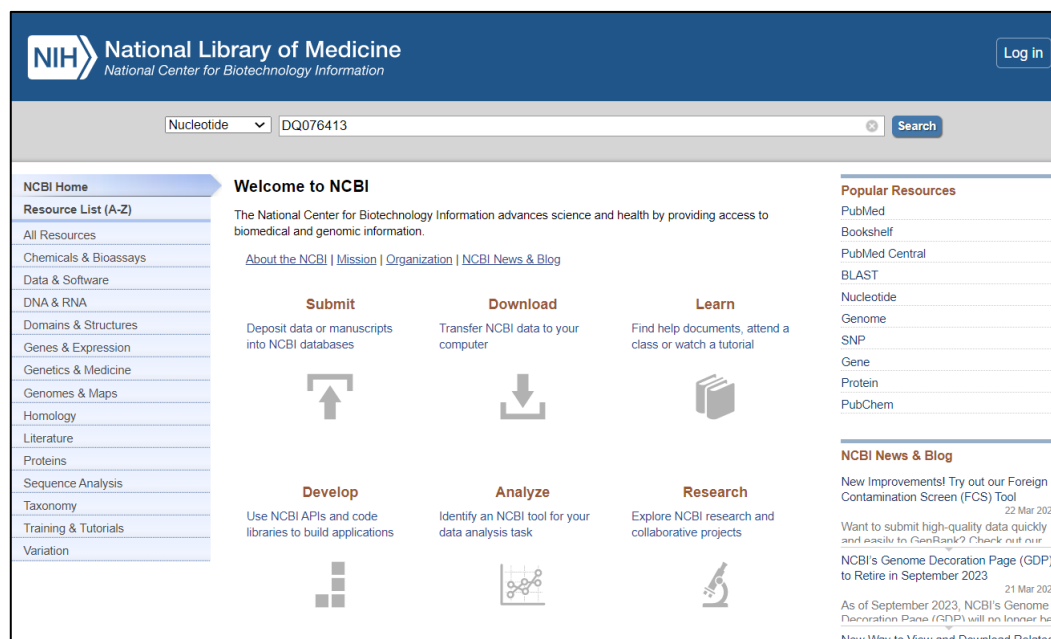


Figura 2. Búsqueda de la secuencia DQ074613 en la sección *Nucleotide* del NCBI.

Una vez realizada la búsqueda, se abre una ventana con toda la información correspondiente a la secuencia y se procede a la descarga en formato FASTA como se indica en la **figura 3**. Este formato es el más habitual para su uso en los diferentes programas de manejo y edición de secuencias nucleotídicas.



Figura 3. Características de la secuencia seleccionada DQ074613 y su descarga en formato FASTA.

Una vez descargadas las 51 secuencias nucleotídicas, estas se dividieron según el origen geográfico de los aislados: secuencias Africanas (n=11), secuencias Asiáticas (n=24) y secuencias Europeas (n=16). A continuación, se realizaron secuencias consenso “geográficas” denominadas consenso Africana (AFC), consenso Asiática (ASC) y consenso Europea (EUC). Finalmente, a partir de estas 3 secuencias consenso “geográficas” se obtuvo una secuencia consenso global (GC) de 1672 pb utilizada para el diseño de los *primers* (**Figura 4**).

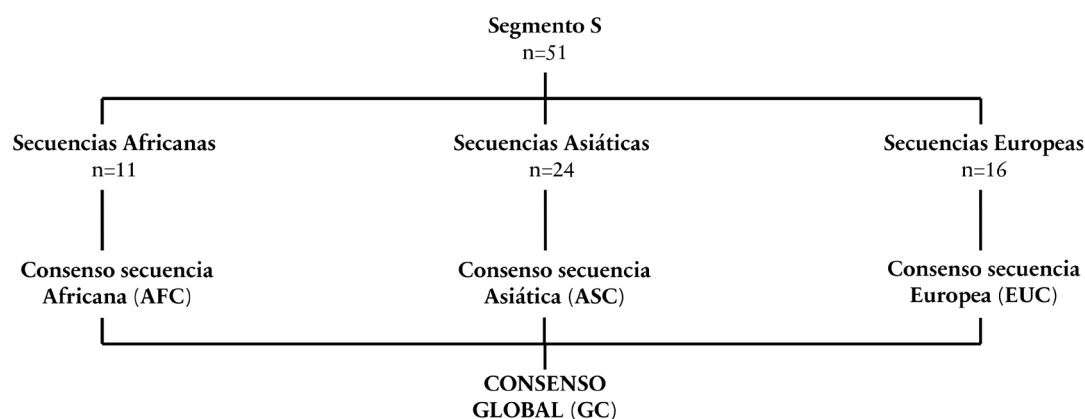
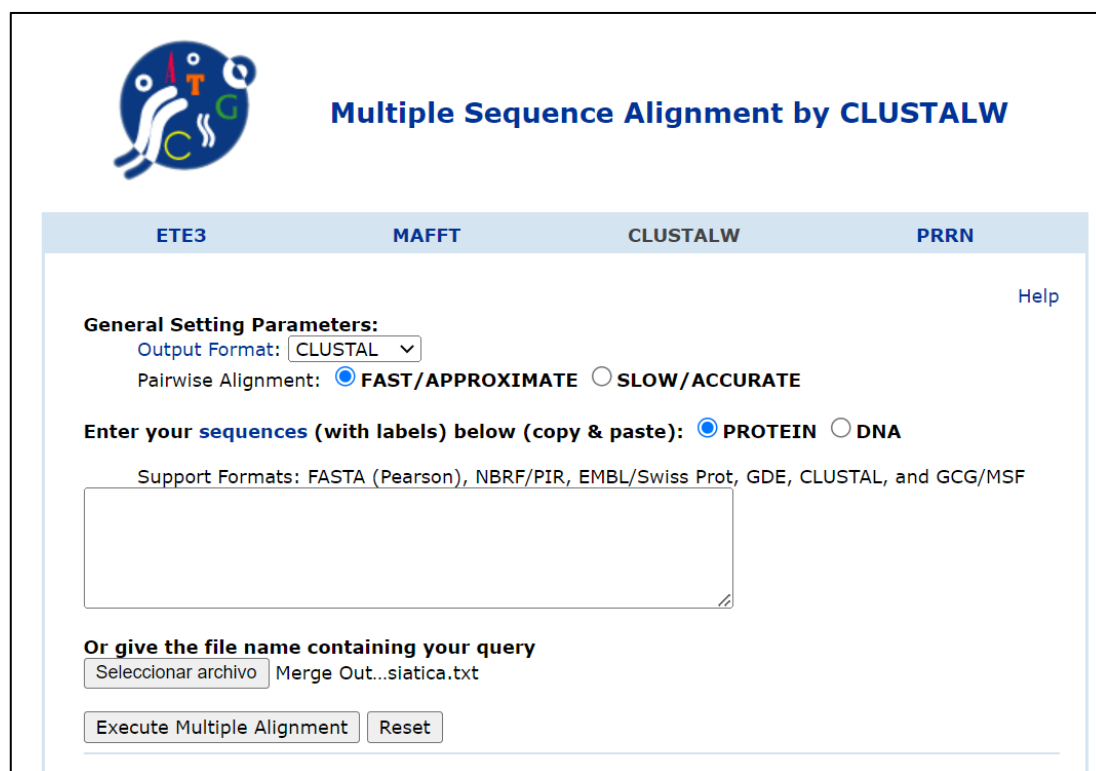


Figura 4. Representación del esquema utilizado para la obtención de la secuencia consenso global (GC).

Para la obtención de las secuencias consenso, en primer lugar, se realizaron alineamientos múltiples utilizando el software *online* ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>). En “Seleccionar archivo”, seleccionamos las secuencias que queremos alinear y posteriormente usamos la función “*Execute Multiple Alignment*” para visualizar y descargar las secuencias alineadas (**Figura 5 y 6**). En segundo lugar, las secuencias consenso se obtuvieron mediante el programa BioEdit (solo disponible para usuarios Windows) (<https://bioedit.software.informer.com/download/?lang=es>) (7). Para ello, abrimos el alineamiento previamente descargado y seleccionamos “*Alignment*” y dentro de esta ventana seleccionamos “*Create Consensus Sequence*” (**Figura 7**).



Multiple Sequence Alignment by CLUSTALW

ETE3 MAFFT **CLUSTALW** PRRN

[Help](#)

General Setting Parameters:

Output Format:

Pairwise Alignment: ☒ **FAST/APPROXIMATE** ☐ SLOW/ACCURATE

Enter your **sequences** (with labels) below (copy & paste): ☒ **PROTEIN** ☐ DNA

Support Formats: FASTA (Pearson), NBRF/PIR, EMBL/Swiss Prot, GDE, CLUSTAL, and GCG/MSF

Or give the file name containing your query

Merge Out...siatica.txt

Figura 5. Página inicial del software *online* ClustalW.

```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

AY029157.1      TCTCAAAGAAACACGTGCCGCTTACGCCCACAGTGTTCTCTTGAGTGCTAGCAAAATGGA
JN572087.1      TCTCAAAGAAACACGTGCCGCTTACGCCCACAGTGTTCTCTTGAGTGCTAGCAAAATGGA
AJ010648.1      TCTCAAAGAAACACGTGCCGCTTACGCCCACAGTGTTCTCTTGAGTGCTAGCTAAATGGA
AF358784.1      TCTCAAAGAAACACGTGCCGCTTACGCCCACAGTGTTATCTTGAGTGCTGACAAAATGGA
MN135942.1      -----GCCACAGTGTTCTCTTGAGTGTTGGCAAAATGGA
AF415236.1      TCTCAAAGAAACACGTGCCGCTTACGCCCACAGTGTTATCTTGAGTGCTGACAAAATGGA
AF527810.1      TCTCAAAGAAACACGTGCCGCTTACGCCCACAGTGTTCTCTTGAGTGTTGGCAAAATGGA
DQ446214.1      -----ACGCCCACAGTGTTCCCTTGAGTGTTGGCAAAATGGA
AJ538196.1      TCTCAAAGAAACACGTGCCGCTTACGCCCACAGTGTTCTCTTGAGTGTTAGCAAAATGGA
KY362516.1      TCTCAAAGAAACACGTGCCGCTTACGCCCACAGTGTTCTCTTGAGTGCTGGCAAAATGGA
JX908640.1      TCTCAAAGAAACACGTGCCGCTTACGCCCACAGTGTTCTCTTGAGTGTTGGCAGAATGGA
KJ566219.1      TCTCAAAGAAACACGTGCCGCTTACGCCCACAGTGTTCTCTTGAGTGTTGGCAGAATGGA
U88414.1        TCTCAAAGAAACACGTGCCGCTTACGCCCACAGTGTTCTCTTGAGTGTTGGCAAAATGGA
DQ211645.1      TCTCAAAGAAACACGTGCCGCTTACGCCCACAGTGTTCTCTTGAGTGCTGGCAAAATGGA
HM452305.1      TCTCAAAGAAACACGTGCCGCTTACGCCCACAGTGTTCTCTTGAGTGTTGGCAAAATGGA
AY297691.2      TCTCAAAGAAACACGTGCCGCTTACGCCCACAGTGTTCCCTTGAGTGCTAGCAAAATGGA
KY213714.1      -----AAACACGTGCCGCTTACGCCCACAGTGTTCTCTTGAGTGTTGGCAAAATGGA
AY223475.1      TCTCAAAGAAACACGTGCCGCTTACGCCCACAGTGTTCTCTTGAGTGCTAGCAAAATGGA
AF481799.1      TCTCAAAGAAACACGTGCCGCTTACGCCCACAGTGTTCTCTTGAGTGCTAGCAAAATGGA
DQ211642.1      TCTCAAAGAAACACGTGCCGCTTACGCCCACAGTGTTCTCTTGAGTGCTAGCAAAATGGA
GQ337053.1      TCTCAAAGAAACACGTGCCGCTTACGCCCACAGTGTTCTCTTGAGTGCTGCAAAATGGA
MH396675.1      -CTCAAAGAAACACGTGCCGCTTACGCCCACAGTGTTCTCTTGAGTGCTAGCAGAATGGA
JN086996.1      -----ATGGA
                                     ****

AY029157.1      GAATAAAATCGAGGTGAATAACAAAGATGAAATGAACAAGTGGTTTGAAGAGTTCAAGAA
JN572087.1      GAATAAAATCGAGGTGAACAACAAAGATGAGATGAACAAGTGGTTTGAAGAGTTCAAGAA
AJ010648.1      GAATAAAATCGAGGTGAATAACAAAGATGAGATGAACAAGTGGTTTGAAGAGTTCAAGAA
AF358784.1      GAACAAAATCGAGGTGAATAACAAAGATGAGATGAATAAGTGGTTTGAAGAGTTCAAGAA

```

Figura 6. Representación gráfica del alineamiento generado utilizando el software *online* ClustalW.



Figura 7. Representación gráfica para la generación de las secuencias consenso utilizando el programa BioEdit.

AI.3.1.1 Ensayo *in silico* de especificidad

Antes de proceder al diseño de los *primers*, conviene realizar un análisis *in silico* de especificidad para comprobar que la secuencia seleccionada no presenta reactividad cruzada con otras secuencias de otros patógenos afines o con secuencias del propio hospedador. Esta especificidad se realiza utilizando el *software online* Nucleotide BLAST (*Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool*) disponible en la base de datos del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Esta nos permite introducir la secuencia diana y la secuencia de los *primers* diseñados y compararlos con gran cantidad de secuencias disponibles. Para ello, introducimos la secuencia GC en el apartado “Enter Query Sequence” y, en la categoría de “Organism” añadimos todos los organismos afines que queramos comparar, en nuestro estudio tuvimos en cuenta otros virus como *Zaire Ebolavirus* (taxid:186538), *Sudan Ebolavirus* (taxid:186540), *Lassa mammarenavirus* (taxid:11620), *Marburg Marburgvirus* (taxid:11269), *Yellow fever virus* (taxid:11089), *Rift Valley fever virus* (taxid:11588), *West Nile virus* (taxid:11082), *Dengue virus* (taxid:12637) y *Chikungunya virus* (taxid:37124) (**Figura 8**).

Figura 8. BLAST para comprobar la especificidad de la secuencia GC con todas las secuencias disponibles en la base de datos del NCBI.

AI.3.2 Diseño de primers

Para el diseño de los *primers* pueden utilizarse diferentes programas como Primer Biosoft (<http://www.premierbiosoft.com/>), Optigene LAMP designer (<http://www.optigene.co.uk/lamp-designer/>), NEB LAMP primer designer tool (<https://lamp.neb.com/>) y PrimerExplorer V5 (<https://primerexplorer.jp/e/>). En nuestro estudio utilizamos el *Primer Explorer V5*. Para ello abrimos el enlace y en “Seleccionar archivo”, subimos nuestra secuencia GC obtenida en el apartado anterior y usamos la función *Primer design* (**Figura 9**). El programa generó 2 juegos de *primers* distintos, para conocer los detalles de estos cebadores, se accedió a través de “Display” (**Figura 10**).

PrimerExplorer V5
Software

Operation procedure for designing regular primers

1. Click on [Browse] button.
Choose and upload the target sequence file.
Following formats can be used.
 - Plain text format (sequence only)
 - FASTA format
 - GenBank format
 - Multiple alignment file format
 - Target sequence save file format
2. Choose the corresponding parameter set.
3. Click on the [Primer Design] button

Operation procedure for designing loop primers

1. Click on the [Browse] button.
Choose the Primer Information File.
2. Click on the [Primer Design] button.

Target Sequence File/Primer Information File

Seleccionar archivo
Consenso...l (GC).fas

Parameter Set(not applicable to the loop primer design.)

☒ Automatic Judgment
☐ Normal
☐ User Assignment

Seleccionar archivo
Ninguno archivo selec.

Primer Design

Figura 9. Página principal del *software Primer Explorer V5*.

UPLOAD FILE: Consenso Global (GC).fas

```

1  TCTCAAAGAA ACACGTGCGG CTTACGCCCCA CAGTGTCTCTC TTGAGTGTTC CAAATGGAA AACAAAATCG AGGTGAACAA 80
.....
81  CAAAGATGAG ATGAACAAGT GGTITGAGAG TTCAAAAAGS GAAATGGACT TGTGGACACT TTCACAAACT CCTACTCCIT 160
.....
161 TTGTGAGAGT GTTCCAAATC TGGACAAGTT TGTGTCCAG ATGGCCASTG CCACATGATG TGCACAAAAG GATTCCRICT 240
.....
241 ACGCATCTGC TCTGCTGAGG GCAACCAAAAT TTGTGACACC ATATATGAGT GTGCTGSGTT AGCTCCACTG GCATTGTGAA 320
.....
321 GAAGGGGACTT GAGTGGTTGG AAAAAAATGC AGGAACCAAT AAATCTTGGG ATGAAAGCTA TACTGAGCTG AAGTTTGAGT 400
.....
401 TCCCAAAATA GAACACCTTG CCAATTACCA ACAGGCTGCT CTCAAGTGGG GGAAGGACAT AGGTTTCOST GTCAATGCAA 480
.....
481 ACACGGCAGC CTTAAGCAAC AAAGTCCTTG CAGAGTACAA AGTCCTTGGC GAAATTGTGA TGTCTGTCAA AGAAATGCTG 560
.....
561 TCAGACATGA TTAGAAGAGG GAACCTGATT CTCAACAGGG GTGGTGATGA AAATCCACGG GCCCAGTGAG CCGTGAACAT 640
.....
641 GTGGAGTGGT GCAGGGAAAT TTCAAAAGGC AAGTACATCA TGGCTTCAA CCCACCTTGG GGGGACATCA ACAAGTCAGG 720
.....
721 CCGTTCAGSA ATAGCACTTG TTGCAACAGG CCITGCCAAG CTTCAGAGA CTGAAGGGAA GGGAGTTTTT GACGAAGCCA 800
.....
801 AGAAGACGTG GAGGCTCTCA ATGGGTATCT GGACAGCAC AAGGACGAAG TTGACAAAGC AAGTGTCTGAC AGCATGATAA 880
.....

```

Set Mutation

Mut/Cons

Clear

Fixed Primer

F3

F2

F1

B1

B2

B3

Clear

Save Target

Design Option

☒ Default

☐ Common

☐ Specific

Number of Primer Candidates: F1=127, F2=184, F3=457, B1=149, B2=163, B3=484, FIF=103, BIF=135
2 Primer set(s) were generated.

1.Generate Generate 2 sets were generated.

2.Display Display

If you can have more detail settings, please click below.

Detail Settings

Figura 10. Generación de los juegos de *primers* LAMP dentro de la secuencia GC.

AI.3.2.1 Análisis de los primers obtenidos

En este punto se pudo observar el sitio de anillamiento concreto de los diferentes juegos de *primers* diseñados, así como el valor de ΔG de cada uno de ellos. Generalmente, se rechazan los juegos de *primers* que presentan una ΔG mayor a -2,00 kcal/mol. En este caso, se seleccionaron ambos juegos y mediante la función “*Confirm*” se obtuvieron todas las características necesarias para la evaluación de cada uno de los juegos, incluyendo su posición, longitud en pares de bases, temperatura de anillamiento (T_m), ΔG en los extremos 3’ y 5’ y el contenido en G+C (*GC rate*) (Figura 11 y 12).



Figura 11. Posición de anillamiento y valor de ΔG de cada uno de los juegos de *primers* LAMP diseñados dentro de la secuencia GC.

Primer Information

Save

1

ID:1

dimer(minimum)dG=-2.23

label	5'pos	3'pos	len	Tm	5'dG	3'dG	GCrate	Sequence
F3	598	617	20	59.65	-6.45	-4.41	0.50	GGGGTGGTGATGAAAATCCA
B3	789	808	20	59.94	-5.18	-5.35	0.50	CGTCTTCTTGGCTTCGTCAA
FIP		41						GGTGGGTTGAAGGCCATGATGT-GTGAGCCGTGAACATGTGG
BIP		42						AGTCAGGCCGTTTCAGGAATAGC-TCCCTTCCCTTCAGTCTCTG
F2	626	644	19	60.55	-5.75	-5.05	0.58	GTGAGCCGTGAACATGTGG
F1c	675	696	22	65.09	-6.45	-4.46	0.55	GGTGGGTTGAAGGCCATGATGT
B2	765	784	20	59.97	-5.20	-4.60	0.55	TCCCTTCCCTTCAGTCTCTG
B1c	714	735	22	64.15	-4.74	-3.97	0.55	AGTCAGGCCGTTTCAGGAATAGC

Primer Information

Save

2

ID:3

dimer(minimum)dG=-2.16

label	5'pos	3'pos	len	Tm	5'dG	3'dG	GCrate	Sequence
F3	809	828	20	59.87	-5.70	-4.57	0.50	TGGAGGCTCTCAATGGGTAT
B3	1001	1020	20	59.50	-5.30	-4.90	0.55	GGGAAGGTTTCTGGAGTCAC
FIP		41						GCTCCTGTGCCTTGGCAATGT-AGCACAAGGACGAAGTTGAC
BIP		41						ATTCTGTCTCTTCTCGTGCACA-CGGCCTTGTAGCCAGTAG
F2	836	855	20	59.94	-5.80	-4.67	0.50	AGCACAAGGACGAAGTTGAC
F1c	895	915	21	65.63	-5.93	-4.21	0.57	GCTCCTGTGCCTTGGCAATGT
B2	980	998	19	59.44	-7.36	-4.07	0.58	CGGCCTTGTAGCCAGTAG
B1c	925	946	22	64.41	-4.73	-5.97	0.50	ATTCTGTCTCTTCTCGTGCACA

Figura 12. Características de los dos juegos de *primers* LAMP generados.

AI.3.2.2 *Primers degenerados*

Además, realizamos un análisis *in silico* para comprobar que cada uno de los *primers* hibridaba con las 51 secuencias nucleotídicas empleadas en el diseño de los mismos. Para ello, utilizamos el programa BioEdit. Brevemente, abrimos el archivo con las 51 secuencias y uno de los *primers* (en el ejemplo, utilizamos la secuencia del *primer* externo F3), seleccionamos “Accessory application” y dentro de esta ventana “ClustalW Multiple Alignment” (**Figura 13**). A continuación, se abre una nueva ventana y se observa el alineamiento del *primer* F3 con las 51 secuencias (**Figura 14**). Pudimos observar que, en algunas ocasiones, uno o dos nucleótidos no coincidían, por lo que optamos por diseñar *primers* degenerados, los cuales presentan en alguna de sus posiciones varias bases posibles. En la **tabla 2** del apartado “AI.3. Selección de secuencias y diseño de *primers*”, se muestran los *primers* diseñados con las respectivas bases degeneradas o “wobble bases”.

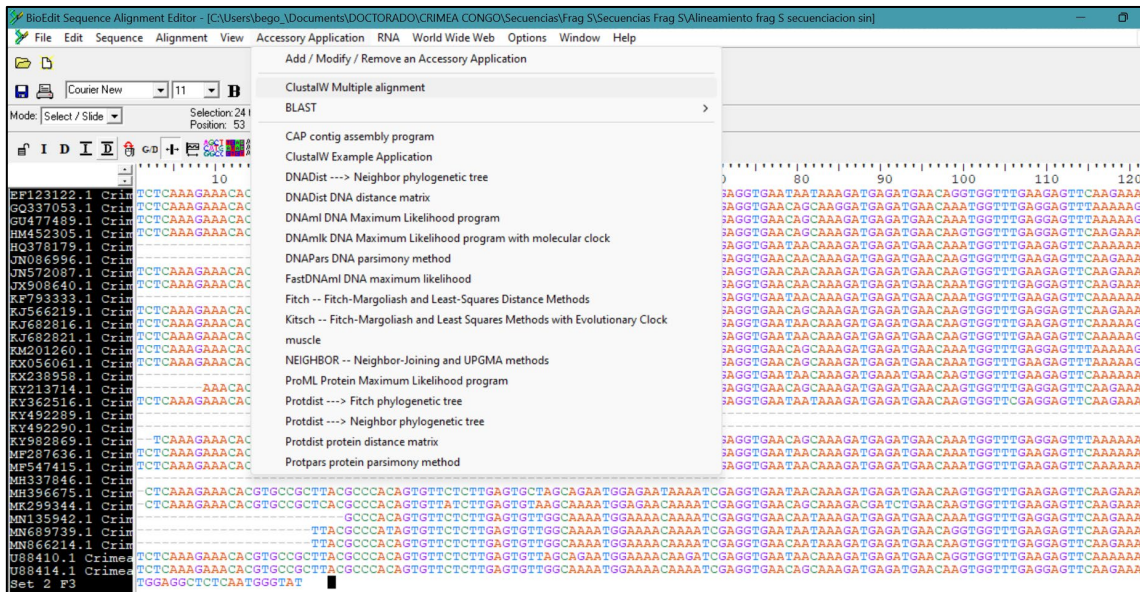


Figura 13. Representación gráfica del análisis *in silico* para comprobar la hibridación entre los *primers* diseñados y las 51 secuencias nucleotídicas utilizando el programa BioEdit.



Figura 14. Representación gráfica del alineamiento de las 51 secuencias nucleotídicas y el *primer* F3.

AI.4. Examen microscópico

En el **primer artículo de investigación**, el examen microscópico para la detección de microfilarias en sangre se realizó en el Centro Nacional de Medicina Tropical, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España.

En el **tercer artículo de investigación**, el examen microscópico se llevó a cabo durante la estancia doctoral en el Hospital Nossa Senhora da Paz, Cubal, Angola. Para ello, se realizaron frotis fino y gota gruesa de sangre capilar de 200 pacientes. Una vez

recogidos los frotis sanguíneos, el frotis fino se fijó con metanol. A continuación, se sumergieron en jarras de tinción que contenían Giemsa al 10% durante 15 minutos y luego fueron lavados con agua para quitar los restos de tinción. Una vez teñidos, se procedió a su lectura bajo microscopio con un aumento de 100X y aceite de inmersión. La carga parasitaria de las gotas gruesas se calculó siguiendo la metodología descrita por Alger y colaboradores (8). Brevemente, se contaron el número de parásitos por 100 leucocitos, asumiendo una concentración constante de 8000 leucocitos/ μ L de sangre. Una muestra se clasificó como negativa si no se observó ninguna forma parasitaria de *Plasmodium* spp. en 500 leucocitos. La fórmula empleada fue la siguiente:

$$\frac{N^{\circ} \text{ de parásitos en 100 leucocitos} \times 8000}{100 \text{ leucocitos}} = X \text{ parásitos por } \mu\text{L sangre}$$

AI.5. Técnicas de amplificación de ADN

Durante estos años de trabajo, siempre que se realizaba cualquier técnica de amplificación de ADN se seguían normas básicas de laboratorio. Así, se realizaba una limpieza previa con etanol al 70% de todo el material a utilizar y de las áreas de trabajo. Además, se trabajó en áreas totalmente separadas para cada procedimiento: las mezclas de reacción se prepararon en una cabina de flujo laminar previamente irradiada con luz ultravioleta durante 15 minutos, el ADN se añadió en una zona de extracción y la manipulación de los productos amplificados se realizó en la zona de amplificación. El material que se utiliza en la cabina es exclusivo y no puede sacarse ni emplearse para otra actividad.

AI.5.1. *Nested Polymerase Chain Reaction (Nested-PCR)*

En el **primer artículo de investigación**, la *Nested-PCR* se realizó en el Centro Nacional de Medicina Tropical, Instituto de Salud Carlos III (Madrid, España). Las muestras se procesaron realizando la extracción del ADN mediante el método Chelex previamente descrito. A continuación, se realizó la *Nested-PCR* basada en la secuencia de repetición 3 (15r3) del gen que codifica la proteína 15-kD de *Loa loa* siguiendo la metodología descrita por Touré y colaboradores (9) con ligeras modificaciones. Brevemente, para la PCR inicial, se utilizaron 5 μ L del ADN y, 2 μ L del producto amplificado en la PCR inicial fue utilizado para realizar la segunda PCR. La amplificación inicial se llevó a cabo en el termociclador *Applied Biosystems GeneAmp*®

PCR System 2700 durante 30 ciclos a 94°C 1 minuto (desnaturalización), 65°C 1 minuto (anillamiento) y, 72°C 2 minutos (extensión). Para la segunda PCR se utilizaron las mismas condiciones, pero se redujo el número de ciclos a 25. Los productos de PCR fueron analizados mediante un sistema automático de electroforesis multicapilar *QIAxcel Advanced* (QUIAGEN GMBF, Hilden, Alemania).

AI.5.2. Reverse-transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

En el **segundo artículo de investigación**, se realizó una RT-qPCR utilizando los *primers* externos diseñados (F3/B3) para comprobar que estábamos amplificando la secuencia esperada. Para llevar a cabo la RT-qPCR se utilizó el *kit One-step NZY RT-qPCR Green Kit, ROX* (Nzytech, Lda., Lisbon, Portugal) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las reacciones fueron realizadas en el dispositivo *PCRmax ECO48 real time PCR System* (PCRmax, Stone, Reino Unido). El volumen de los distintos reactivos para preparar la muestra de reacción y los ciclos de temperatura se muestran en la **tabla 3 y 4**.

Posteriormente, los amplicones obtenidos en la RT-qPCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1,5% utilizando el tampón de carga *GreenSafe Premium* (NZYtech, Lda., Lisboa, Portugal) y el marcador de peso molecular *NZYDNA Ladder V* (NZYtech, Lda., Lisboa, Portugal). Los resultados se observaron bajo luz ultravioleta.

Tabla 3. Mezcla de reacción de la RT-qPCR para la detección del VFHCC utilizando el *kit One-step NZY RT-qPCR Green kit, ROX*.

Reactivo	Volumen por tubo
Agua libre de nucleasas	Hasta completar 20µL
<i>One-step NZY RT-qPCR Green master mix</i> (2x)	10 µL
F3	0,8 µL
B3	0,8 µL
NZYRT mix	0,8 µL
Muestra/Control	5 µL

Tabla 4. Ciclos de la RT-qPCR para la detección del VFHCC.

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo	Etapas
1	50	20 min	Retrotranscripción
1	95	10 min	Activación de la polimerasa
40	95	15 seg	Desnaturalización
	60	1 min	Anillamiento/Extensión

AI.5.3. LAMP colorimétrico

Las mezclas de reacción utilizadas para llevar a cabo el ensayo LAMP colorimétrico en el **primer y tercer artículo de investigación** son análogas. Se harán especificaciones particulares cuando sea necesario. Brevemente, la mezcla de reacción LAMP contiene los siguientes reactivos: dNTPs (1,4 mM), *Isothermal buffer* 1X (20mM Tris-HCl (pH 8.8), 50 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0.1 % Tween20), MgSO₄ suplementario (6 mM), 8U de polimerasa *Bst* 2.0 *WarmStart* (NEW ENGLAND BIOLABS, Reino Unido), 0,4 µM LF/LB (de cada uno, si se incluyen), 1,6 µM FIP/BIP (de cada uno) y 0,2 µM F3/B3 (de cada uno) (BIORON). Los volúmenes de reacción para llevar a cabo un LAMP se muestran en la **tabla 5**.

Tabla 5. Reactivos y volúmenes para una reacción LAMP colorimétrica.

Reactivo	Volumen por tubo
H ₂ O mQ*	Hasta completar 15 µL
dNTPs	2,1 µL
<i>Isothermal buffer</i> 10x	1,5 µL
MgSO ₄	0,9 µL
LF/LB	0,6 µL
F3/B3	0,3 µL
FIP/BIP	0,24 µL
<i>Bst</i> polimerasa 2.0	0,6 µL
Muestra/Control	2 µL

*H₂O mQ (Agua ultrapura)

Una vez realizada la mezcla de reacción se distribuyeron 13 µL de mezcla a cada tubo. Después, se añadieron 2 µL de muestra/control a cada tubo. La incubación de los tubos de reacción se realizó a 65°C durante 50 minutos y posteriormente 5-10 min a 80°C para la inactivación de la enzima en el caso de *Loa loa* y a 65°C durante 55 minutos seguido de 5-10 min a 80°C en el caso de *Plasmodium* spp. La detección

de los productos amplificados se llevó a cabo de manera visual a través de la adición de 2 µL de SYBR® Green I 1000x (INVITROGEN), que produce un cambio de color de naranja (negativo) a verde (positivo). Además, la visualización de los resultados también puede realizarse mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% para la observación del típico patrón de bandas en escalera característico de una reacción tipo LAMP.

AI.5.4. LAMP a tiempo real

A diferencia del LAMP colorimétrico, en este caso el método de detección de la amplificación se realiza añadiendo al inicio de la reacción 0,24 µL de colorante intercalante fluorescente EvaGreen 20x (BIOTIUM, Fremont, Estados Unidos). La monitorización de la reacción a tiempo real se llevó a cabo en dos dispositivos diferentes: en el dispositivo portátil *Genie III* (OPTIGENE Ltd., Horsham, Reino Unido) y/o en el dispositivo *PCRmax ECO 48 real time PCR System* (PCRmax, Stone, Reino Unido).

AI.5.5. Reverse-transcription-LAMP (RT-LAMP)

Para la detección de ARN mediante la tecnología LAMP (RT-LAMP) se pueden utilizar dos enzimas diferentes: la enzima *Bst* 3.0 (NEW ENGLAND BIOLABS Ltd., Ipswich, Estados Unidos) que tiene tanto actividad polimerasa como retrotranscriptasa o utilizando la polimerasa *Bst* 2.0 *WarmStart* (NEW ENGLAND BIOLABS, Reino Unido) junto con la enzima retrotranscriptasa *RTx* (NEW ENGLAD BIOLABS Ltd., Ipswich, EE. UU.). Las reacciones son análogas al LAMP colorimétrico y a tiempo real descrito en los apartados anteriores, simplemente se añade a la mezcla de reacción 0,3 µL de la enzima *RTx*. En el segundo **artículo científico** se llevaron a cabo los RT-LAMP tanto de forma colorimétrica como a tiempo real. En este caso, el volumen final de reacción, en lugar de 15 µL fue 25 µL. La incubación se realizó de dos maneras diferentes:

- RT-LAMP colorimétrico: a 63°C durante 60 minutos y 5-10 minutos a 80°C para inactivar la enzima.
- RT-LAMP a tiempo real: a 63°C durante 70-80 minutos seguido de 10 minutos a 80°C o a 50°C para facilitar la retrotranscripción seguido de 50 minutos a 63°C y 5-10 minutos a 80°C.

En la **tabla 6** se muestran detallados los volúmenes de reacción utilizados.

Tabla 6. Reactivos y volúmenes necesarios para llevar a cabo una RT-LAMP colorimétrica.

Reactivos	Volumen por tubo
H ₂ O mQ	Hasta completar 25 µL
dNTPs	3,5 µL
<i>Isothermal buffer</i> 10x	2,5 µL
MgSO ₄	1.5 µL
LF/LB	1 µL
F3/B3	0,5 µL
FIP/BIP	0,4 µL
<i>RTx</i> polimerasa	0,5 µL
<i>Bst</i> polimerasa 2.0	1 µL
Muestra/Control	3 µL

AI.6. Ensayos de sensibilidad y especificidad

AI.6.1. Sensibilidad

En el **segundo artículo de investigación** se evaluó la sensibilidad del ensayo RT-LAMP diseñado para la detección del VFHCC. Para ello se utilizó como control positivo una muestra de un paciente diagnosticado con FHCC en el Hospital Del Bierzo (Ponferrada, León, España) con un resultado positivo por RT-PCR. El ARN se midió utilizando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, NC, EE.UU.) y se diluyó en agua ultrapura hasta una concentración final de 5ng/µL. A continuación, se realizaron diluciones seriadas desde 1x a 1:10⁶ y se almacenaron a -80°C hasta su uso. Los ensayos de sensibilidad se realizaron tanto colorimétricamente como a tiempo real.

AI.6.2. Especificidad

En el **segundo artículo de investigación** se realizaron estudios de especificidad del ensayo RT-LAMP diseñado para la detección del VFHCC. Para ello el ensayo se sometió a pruebas cruzadas de especificidad contra un panel de 8 aislados de ARN, incluyendo virus hemorrágicos: virus del Ébola (cepa Zaire y Sudán) y virus de Lassa, cedidos amablemente por el Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III (Madrid, España) y virus respiratorios: virus respiratorio sincitial A (RSVA), virus respiratorio sincitial B (RSVB), coronavirus NL63 (NL63), coronavirus OC43 (OC43) e influenza A H1 (AH1), cedidos generosamente por el Laboratorio del Centro Nacional de Gripe, Hospital Clínico Universitario de Valladolid (Valladolid,

España). Los ensayos de especificidad se realizaron tanto colorimétricamente como a tiempo real.

AI.7. Secuenciación de ADN

La secuenciación del ADN en el **segundo artículo de investigación** se llevó a cabo de dos formas diferentes.

Por un lado, como se ha comentado en el apartado “AI.5. Técnicas de amplificación”, se realizó una RT-qPCR utilizando los primers externos diseñados (F3/B3) para comprobar que estábamos amplificando la secuencia esperada. Para ello, se utilizó una muestra positiva de un paciente diagnosticado con FHCC en el Hospital del Bierzo (Ponferrada, España). Para la secuenciación del ADN, el producto de amplificación obtenido en la RT-qPCR se purificó utilizando el *kit NZY Gelpure* (Nzytech, Lisboa, Portugal) siguiendo los siguientes pasos:

1. Se añadieron 5 volúmenes del *buffer* de unión a la mezcla de reacción. Posteriormente, se mezcló invirtiendo el tubo varias veces.
2. Después, se transfirió la mezcla anterior a las columnas de centrifugación NZYTech. Se centrifugó a 12.000 x g durante 1 min y se descartó el eluido.
3. A continuación, se añadieron 600 µL de *buffer* de lavado y se centrifugó a 12.000 x g 1 minuto y se descartó el eluido.
4. Para eliminar el etanol residual y secar la membrana de la columna, se realizó una centrifugación durante 1 min a 12.000 x g.
5. Por último, se colocó la columna en un tubo de 1,5 mL, añadieron 50 µL de *buffer* de elución en el centro de la columna y se incubó a temperatura ambiente durante 1 min. A continuación, se realizó una última centrifugación a 12.000 x g durante 1 min y el ADN purificado se almacenó a -80°C hasta uso.

Una vez purificado, se envió refrigerado al Servicio de Secuenciación de ADN (NUCLEUS), Universidad de Salamanca, donde se realizó una secuenciación de Sanger utilizando los primers externos F3 y B3.

Por otro lado, el proceso completo de secuenciación de las muestras cedidas de los pacientes diagnosticados con FHCC en el Hospital Universitario de Salamanca (Salamanca, España) también se realizó en el Servicio de Secuenciación de ADN (NUCLEUS), Universidad de Salamanca. Para ello, se realizó una *Nested* RT-PCR siguiendo la metodología descrita por Negredo y colaboradores (10). Brevemente, en

la primera amplificación se amplificó la región 123-764 y, en la segunda, la región 450-674 del segmento S del VFHCC. Posteriormente, el producto amplificado se purificó y se realizó una secuenciación de Sanger utilizando el segundo juego de *primers* utilizado en la *Nested* RT-PCR.

En ambos casos, para examinar las secuencias obtenidas por secuenciación, se utilizó el *software* gratuito BioEdit (7). Además, se realizó un BLAST (ver apartado “AI.3.1.1 Ensayo *in silico* de especificidad”) para comparar las secuencias con las disponibles en la base de datos del NCBI.

AI.8. Análisis filogenético

En el **segundo artículo de investigación** se llevó a cabo un análisis filogenético de las secuencias obtenidas en el apartado “AI.7. Secuenciación de ADN”. En primer lugar, se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias obtenidas y las 51 secuencias utilizadas en el diseño de los *primers* del ensayo RT-LAMP. Para ello, se utilizó el *software* disponible *online* ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) y se procedió a realizar el alineamiento múltiple (ver apartado AI.3.1 Selección y obtención de las secuencias). En segundo lugar, se utilizó el programa MEGA v10.2.5 (11) con el fin de seleccionar el mejor modelo de sustitución nucleotídica. Se seleccionó el modelo “*Tamura-Nei parameter*” y se utilizó el método “*Neighbour-joining*” y 1000 réplicas de *Bootstrap*. Para general el árbol filogenético se utilizó el *software* Geneious Tree Builder 2022 (12). Por último, el árbol filogenético se editó utilizando el programa Adobe® Illustrator CS4.

AI.9. Análisis estadístico

En el **primer y tercer artículo de investigación** para estimar la precisión de los métodos moleculares como pruebas diagnósticas, se calcularon los porcentajes de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo e índice Kappa. Estos valores se obtuvieron mediante el programa gratuito *online* WinEpi 2.0 (*Working in Epidemiology*: <http://www.winepi.net/>) (13). Se estableció un intervalo de confianza del 95%.

Además, en el **primer artículo de investigación**, para la representación gráfica de los datos se utilizó el *software* estadístico R (v. 3.6.3) y los paquetes “*ggplot2*”, “*ggpubr*” y “*ggrepel*”.

AI.10. Referencias

1. Plowe C V., Djimde A, Bouare M, Doumbo O, Wellems TE. Pyrimethamine and proguanil resistance-conferring mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase: Polymerase chain reaction methods for surveillance in Africa. *Am J Trop Med Hyg.* 1995;52(6):565–8.
2. Fernández-Soto P, Mvoulouga PO, Akue JP, Abán JL, Santiago BV, Sánchez MC, et al. Development of a highly sensitive Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) method for the detection of *Loa loa*. *PLoS One.* 2014;9(4):1–7.
3. Febrer-Sendra B, Fernández-Soto P, García-Bernalt Diego J, Crego-Vicente B, Negredo A, Muñoz-Bellido JL, et al. A Novel RT-LAMP for the Detection of Different Genotypes of Crimean-Congo Haemorrhagic Fever Virus in Patients from Spain. *Int J Mol Sci.* 2023;24(7).
4. Chen X, Zhang J, Pan M, Qin Y, Zhao H, Qin P, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays targeting 18S ribosomal RNA genes for identifying *P. vivax* and *P. ovale* species and mitochondrial DNA for detecting the genus *Plasmodium*. *Parasites and Vectors.* 2021;14(1):1–10.
5. Gandasegui J. Diseño, desarrollo y aplicación de la tecnología LAMP para el diagnóstico de la esquistosomosis: del laboratorio al campo. Tesis Doctoral. 2017.
6. Eiken Chemical Co. A Guide to LAMP primer designing (PrimerExplorer V5). A Guid to LAMP Prim Des (PrimerExplorer V5). 2014;1–18. Available from: available: http://primerexplorer.jp/e/v4_manual/pdf/PrimerExplorerV4_Manual_1.pdf.
7. Hall TA. Bioedit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows. *Nucleic Acids Symp Ser.* 1999;41:95–8.
8. Alger J. Densidad parasitaria en malaria: métodos de determinación y su interpretación. *Rev méd hondur.* 2001;118–20.
9. Touré FS, Kassambara L, Williams T, Millet P, Bain O, Georges AJ, et al. Human occult loiasis: Improvement in diagnostic sensitivity by the use of a nested polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;59(1):144–9.
10. Negredo A, de la Calle-Prieto F, Palencia-Herrejón E, Mora-Rillo M, Astray-Mochales J, Sánchez-Seco MP, et al. Autochthonous Crimean–Congo Hemorrhagic Fever in Spain. *N Engl J Med.* 2017;377(2):154–61.
11. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol.* 2018;35(6):1547–9.
12. Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, et al. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics.* 2012;28(12):1647–9.
13. Blas, I; Ruíz-Zarzuela, I; Vallejo A. WinEpi: Working in Epidemiology. An online epidemiological tool. ISVEE 11: Proceedings of the 11th Symposium of the International Society for Veterinary Epi-demiology and Economics, Cairns (Australia). Theme 4 - Tools & training for epidemiologists: Poste. 2006 [cited 2022 Nov 25]. p. 800. Available from: <http://winepi.net/>.

ANEXO II

*Otras publicaciones científicas,
comunicaciones a congresos,
publicaciones docentes, premios de
investigación y estancias en el extranjero*

AII.1. Otras publicaciones científicas

En este apartado se recogen los artículos de investigación en los cuales se ha colaborado durante el tiempo de formación predoctoral en el Programa de Salud y Desarrollo en los Trópicos, en la Universidad de Salamanca. A continuación, se muestra una lista detallada de los mismos. Además, se incluye la primera página de cada uno de ellos.

1. **Febrer-Sendra B**, Crego-Vicente B, García-Bernalt Diego J, Fernández-Soto P. Loop-mediated isothermal amplification: towards point-of-care diagnostics. JIDTM. 2019. 3(2): 000129.
2. García-Bernalt Diego J, Fernández-Soto P, Crego-Vicente B, Alonso-Castrillejo S, **Febrer-Sendra B**, Gómez-Sánchez A, Vicente B, López-Abán J, Muro A. Progress in loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Schistosoma mansoni* DNA: towards a ready-to-use test. Sci Rep. 2019. 14;9(1):14744.
3. Ordóñez D, Fernández-Soto P, Fernández-Martín AM, Crego-Vicente B, **Febrer-Sendra B**, García-Bernalt Diego J, Vicente B, López-Abán J, Belhassen-García M, Muro A, Patarroyo MA. A *Trypanosoma cruzi* genome tandem repetitive satellite DNA sequence as a molecular marker for a LAMP assay for diagnosing chagas' disease. Dis Markers. 2020. 22;2020:8074314.
4. Fernández-Soto P, Avendaño C, Sala-Vizcaíno A, Crego-Vicente B, **Febrer-Sendra B**, García-Bernalt Diego J, Oleaga A, López-Abán J, Vicente B, Patarroyo MA, Muro A. Molecular markers for detecting *Schistosoma* species by loop-mediated isothermal amplification. Dis Markers. 2020. 22;2020:8042705.
5. Fernández-Soto P, Fernández-Medina C, Cruz-Fernández S, Crego-Vicente B, **Febrer-Sendra B**, García-Bernalt Diego J, Gorgojo-Galindo Ó, López-Abán J, Vicente Santiago B, Muro Álvarez A. Whip-LAMP: a novel LAMP assay for the detection of *Trichuris muris*-derived DNA in stool and urine samples in a murine experimental infection model. Parasite Vectors. 2020. 7;13(1):552.

6. García-Bernalt Diego J, Fernández-Soto P, **Febrer-Sendra B**, Crego-Vicente B, Muro A. Loop-Mediated Isothermal Amplification in Schistosomiasis. *J Clin Med*. 2021. 1;10(3):511.
7. Crego-Vicente B, Fernández-Soto P, **Febrer-Sendra B**, García-Bernalt Diego J, Boissier J, Angora EK, Oleaga A, Muro A. Application of a genus-specific LAMP assay for schistosome species to detect *Schistosoma haematobium* x *Schistosoma bovis* hybrids. *J Clin Med*. 2021. 22;10(6):1308.
8. Muro A, Belhassen-García M, Muñoz Bellido JL, Lorenzo Juanes H, Vicente B, Pendones J, Adserias J, Sánchez Hernández G, Rodríguez Rosa M, Vicente Villardón JL, Burguillo J, López Andaluz J, Martín Oterino JA, García Criado FJ, Barbero F, Morales AI, Galindo Villardón P, González Sarmiento R, **On Behalf Of The DIANCUSAL Team**. Seroprevalence of SARS-CoV-2 antibodies and factors associated with seropositivity at the University of Salamanca: The DIANCUSAL study. *J Clin Med*. 2021. 21;10(15):3214.
9. García-Bernalt Diego J, Fernández-Soto P, Muñoz-Bellido JL, **Febrer-Sendra B**, Crego-Vicente B, Carbonell C, López-Bernús A, Marcos M, Belhassen-García M, Muro A. Detection of SARS-CoV-2 RNA in Urine by RT-LAMP: A Very Rare Finding. *J Clin Med*. 2021. 29;11(1):158.
10. García-Bernalt Diego J, Fernández-Soto P, Márquez-Sánchez S, Santos Santos D, **Febrer-Sendra B**, Crego-Vicente B, Muñoz-Bellido JL, Belhassen-García M, Corchado Rodríguez JM, Muro A. SMART-LAMP: A Smartphone-Operated Handheld Device for Real-Time Colorimetric Point-of-Care Diagnosis of Infectious Diseases via Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Biosensors (Basel)*. 2022. 16;12(6):424.
11. Ta-Tang TH, **Febrer-Sendra B**, Berzosa P, Rubio JM, Romy-Barja M, Ncogo P, Agudo D, Herrador Z, Fernández-Soto P, Muro A, Benito A. Comparison of three PCR-based methods to detect *Loa loa* and *Mansonella perstans* in long-term frozen storage dried blood spots. *Trop Med Int Health*. 2022. 27(8):686-695.

12. Lorenzo Juanes HM, Carbonell C, **Febrer-Sendra B**, López-Bernus A, Bahamonde A, Orfao A, Lista CV, Ledesma MS, Negredo AI, Rodríguez-Alonso B, Bua BR, Sánchez-Seco MP, Muñoz Bellido JL, Muro A, Belhassen-García M. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever, Spain, 2013-2021. *Emerg Infect Dis.* 2023. 29(2):252-259.
13. Crego-Vicente B, Fernández-Soto P, García-Bernalt Diego J, **Febrer-Sendra B**, Muro A. Development of a Duplex LAMP Assay with Probe-Based Readout for Simultaneous Real-Time Detection of *Schistosoma mansoni* and *Strongyloides* spp. -A Laboratory Approach to Point-Of-Care. *Int J Mol Sci.* 2023 Jan 3;24(1):893.



Loop Mediated Isothermal Amplification: Towards Point-of-Care Diagnostic

Febrer-Sendra B, Crego-Vicente B, García-Bernalt Diego J and Fernández-Soto P*

Infectious and Tropical Diseases Research Group (e-INTRO), University of Salamanca, Spain

Perspective

Volume 3 Issue 2

Received Date: July 20, 2019

Published Date: August 06, 2019

***Corresponding author:** Pedro Fernández-Soto, Infectious and Tropical Diseases Research Group (e-INTRO), Biomedical Research Institute of Salamanca-Research Centre for Tropical Diseases at the University of Salamanca (IBSAL-CIETUS), LAMP working group, Faculty of Pharmacy, University of Salamanca, Salamanca, Spain, Tel: +34-677596173; Email: pfsoto@usal.es

Abbreviations: POCD: Point-of-Care Diagnostics; SDI: Sexually Transmitted Diseases Diagnostics Initiative; ASSURED: Affordable, Sensitive, Specific, User-friendly, Rapid and robust, Equipment-free, Deliverable; LAMP: Loop-Mediated Isothermal Amplification; iRBCs: Infected Red Blood Cells; COC: Cyclic Olefin Copolymer.

Introduction

In 2002, Daar AS, et al. [1] listed the top ten challenges that biotechnology faced to improve health in developing countries. On the top of that list we could find: "Modified molecular technologies for affordable, simple diagnosis of infectious diseases". This idea has been materialized over the following years into the principle of point-of-care diagnostics (POCD). Several definitions have been published since then. A good example of that is the one given by Schito M, et al. [2], which says: "a diagnostic test that is performed near the patient or treatment facility, has a fast turnaround time, and may lead to a change in patient management". Moreover, the test should not require trained laboratory personnel, clinical laboratory or other infrastructural support. Over ten years ago, this basic concept was divided into specific criteria that must be achieved with any POCD. Those criteria were proposed by the World Health Organization Sexually Transmitted Diseases Diagnostics Initiative (SDI) in the acronym ASSURED (Affordable, Sensitive, Specific, User-friendly, Rapid and robust, Equipment-free, Deliverable) [3]. This term has been revisited recently by Land KJ, et al. [4],

updating it to the newest technological innovations. Thus, they established the new acronym REASSURED that now also includes: Real-time connectivity and Ease of specimen collection and Environmental friendliness.

The challenge that Daar AS, et al. [1] recognized often face strong limitations, as classic molecular techniques, such as PCR and its variants, require specialized and expensive equipment and a high degree of expertise to perform them. Thus, their arrival and establishment into low-income developing countries is constantly set back. At present, there is a nucleic acid amplification method named loop-mediated isothermal amplification (LAMP) [5]. Compared to PCR-based techniques, the simplicity of the LAMP method makes it suitable for field testing in developing countries [6,7] and an ideal candidate to be used as a POCD tool. LAMP is a highly specific, sensitive and efficient DNA amplification method based on strand displacement reaction and a stem-loop structure under isothermal condition [5]. It uses the *Bacillus stearothermophilus* DNA polymerase and a set of 4 (or 6) primers that hybridize to 6 (or 8) different regions of the target DNA sequence. The LAMP reaction does not require expensive devices and is completed in a short time. Since its emergence, LAMP technology has been successfully used for the detection of a great number of pathogens, including viruses, bacteria, fungi and parasites [8] and, over the past 10 years the number of publications involving the use of LAMP has showed a multiplied exponentially.

OPEN

Progress in loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Schistosoma mansoni* DNA: towards a ready-to-use test

Received: 19 June 2019
Accepted: 27 September 2019
Published online: 14 October 2019

J. García-Bernalt Diego, P. Fernández-Soto , B. Crego-Vicente, S. Alonso-Castrillejo, B. Febrer-Sendra, A. Gómez-Sánchez, B. Vicente, J. López-Abán & A. Muro

Schistosomiasis is one of the most prevalent Neglected Tropical Disease, affecting approximately 250 million people worldwide. *Schistosoma mansoni* is the most important species causing human intestinal schistosomiasis. Despite significant efforts in recent decades, the global disease burden of schistosomiasis remains extremely high. This could partly be attributed to the absence of accurate diagnostic tools, primarily in endemic areas. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is increasingly used in molecular diagnostics as a field-friendly alternative to many other complex molecular methods and it has been proposed as an ideal candidate for revolutionizing point-of-care molecular diagnostics. In a previous work, a LAMP-based method to detect *S. mansoni* DNA (SmMIT-LAMP) was developed by our research group for early diagnosis of active schistosomiasis in an experimental infection murine model. The SmMIT-LAMP has been further successfully evaluated in both human stool and snail samples and, recently, in human urine samples. In this study, we developed an important improvement for SmMIT-LAMP molecular assay, transforming it into a cold maintenance dry format suitable for potentially manufacturing as kit for ready-to-use for schistosomiasis diagnosis. This procedure could be applied to create dry LAMP kits for a laboratory setting and for diagnostic applications for other neglected tropical diseases.

The World Health Organization (WHO) identifies Neglected Tropical Diseases (NTD) as a diverse group of communicable chronic, debilitating and often stigmatizing infectious diseases affecting more than one thousand million people in tropical and subtropical regions along 149 countries, especially in populations living in extreme poverty and inadequate sanitation¹. One of these NTD is schistosomiasis, a parasitic disease caused by trematode worms (blood flukes) of the genus *Schistosoma*. There are two major forms of human schistosomiasis: urogenital schistosomiasis, caused by *Schistosoma haematobium*, and intestinal schistosomiasis, caused by any of the organisms *S. mansoni*, *S. intercalatum*, *S. guineensis*, *S. japonicum*, and *S. mekongi*. It is estimated that 779 million people live within high-risk-of-infection areas and 250 million are infected, more than 80% of them living in sub-Saharan Africa². The disease accounts for an estimated 1.9 million disability-adjusted life years (DALYs) annually³. In recent years, autochthonous outbreaks of urogenital schistosomiasis in the south of Europe have been reported⁴. All these figures emphasize the importance and the need for control and elimination of schistosomiasis. Despite significant efforts in recent decades, the global disease burden of schistosomiasis remains extremely high since a regular treatment with praziquantel, provision of water, sanitation and hygiene, new complementary drugs, local recommendations for snail control, surveillance and management of hotspots, and long-term, well-structured control programmes are still needed in endemic areas. Besides, more accurate diagnostic tools for detecting schistosome infections are also required to help in the overall control of schistosomiasis.

The traditional Kato-Katz fecal microscopic examination for counting schistosome eggs and immunology-based analyses detecting schistosome-derived circulating anodic (CAA) and cathodic (CCA) antigens mainly lack sensitivity in low-intensity infections and posttreatment conditions^{5,6}. Antibody detection also

Infectious and Tropical Diseases Research Group (e-INTRO), Biomedical Research Institute of Salamanca-Research Centre for Tropical Diseases at the University of Salamanca (IBSAL-CIETUS), Faculty of Pharmacy, University of Salamanca, Salamanca, Spain. Correspondence and requests for materials should be addressed to P.F.-S. (email: pfsoto@usal.es) or A.M. (email: ama@usal.es)

Hindawi
Disease Markers
Volume 2020, Article ID 8074314, 8 pages
<https://doi.org/10.1155/2020/8074314>



Research Article

A *Trypanosoma cruzi* Genome Tandem Repetitive Satellite DNA Sequence as a Molecular Marker for a LAMP Assay for Diagnosing Chagas' Disease

Diego Ordóñez¹,² Pedro Fernández-Soto², Ana M. Fernández-Martín,² Beatriz Crego-Vicente², Begoña Febrer-Sendra,² Juan García-Bernalt Diego², Belén Vicente,² Julio López-Abán², Moncef Belhassen-García,² Antonio Muro²,^{3,4} and Manuel A. Patarroyo^{3,4}

¹Animal Science Faculty, Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales (U.D.C.A.), 11166 Bogotá, Colombia

²Infectious and Tropical Diseases Research Group (e-INTRO), Biomedical Research Institute of Salamanca, Research Centre for Tropical Diseases at the University of Salamanca (IBSAL-CIETUS), Faculty of Pharmacy, University of Salamanca, 37007 Salamanca, Spain

³School of Medicine and Health Sciences, Universidad del Rosario, 11211 Bogotá, Colombia

⁴Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC), 111321 Bogotá, Colombia

Correspondence should be addressed to Antonio Muro; ama@usal.es and Manuel A. Patarroyo; mapatarr.fidic@gmail.com

Received 5 December 2019; Accepted 17 January 2020; Published 24 February 2020

Guest Editor: Marcos Vinicius da Silva

Copyright © 2020 Diego Ordóñez et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Chagas' disease is a neglected tropical disease caused by *Trypanosoma cruzi* which is endemic throughout Latin America and is spread by worldwide migration. Diagnosis is currently limited to serological and molecular techniques having variations regarding their sensitivity and specificity. This work was aimed at developing a new sensitive, applicable, and cost-effective molecular diagnosis technique for loop-mediated isothermal amplification-based detection of *T. cruzi* (Tc-LAMP). The results led to determining a highly homologous satellite repeat region (231 bp) among parasite strains as a molecular marker for diagnosing the disease. Tc-LAMP was performed correctly for detecting parasite DNA (5 fg for the CL Brener strain and 50 fg for the DM28, TcVI, and TcI strains). Assay results proved negative for DNA from 16 helminth species and 7 protozoa, including *Leishmania* spp. Tc-LAMP based on the highly repeated *T. cruzi* satellite region is thus proposed as an important alternative for diagnosing *T. cruzi* infection, overcoming other methods' limitations such as their analytic capability, speed, and requiring specialized equipment or highly trained personnel. Tc-LAMP could be easily adapted for point-of-care testing in areas having limited resources.

1. Introduction

American trypanosomiasis, or Chagas' disease, is a zoonotic disease, usually consisting of chronic parasitic infection caused by the kinetoplastid protozoan *Trypanosoma cruzi*. The World Health Organization (WHO) recognizes Chagas' disease as one of the 20 neglected tropical diseases (NTD) [1] and one of the 13 most NTD worldwide [2]. Chagas' disease was considered a strictly rural disease for many decades; however, socioeconomic changes, rural exodus, deforesta-

tion, and urbanization have transformed the disease's epidemiological profile, making it an increasingly urban phenomenon and a major public health problem [3]. The disease can currently be found in 21 Latin American countries, and it has been estimated that at least 8 million people are infected worldwide. Migration has increased the disease's incidence, and it has been spread to other continents [2, 4].

Chagas' disease diagnosis depends on the phase in which a patient is found to be. Parasitemia is high during the acute phase and the congenital form, as well as in reactivations

Hindawi
Disease Markers
Volume 2020, Article ID 8042705, 11 pages
<https://doi.org/10.1155/2020/8042705>



Research Article

Molecular Markers for Detecting *Schistosoma* Species by Loop-Mediated Isothermal Amplification

Pedro Fernández-Soto¹, Catalina Avendaño², Anna Sala-Vizcaino¹,
Beatriz Crego-Vicente¹, Begoña Febrer-Sendra¹, Juan García-Bernalt Diego¹,
Ana Oleaga³, Julio López-Abán¹, Belén Vicente¹, Manuel A. Patarroyo^{4,5},
and Antonio Muro¹

¹Infectious and Tropical Diseases Research Group (e-INTRO), Biomedical Research Institute of Salamanca, Research Centre for Tropical Diseases at the University of Salamanca (IBSAL-CIETUS), Faculty of Pharmacy, University of Salamanca, 37007 Salamanca, Spain

²Animal Science Faculty, Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales (U.D.C.A), 111166 Bogotá, Colombia

³Parasitología Animal, Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA, CSIC), Cordel de Merinas, 40-52, 37008 Salamanca, Spain

⁴Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC), 111321, Bogotá, Colombia

⁵School of Medicine and Health Sciences, Universidad del Rosario, 112111 Bogotá, Colombia

Correspondence should be addressed to Manuel A. Patarroyo; mapatarr.fidic@gmail.com and Antonio Muro; ama@usal.es

Received 23 October 2019; Revised 20 June 2020; Accepted 1 July 2020; Published 24 July 2020

Academic Editor: Lucio Castellano

Copyright © 2020 Pedro Fernández-Soto et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Schistosomiasis is considered a neglected parasitic disease. Around 280,000 people die from it annually, and more than 779 million people are at risk of getting infected. The schistosome species which infect human beings are *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma intercalatum*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma guineensis*, and *Schistosoma mekongi*. This disease is also of veterinary significance; the most important species being *Schistosoma bovis* since it causes the disease in around 160 million livestock in Africa and Asia. This work was aimed at designing and developing a genus-specific loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for detecting the most important schistosome species affecting humans and for the species-specific detection of *S. bovis*. Bioinformatics tools were used for primer design, and the LAMP method was standardised for detecting the ITS-1 region from *S. intercalatum*, *S. haematobium*, *S. mansoni*, *S. japonicum*, and *S. bovis* DNA (generic test) and the NADH 1 gene for specifically detecting *S. bovis* (at different DNA concentrations). Detection limits achieved were 1 pg DNA for *S. mansoni*, 0.1 pg for *S. haematobium*, 1 pg for *S. intercalatum*, and 10 pg for *S. bovis*. No amplification for *S. japonicum* DNA was obtained. The LAMP designed for the amplification of *S. bovis* NADH-1 worked specifically for this species, and no other DNA from other schistosome species included in the study was amplified. Two highly sensitive LAMP methods for detecting different *Schistosoma* species important for human and veterinary health were standardised. These methods could be very useful for the diagnosis and surveillance of schistosome infections.

1. Introduction

Schistosomiasis is a parasitic disease caused by several species of trematode worms of the genus *Schistosoma*. It is one of the 20 tropical diseases on the World Health Organization's (WHO) list of Neglected Tropical Diseases (NTDs) [1]. The disease affects at least 240 million people worldwide and

more than 779 million are at risk of contracting it [2]. The infection is endemic in 78 countries, mainly in tropical and subtropical areas, although it predominates in Sub-Saharan Africa where more than 80% of the cases occur, leading to around 280,000 deaths annually. The Global Burden of Disease study attributed 1.43 million disability-adjusted life years (DALYs) to it in 2017 [2–5].

Fernández-Soto et al. *Parasites Vectors* (2020) 13:552
<https://doi.org/10.1186/s13071-020-04435-1>

RESEARCH

Open Access



Whip-LAMP: a novel LAMP assay for the detection of *Trichuris muris*-derived DNA in stool and urine samples in a murine experimental infection model

Pedro Fernández-Soto^{*,†}, Carlos Fernández-Medina[†], Susana Cruz-Fernández, Beatriz Crego-Vicente, Begoña Febrer-Sendra, Juan García-Bernalt Diego, Óscar Gorgojo-Galindo, Julio López-Abán, Belén Vicente Santiago and Antonio Muro Álvarez^{*}

Abstract

Background: *Trichuris trichiura* (human whipworm) infects an estimated 477 million individuals worldwide. In addition to *T. trichiura*, other *Trichuris* species can cause an uncommon zoonosis and a number of human cases have been reported. The diagnosis of trichuriasis has relied traditionally on microscopy. Recently, there is an effort to use molecular diagnostic methods, mainly qPCR. LAMP technology could be an alternative for qPCR especially in low-income endemic areas. *Trichuris muris*, the causative agent of trichuriasis in mice, is of great importance as a model for human trichuriasis. Here, we evaluate the diagnostic utility of a new LAMP assay in an active experimental mouse trichuriasis in parallel with parasitological method by using stool and, for the first time, urine samples.

Methods: Stool and urine samples were collected from mice infected with eggs of *T. muris*. The dynamics of infection was determined by counting the number of eggs per gram of faeces. A LAMP based on the 18S rRNA gene from *T. muris* was designed. Sensitivity and specificity of LAMP was tested and compared with PCR. Stool and urine samples were analysed by both LAMP and PCR techniques.

Results: *Trichuris muris* eggs were detected for the first time in faeces 35 days post-infection. LAMP resulted specific and no cross-reactions were found when using 18 DNA samples from different parasites. The detection limit of the LAMP assay was 2 pg of *T. muris* DNA. When testing stool samples by LAMP we obtained positive results on day 35 p.i. and urine samples showed amplification results on day 20 p.i., i.e. 15 days before the onset of *T. muris* eggs in faeces.

Conclusions: To the best of our knowledge, we report, for the first time, a novel LAMP assay (Whip-LAMP) for sensitive detection of *T. muris* DNA in both stool and urine samples in a well-established mice experimental infection model. Considering the advantages of urine in molecular diagnosis in comparison to stool samples, should make us consider the possibility of starting the use urine specimens in molecular diagnosis and for field-based studies of human trichuriasis where possible. Further studies with clinical samples are still needed.

Keywords: *Trichuris trichiura*, LAMP, *Trichuris muris*, Human trichuriasis, Urine

^{*}ch Centre for Tropical Diseases
at the University of Salamanca (IBSAL-CIETUS), Faculty of Pharmacy,
University of Salamanca, Salamanca, Spain

© The Author(s) 2020. This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.



Review

Loop-Mediated Isothermal Amplification in Schistosomiasis

Juan García-Bernalt Diego, Pedro Fernández-Soto ^{*}, Begoña Febrer-Sendra, Beatriz Crego-Vicente and Antonio Muro ^{ID}

Infectious and Tropical Diseases Research Group (e-INTRO), Biomedical Research Institute of Salamanca-Research Centre for Tropical Diseases at the University of Salamanca (IBSAL-CIETUS), Faculty of Pharmacy, University of Salamanca, 37007 Salamanca, Spain; juanbernal95@usal.es (J.G.-B.D.); begofebrer@usal.es (B.F.-S.); beatrizcregovic@usal.es (B.C.-V.); ama@usal.es (A.M.)

* Correspondence: pfsoto@usal.es



Citation: García-Bernalt Diego, J.; Fernández-Soto, P.; Febrer-Sendra, B.; Crego-Vicente, B.; Muro, A. Loop-Mediated Isothermal Amplification in Schistosomiasis. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 511. <https://doi.org/10.3390/jcm10030511>

Academic Editor: Miguel

A. Martín-Acebes

Received: 29 December 2020

Accepted: 28 January 2021

Published: 1 February 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Human schistosomiasis is one of the most important parasitic diseases, causing around 250 million cases (mostly in Africa) and 280,000–500,000 deaths every year. Due to the limited resources and the far-removed nature of many endemic areas, the implementation of new, sensitive and specific diagnostic tools has had little success. This is particularly true for PCR-based molecular methods that require expensive equipment and trained personnel to be executed. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) along with other isothermal techniques appeared in the early 21st century as an alternative to those methods, overcoming some of the aforementioned limitations and achieving a more inexpensive diagnostic. However, to this date, neither LAMP nor any other isothermal technique have signified a meaningful change in the way schistosomiasis diagnosis is routinely performed. Here, we present the recent developments in LAMP-based schistosomiasis diagnosis. We expose the main advantages and disadvantages of LAMP technology over PCR and other classical diagnostic methods focusing in various research approaches on intermediate hosts, animal models and patients. We also examine its potential clinical application in post-therapy monitoring, as well as its usefulness as a point-of-care test.

Keywords: schistosomiasis; LAMP; diagnosis; point-of-care; neglected tropical diseases; molecular diagnostics

1. Introduction

Human schistosomiasis is the most important helminthic Neglected Tropical Disease (NTD), causing significant morbidity and mortality [1]. It is a chronic waterborne parasitic disease caused by several flatworm (blood flukes) trematodes of the genus *Schistosoma*. It is transmitted in 78 countries with over 250 million estimated cases (mostly in Africa), around 280,000–500,000 deaths every year, and a DALYs index of 3.3 million per year [2]. The three most widespread and clinically impactful *Schistosoma* species affecting humans are *Schistosoma haematobium* (Africa and the Middle East), *S. mansoni* (Africa, South America, the Middle East and the Caribbean), and *S. japonicum* (Indonesia, China, Southeast Asia and the Philippines). Moreover, there are four additional *Schistosoma* species able to infect humans, which present a lower prevalence: *S. mekongi*, *S. guineensis*, *S. intercalatum* and *S. malayensis* [3]. Additionally, the hybridization between *Schistosoma* species is an increasing concern [4]. Schistosomiasis is acquired by contact with freshwater contaminated with cercariae penetrating the skin that are disseminated by specific intermediate-host snails [1,3]. Transmission typically occurs in tropical and subtropical regions (80–90% of cases in sub-Saharan Africa). Nevertheless, recent outbreaks caused by schistosome hybrids in the south of Europe have proved the reemergence potential of the disease in temperate regions [5,6]. Clinically, three stages are typically distinguished: cercarial dermatitis, acute and chronic schistosomiasis. *Cercarial dermatitis* is due to skin penetration of cercariae, which cause a maculopapular pruritic reaction that lasts for 24–48 h. This is

Article

Application of A Genus-Specific LAMP Assay for Schistosome Species to Detect *Schistosoma haematobium* x *Schistosoma bovis* Hybrids

Beatriz Crego-Vicente ¹, Pedro Fernández-Soto ^{1,*}, Begoña Febrer-Sendra ¹, Juan García-Bernalt Diego ¹, Jérôme Boissier ², Etienne K. Angora ^{3,4,5}, Ana Oleaga ⁶ and Antonio Muro ^{1,*}

- ¹ Infectious and Tropical Diseases Research Group (e-INTRO), Research Centre for Tropical Diseases at the University of Salamanca (IBSAL-CIETUS), Biomedical Research Institute of Salamanca, Faculty of Pharmacy, University of Salamanca, 37007 Salamanca, Spain; beatrizcgregovic@usal.es (B.C.-V.); begofebrer@usal.es (B.F.-S.); juanbernal95@usal.es (J.G.-B.D.)
 - ² IHPE, Université Montpellier, CNRS, Ifremer, Université Perpignan Via Domitia, 66100 Perpignan, France; boissier@univ-perp.fr
 - ³ Swiss Tropical and Public Health Institute, P.O. Box, CH-4002 Basel, Switzerland; kpongboetienne.angora@swisstph.ch
 - ⁴ Department of Public Health, University of Basel, P.O. Box, CH-4003 Basel, Switzerland
 - ⁵ Unité de Formation et de Recherche Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Félix Houphouët-Boigny, Abidjan BPV 34, Côte d'Ivoire
 - ⁶ Parasitology Laboratory, Institute of Natural Resources and Agrobiology (IRNASA, CSIC), Cordel de Merinas, 40-52, 37008 Salamanca, Spain; ana.oleaga@irnasa.csic.es
- * Correspondence: pfsoto@usal.es (P.F.-S.); ama@usal.es (A.M.); Tel.: +34-677596173 (P.F.-S.); +34-677596155 (A.M.)

Citation: Crego-Vicente, B.; Fernández-Soto, P.; Febrer-Sendra, B.; García-Bernalt Diego, J.; Boissier, J.; Angora, E.K.; Oleaga, A.; Muro, A. Application of A Genus-Specific LAMP Assay for Schistosome Species to Detect *Schistosoma haematobium* x *Schistosoma bovis* Hybrids. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 1308. <https://doi.org/10.3390/jcm10061308>

Academic Editor: Roberta Ettari

Received: 1 February 2021

Accepted: 18 March 2021

Published: 22 March 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Schistosomiasis is a disease of great medical and veterinary importance in tropical and subtropical regions caused by different species of parasitic flatworms of the genus *Schistosoma*. The emergence of natural hybrids of schistosomes indicate the risk of possible infection to humans and their zoonotic potential, specifically for *Schistosoma haematobium* and *S. bovis*. Hybrid schistosomes have the potential to replace existing species, generate new resistances, pathologies and extending host ranges. Hybrids may also confuse the serological, molecular and parasitological diagnosis. Currently, LAMP technology based on detection of nucleic acids is used for detection of many agents, including schistosomes. Here, we evaluate our previously developed species-specific LAMP assays for *S. haematobium*, *S. mansoni*, *S. bovis* and also the genus-specific LAMP for the simultaneous detection of several *Schistosoma* species against both DNA from pure and, for the first time, *S. haematobium* x *S. bovis* hybrids. Proper operation was evaluated with DNA from hybrid schistosomes and with human urine samples artificially contaminated with parasites' DNA. LAMP was performed with and without prior DNA extraction. The genus-specific LAMP properly amplified pure *Schistosoma* species and different *S. haematobium*-*S. bovis* hybrids with different sensitivity. The *Schistosoma* spp.-LAMP method is potentially adaptable for field diagnosis and disease surveillance in schistosomiasis endemic areas where human infections by schistosome hybrids are increasingly common.

Keywords: LAMP; Schistosomiasis; schistosome hybrids; *Schistosoma haematobium*; *Schistosoma bovis*; molecular diagnosis; species-specific LAMP; genus-specific LAMP

1. Introduction

Environmental changes due to ecosystem decline, biodiversity loss and climate change are some issues with potential ecological risk that we are facing as human beings. These changes driven by increasing economic development, migration, agricultural and



Article

Seroprevalence of SARS-CoV-2 Antibodies and Factors Associated with Seropositivity at the University of Salamanca: The DIANCUSAL Study

Antonio Muro ^{1,*}, Moncef Belhassen-García ^{1,*}, Juan Luis Muñoz Bellido ^{2,3,4}, Helena Lorenzo Juanes ^{2,3,4}, Belén Vicente ¹, Josué Pendones ^{2,3,4}, José Adserías ⁵, Gonzalo Sánchez Hernández ⁶, Miguel Rodríguez Rosa ⁷, José Luis Vicente Villardón ⁷, Javier Burguillo ⁸, Javier López Andaluz ⁹, Jose Angel Martín Oterino ^{2,10}, Francisco Javier García Criado ², Fausto Barbero ⁹, Ana Isabel Morales ^{2,11}, Purificación Galindo Villardón ⁷, Rogelio González Sarmiento ^{2,12} and on behalf of the DIANCUSAL Team [†]



Citation: Muro, A.; Belhassen-García, M.; Muñoz Bellido, J.L.; Lorenzo Juanes, H.; Vicente, B.; Pendones, J.; Adserías, J.; Sánchez Hernández, G.; Rodríguez Rosa, M.; Vicente Villardón, J.L.; et al. Seroprevalence of SARS-CoV-2 Antibodies and Factors Associated with Seropositivity at the University of Salamanca: The DIANCUSAL Study. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 3214. <https://doi.org/10.3390/jcm10153214>

Academic Editor: Alessandra Falchi

Received: 17 May 2021

Accepted: 15 July 2021

Published: 21 July 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- ¹ Infectious and Tropical Diseases Group (e-INTRO), Institute of Biomedical Research of Salamanca-Research Center for Tropical Diseases at the University of Salamanca (IBSAL-CIETUS), Faculty of Pharmacy, University of Salamanca, 37008 Salamanca, Spain; belvi25@usal.es
- ² Institute of Biomedical Research of Salamanca (IBSAL), University of Salamanca, University Hospital of Salamanca, 37007 Salamanca, Spain; jlmubel@usal.es (J.L.M.B.); hllorenzajuanes@gmail.com (H.L.J.); jpendones@saludcastillayleon.es (J.P.); jamarot@usal.es (J.A.M.O.); figc@usal.es (F.J.G.C.); amorales@usal.es (A.I.M.); gonzalez@usal.es (R.G.S.)
- ³ Microbiology & Parasitology Service, University Hospital of Salamanca, 37007 Salamanca, Spain
- ⁴ Department of Biomedical and Diagnostic Sciences, University of Salamanca, 37008 Salamanca, Spain
- ⁵ IT Department, University of Salamanca Foundation (FGUSAL), University of Salamanca, 37008 Salamanca, Spain; huesca@usal.es
- ⁶ Data Processing Center (CPD), University of Salamanca, 37008 Salamanca, Spain; gsh@usal.es
- ⁷ Department of Statistics, University of Salamanca, 37008 Salamanca, Spain; miguel_rosa90@usal.es (M.R.R.); villardon@usal.es (J.L.V.V.); pgalindo@usal.es (P.G.V.)
- ⁸ Department of Chemistry-Physics, Faculty of Pharmacy, University of Salamanca, 37008 Salamanca, Spain; burgj@usal.es
- ⁹ Department of Nursing and Physiotherapy, University of Salamanca, 37008 Salamanca, Spain; jandaluz_11@usal.es (J.L.A.); fausbar@usal.es (F.B.)
- ¹⁰ Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University Hospital of Salamanca, 37008 Salamanca, Spain
- ¹¹ Toxicology Unit, University of Salamanca, 37008 Salamanca, Spain
- ¹² Molecular Medicine Unit, Department of Medicine, University of Salamanca, 37008 Salamanca, Spain
- * Correspondence: ama@usal.es (A.M.); belhassen@usal.es (M.B.-G.)
- [†] Membership of the group is provided in Appendix A.

Abstract: Background: Systematic screening for antibodies against SARS-CoV-2 is a crucial tool for surveillance of the COVID-19 pandemic. The University of Salamanca (USAL) in Spain designed a project called “DIANCUSAL” (Diagnosis of New Coronavirus, COVID-19, in University of Salamanca) to measure antibodies against SARS-CoV-2 among its ~34,000 students and academic staff, as the influence of the university community in the spread of the SARS-CoV-2 pandemic in the city of Salamanca and neighboring towns hosting USAL campuses could be substantial. Objective: The aim of this study was to estimate the prevalence of SARS-CoV-2 antibodies among USAL students, professors and staff and to evaluate the demographic, academic, clinical and lifestyle and behavioral factors related to seropositivity. Methodology: The DIANCUSAL study is an ongoing university population-based cross-sectional study, with the work described herein conducted from July–October 2020. All USAL students, professors and staff were invited to complete an anonymized questionnaire. Seroprevalence of anti-SARS-CoV-2 antibodies was detected and quantified by using chemiluminescent assays for IgG and IgM. Principal findings: A total of 8197 (24.71%) participants were included. The mean age was 31.4 (14.5 SD) years, and 66.0% of the participants were female. The seroprevalence was 8.25% overall and was highest for students from the education campus (12.5%) and professors from the biomedical campus (12.6%), with significant differences among faculties ($p = 0.006$). Based on the questionnaire, loss of smell and fever were the symptoms most strongly associated with seropositivity, and 22.6% of seropositive participants were asymptomatic. Social distancing was the



Article

Detection of SARS-CoV-2 RNA in Urine by RT-LAMP: A Very Rare Finding

Juan García-Bernalt Diego ^{1,*}, Pedro Fernández-Soto ^{1,*}, Juan Luis Muñoz-Bellido ², Begoña Febrer-Sendra ¹, Beatriz Crego-Vicente ¹, Cristina Carbonell ^{1,3}, Amparo López-Bernús ^{1,3}, Miguel Marcos ³, Moncef Belhassen-García ^{1,3} and Antonio Muro ^{1,*}

- ¹ Infectious and Tropical Diseases Research Group (e-INTRO), Research Centre for Tropical Diseases at the University of Salamanca (IBSAL-CIETUS), Biomedical Research Institute of Salamanca, Faculty of Pharmacy, University of Salamanca, 37007 Salamanca, Spain; juanbernalt95@usal.es (J.G.-B.D.); begofebrer@usal.es (B.F.-S.); beatrizcgregovic@usal.es (B.C.-V.); carbonell@usal.es (C.C.); alopez@usal.es (A.L.-B.); belhassen@usal.es (M.B.-G.)
² Microbiology and Parasitology Service, Complejo Asistencial Universitario de Salamanca (CAUSA), University of Salamanca, 37007 Salamanca, Spain; jlmubel@usal.es
³ Internal Medicine Service, Unidad de Enfermedades Infecciosas, Complejo Asistencial Universitario de Salamanca (CAUSA), University of Salamanca, 37007 Salamanca, Spain; mmarcos@usal.es
* Correspondence: pfsoto@usal.es (P.F.-S.); ama@usal.es (A.M.)



Citation: García-Bernalt Diego, J.; Fernández-Soto, P.; Muñoz-Bellido, J.L.; Febrer-Sendra, B.; Crego-Vicente, B.; Carbonell, C.; López-Bernús, A.; Marcos, M.; Belhassen-García, M.; Muro, A. Detection of SARS-CoV-2 RNA in Urine by RT-LAMP: A Very Rare Finding. *J. Clin. Med.* **2022**, *11*, 158. <https://doi.org/10.3390/jcm11010158>

Academic Editor: Nicola Petrosillo

Received: 17 December 2021

Accepted: 27 December 2021

Published: 29 December 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Detection of SARS-CoV-2 is routinely performed in naso/oropharyngeal swabs samples from patients via RT-qPCR. The RT-LAMP technology has also been used for viral RNA detection in respiratory specimens with both high sensitivity and specificity. Recently, we developed a novel RT-LAMP test for SARS-CoV-2 RNA detection in nasopharyngeal swab specimens (named, N15-RT-LAMP) that can be performed as a single-tube colorimetric method, in a real-time platform, and as dry-LAMP. To date, there has been very little success in detecting SARS-CoV-2 RNA in urine by RT-qPCR, and the information regarding urine viral excretion is still scarce and not comprehensive. Here, we tested our N15-RT-LAMP on the urine of 300 patients admitted to the Hospital of Salamanca, Spain with clinical suspicion of COVID-19, who had a nasopharyngeal swab RT-qPCR-positive ($n = 100$), negative ($n = 100$), and positive with disease recovery ($n = 100$) result. The positive group was also tested by RT-qPCR for comparison to N15-RT-LAMP. Only a 4% positivity rate was found in the positive group via colorimetric N15-RT-LAMP and 2% via RT-qPCR. Our results are consistent with those obtained in other studies that the presence of SARS-CoV-2 RNA in urine is a very rare finding. The absence of SARS-CoV-2 RNA in urine in the recovered patients might suggest that the urinary route is very rarely used for viral particle clearance.

Keywords: SARS-CoV-2; urine; COVID-19; RT-LAMP; RT-qPCR; molecular diagnostics

1. Introduction

The infection caused by SARS-CoV-2 (COVID-19) affects mainly the respiratory system, and the typical symptoms at onset are fever, dry cough, fatigue, and dyspnea. Most patients present a good prognosis, while a few develop severe complications such as acute respiratory distress syndrome (ARDS) which can lead to death [1,2]. SARS-CoV-2 infects human cells using the angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) receptor [3–5]. Due to the expression across a wide variety of human tissues of ACE2, COVID-19 infection can lead to renal, hematological, skin, neurological, cardiovascular, gastrointestinal, liver, endocrine, and ophthalmological involvement, with different degrees of severity in patients [6,7]. The potential systemic dissemination of SARS-CoV-2 suggests that detection of viral particles or viral RNA might be possible in several biologic fluids depending on the patients' disease presentation.

Nucleic acid amplification tests (NAATs) are considered the most appropriate methods for screening suspected SARS-CoV-2 cases, with the reverse transcription-polymerase chain



Article

SMART-LAMP: A Smartphone-Operated Handheld Device for Real-Time Colorimetric Point-of-Care Diagnosis of Infectious Diseases via Loop-Mediated Isothermal Amplification

Juan García-Bernalt Diego ¹, Pedro Fernández-Soto ^{1,*}, Sergio Márquez-Sánchez ^{2,3}, Daniel Santos Santos ², Begoña Febrer-Sendra ¹, Beatriz Crego-Vicente ¹, Juan Luis Muñoz-Bellido ⁴, Moncef Belhassen-García ⁵, Juan M. Corchado Rodríguez ^{2,3} and Antonio Muro ^{1,*}

- ¹ Infectious and Tropical Diseases Research Group (e-INTRO), Biomedical Research Institute of Salamanca-Research Centre for Tropical Diseases at the University of Salamanca (IBSAL-CIETUS), Faculty of Pharmacy, University of Salamanca, 37007 Salamanca, Spain; juanbernal95@usal.es (J.G.-B.D.); begofebrer@usal.es (B.F.-S.); beatrizcregovic@usal.es (B.C.-V.)
 - ² BISITE Research Group, University of Salamanca, Calle Espejo s/n. Edificio Multiusos I+D+i, 37007 Salamanca, Spain; smarquez@usal.es (S.M.-S.); daniel_santos@usal.es (D.S.S.); jm@corchado.net (J.M.C.R.)
 - ³ Air Institute, IoT Digital Innovation Hub (Spain), 37188 Salamanca, Spain
 - ⁴ Microbiology and Parasitology Service, Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, University of Salamanca, 37007 Salamanca, Spain; jlmubel@usal.es
 - ⁵ Internal Medicine Service, Infectious Diseases Section, Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, University of Salamanca, 37007 Salamanca, Spain; belhassen@usal.es
- * Correspondence: pfsoto@usal.es (P.F.-S.); ama@usal.es (A.M.); Tel.: +34-677596173 (ext. 6861) (P.F.-S.)



Citation: García-Bernalt Diego, J.; Fernández-Soto, P.; Márquez-Sánchez, S.; Santos Santos, D.; Febrer-Sendra, B.; Crego-Vicente, B.; Muñoz-Bellido, J.L.; Belhassen-García, M.; Corchado Rodríguez, J.M.; Muro, A. SMART-LAMP: A Smartphone-Operated Handheld Device for Real-Time Colorimetric Point-of-Care Diagnosis of Infectious Diseases via Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Biosensors* **2022**, *12*, 424. <https://doi.org/10.3390/bios12060424>

Received: 20 May 2022

Accepted: 15 June 2022

Published: 16 June 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Nucleic acid amplification diagnostics offer outstanding features of sensitivity and specificity. However, they still lack speed and robustness, require extensive infrastructure, and are neither affordable nor user-friendly. Thus, they have not been extensively applied in point-of-care diagnostics, particularly in low-resource settings. In this work, we have combined the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technology with a handheld portable device (SMART-LAMP) developed to perform real-time isothermal nucleic acid amplification reactions, based on simple colorimetric measurements, all of which are Bluetooth-controlled by a dedicated smartphone app. We have validated its diagnostic utility regarding different infectious diseases, including Schistosomiasis, Strongyloidiasis, and COVID-19, and analyzed clinical samples from suspected COVID-19 patients. Finally, we have proved that the combination of long-term stabilized LAMP master mixes, stored and transported at room temperature with our developed SMART-LAMP device, provides an improvement towards true point-of-care diagnosis of infectious diseases in settings with limited infrastructure. Our proposal could be easily adapted to the diagnosis of other infectious diseases.

Keywords: loop-mediated isothermal amplification; point-of-care diagnostics; infectious diseases SARS-CoV-2; mHealth; Neglected Tropical Diseases

1. Introduction

The lack of affordable and simple molecular diagnostic tools for infectious diseases represents a long standing bottleneck in the health improvement of developing countries [1]. This problem has been tackled through the development of point-of-care tests (POCTs), defined as the rapid detection of analytes near the patient to enable better diagnosis, monitoring, and management of diseases [2]. Nowadays, some forms of POCTs have been reported for many Neglected Tropical Diseases (NTDs), including schistosomiasis (rapid tests for cathodic and anodic circulating antigens), as well as strongyloidiasis and other soil-transmitted helminthiasis (microscopy tool Kankanet) [3]. Furthermore, since the advent of the COVID-19 pandemic, the importance of these POCTs has also been highlighted



DOI: 10.1111/tmi.13786

RESEARCH ARTICLE

Comparison of three PCR-based methods to detect *Loa loa* and *Mansonella perstans* in long-term frozen storage dried blood spots

Thuy-Huong Ta-Tang^{1,2} | Begoña Febrer-Sendra^{2,3} | Pedro Berzosa^{1,2} |
José Miguel Rubio^{2,4} | María Romay-Barja^{1,2} | Policarpo Ncogo^{5,6} | Diego Agudo⁷ |
Zaida Herrador^{1,2} | Pedro Fernández-Soto^{2,3} | Antonio Muro^{2,3} | Agustín Benito^{1,2}

¹Malaria and Neglected Tropical Diseases Laboratory, National Centre of Tropical Medicine, Institute of Health Carlos III, Biomedical Research Networking Center of Infectious Diseases, Madrid, Spain

²Cooperative Research Network in Tropical Diseases, Madrid, Spain

³Infectious and Tropical Diseases Research Group (e-INTRO), Biomedical Research Institute of Salamanca-Research Centre for Tropical Diseases at the University of Salamanca, Faculty of Pharmacy, University of Salamanca, Salamanca, Spain

⁴Malaria and Emerging Parasitic Diseases Laboratory, National Microbiology Center, Institute of Health Carlos III, Madrid, Spain

⁵Ministry of Health, Malabo, Equatorial Guinea

⁶Fundación Estatal, Salud, Infancia y Bienestar Social, Madrid, Spain

⁷Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

Correspondence

Thuy-Huong Ta-Tang, Malaria and Neglected Tropical Diseases Laboratory, National Centre of Tropical Medicine, Institute of Health Carlos III, Biomedical Research Networking Center of Infectious Diseases, Madrid, Spain.
Email: tt@isciii.es

Funding information

Fondo Social Europeo; Junta de Castilla y León; Institute of Health Carlos III

Abstract

Objectives: *Loa loa* and *Mansonella perstans* are two very common filarial species in Africa. Although microscopy is the traditional diagnostic method for human filariasis, several polymerase chain reaction (PCR) methods have emerged as an alternative approach for identifying filarial parasites. The aim of this study is to compare three molecular methods and decide which is the most suitable for diagnosing human loiasis and mansonellosis in non-endemic regions using dried blood spot (DBS) as a medium for sample collection and storage.

Methods: A total of 100 DBS samples, with their corresponding thin and thick blood smears, were selected for this study. Microscopy was used as the reference method to diagnose and calculate the microfilaraemia. Filarial DNA was extracted using the saponin/Chelex method and the DNA isolated was assayed by Filaria-real time-PCR, filaria-nested PCR, and cytochrome oxidase I PCR. All PCR products were subsequently purified and sequenced. The statistical values for each molecular test were calculated and compared.

Results: Overall, 64 samples were identified as negative by all tests and a further 36 samples were positive by at least one of the methods used. The sensitivity and specificity were similar for the different molecular methods, all of which demonstrated good agreement with microscopy.

Conclusions: Based on this study, and from a practical point of view (single and short amplification round), the optimal technique for diagnosing filarial infection in non-endemic regions is filaria-real time-PCR, which presents high sensitivity and specificity and is also able to detect a wide range of human filariae.

KEYWORDS

dried blood spots, Filariæ, *Loa loa*, *Mansonella perstans*, microscopy, molecular diagnosis, nested-PCR, real-time PCR, saponin/Chelex

INTRODUCTION

Human filariasis is a parasitic disease caused by nematodes that are found in different parts of the body, depending on the species, including subcutaneous tissue (*Onchocerca volvulus*, *Loa loa*, *Mansonella streptocerca*, and *Mansonella ozzardi*), lymphatic tissue (*Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* and *Brugia timori*), and body cavities (*M. ozzardi*

and *Mansonella perstans*) [1–4]. Filariæ have a remarkable specificity for their definitive mammalian host and obligate intermediate vector species, with the causative agent reaching sexual maturity in the human host [5]. Two of the most predominant human filarial species in Africa are *L. loa* and *M. perstans* [6–8], which are the focus of this study.

Loa Loa, the parasite that causes loiasis (also known as African eye worm) [9], is endemic in 11 African countries, according to the Rapid Assessment Procedure for Loiasis (RAPLOA) [6, 8, 10, 11]. The recent increased interest in *L. loa* began when severe adverse events (SAE) were recorded after treatment of people heavily infected with

Thuy-Huong Ta-Tang and Begoña Febrer-Sendra contributed equally to this study.

Sustainable Development Goals: Good health and wellbeing, Sustainable Cities and Communities.

SYNOPSIS

Crimean-Congo Hemorrhagic Fever, Spain, 2013–2021

Helena Miriam Lorenzo Juanes,¹ Cristina Carbonell,¹ Begoña Febrer Sendra, Amparo López-Bernus, Alberto Bahamonde, Alberto Orfao, Carmen Vieira Lista, María Sánchez Ledesma, Ana Isabel Negredo, Beatriz Rodríguez-Alonso, Beatriz Rey Bua, María Paz Sánchez-Seco, Juan Luis Muñoz Bellido, Antonio Muro, Moncef Belhassen-García



JOINTLY ACCREDITED PROVIDER[®]
INTERPROFESSIONAL CONTINUING EDUCATION

In support of improving patient care, this activity has been planned and implemented by Medscape, LLC and Emerging Infectious Diseases. Medscape, LLC is jointly accredited with commendation by the Accreditation Council for Continuing Medical Education (ACCME), the Accreditation Council for Pharmacy Education (ACPE), and the American Nurses Credentialing Center (ANCC), to provide continuing education for the healthcare team.

Medscape, LLC designates this Journal-based CME activity for a maximum of 1.00 **AMA PRA Category 1 Credit(s)**[™]. Physicians should claim only the credit commensurate with the extent of their participation in the activity.

Successful completion of this CME activity, which includes participation in the evaluation component, enables the participant to earn up to 1.0 MOC points in the American Board of Internal Medicine's (ABIM) Maintenance of Certification (MOC) program. Participants will earn MOC points equivalent to the amount of CME credits claimed for the activity. It is the CME activity provider's responsibility to submit participant completion information to ACCME for the purpose of granting ABIM MOC credit.

All other clinicians completing this activity will be issued a certificate of participation. To participate in this journal CME activity: (1) review the learning objectives and author disclosures; (2) study the education content; (3) take the post-test with a 75% minimum passing score and complete the evaluation at <http://www.medscape.org/journal/eid>; and (4) view/print certificate. For CME questions, see page XXX.

Release date: January 23, 2023; Expiration date: January 23, 2024

Learning Objectives

Upon completion of this activity, participants will be able to:

- Analyze the disease condition of Crimean-Congo hemorrhagic fever
- Assess the epidemiology of Crimean-Congo hemorrhagic fever in the current study
- Assess the clinical presentation of Crimean-Congo hemorrhagic fever in the current study
- Distinguish the most common genotype of Crimean-Congo hemorrhagic fever in the current study

CME Editor

Dana C. Dolan, BS, Technical Writer/Editor, Emerging Infectious Diseases. *Disclosure: Dana C. Dolan, BS, has disclosed no relevant financial relationships.*

CME Author

Charles P. Vega, MD, Health Sciences Clinical Professor of Family Medicine, University of California, Irvine School of Medicine, Irvine, California. *Disclosure: Charles P. Vega, MD, has the following relevant financial relationships: consultant or advisor for GlaxoSmithKline; Johnson & Johnson Pharmaceutical Research & Development, L.L.C.*

Authors

Helena Miriam Lorenzo Juanes, PharmD, PhD Student; Cristina Carbonell, MD, PhD; Begoña Febrer Sendra, BSc, PhD Student; Amparo López-Bernus, MD, PhD; Alberto Bahamonde, MD, PhD; Alberto Orfao, MD, PhD; Carmen Viera Lista, BSc, PhD Student; María Sánchez Ledesma, MD, PhD; Ana Isabel Negredo, PhD; Beatriz Rodríguez Alonso, MD, PhD; Beatriz Rey Bua, MD; María Paz Sánchez-Seco, PhD; Juan Luis Muñoz Bellido, MD, PhD; Antonio Muro, MD, PhD; Moncef Belhassen-García, MD, PhD.

¹These authors contributed equally to this article.



Article

Development of a Duplex LAMP Assay with Probe-Based Readout for Simultaneous Real-Time Detection of *Schistosoma mansoni* and *Strongyloides* spp. -A Laboratory Approach to Point-Of-Care

Beatriz Crego-Vicente , Pedro Fernández-Soto *, Juan García-Bernalt Diego , Begoña Febrer-Sendra and Antonio Muro

Infectious and Tropical Diseases Research Group (e-INTRO), Biomedical Research Institute of Salamanca Research Centre for Tropical Diseases at the University of Salamanca (IBSAL-CIETUS), Faculty of Pharmacy, University of Salamanca, 37007 Salamanca, Spain

* Correspondence: pfsoto@usal.es



Citation: Crego-Vicente, B.; Fernández-Soto, P.; García-Bernalt Diego, J.; Febrer-Sendra, B.; Muro, A. Development of a Duplex LAMP Assay with Probe-Based Readout for Simultaneous Real-Time Detection of *Schistosoma mansoni* and *Strongyloides* spp. -A Laboratory Approach to Point-Of-Care. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 893. <https://doi.org/10.3390/ijms24010893>

Academic Editor: Thiago Almeida Pereira

Received: 17 November 2022

Revised: 22 December 2022

Accepted: 30 December 2022

Published: 3 January 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is the most popular technology for point-of-care testing applications due its rapid, sensitive and specific detection with simple instrumentation compared to PCR-based methods. Many systems for reading the results of LAMP amplifications exist, including real-time fluorescence detection using fluorophore-labelled probes attached to oligonucleotide sequences complementary to the target nucleic acid. This methodology allows the simultaneous detection of multiple targets (multiplexing) in one LAMP assay. A method for multiplexing LAMP is the amplification by release of quenching (DARQ) technique by using a 5'-quencher modified LAMP primer annealed to 3'-fluorophore-labelled acting as detection oligonucleotide. The main application of multiplex LAMP is the rapid and accurate diagnosis of infectious diseases, allowing differentiation of co-infecting pathogens in a single reaction. Schistosomiasis, caused among other species by *Schistosoma mansoni* and strongyloidiasis, caused by *Strongyloides stercoralis*, are the most common helminth-parasite infections worldwide with overlapping distribution areas and high possibility of coinfections in the human population. It would be of great interest to develop a duplex LAMP to detect both pathogens in the same reaction. In this study, we investigate the use of our two previously developed and well-established LAMP assays for *S. mansoni* and *Strongyloides* spp. DNA detection in a new duplex real-time eight-primer system based on a modified DARQ probe method that can be performed in a portable isothermal fluorimeter with minimal laboratory resources. We also applied a strategy to stabilize the duplexed DARQ-LAMP mixtures at room temperature for use as ready-to-use formats facilitating analysis in field settings as point-of-care diagnostics for schistosomiasis and strongyloidiasis.

Keywords: LAMP; multiplex LAMP; duplex LAMP; DARQ-LAMP; *Schistosoma mansoni*; *Strongyloides* spp.; diagnostic; point-of-care

1. Introduction

Nucleic acids are commonly used as important biomarkers for biological studies and medical diagnosis. Polymerase chain reaction (PCR) was the first method for detecting minute quantities of nucleic acids and is still used widely today because it is sensitive, specific and can be quantitative. However, PCR and PCR-based methods have several limitations, mainly due to the susceptibility to inhibitors present in environmental and clinical samples, the need for accurate thermocycling requirements and the difficulty of its applicability in field conditions. These shortcomings prompted the emergence of a number of isothermal nucleic acid amplification assays as a promising alternative to PCR-based methods since the early 1990s onwards. The isothermal amplification methods

AII.2. Comunicaciones en congresos

En este apartado se recogen las comunicaciones presentadas en congresos tanto nacionales como internacionales para la difusión del trabajo científico incluido en esta Tesis Doctoral y de otras en las cuales se ha participado durante el tiempo de formación predoctoral. A continuación, se muestra una lista detallada las comunicaciones en congresos indicando si se tratan de comunicaciones orales o póster. Además, se incluye el resumen o certificado de cada una de ellas.

1. **Febrer-Sendra B**, Fernández-Soto P, Escolar Ramírez E, Crego-Vicente B, García-Bernalt Diego J, Ta-Tang TH, Rubio JM, Gómez-Sánchez A, Vicente B, Vieira C, López-Abán J, Muro A. Detección de ADN de *Loa loa* en muestras clínicas mediante LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) a tiempo real. XXI Congreso SOCEPA. Pontevedra (España). 2019. **Póster.**
2. García-Bernalt Diego J, Fernández-Soto P, Crego-Vicente B, **Febrer-Sendra B**, Gómez-Sánchez A, Gorgojo O, Vicente B, López-Abán J, Muro A. Estabilización de reactivos para la aplicación de la técnica SmMIT-LAMP en el diagnóstico de la esquistosomosis a pie de paciente. XXI Congreso SOCEPA. Pontevedra (España). 2019. **Comunicación oral.**
3. Crego-Vicente B, Fernández-Soto P, Sempere MA, García-Bernalt Diego J, **Febrer-Sendra B**, Ramos Montesdeoca M, Saugar JM, Rubio JM, Gómez-Sánchez A, López-Abán J, Vicente B, Muro A. Detección de ADN de *Schistosoma mansoni* mediante LAMP en un paciente asintomático con eosinofilia y quiluria. XXI Congreso SOCEPA. Pontevedra (España). 2019. **Póster.**
4. García-Bernalt Diego J, Fernández-Soto P, Alonso Castrillejo S, Crego-Vicente B, **Febrer-Sendra B**, Gómez Sánchez A, Vicente B, López-Abán J, Muro Álvarez A. Stabilization of SmMIT-LAMP reagents for application in point-of-care diagnostic of schistosomiasis. 11th European Congress on Tropical Medicine and International Health. Liverpool (UK). 2019. **Póster.**

5. Gorgojo Galindo O, López-Abán J, Torres Valle A, González M, Gómez A, Crego-Vicente B, García-Bernalt Diego J, **Febrer-Sendra B**, Vicente B, Fernández-Soto F, Álvarez R, González M, Vicente-Blázquez A, Marín M, Medarde M, Sanz S, Peláez R, Muro A. Diseño, síntesis y evaluación de amidas y sulfonamidas con actividad tipo colchicina contra *Strongyloides venezuelensis*. XI Congreso Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional (SEMTSI). Retos en Salud Global. Ávila (España). 2019. **Póster**.
6. Crego-Vicente B, Fernández-Soto P, Sempere MA, **Febrer-Sendra B**, García-Bernalt Diego J, Saugar JM, Rubio JM, Gómez Sanchez A, López-Abán J, Vicente B, Muro A. *Schistosoma mansoni* en paciente con quiluria y eosinofilia: detección molecular y seguimiento del tratamiento por LAMP. XI Congreso Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional (SEMTSI). Retos en Salud Global. Ávila (España). 2019. **Póster**.
7. Fernández-Soto P, García-Bernalt Diego J, Santos Santos D, Crego-Vicente B, **Febrer-Sendra B**, Vicente Santiago B, López-Abán J, Corchado JM, Muro A. SMART-LAMP: un nuevo dispositivo portátil para el diagnóstico molecular *point-of-care*. XI Congreso Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional (SEMTSI). Retos en Salud Global. Ávila (España). 2019. **Comunicación oral**.
8. García-Bernalt Diego J, Fernández-Soto P, Romero Alegría Á, Martín Oterino JA, Gómez Mingo AI, Crego-Vicente B, **Febrer-Sendra B**, Vicente Santiago B, López-Abán J, Muro A. Aplicación del dispositivo SMART-LAMP para el diagnóstico *point-of-care* en campo: prueba piloto en Cayapas, Ecuador. XI Congreso Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional (SEMTSI). Retos en Salud Global. Ávila (España). 2019. **Comunicación oral**.
9. **Febrer-Sendra B**, Fernández-Soto P, Crego-Vicente B, **García-Bernalt Diego J**, Negredo Antón A, Sánchez Seco Fariñas MP, Vieira Lista MC, López Bernús A, Belhassen-García M, Muñoz Bellido JL, Muro Álvarez A. Diseño, desarrollo y aplicación de un nuevo RT-LAMP para la detección del Virus de la Fiebre Hemorrágica de Crimea-Congo. XII Congreso de la Sociedad Española de

Medicina Tropical y Salud Internacional (SEMTSI). Pamplona (España). 2022. **Comunicación oral.**

10. Crego-Vicente B, Fernández-Soto P, **Febrer-Sendra B**, García-Bernalt Diego J, Soto López JD, Murcia X, Muro Álvarez A. Desarrollo de tecnología LAMP múltiple para el diagnóstico de eosinofilias importadas de difícil tipificación. XII Congreso de la Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional (SEMTSI). Pamplona (España). 2022. **Comunicación oral.**
11. García-Bernalt Diego J, Fernández-Soto P, Márquez-Sánchez S, Santos Santos D, **Febrer-Sendra B**, Crego-Vicente B, Muñoz Bellido JL, Belhassen-García M, Corchado Rodríguez JM, Muro Álvarez A. SMART-LAMP: diagnóstico molecular a pie de paciente mediante un dispositivo portátil y tecnología móvil. XII Congreso de la Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional (SEMTSI). Pamplona (España). 2022. **Comunicación oral.**
12. Salas-Coronas J, Crego-Vicente B, Luzón-García P, **Febrer-Sendra B**, Soriano-Pérez MJ, García-Bernalt Diego J, Vázquez-Villegas J, Muro A, Cabeza-Barrera I, Fernández-Soto P. Utilidad de la técnica LAMP en orina en el diagnóstico de la Esquistosomosis importada: análisis preliminar. XII Congreso de la Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional (SEMTSI). Pamplona (España). 2022. **Póster.**
13. Luzón García M.P, Crego-Vicente B, Salas-Coronas J, Febrer-Sendra B, Soriano-Pérez M.J., Fernández-Soto P. Utilidad de la técnica LAMP en orina en paciente inmigrantes con eosinofilia sin diagnóstico etiológico. Congreso Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica (SEIMC). Granada (España). 2022. **Póster.**
14. García-Bernalt Diego J, Fernández-Soto P, Márquez-Sánchez S, Santos Santos D, **Febrer-Sendra B**, Crego-Vicente B, Corchado Rodríguez JM, Muro A. Diagnóstico molecular de enfermedades parasitarias a pie de paciente mediante un dispositivo portátil y tecnología móvil: SMART-LAMP. XXII Congreso SOCEPA. 2022. Madrid (España). **Comunicación oral.**



Sociedad Española
de Parasitología



XXI Congreso SOCEPA

Pontevedra
3-5 julio 2019

BEGOÑA FEBRER SENDRA es coautora y presentadora del trabajo Detección de ADN de *Loa loa* en muestras clínicas mediante LAMP (*Loop-Mediated Isothermal Amplification*) a tiempo real, presentado en formato poster en el XXI congreso de la Sociedad Española de Parasitología, celebrado en Pontevedra los días 3, 4 y 5 de julio de 2019.



Raul Iglesias Blanco.
Secretario del XXI Congreso de la SOCEPA



Sociedad Española
de Parasitología



XXI Congreso SOCEPA

Pontevedra
3-5 JULIO 2019

BEGOÑA FEBRER SENDRA es coautora del trabajo Estabilización de reactivos para la aplicación de la técnica SmMIT-LAMP en el diagnóstico de la esquistosomosis a pie de paciente, presentado en formato comunicación oral en el XXI congreso de la Sociedad Española de Parasitología, celebrado en Pontevedra los días 3, 4 y 5 de julio de 2019.



Paul Iglesias Blanco.
Secretario del XXI Congreso de la SOCEPA.



Sociedad Española
de Parasitología



XXI CONGRESO SOCEPA

Pontevedra
3-5 JULIO 2019

BEGOÑA FEBRER SENDRA es coautora del trabajo Detección de ADN de Schistosoma mansoni mediante LAMP en un paciente asintomático con eosinofilia y quiluria, presentado en formato poster en el XXI congreso de la Sociedad Española de Parasitología, celebrado en Pontevedra los días 3, 4 y 5 de julio de 2019.



Raúl Iglesias Blanco.
Secretario del XXI Congreso de la SOCEPA

Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene

When comparing the results according to the educational level (elementary, secondary and higher education, the average percentages of correct answers about ways of transmission were 2.2, 3.2 and 4.1 respectively ($p < 0.001$), and about heart involvement were 0.7, 1.1 and 1.7 ($p = 0.001$).

Conclusions: Knowledge about CD among Latin-American migrants was poor, especially regarding vertical transmission of CD, which is the most relevant mechanism of transmission in Europe.

P204

STABILIZATION OF SmMIT-LAMP REAGENTS FOR APPLICATION IN POINT-OF-CARE DIAGNOSTIC OF SCHISTOSOMIASIS

García-Bernalt Diego J., Fernández-Soto P., Alonso-Castrillejo S., Crego-Vicente B., Febrer B., Gómez A., Vicente B., López-Abán J., Muro A.

Infectious and Tropical Diseases Research Group (e-INTRO), Biomedical Research Institute of Salamanca-Research Centre for Tropical Diseases (IBSAL-CIETUS), Faculty of Pharmacy, University of Salamanca, Salamanca, Spain

Introduction: Human schistosomiasis is one of the most important NTDs. A LAMP method for the detection of *S. mansoni* DNA (SmMIT-LAMP) was established by our group to perform early diagnosis of schistosomiasis in a murine model. Recently, the SmMIT-LAMP was successfully tested in human stool samples, snails and in human urine samples. LAMP technology has been proposed as the ideal tool for a molecular POC diagnosis. However, one of the drawbacks is to maintain the cold chain to preserve reagents for application in low-resources endemic areas.

Aim: The goal is to develop a LAMP kit in a ready-to-use format with dried reagents useful for easy application in resources limited settings of schistosomiasis.

Methods: Both concentration and desiccation procedures, based on the use of trehalose, were studied to stabilize SmMIT-LAMP reaction mixes over. These procedures were applied to reaction mixes used in real-time LAMP assays (using a portable device) or in end-point conventional colorimetric detection (using a thermoblock) adding different dyes pre- (malachite green/calcein) or post-amplification (SYBR Green I). Reaction volumes ranging 5-25 μ L were also tested. Desiccated mixes were stored up to 3 months both at RT and 4°C to evaluate. DNA from *S. mansoni* was also included from the beginning of the desiccation procedure as positive control. The rehydration of the mixtures and subsequent LAMP reactions were performed at different times post-desiccation.

Results: The SmMIT-LAMP reactions gave positive results with desiccated mixes after 1 month stored at RT and 3 months stored at 4°C. A notable delay in amplification time (30 to 60 min) was observed in stabilized mixes in comparison to fresh liquid ones, although not significant reduction in final amplification levels took place. We find out differences in color turns between fresh and desiccated LAMP mixes for the same pre-amplification dyes concentration. We also obtained functional LAMP reactions with reaction mix volumes down to 15 μ L.

Conclusion: We established a simple 30 min one-step desiccation procedure to stabilize SmMIT-LAMP reaction mixes for potential ready-to-use application. This procedure is adaptable to different LAMP assays to a POC set-up for many NTDs.

Funding:

This study was supported by the Institute of Health Carlos III, ISCIII, Spain (www.isciii.es) grants: RICET RD16/0027/0018, DTS16/00207, PI16/01784 European Union co-financing by FEDER (Fondo Europeo de Desarrollo Regional) "Una manera de hacer Europa".

P206

AN UNUSUAL CASE OF RELAPSING VISCERAL AND CUTANEOUS LEISHMANIASIS IN AN IMMUNOCOMPROMISED PATIENT

Jawad S., Dhariwal A.

Clinical Infection Unit, St George's Hospital, London, UK

Introduction: We present the case of a 43-year-old man with refractory visceral leishmaniasis.

Background: This gentleman of Portuguese origin had a background of treated hepatitis C infection and of HIV-1 infection diagnosed over 20 years ago, with intermittent anti-retroviral therapy adherence leading to development of resistance mutations. He initially presented in 2012 in Portugal with visceral leishmaniasis diagnosed on bone marrow morphology. He required three consecutive courses of treatment with ambisome due to persistently abnormal bone marrow morphology on repeat sampling. He represented in March 2018 with symptoms of fever and weight loss and was given a further course of ambisome treatment.

His latest presentation was in August 2018 with suspicious skin lesions and incidental mild pancytopenia. His CD4 was <100 at the time due to continued non-adherence to HIV therapy. Amastigotes were seen in the skin biopsy, and in a subsequent bone marrow biopsy. Bone marrow PCR was positive for *Leishmania donovani*. He was treated with a full course of ambisome as well as concurrent miltefosine, followed by 3 weekly prophylactic pentamidine due to multiple relapses. He also re-engaged with HIV services with satisfactory viral load suppression.

Discussion: Literature suggests that unusual manifestations of visceral leishmaniasis are more common in HIV co-infected patients, as is the incidence of relapses or refractory leishmaniasis. Predictive factors are poorly known, although low CD4 count and absence of secondary prophylaxis against visceral leishmaniasis contribute to a higher relapse rate. Diagnostics are more difficult as serology sensitivity is much lower; indeed, diagnosis was made first on bone marrow biopsy and finally on skin biopsy in the above case.

This presents a reminder in clinical practice that HIV and visceral leishmaniasis coinfection is on the increase, with 5-7% of cases occurring in southern European countries and can present with atypical symptoms. The relapse rate is higher in HIV co-infected individuals, and this is compounded by low CD4 count and lack of secondary prophylaxis post treatment. Finally, cutaneous leishmaniasis in an immunosuppressed patient should always prompt investigation for visceral leishmaniasis even in the absence of typical clinical symptoms. Serology often has low sensitivity in these patients.

P207

VALIDATION OF A PORTABLE THREE-DIMENSIONAL IMAGING SYSTEM FOR MEASURING LOWER LIMB VOLUME OF PODOCO- NIOSIS PATIENTS; A PILOT STUDY

Temesgen A.^{1,2,4}, Chatwin C.³, Fekadu A.^{1,4}, Dixon B.³, Deribe K.¹, Callow C.¹, Davey G.¹

¹Centre for Global Health Research, Brighton and Sussex Medical School, Brighton, UK;

²Dept. of Medical Laboratory Sciences, Wollega University, Nekemte, Ethiopia;

³School of Engineering and Design, University of Sussex, Brighton, UK;

⁴CDT Africa, Addis Ababa University, Addis Ababa, Ethiopia;

⁵George W. Woodruff School of Mechanical Engineering, Georgia Institute of Technology Atlanta, USA



**XI Congreso
Sociedad Española de
Medicina Tropical y
Salud Internacional
(SEMTSI)**

Ávila, 28-30
octubre de 2019



**La Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional
(SEMTSI)**

Certifica que el trabajo

**Diseño, síntesis y evaluación de amidas y sulfonamidas con actividad tipo colchicina contra
"Strongyloides venezuelensis"**

de los autores

*Óscar Gorgojo Galindo, Julio López-Abán, Alba Torres Valle, Marta González, Ana Gómez, Beatriz Crego
Vicente, Juan García-Bernalt Diego, Begoña Febrer Sendra, María Belén Vicente Santiago, Pedro
Fernández-Soto, Raquel Álvarez, Myriam González, Alba Vicente - Blázquez, Miguel Marín, Manuel Medarde,
Cristina Sanz, Rafael Peláez, Antonio Muro Álvarez*

ha sido presentado como póster en el **XI Congreso de la Sociedad Española de Medicina Tropical y
Salud Internacional (SEMTSI) – Retos en Salud Global**, celebrado del 28 al 30 de octubre de 2019 en
Ávila.

Y para que así conste donde convenga firmamos la presente en Ávila a 30 de octubre de 2019.

**María Dolores Barges Castelló
Presidenta de la SEMTSI**

**Israel Cruz Mata
Presidente del Comité Científico**

www.semtsi.org



**XI Congreso
Sociedad Española de
Medicina Tropical y
Salud Internacional
(SEMTSI)**

Ávila, 28-30
octubre de 2019



La Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional (SEMTSI)

Certifica que el trabajo

**Schistosoma mansoni en paciente con quiluria y eosinofilia: detección molecular y seguimiento del
tratamiento por LAMP**

de los autores

*Beatriz Crego Vicente, Pedro Fernández Soto, Marco Antonio Sempere, José Manuel Fernández Montero,
Luis Hidalgo, Begoña Febrer Sendra, Juan García-Bernalt Diego, José María Saugar, Julio López Abán,
Belén Vicente Santiago, Antonio Muro Álvarez*

ha sido presentado como póster en el **XI Congreso de la Sociedad Española de Medicina Tropical y
Salud Internacional (SEMTSI) – Retos en Salud Global**, celebrado del 28 al 30 de octubre de 2019 en
Ávila.

Y para que así conste donde convenga firmamos la presente en Ávila a 30 de octubre de 2019.

**María Dolores Barges Castelló
Presidenta de la SEMTSI**

**Israel Cruz Mata
Presidente del Comité Científico**

www.semtsi.org



**XI Congreso
Sociedad Española de
Medicina Tropical y
Salud Internacional
(SEMTSI)**

Ávila, 28-30
octubre de 2019



La Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional (SEMTSI)

Certifica que el trabajo

SMART-LAMP: un nuevo dispositivo portátil para el diagnóstico molecular point-of-care

de los autores

Pedro Fernández Soto, Juan García-Bernalt Diego, Daniel Santos Santos, Beatriz Crego Vicente, Begoña Febrer Sendra, María Belén Vicente Santiago, Julio López Abán, Juan Manuel Corchado, Antonio Muro Álvarez

ha sido presentado como comunicación oral en el **XI Congreso de la Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional (SEMTSI) – Retos en Salud Global**, celebrado del 28 al 30 de octubre de 2019 en Ávila.

Y para que así conste donde convenga firmamos la presente en Ávila a 30 de octubre de 2019.

María Dolores BARGUES CASTELLÓ
Presidenta de la SEMTSI

Israel Cruz MATA
Presidente del Comité Científico

www.semtsi.org



**XI Congreso
Sociedad Española de
Medicina Tropical y
Salud Internacional
(SEMTSI)**

Ávila, 28-30
octubre de 2019



**La Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional
(SEMTSI)**

Certifica que el trabajo

Aplicación del dispositivo SMART-LAMP para el diagnóstico point-of-care en campo: prueba piloto en Cayapas, Ecuador

de los autores

Juan García-Bernalt Diego, Pedro Fernández Soto, Ángela Romero Alegría, José Ángel Martín Oterino, Ana Isabel Gómez Mingo, Beatriz Crego Vicente, Begoña Febrer Sendra, María Belén Vicente Santiago, Julio López Abán, Moncef Belhassen García, Antonio Muro Álvarez

ha sido presentado como comunicación oral en el **XI Congreso de la Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional (SEMTSI) – Retos en Salud Global**, celebrado del 28 al 30 de octubre de 2019 en Ávila.

Y para que así conste donde convenga firmamos la presente en Ávila a 30 de octubre de 2019.

**María Dolores Bagues Castelló
Presidenta de la SEMTSI**

**Israel Cruz Mata
Presidente del Comité Científico**

www.semtsi.org

Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional

**XII Congreso
SEM-TSI**
Museo Universidad de
Navarra, Pamplona,
del 8 al 10 de marzo de 2022



La Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional (SEM-TSI)

Certifica que el trabajo

Diseño, desarrollo y aplicación de un nuevo RT-LAMP para la detección del Virus de la Fiebre Hemorrágica de Crimea-Congo

de los autores

Begoña Febrer Sendra, Pedro Fernández Soto, Beatriz Crego Vicente, Juan García-Bernalt Diego, Anabel Negredo Antón, María Paz Sánchez Seco Fariñas, María Carmen Vieira Lista, Amparo López Bernús, Moncef Belhassen García, Juan Luis Muñoz Bellido, Antonio Muro Álvarez

ha sido presentado como comunicación oral en el **XII Congreso de la Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional (SEM-TSI)**, celebrado del 8 al 10 de marzo de 2022 en el Museo Universidad de Navarra de Pamplona.

Y para que así conste donde convenga firmamos la presente en Pamplona a 10 de marzo de 2022.

María Dolores Barges Castelló
Presidenta de la SEM-TSI

Santiago Mas-Comas
Presidente del Comité Científico

www.semtsi.org

Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional

**XII Congreso
SEM-TSI**
Museo Universidad de
Navarra, Pamplona,
del 8 al 10 de marzo de 2022



**La Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional
(SEM-TSI)**

Certifica que el trabajo

**Desarrollo de tecnología LAMP múltiple para el diagnóstico de eosinofilias importadas de difícil
tipificación**

de los autores

*Beatriz Crego Vicente, Pedro Fernández Soto, Begoña Febrer Sendra, Juan García-Bernalt Diego, Julio
David Soto López, Xiomara Murcia, Antonio Muro Álvarez*

ha sido presentado como comunicación oral en el **XII Congreso de la Sociedad Española de Medicina
Tropical y Salud Internacional (SEM-TSI)**, celebrado del 8 al 10 de marzo de 2022 en el Museo Universidad
de Navarra de Pamplona.

Y para que así conste donde convenga firmamos la presente en Pamplona a 10 de marzo de 2022.

María Dolores Bargues Castelló
Presidenta de la SEM-TSI

Santiago Mas-Comas
Presidente del Comité Científico

www.semtsi.org

Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional

**XII Congreso
SEM-TSI**
Museo Universidad de
Navarra, Pamplona,
del 8 al 10 de marzo de 2022



**La Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional
(SEM-TSI)**

Certifica que el trabajo

SMART-LAMP: diagnóstico molecular a pie de paciente mediante un dispositivo portátil y tecnología móvil.

de los autores

Juan García Bernalt Diego, Pedro Fernández Soto, Sergio Márquez Sánchez, Daniel Santos Santos, Begoña Febrer Sendra, Beatriz Crego Vicente, Juan Luis Muñoz Bellido, Moncef Belhassen García, Juan Manuel Corchado Rodríguez, Antonio Muro Álvarez

ha sido presentado como comunicación oral en el **XII Congreso de la Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional (SEM-TSI)**, celebrado del 8 al 10 de marzo de 2022 en el Museo Universidad de Navarra de Pamplona.

Y para que así conste donde convenga firmamos la presente en Pamplona a 10 de marzo de 2022.

María Dolores Bagues Castelló
Presidenta de la SEM-TSI

Santiago Mas-Comas
Presidente del Comité Científico

www.semtsi.org

Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional

**XII Congreso
SEM-TSI**
Museo Universidad de
Navarra, Pamplona,
del 8 al 10 de marzo de 2022



**La Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional
(SEM-TSI)**

Certifica que el trabajo

Utilidad de la técnica LAMP en orina en el diagnóstico de la esquistosomosis importada: análisis preliminar

de los autores

Joaquín Salas Coronas, Beatriz Crego Vicente, María Pilar Luzón García, Begoña Febrer Sendra, Manuel Jesús Soriano Pérez, Juan García-Bernalt Diego, José Vázquez Villegas, Antonio Muro Álvarez, María Isabel Cabeza Barrera, Pedro Fernández Soto

ha sido presentado como comunicación póster en el **XII Congreso de la Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional (SEM-TSI)**, celebrado del 8 al 10 de marzo de 2022 en el Museo Universidad de Navarra de Pamplona.

Y para que así conste donde convenga firmamos la presente en Pamplona a 10 de marzo de 2022.

María Dolores Bagues Castelló
Presidenta de la SEM-TSI

Santiago Mas-Comas
Presidente del Comité Científico

www.semtsi.org



CERTIFICADO DE PARTICIPACIÓN

La Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica – SEIMC

CERTIFICA QUE:

M.P. Luzón García, B. Crego Vicente, J. Salas Coronas, B. Febrer Sendra, M.J. Soriano Pérez, P. Fernández Soto

Han realizado la presentación **POSTER** de la comunicación con título:

UTILIDAD DE LA TÉCNICA LAMP EN ORINA EN PACIENTES INMIGRANTES CON EOSINOFILIA SIN DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO

En el **XXV Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica** celebrado en Granada del 2 al 4 de junio del 2022.

Granada, a 4 de junio de 2022

DOCUMENTO FIRMADO DIGITALMENTE
https://intranet.pacifico-meetings.com/Esperso/faces/comprobarCertificadoFirmado.xhtml?_af=AY749-C168775-PCA659-PD1989-V1

Dr. Antonio Rivero
Presidente de la SEIMC

Dra. Carmen Fariñas
Presidenta Comité Científico Congreso



XXII congreso de la
**Sociedad Española
de Parasitología**

MADRID
5 | 8 julio 2022



El Comité Científico certifica que

Juan García-Bernalt Diego, Pedro Fernández-Soto , Sergio Márquez-Sánchez , Daniel Santos Santos,
Begoña Febrer-Sendra , Beatriz Crego-Vicente , Juan Manuel Corchado , Antonio Muro

Han presentado la comunicación oral

Diagnóstico molecular de enfermedades parasitarias a pie de paciente mediante un dispositivo portátil y
tecnología móvil: SMART-LAMP

en el XXII congreso de la Sociedad Española de Parasitología celebrado en Madrid del 5 al 8 de julio de 2022.



Dra. Carmen del Águila de la Puente
Presidenta del XXII Congreso de la Sociedad Española de Parasitología

AII.3. Publicaciones docentes

En este apartado se recogen las publicaciones docentes en las cuales se ha colaborado durante el tiempo de formación predoctoral en el Programa de Salud y Desarrollo en los Trópicos, en la Universidad de Salamanca. A continuación, se muestra una lista detallada de cada una de ellas, incluyendo la primera página.

1. **Febrer-Sendra B**, Crego-Vicente B, García-Bernalt Diego J, Fernández-Soto P. Tecnología LAMP: teoría, práctica y aplicación diagnóstica. Educafarma 7.0. Curso 2018/2019. *White papers* sobre innovación aplicada y divulgación científica en el área de las ciencias biosanitarias. 2020. ISBN: 978-84-09-17931-2.
2. Crego-Vicente B, García-Bernalt Diego J, **Febrer-Sendra B**, Fernández-Soto P. Selección de secuencias nucleotídicas y proteicas útiles para el diagnóstico y vacunas de enfermedades parasitarias. Educafarma 8.0. Curso 2019/2020. *White papers* sobre innovación aplicada y divulgación científica en el área de las ciencias biosanitarias. 2021. ISBN: 978-84-09-28512-9.
3. **Febrer-Sendra B**, Crego-Vicente B, García-Bernalt Diego J, Fernández-Soto P. Tecnología LAMP: diagnóstico molecular a pie de paciente. Educafarma 9.0. Curso 2020/2021. *White papers* sobre innovación aplicada y divulgación científica en el área de las ciencias biosanitarias. 2021. ISBN: 978-84-09-32855-0.
4. Crego-Vicente B, **Febrer-Sendra B**, García-Bernalt Diego J, Manzano-Román R, Fernández-Soto P. Diagnóstico molecular en enfermedades parasitarias. Educafarma 10.0. Curso 2021/2022. *White papers* sobre innovación aplicada y divulgación científica en el área de las ciencias biosanitarias. 2022. ISBN: 978-84-09-44271-3.
5. Manzano-Román R, García-Bernalt Diego J, **Febrer-Sendra B**, Crego-Vicente B, Fernández-Soto P. Nano-Biotecnología y enfermedades parasitarias. Educafarma 10.0. Curso 2021/2022. *White papers* sobre innovación aplicada y divulgación científica en el área de las ciencias biosanitarias. 2022. ISBN: 978-84-09-44271-3.

TECNOLOGÍA LAMP: TEORÍA, PRÁCTICA Y APLICACIÓN DIAGNÓSTICA

*Begoña Febrer Sendra, Beatriz Crego Vicente, Juan García-Bernalt Diego, Pedro
Fernández-Soto*

*Laboratorio de Inmunología Parasitaria y Molecular. Grupo e-INTRO. IBSAL-CIETUS.
Área de Parasitología. Facultad de Farmacia. Avda. Licenciado Méndez Nieto s/n.
37007. Salamanca.*

*PALABRAS CLAVE: NTD, Neglected Tropical Diseases, LAMP, Loop-mediated
isothermal amplification, secuencias, primers*

1.- INTRODUCCIÓN

La lucha contra las enfermedades tropicales desatendidas (NTD, del inglés *Neglected Tropical Diseases*), se ve muy afectada, entre otros factores, por las limitaciones que presentan los métodos diagnósticos clásicos. Generalmente, la microscopía carece de la sensibilidad necesaria y la serología, de la especificidad. Las técnicas moleculares clásicas (PCR y sus variantes) aunque poseen características de especificidad y sensibilidad, solo tienen una aplicación realista en laboratorios o clínicas donde se dispone tanto de un equipamiento especializado, como de personal entrenado. Esto sigue dificultando enormemente su utilización en zonas de escasos recursos, donde la incidencia de estas enfermedades es mucho más relevante.

Para solventar este problema, han surgido recientemente un grupo de técnicas isotérmicas de amplificación de ácidos nucleicos. Todas ellas siguen los principios básicos de la PCR, aunque no necesitan de un paso previo de desnaturalización de la doble hebra de ADN, ya que utilizan enzimas con actividad de desplazamiento de cadena que permiten realizar la reacción a temperatura constante sin depender de un termociclador, utilizando un simple termobloque o incluso un baño de agua.

Estas técnicas se dividen en tres grupos, en función de la cinética de reacción: lineales, exponenciales y en cascada (que combinan dos o más técnicas para la amplificación del ADN). Para el diagnóstico se utilizan las exponenciales, que nos permiten obtener una cantidad apreciable de ADN diana a partir de las ínfimas cantidades iniciales que suelen estar presentes en muestras de fluidos o tejidos de los pacientes. Entre ellas destacan: NASBA, SDA, RCA, LAMP, HDA, RPA y EXPAR (Zhao et al., 2015). Hasta la fecha, la más utilizada en el diagnóstico de NTD es la tecnología LAMP (del inglés, *Loop-mediated isothermal amplification*) (Notomi et al., 2000).

SELECCIÓN DE SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS Y PROTEICAS ÚTILES PARA EL DIAGNÓSTICO Y VACUNAS DE ENFERMEDADES PARASITARIAS

Beatriz Crego Vicente, Juan García-Bernalt Diego, Begoña Febrer Sendra, Pedro
Fernández-Soto

Laboratorio de Inmunología Parasitaria y Molecular. Grupo e-INTRO. IBSAL-CIETUS.
Área de Parasitología. Facultad de Farmacia. Avda. Licenciado Méndez Nieto s/n.
37007. Salamanca.

PALABRAS CLAVE: NTD, Neglected Tropical Diseases, LAMP, Loop-mediated
isothermal amplification, secuencias, primers

1.- INTRODUCCIÓN. DIAGNÓSTICO MOLECULAR MEDIANTE TECNOLOGÍA LAMP. IMPORTANCIA Y APLICACIÓN

La lucha contra las enfermedades tropicales olvidadas (NTDs) es uno de los principales retos de la OMS. Se trata principalmente de enfermedades infecciosas que proliferan en lugares de escasos recursos, donde es necesario un buen diagnóstico y tratamiento. Los métodos de diagnóstico habituales se centran en técnicas de microscopía y serología con problemas de sensibilidad y especificidad. El surgimiento de técnicas moleculares, como la PCR, son una alternativa más fiable, sin embargo, requieren de equipamiento especial y personal cualificado lo que supone un problema para su aplicación en zona endémica. Una alternativa es el uso de técnicas isotérmicas de amplificación de ácidos nucleicos como la tecnología LAMP (del inglés, *Loop-mediated isothermal amplification*).

Para la aplicación de esta técnica LAMP (Figura 1) basta con un termobloque o baño de agua capaz de mantener una temperatura constante. Su funcionamiento se basa en el uso de 4 o 6 primers capaces de reconocer respectivamente 6 u 8 secuencias específicas dentro de la región de amplificación. Además, se utiliza una *Bst* polimerasa de *Bacillus stearothermophilus* con actividad de desplazamiento de cadena. La cantidad de ADN generada es mayor a la de otras técnicas moleculares y da lugar a fragmentos de distintos tamaños de ADN. Así, la obtención de resultados se puede llevar a cabo mediante diferentes métodos de detección: **electroforesis en gel de agarosa** donde se visualiza un patrón en escalera característico de los productos de reacción; **turbidez** causada por el precipitado de un subproducto de la reacción (pirofosfato de magnesio); **colorantes** que permiten la observación directa de un cambio colorimétrico en función del resultado, donde podemos distinguir entre colorantes intercalantes en el ADN como el SYBRTM Green y EvaGreen[®], e indicadores de metal como calceína y verde de malaquita; **floreescencia a tiempo real** capaz de cuantificar a medida que avanza la

Tecnología LAMP: diagnóstico molecular a pie de paciente.

Begoña Febrer-Sendra, Beatriz Crego-Vicente, Juan García-Bernal Diego, Pedro Fernández-Soto

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

PALABRAS CLAVE: LAMP, Loop-mediated isothermal amplification, point-of-care, multiplex-LAMP, sequences, primers design

INTRODUCCIÓN

Desde el revolucionario desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la década de 1980, las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT) se han convertido en una herramienta imprescindible tanto en el laboratorio como en la rutina clínica. Sin embargo, las limitaciones de la PCR, entre las que destacan la necesidad de equipos sofisticados y complejos, así como de un laboratorio equipado y personal capacitado, provocaron una búsqueda de alternativas más simples y asequibles, resultando en el desarrollo de varias NAAT isotérmicas. Estas técnicas, a diferencia de la PCR, no necesitan de un paso previo de desnaturalización de la doble hebra de ADN, ya que utilizan enzimas con actividad de desplazamiento de cadena que permiten realizar la reacción a temperatura constante sin depender de un termociclador, utilizando un simple termobloque. Hasta la fecha, la más utilizada en el diagnóstico de NTD (del inglés, *Neglected Tropical Diseases*) es la tecnología LAMP (del inglés, *Loop-mediated isothermal amplification*) (Notomi *et al.*, 2000).

Esta tecnología, se basa en el uso de 4 o 6 *primers* capaces de reconocer 6 u 8 secuencias específicas dentro de la región de amplificación. Además, la obtención de los resultados se puede llevar a cabo mediante diferentes métodos de detección: **electroforesis en gel de agarosa**; **turbidez** causada por el precipitado de un subproducto de la reacción (pirofosfato de magnesio); **colorantes** que permiten la observación directa de un cambio colorimétrico en función del resultado, donde podemos distinguir entre colorantes intercalantes del ADN (como el SYBR Green y EvaGreen) e indicadores de metal (como calceína y verde malaquita); **fluorescencia a tiempo real**, capaz de cuantificar la señal de fluorescencia generada en la reacción de amplificación de ADN, gracias al uso de termocicladores convencionales a tiempo real o de dispositivos portátiles, como por ejemplo el Genie® III (Optigen, UK); **ensayos de flujo lateral**, que combinan la técnica LAMP con el uso de tiras inmunocromatográficas (Wong *et al.* 2018).

DIAGNÓSTICO MOLECULAR EN ENFERMEDADES PARASITARIAS

Beatriz Crego-Vicente, Begoña Febrer-Sendra, Juan García-Bernal Diego, Raúl Manzano-Román, Pedro Fernández-Soto

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

PALABRAS CLAVE: LAMP, Loop-mediated isothermal amplification, point-of-care, multiplex-LAMP, sequences, primers design

1. TÉCNICAS DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA DE ÁCIDOS NUCLEICOS Y LAMP

Desde el revolucionario desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la década de 1980, las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT) se han convertido en una herramienta imprescindible tanto en el laboratorio como en la rutina clínica. Sin embargo, las limitaciones de la PCR, entre las que destacan la necesidad de equipos sofisticados y complejos, así como de un laboratorio equipado y personal capacitado, provocaron una búsqueda de alternativas más simples y asequibles, resultando en el desarrollo de varias NAAT isotérmicas. Estas técnicas, a diferencia de la PCR, no necesitan de un paso previo de desnaturalización de la doble hebra de ADN, ya que utilizan distintas enzimas que permiten realizar la reacción a temperatura constante sin depender de un termociclador, utilizando un simple termobloque o baño de agua. Hay numerosos ejemplos de estas técnicas, y nuevos desarrollos amplían regularmente esta lista. Un resumen de las principales técnicas de amplificación isotérmica se puede encontrar en la Tabla 1.

NANO-BIOTECNOLOGÍA Y ENFERMEDADES PARASITARIAS

Raúl Manzano-Román, Juan García-Bernal Diego, Begoña Febrer-Sendra, Beatriz Crego-Vicente, Pedro Fernández-Soto

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

PALABRAS CLAVE: Nano-partículas, parásitos, nano-plataformas, nano-materiales, enfermedades parasitarias

INTRODUCCIÓN

Desde el revolucionario desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa La nano-biotecnología es un campo de investigación muy reciente que trabaja con una fuerte orientación interdisciplinaria. Combina leyes físicas, procesos químicos y principios biológicos en la nano-escala. Se está convirtiendo en una de las tecnologías fundamentales del siglo XXI. La nano-biotecnología puede definirse como un campo que aplica principios y técnicas de nano-escala para comprender y diseñar biosistemas con materiales y dispositivos de nano-escala, lo que incluye la incorporación de sistemas biológicos y no biológicos y la integración de nuevos nano-materiales para mejorar la salud y la calidad de vida.

El término "nano-tecnología" se utilizó por primera vez en el año 1974 para describir herramientas científicas utilizadas para la manipulación de los materiales en su nano-escala. El término "nano-escala" suele utilizarse para describir materiales que tienen una o más de sus tres dimensiones que miden entre 1 y 100 nm; incluyendo algunas moléculas biológicas que existen naturalmente como es el caso del ADN o las proteínas que miden entre 2,5 y 5 nm. La biotecnología utiliza biomoléculas y organismos para desarrollar terapias farmacéuticas, tratamientos e investigaciones médicas e innovaciones agrícolas. Las moléculas utilizadas pueden incluir anticuerpos, ácidos nucleicos como el ADN y el ARN, proteínas y hormonas, virus, células humanas y bacterias, y células vegetales. Mientras que las biomoléculas suelen tener un tamaño de entre 3 y 15 nm, las células humanas y las células vegetales pueden medir hasta 25 micras y 100 micras, respectivamente.

Por otra parte, la expresión "nano-biotecnología" se aplica para describir el uso de la nanotecnología en las ciencias biológicas. La cual utiliza las propiedades desarrolladas por un material/sistema a un tamaño nano-métrico que a menudo difiere en términos físicos, químicos o biológicos del mismo material/sistema a un tamaño mayor. Y existen "nano-biomateriales" desarrollados recientemente (normalmente de entre 5-20 nm) diseñados para tener similitud estructural con diferentes receptores corporales, ligandos, ADN y proteínas para facilitar su interacción con las membranas celulares y tejidos en diferentes condiciones y permitir cruzar las barreras biológicas y su internalización. La nano-biotecnología utiliza por tanto materiales naturales (nanopartículas similares a los virus, ácidos nucleicos, etc) como artificiales e inorgánicos, principalmente nano-partículas (NPs), que suelen tener un tamaño inferior a 100 nm.

AII.4. Premios de investigación

En este apartado se incluyen dos premios de investigación otorgados por el Decanato de la Facultad de Farmacia a las mejores publicaciones científicas publicadas por estudiantes de doctorado, en las convocatorias de 2019 y 2020.



FACULTAD DE FARMACIA
DECANATO
Campus Unamuno
Av. Méndez Nieto, s/n
37007.Salamanca, s/n
Tel.: +34 923 29 4522 Fax: +34 923 29 45 15
dec.ffa@usal.es

RAQUEL ÁLVAREZ LOZANO, Secretaria Académica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Salamanca,

CERTIFICA QUE:

según consta en la documentación de este Centro, **D. Juan García-Bernalt Diego**, estudiante de Doctorado con NIF 70906839-R, recibió el "Premio de Investigación Inmaculada 2019" como primer firmante del artículo "Progress in loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Schistosoma mansoni* DNA: towards a ready-to-use test".

Los demás firmantes del artículo son **D. Pedro Fernández Soto**, **Dª. Beatriz Crego Vicente**, **D. Sergio Alonso Castrillejo**, **Dª. Begoña Febrer Sendra**, **Dª. Ana Gómez Sánchez**, **Dª. Belén Vicente Santiago**, **D. Julio López Abán** y **D. Antonio Muro Álvarez**.

Y para que conste a los efectos oportunos, y a petición del interesado, expido el presente certificado, con el Vº Bº del Decano, en Salamanca a diez de diciembre de dos mil diecinueve.

VºBº

El Decano

Antonio Muro Álvarez

La Secretaria

P.S. Rosa Amanda Sepúlveda Correa



FACULTAD DE FARMACIA
DECANATO
Campus Unamuno
C/ Lic. Méndez Nieto, s/n 37007 Salamanca
Tel.: +34 923 29 4522
dec.ffa@usal.es

D^{ña}. ROSA AMANDA SEPÚLVEDA CORREA, Secretaria de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Salamanca,

CERTIFICA QUE:

Según consta en la documentación de este Centro, D.^{ña} BEATRIZ CREGO VICENTE, estudiante de Doctorado con NIF 70888306-Y, recibió el “Premio de Investigación Experimental INMACULADA 2021” como primer firmante del artículo “Application of a Genus-Specific LAMP Assay for Schistosome Species to Detect *Schistosoma haematobium* x *Schistosoma bovis* Hybrids”.

Los demás firmantes del artículo son D. Pedro Fernández-Soto, D.^{ña}. Begoña Febrer-Sendra, D. Juan García-Bernalt Diego, D. Jérôme Boissier, D. Etienne K. Angora, D.^{ña}. Ana Oleaga y D. Antonio Muro.

Y para que conste a los efectos oportunos, y a petición de la interesada, expido el presente certificado, con el V.º B.º de la Decana, en Salamanca a veintiuno de diciembre de dos mil veintiuno.

V.º B.º

LA DECANA

MORALES MARTÍN
Firmado digitalmente por
MORALES MARTÍN ANA
ISABEL - 11764194Q
Fecha: 2022.01.12
14:57:20 +01'00'

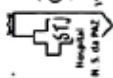
Fdo.: Ana Isabel Morales Martín

LA SECRETARIA

Firmado digitalmente por
SEPULVEDA CORREA ROSA
AMANDA - 70960119J
Fecha: 2022.01.11 15:54:52
+01'00'

AII.5. Estancias en el extranjero

Se adjunta certificado de la estancia de investigación realizada en el Hospital Nossa Senhora da Paz, Cubal, Angola, para cumplir con los requisitos necesarios de mención internacional de esta Tesis Doctoral.

 PROVINCIA NOSSA SENHORA RAÍNHA Companhia de Santa Teresa de Jesus Nada se consegue sem Educação e caridade virtude e superfluidade sem ela. (Bianque de Oude)	HNSP	A Direcção do Hospital Nossa Senhora da Paz, - Cubal, vem por este meio certificar que a Sra. Begoña Febrer Sendra, com passaporte nº PAN275705 emitido pela Polícia nacional do Reino de Espanha, esteve conosco exercendo as actividades como Pesquisadora no Laboratório de Estudos e Análises Clínicas e no processo formativo do pessoal do mesmo Hospital com diferentes temas, no período de 10 Maio à 07 de Agosto de 2022. Por ser verdade passou-se o presente certificado que vai ser assinado e carimbado com selo em uso nesta Instituição. Cubal, Agosto de 2022 O DIRECTOR CLÍNICO <i>Daniel Bandeira Sumbelelo</i> Dr. Daniel Bandeira Sumbelelo O DIRECTOR PEDAGÓGICO E CIENTÍFICO <i>Nicolau Mailengue Sikalela</i> Dr. Nicolau Mailengue Sikalela O DIRECTOR GERAL <i>Dra. Maria Rosalina Prala</i> Dra. Maria Rosalina Prala
---	---	--

