



TESIS DOCTORAL

**Tecnología LAMP: avances en el diagnóstico de esquistosomosis y
estrongiloidosis**

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Biología Animal, Parasitología,

Ecología, Edafología y Química Agrícola.

-Área de Parasitología-

Beatriz Crego Vicente

2023

TESIS DOCTORAL POR COMPENDIO DE PUBLICACIONES

Se presenta este documento de Tesis Doctoral por compendio de publicaciones para optar al título de Doctora por la Universidad de Salamanca. Se aportan para su evaluación dos artículos de investigación publicados y uno en proceso de publicación. Los artículos científicos aquí recogidos han sido publicados en revistas científicas indexadas en el Journal Citation Reports dentro del primer (Q1) o segundo (Q2) cuartil. En conjunto, adquieren una adecuada relevancia, originalidad, y excelencia, siendo la doctoranda la primera autora en todos ellos.

1. Primer artículo de investigación

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

Revista: Journal of Clinical Medicine

Año: 2021

Autores: Beatriz Crego-Vicente¹, Pedro Fernández-Soto¹, Begoña Febrer-Sendra¹, Juan García-Bernalt Diego¹, Jérôme Boissier², Etienne K. Angora^{3,4,5}, Ana Oleaga⁶, Antonio Muro¹.

Afiliaciones: ¹Infectious 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. ²IHPE, Université Montpellier, CNRS, Ifremer, Université Perpignan Via Domitia, 66100 Perpignan, France. ³Swiss Tropical and Public Health Institute, P.O. Box, CH-4002 Basel, Switzerland. ⁴Department of Public Health, University of Basel, P.O. Box, CH-4003 Basel, Switzerland. ⁵Unité de Formation et de Recherche Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Félix Houphouët-Boigny, Abidjan BPV 34, Côte d'Ivoire. ⁶Parasitology Laboratory, Institute of Natural Resources and Agrobiolgy (IRNASA, CSIC). Cordel de Merinas, 40-52, 37008 Salamanca, Spain.

DOI: <https://doi.org/10.3390/jcm10061308>

Indicadores de calidad: Factor de impacto: 4,964; Q2 en Medicina, General e Interna.

2. Segundo artículo de investigación

Título: 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.

Revista: International Journal of Molecular Sciences

Año: 2023

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

Afiliaciones: 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

DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms24010893>

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

3. Tercer artículo de investigación

Título: First field study using Strong-LAMP for diagnosis of strongyloidiasis in Cubal, Angola.

Revista: PLOS Neglected Tropical Diseases

Año: Publicación prevista en 2023

Autores: Beatriz Crego-Vicente¹, Begoña Febrer-Sendra¹, Arlette Nindia², Agostinho Pessela², Sandra Aixut², Joan Martínez-Campreciós^{2,3}, Alejandro Mediavilla⁴, Aroa Silgado⁴, Elena Sulleiro^{3,4}, Begoña Treviño^{3,5}, Israel Molina^{3,5}, Antonio Muro¹, Fernando Salvador^{3,5*}, Pedro Fernández-Soto^{1*}

Afiliaciones: 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. 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: 4,781; Q1 en Parasitología.

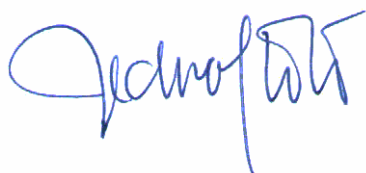
CERTIFICACIÓN

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, y Prof. Dr. Antonio Muro Álvarez, Catedrático 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: avances en el diagnóstico de esquistosomosis y estrombiloidosis”, que se presenta para optar al grado de Doctora por la Universidad de Salamanca en la **modalidad de Tesis por compendio de publicaciones**, ha sido realizada por **Beatriz Crego Vicente**, 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 26 de mayo de 2023.



Fdo. Dr. Pedro Fernández Soto



Fdo. Dr. Antonio Muro Álvarez

La evocación de los árboles, de su majestuosidad indiferente y del amor que por ellos sentimos nos enseña cuán irrisorios somos, viles parásitos que pululamos en la superficie de la tierra, y al mismo tiempo nos hace dignos de vivir, pues somos capaces de reconocer la belleza que no nos debe nada.

-Muriel Barbery (La elegancia del erizo)

AGRADECIMIENTOS

A través de estas líneas quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que con su soporte científico y humano han colaborado en hacer posible este trabajo de investigación.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores, Pedro y Antonio, por darme la oportunidad y la confianza para comenzar mi carrera investigadora y orientarme estos años. A Pedro por su dedicación y tiempo invertido, su detallismo y elegancia en todo lo que hace. A Antonio por su aptitud optimista e ideas brillantes.

En segundo lugar, a todas las personas con las que he compartido camino, poyata y horas estos años en el laboratorio ayudando hacer que el trayecto merezca la pena, gracias por todo lo compartido. Con las que comencé la aventura, Ana, Marta y Óscar; con las que siempre han estado para compartir unas palabras de motivación, ofreciendo consejos y calma en los momentos más necesarios, Belén, Carmen y Julio López; y las que se incorporaron más tarde para sostener los últimos años, Julio Soto, Xiomara y Quina; y todas las personas que han ido y venido por el camino, gracias. Finalmente, mi más sincero agradecimiento a mis amigos y compañeros, Bego y Juan, presentes en esta fragosa andadura que deja atrás toda clase de momentos, científicos y de la vida, sin vosotros nada de esto habría sido posible, gracias por tanto.

De mi estancia en Cubal, Angola, quiero dar las gracias en primer lugar a Nano y Elena que desde Vall d'Hebron me brindaron la oportunidad y confianza para llevar a cabo el estudio realizado en Cubal. A las hermanas Teresianas de la Misión Católica de Cubal y a los trabajadores del Hospital Nossa Senhora da Paz, especialmente a Arlette y Pesela por su disposición, alegría y cariño, a todos gracias por abrirme los brazos y las puertas de vuestras casas. A Sandra y Joan por la pasión que desprenden en su trabajo y que es digna de admirar. A las voluntarias, trabajadoras del Quintal y demás personas que hicieron de la estancia algo inolvidable. Gracias a todas y todos de corazón.

A todas las personas con las que he tenido la oportunidad de coincidir y colaborar relacionadas con el mundo de las enfermedades tropicales, destacando especialmente al Dr. Joaquín Salas Coronas y todo su equipo del Hospital de Poniente, El Ejido.

A nivel personal quería agradecer a mi madre Chelo y mi padre Maxi por apoyarme en mis decisiones, confiar y creer en mí, educarme en valores y hacerme ser como soy. Todo lo que he ido consiguiendo ha sido gracias a vosotros. A mi hermana

Cristina por ser la persona sin la cual nunca habría llegado hasta aquí. Por su paciencia infinita y estar siempre a mi lado para ayudarme a no perderme, gracias hermana. A mi lala, porque siempre estará conmigo en cada paso de mi vida.

A Jorge, para el que nunca tendré palabras de agradecimiento suficientes, mi mayor apoyo todo este tiempo. Gracias por estar, por saber calmarme, por tu paciencia eterna, por enseñarme a mirar el mundo y “[...] *vivir profundamente y desechar todo aquello que no fuera vida*”- Henry David Thoreau. Todo este trabajo es tan mío como tuyo.

A Bongo y Darwin por llenarme de amor y alegría cada día.

A mis amigos Christian y Paula, por embarcarse también en esta aventura de búsqueda de respuestas científicas y ser referentes de constancia, pasión y resiliencia. A Cristina, Laura, Azufaixas, Eugenia y muchas más que hacen una larga lista de amigos y familia importantes en esta etapa.

¡Gracias, Obrigado, Twapandula!

ÍNDICE

Resumen	15
Resumo.....	18
Capítulo I: Introducción.....	21
1.1. Importancia de las Enfermedades Tropicales Olvidadas.....	23
1.2. LAMP. Principios y aplicaciones en esquistosomosis y estrombiloidosis	25
1.2.1. LAMP y esquistosomosis.....	29
1.2.2. LAMP y estrombiloidosis	30
1.3. LAMP múltiple	31
1.3.1. Métodos que utilizan <i>primers</i> modificados.....	31
1.3.1.1. <i>DARQ</i> o ‘detección de la amplificación por liberación de quencher’	32
1.3.1.2. <i>QUASR</i> o ‘detección por apagamiento del quencher no incorporado a la amplificación’ ..	34
1.3.1.3. <i>FLOS</i> o ‘fluorescencia del cebador de bucle por autoactivación’	35
1.3.1.4. <i>Guanina quenching</i>	36
1.3.1.5. <i>Sondas de asimilación o fluorescencia de primers</i>	38
1.3.2. Métodos que utilizan sondas universales	40
1.3.2.1. <i>Sondas OSD</i> o ‘sondas de desplazamiento de hebra en un paso’	40
1.3.2.2. <i>Molecular beacon</i> o <i>baliza molecular</i>	41
1.3.2.3. <i>Sonda MD</i> o ‘de desplazamiento del mediador’	43
1.3.3. Métodos que utilizan enzimas de restricción o endonucleasas	44
1.3.4. Métodos que utilizan nanopartículas	47
1.3.5. Métodos que utilizan combinación de varias técnicas	50
1.3.5.1. <i>LAMP-ELISA</i> o ‘ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima’	50
1.3.5.2. <i>LAMP-Secuenciación</i>	52
1.3.6. Otros métodos	53
1.4. Bibliografía	59
Capítulo II: Hipótesis y objetivos	73
2.1. Hipótesis.....	75
2.2. Objetivos.....	75
Capítulo III: Artículos de investigación	77
3.1. <i>Application of a Genus-Specific LAMP Assay for Schistosome Species to Detect Schistosoma haematobium x Schistosoma bovis Hybrids</i>	79
3.2. <i>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</i>	97
3.3. <i>First field study using Strong-LAMP for diagnosis of strongyloidiasis in Cubal, Angola</i>	117
Capítulo IV: Conclusiones.....	141
Conclusiones	143
Conclusões.....	144

Anexo I: Anexo metodológico 145

AI.1. Muestras biológicas.....	147
AI.2. Procesamiento de muestras y extracción de ADN	148
AI.2.1. Purificación de ADN genómico de parásitos	148
AI.2.2. Purificación de ADN genómico de muestras de orina	149
AI.2.3. Purificación de ADN genómico de muestras de heces	150
AI.3. Selección de secuencias.....	151
AI.4. Amplificación de ADN.....	153
AI.4.1. PCR a tiempo real (qPCR).....	153
AI.4.2. LAMP colorimétrico.....	154
AI.5. Sensibilidad	155
AI.6. Diseño y puesta a punto de la tecnología DARQ-LAMP.....	156
AI.6.1. Elección de fluoróforos y marcaje de <i>primers</i>	156
AI.6.2. Puesta a punto.....	157
AI.6.3. Evaluación de sensibilidad	159
AI.7. Estabilización de reactivos DARQ-LAMP	159
AI.8. Técnicas parasitológicas.....	160
AI.8.1. Observación microscópica directa con solución salina	160
AI.8.2. Técnica Baermann	160
AI.9. Bibliografía.....	161

Anexo II: Otras publicaciones científicas, comunicaciones en congresos, publicaciones docentes, premios de investigación y estancias en el extranjero 163

AII.1. Otras publicaciones científicas.....	165
AII.2. Comunicaciones en congresos.....	179
AII.3. Publicaciones docentes	197
AII.4. Premios de investigación	203
AII.5. Estancias en el extranjero	205

RESUMEN

Las Enfermedades Tropicales Olvidadas o Desatendidas (NTDs; del inglés *Neglected Tropical Diseases*) son un grupo heterogéneo de 20 entidades, de elevada prevalencia principalmente en áreas tropicales y subtropicales, que afectan a más de mil millones de personas pertenecientes a comunidades empobrecidas con consecuencias devastadoras en el ámbito social, económico y de la salud. Geográficamente, las regiones más afectadas por las NTDs son el África subsahariana, el sureste asiático y las regiones tropicales de América.

Sin embargo, en los países occidentales, el número de casos importados de algunas de estas NTDs, como la esquistosomosis y la estrongiloidosis, ha ido incrementando en los últimos años debido al aumento del flujo migratorio y los viajes a regiones endémicas de estas enfermedades. En relación a la esquistosomosis, se han registrado ya casos de transmisión autóctona en Europa, incluyendo España, y la aparición de formas híbridas que pueden tener consecuencias en el diagnóstico, transmisión y morbilidad de la enfermedad. La estrongiloidosis importada también ha sufrido un incremento en su diagnóstico en áreas no endémicas, convirtiéndose según los últimos estudios en un reto para la Salud Pública mundial. Por otra parte, hay que destacar que las coinfecciones de estas dos enfermedades son frecuentes debido al solapamiento geográfico de sus áreas de distribución.

Los problemas de diagnóstico a los que se enfrentan estas enfermedades, especialmente en zonas endémicas de bajos recursos, son la falta de sensibilidad de las técnicas tradicionales y la incapacidad de aplicación de metodologías con elevada sensibilidad y especificidad como los métodos moleculares, ya que requieren de equipos complejos que tienen un coste elevado. La técnica de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos LAMP (del inglés, *Loop-mediated isothermal amplification*), presenta las ventajas de rapidez, sencillez, especificidad y fácil aplicación en campo, necesarias para ser un método adecuado para el diagnóstico de las NTDs. El LAMP ya ha sido utilizado con éxito para el diagnóstico de esquistosomosis en estudios de campo en áreas de escasos recursos. Sin embargo, aún no se ha utilizado para la posible detección de híbridos. En el caso de la estrongiloidosis, los estudios con la tecnología LAMP son más limitados, y ninguno de ellos ha evaluado su eficacia en el terreno. Las ventajas de desarrollar un método LAMP múltiple, que permita la detección simultánea de coinfecciones, supondría un gran avance en el diagnóstico de estas enfermedades. Los métodos utilizados para

el desarrollo de un LAMP múltiplex son variados, y hasta la fecha no están estandarizados.

En este contexto, teniendo en cuenta la reciente aparición e introducción de formas híbridas de esquistosomas en áreas no endémicas, y la elevada prevalencia de coinfecciones en zonas endémicas, nos planteamos como **hipótesis de trabajo** la necesidad de disponer de un método LAMP múltiplex que permita la detección simultánea de varios patógenos en un mismo ensayo. Todo ello, buscando la posibilidad de su adaptación al diagnóstico *point-of-care* de las NTDs.

Así, nos propusimos como **objetivo general** la aplicación de la tecnología LAMP y la adaptación a un formato múltiple que permita su uso como diagnóstico *point-of-care* y la detección simultánea de varios patógenos. Para ello, se definieron diversos objetivos específicos que se van logrando en los diferentes artículos de investigación presentados en esta Tesis Doctoral.

El **primer objetivo específico** se basó en la evaluación de la tecnología LAMP para la detección de formas híbridas de esquistosomas. Para ello, utilizamos un método LAMP para la amplificación género-específica de *Schistosoma* previamente desarrollado por nuestro grupo de investigación. Se evaluó su eficacia con diferentes perfiles moleculares de híbridos *S. haematobium/S. bovis* procedentes del primer brote de esquistosomosis urogenital autóctono registrado en Europa (Córcega) y en estudios en Costa de Marfil.

En el **segundo objetivo específico** nos planteamos desarrollar un método LAMP múltiplex con el fin de poder detectar coinfecciones producidas por *S. mansoni* y *Strongyloides* spp. Para ello, adaptamos el método SmMIT-LAMP y el método *Strong-LAMP*, previamente desarrollados por nuestro grupo de investigación, de forma conjunta por primera vez a la metodología DARQ-LAMP como sistema de detección múltiple de las dianas amplificadas. El método empleado en el desarrollo de nuestro LAMP múltiplex es adaptable a otros métodos LAMP en formato dúplex para la detección de otras posibles coinfecciones. Además, evaluamos su funcionalidad con los reactivos estabilizados y almacenados a temperatura ambiente en un formato “listo para su uso” en un dispositivo portátil de detección a tiempo real, favoreciendo su posible aplicación en estudios de campo.

El **tercer objetivo específico** tuvo como finalidad aplicar la tecnología LAMP para el diagnóstico *point-of-care* de la estrongiloidosis en una zona endémica de escasos recursos. Para ello, aplicamos nuestro *Strong-LAMP* en un estudio de campo realizado en Cubal, Angola, en el que se recogieron un total de 192 muestras de heces de

pacientes. Se compararon los resultados obtenidos con el análisis parasitológico convencional mediante observación directa con solución salina y técnica de Baermann. Además, para comprobar la reproducibilidad de la técnica, se reanalizaron posteriormente las muestras en un laboratorio de referencia y se compararon los resultados con una qPCR comúnmente utilizada en los estudios de estrogiloidosis.

En **conclusión**, el trabajo que aquí se presenta muestra: (i) la eficacia del método LAMP género-específico de *Schistosoma* para la detección de formas híbridas de *S. haematobium/S. bovis*; (ii) el desarrollo, por primera vez, de un método LAMP múltiple que detecta simultáneamente y a tiempo real *S. mansoni* y *Strongyloides* spp.; (iii) su eficacia utilizando reactivos estabilizados y almacenados a temperatura ambiente; (iv) un mayor rendimiento diagnóstico del método *Strong-LAMP* en el diagnóstico de campo de la estrogiloidosis frente a los métodos parasitológicos convencionales y otros métodos moleculares como la qPCR en el laboratorio; (v) la utilidad del método *Strong-LAMP* como método de diagnóstico *point-of-care* de la estrogiloidosis.

RESUMO

As Doenças Tropicais Negligenciadas (NTDs, em inglês Neglected Tropical Diseases) são um grupo heterogêneo de 20 entidades, altamente prevalentes sobretudo em zonas tropicais e subtropicais, que afectam a mais de mil milhões de pessoas em comunidades empobrecidas, com consequências devastadoras a nível social, económico e de saúde. Geograficamente, as regiões mais afectadas pelas NTDs são a África Subsariana, o Sudeste Asiático e as regiões tropicais das Américas.

Contudo, nos países ocidentais, o número de casos importados de algumas destas NTDs, como a esquistossomose e a estrogiloidose, tem vindo a aumentar nos últimos anos devido ao aumento da migração e das viagens para regiões endémicas destas doenças. Em relação à esquistossomose, já foram notificados casos de transmissão autóctone na Europa, incluindo em Espanha, e o aparecimento de formas híbridas pode ter consequências para o diagnóstico, a transmissão e a morbilidade da doença. A estrogiloidose importada também tem sido cada vez mais diagnosticada em áreas não endémicas, o que, de acordo com os estudos mais recentes, a torna um desafio de saúde pública global. Por outro lado, é de salientar que as co-infecções destas duas doenças são frequentes devido à sobreposição geográfica das suas áreas de distribuição.

Os problemas de diagnóstico enfrentados por estas doenças, especialmente em áreas endémicas com poucos recursos, são a falta de sensibilidade das técnicas tradicionais e a incapacidade de aplicar metodologias com elevada sensibilidade e especificidade, como os métodos moleculares, uma vez que requerem equipamento complexo e dispendioso. A técnica LAMP (em inglês; Loop-mediated isothermal amplification) tem as vantagens da rapidez, simplicidade, especificidade e a fácil aplicação no terreno necessárias para ser um método adequado para o diagnóstico de NTD. A técnica LAMP já foi utilizada com êxito para o diagnóstico da esquistossomose em estudos de campo em zonas com poucos recursos. No entanto, ainda não foi utilizado para a detecção de possíveis híbridos. No caso da estrogiloidose, os estudos com a tecnologia LAMP são mais limitados e nenhum deles avaliou a sua eficácia no terreno. As vantagens do desenvolvimento de um método LAMP multiplex, permitindo a detecção simultânea de co-infecções, seriam um grande avanço no diagnóstico destas doenças. Os métodos utilizados para o desenvolvimento de um LAMP multiplex são variados e, até à data, não estão normalizados.

*Neste contexto, tendo em conta o recente aparecimento e introdução de formas híbridas de esquistossomas em áreas não endémicas, e a elevada prevalência de co-infecções em áreas endémicas, propomos como **hipótese de trabalho** a necessidade de um método*

LAMP multiplex que permita a detecção simultânea de vários agentes patogénicos no mesmo ensaio. Tudo isto, procurando a possibilidade de o adaptar ao diagnóstico de NTD no local de prestação de cuidados.

Assim, estabelecemos o **objectivo geral** a aplicação da tecnologia LAMP e a sua adaptação a um formato múltiplo que permita a sua utilização como diagnóstico point-of-care e a detecção simultânea de vários agentes patogénicos. Para tal, foram definidos vários objectivos específicos, que estão a ser concretizados nos diferentes artigos de investigação apresentados nesta Tese de Doutoramento.

O **primeiro objectivo específico** baseou-se na avaliação da tecnologia LAMP para a detecção de formas híbridas de esquistosomas. Para o efeito, utilizámos um método LAMP para amplificação género-específica de *Schistosoma* previamente desenvolvido pelo nosso grupo de investigação. A sua eficácia foi avaliada com diferentes perfis moleculares de híbridos *S. haematobium/S. bovis* provenientes do primeiro surto de esquistossomose urogenital autóctone na Europa (Córsega) e em estudos na Costa do Marfim.

No **segundo objectivo específico**, pretendemos desenvolver um método LAMP multiplex para detectar co-infecções causadas por *S. mansoni* e *Strongyloides spp.* Para este efeito, adaptámos o método SmMIT-LAMP e o método Strong-LAMP, previamente desenvolvidos pelo nosso grupo de investigação, em conjunto, pela primeira vez, com a metodologia DARQ-LAMP como um sistema de detecção multiplex para os alvos amplificados. O método utilizado no desenvolvimento do nosso LAMP multiplex é adaptável a outros métodos LAMP em formato duplex para a detecção de outras possíveis co-infecções. Além disso, avaliámos a sua funcionalidade com os reagentes estabilizados e armazenados à temperatura ambiente num formato "pronto a usar" num dispositivo portátil de detecção em tempo real, favorecendo a sua potencial aplicação em estudos de campo.

O **terceiro objectivo específico** visava aplicar a tecnologia LAMP para o diagnóstico da estrongiloidose no local de tratamento numa área endémica com poucos recursos. Para este efeito, aplicámos a nossa Strong-LAMP num estudo de campo no Cubal, Angola, no qual foram recolhidas 192 amostras de fezes de pacientes. Os resultados foram comparados com a análise parasitológica convencional por observação directa com solução salina e a técnica de Baermann. Além disso, para verificar a reprodutibilidade da técnica, as amostras foram posteriormente reanalisadas num laboratório de referência e os resultados foram comparados com uma qPCR habitualmente utilizada em estudos de estrongiloidose.

Em **conclusão**, o trabalho aqui apresentado mostra: (i) a eficácia do método LAMP específico do género *Schistosoma* para a detecção de formas híbridas de *S. haematobium/S. bovis*; (ii) o desenvolvimento, pela primeira vez, de um método LAMP multiplex que permite

a detecção simultânea e em tempo real de S. mansoni e Strongyloides spp. (iii) a sua eficácia utilizando reagentes estabilizados e armazenados à temperatura ambiente; (iv) um melhor desempenho de diagnóstico do método Strong-LAMP no diagnóstico de campo da estrogiloidose em comparação com os métodos parasitológicos convencionais e outros métodos moleculares como a qPCR no laboratório; (v) a utilidade do método Strong-LAMP como método de diagnóstico da estrogiloidose no local de prestação de cuidados.

CAPÍTULO I

Introducción

1.1. Importancia de las Enfermedades Tropicales Olvidadas

Las Enfermedades Tropicales Olvidadas (NTDs; del inglés, *Neglected Tropical Disease*) son un grupo de entidades asociadas a regiones tropicales y subtropicales del planeta, que afectan a las comunidades más empobrecidas. La Organización Mundial de la Salud (OMS) calcula que anualmente más de 1.700 millones de personas a nivel mundial se incluyen en actividades de prevención y tratamiento para al menos una de estas enfermedades [1].

El marco conceptual de las NTDs se formuló en los años posteriores a la Declaración del Milenio en el año 2000, donde se fijaron ocho propósitos para el desarrollo humano. Uno de los objetivos que se pretendía abordar era “combatir el SIDA, malaria y otras enfermedades”. Estas últimas serían más tarde las denominadas NTDs. En un principio se reconocieron 13 [2,3], aunque en la actualidad la OMS ya ha aumentado su número a 20, englobando infecciones causadas por parásitos, virus, bacterias y hongos, así como envenenamiento por mordedura de serpiente [1].

Las NTDs no son consideradas enfermedades con una alta mortalidad, pero si con una elevada morbilidad, así su impacto sanitario se expresa en DALYs (*Disability-Adjusted Life-years*) o años de vida perdidos por discapacidad causados por la enfermedad [4,5]. Se estima que aproximadamente 200.000 muertes y 19 millones de DALYs están causados por las NTDs anualmente [1]. Los datos epidemiológicos de estas enfermedades son aproximados y sufren fluctuaciones dada la dificultad de recogida de los datos de incidencia y de mortalidad [4]. En la tabla 1 se muestran los valores de prevalencia, morbilidad (DALYs) y mortalidad de las NTDs causadas por parásitos.

La característica común de todas las NTDs respecto a su distribución es su endemidad en zonas empobrecidas de países de renta baja, tanto áreas rurales como urbanas. Un saneamiento inadecuado, así como un estrecho contacto con vectores, animales domésticos y ganado fomentan la prevalencia de estas enfermedades. Las consecuencias van desde la discapacidad y estigmatización social hasta la pérdida de escolarización y desarrollo infantil, así como el impedimento de que las personas lleven una vida productiva afectando negativamente a las familias y comunidades [6]. Por tanto, se hace necesario abordar el control de las NTDs desde distintas perspectivas, tanto políticas y sociales como sanitarias y científicas.

Tabla 1. Prevalencia, morbilidad y mortalidad de enfermedades olvidadas causadas por parásitos.
Adaptada de García-Bernalt y colaboradores [7].

Parasitosis	Prevalencia (millones)	Morbilidad (DALYs)	Mortalidad (muertes/año)
Ascariosis	800	427.000	14.000
Uncinariosis	450	373.000	1
Trichuriasis	435	373.000	1
Esquistosomosis	190	693.000	24.000
Trematodosis alimentarias	75	1.110.000	7.300
Filariosis linfáticas	29	1.110.000	1
Oncocercosis	15	719.000	1
Chagas	7.2	138.000	8.000
Leishmaniosis	4.8	442.000	14.000
Cisticercosis	2.6	671.000	26.000
Equinococosis	1	47.000	19.000
Tripanosomosis africana	0.007	42.000	3.000

Geográficamente, las NTDs tienen lugar en regiones tropicales y subtropicales, siendo el África subsahariana, el sureste asiático y las regiones tropicales de América las zonas más afectadas. África es el continente donde existe la mayor concentración de pobreza, más del 50% de la población vive con menos de 1.25 dólares al día [8]. Este continente alberga todos los casos de dracunculosis y tripanosomosis humana africana, el 99% de los casos de oncocercosis, más del 90% de todos los casos de esquistosomosis, el 85% de los casos de úlcera de Buruli y hasta un 30% de los casos de geohelmintosis a nivel mundial [1].

En los países occidentales, el número de casos importados de esquistosomosis y strongiloidosis se ha ido incrementando en los últimos años debido a la llegada de un importante número de migrantes procedentes de regiones endémicas y de un número creciente de viajeros que han visitado las mismas. Así, la strongiloidosis importada se diagnostica cada vez más en zonas no endémicas, incluyendo España, convirtiéndose según los últimos estudios en un reto para la Salud Pública mundial [9–13]. En relación a la esquistosomosis, un metaanálisis reciente sobre la infección en migrantes procedentes de países endémicos estima su seroprevalencia en el 18%, aumentando hasta el 24% cuando son de origen subsahariano [14]. También se ha notificado un aumento de casos importados en Europa en viajeros [15]. Además, se ha descrito la transmisión autóctona de la esquistosomosis en regiones no endémicas en Europa por la presencia de caracoles hospedadores intermediarios. En el año 2013 se detectó un brote de esquistosomosis urogenital en el río Cavu en Córcega (Francia),

que afectó a más de 120 personas locales y turistas franceses, alemanes e italianos. El brote se atribuyó a la llegada de personas infectadas procedentes de Senegal que diseminaron la infección al orinar en el río y activar el ciclo del parásito. Los análisis moleculares determinaron que las especies causantes de la infección eran *Schistosoma haematobium*, *S. bovis* y formas híbridas de *S. haematobium/S. bovis* [16]. Recientemente, también se ha descrito la transmisión autóctona de la enfermedad en España, en un grupo de agricultores que se bañaron en una balsa de riego en Almería [17]. Los cambios medioambientales y antropogénicos por fenómenos naturales o actividades humanas pueden afectar sustancialmente a la dinámica y distribución de la esquistosomosis, con posibles efectos sobre la salud humana y animal [18]. Estos cambios tienen el potencial de ejercer presión selectiva sobre la esquistosomosis animal y humana, favoreciendo la interacción y oportunidad de hibridación entre las diferentes especies. La aparición de nuevos parásitos híbridos puede tener consecuencias en la transmisión y morbilidad de la enfermedad, poniendo de manifiesto un problema emergente de Salud Pública [19]. Además, el surgimiento de híbridos zoonóticos puede llegar a invalidar las medidas de control actuales y la existencia de diferentes reservorios animales puede impulsar la transmisión continua de la enfermedad, haciendo más complicada su erradicación [20]. En África, ya se han notificado infecciones humanas por diferentes poblaciones de híbridos de esquistosomas incluyendo *S. haematobium/S. mattheei*, *S. haematobium/S. guineensis*, *S. haematobium/S. bovis*, *S. haematobium/S. curassoni* y *S. haematobium/S. mansoni* [19].

Por otra parte, algunos estudios aportan datos sobre la prevalencia de coinfección de esquistosomosis y estrongiloidosis en personas procedentes de zonas endémicas, con valores muy variables que oscilan entre un 0,6% a un 22,1% [21–27]. La muestra poblacional, los diferentes países de origen de los individuos, así como las técnicas empleadas para el diagnóstico pueden contribuir a la variabilidad de estos resultados.

1.2. LAMP. Principios y aplicaciones en esquistosomosis y estrongiloidosis

Desde el desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; del inglés, *Polimerase Chain Reaction*) en la década de los años 80, los métodos de amplificación de ácidos nucleicos (NAATs; del inglés, *nucleic acid amplification tests*) se convirtieron en una herramienta de uso habitual en el campo del diagnóstico clínico.

Posteriormente, dadas las limitaciones de la PCR para su aplicación *point-of-care* (POC), comienzan a aparecer los NAATs isotérmicos (iNAATs) como una alternativa prometedora [28,29]. Entre ellos, la amplificación isotérmica de ácidos nucleicos mediada por bucle o LAMP (*Loop-mediated isothermal amplification*) se ha convertido en el método más popular entre los investigadores, representando hasta el 60% de todas las publicaciones de ensayos de amplificación isotérmica [30].

El LAMP fue descrito por Notomi y colaboradores en el año 2000 [31] y patentado por Eiken Chemical Co., Ltd. (<http://www.eiken.com.cn/>). El LAMP se basa en la síntesis de ADN/ARN en condiciones isotérmicas (60°C – 65°C) mediante una polimerasa con actividad de desplazamiento de cadena, la *Bst* polimerasa obtenida de la bacteria *Bacillus stearothermophilus* [31]. Esta técnica requiere de 4 a 6 cebadores o *primers*, capaces de reconocer 6 a 8 regiones específicas de la secuencia del ADN/ARN diana, lo que le confiere una alta especificidad. Este conjunto o set de *primers* incluye: dos *primers* internos, *Forward Inner Primer* (FIP) formado por las secuencias F1c-F2 y *Backward Inner Primer* (BIP) formado por las secuencias B1c-B2; dos *primers* externos, *Forward Outer Primer* (F3) y *Backward Outer Primer* (B3); y dos *primers* adicionales que permiten acelerar la reacción, *Loop Forward* (LF) *primer* y *Loop Backward* (LB) *primer* (Figura 1a) [32].

El proceso de amplificación mediante LAMP consta de dos fases. En la primera fase, el FIP hibrida con el ADN diana y la *Bst* polimerasa inicia la síntesis de la cadena complementaria. El F3 inicia el desplazamiento de la hebra formada por el FIP, liberando una secuencia de ADN monocatenario (ssADN). Este ssADN es utilizado como molde por el BIP, que hibrida e inicia la síntesis de una nueva cadena, que será desplazada posteriormente por el B3. Así, se formará una secuencia con los extremos 3' y 5' complementarios a otra parte de la secuencia más interna, que dará lugar a la formación de estructuras de ADN en forma de bucle, que serán utilizadas consecutivamente como dianas para una segunda fase de amplificación exponencial (Figura 1b). Durante esta segunda fase, se produce el autocebado y la elongación del extremo 3' que inducirá el posterior desplazamiento del extremo 5', produciendo el desprendimiento de la horquilla y el plegamiento de la hebra recién sintetizada. A lo largo de esta fase se van a producir otras formas de autocebado que generarán amplicones con diferentes conformaciones y tamaños. Además, los *primers* internos (FIP y BIP) hibridan con las nuevas estructuras de bucle formadas e inician nueva síntesis. Debido a este proceso, la tecnología LAMP va a ser capaz de producir una gran cantidad de productos de amplificación de ADN de manera exponencial a partir de una cantidad muy baja de ADN [33,34]. La alta eficiencia de amplificación del

LAMP va a permitir llevar a cabo reacciones de una hora, pudiendo incluso reducirse a 30 minutos en el caso de utilizar también los *Loop primers* [35].

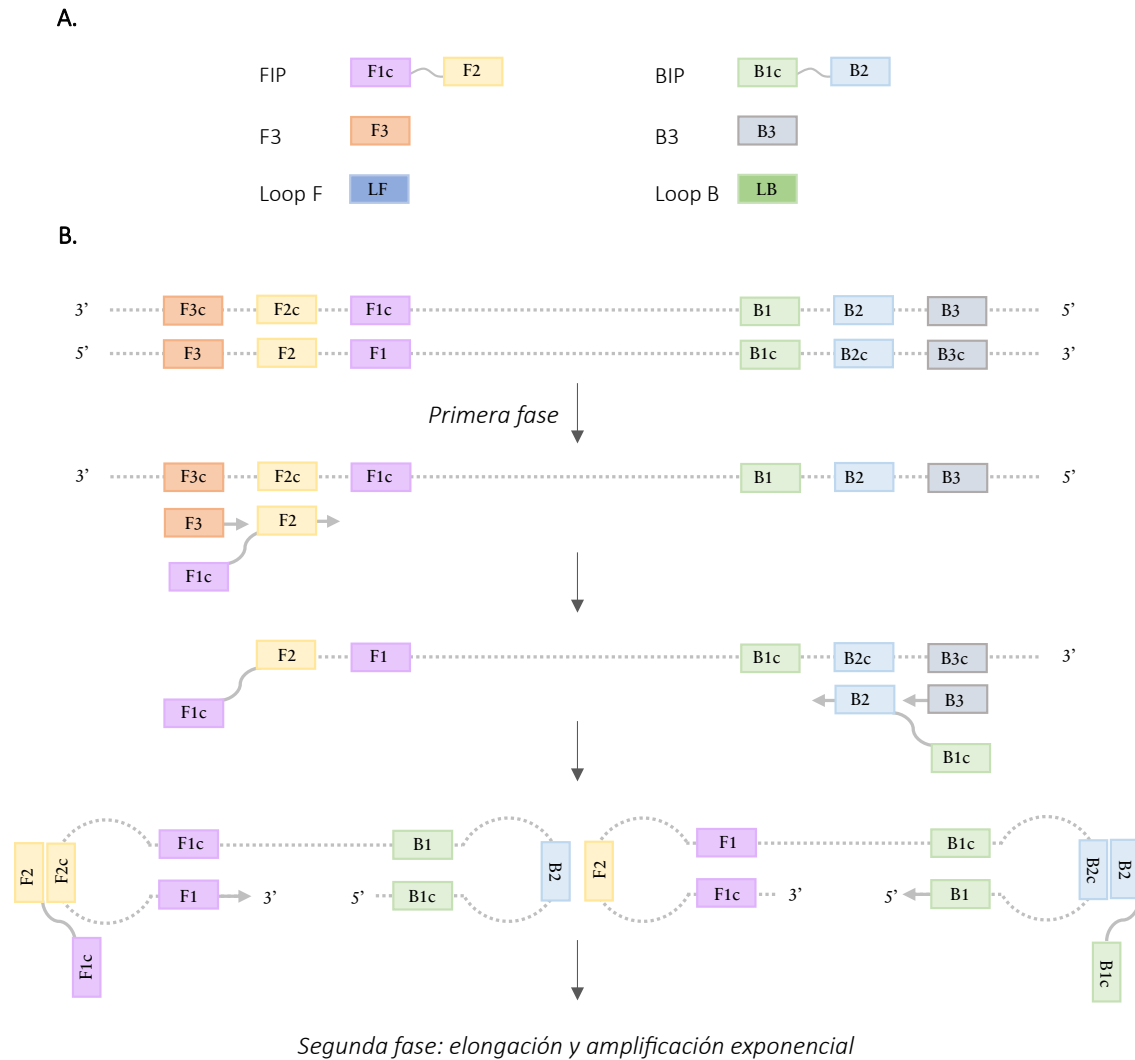


Figura 1. Esquema de los *primers* y mecanismo de reacción de *Loop-mediated isothermal amplification* (LAMP). **A)** Representación del conjunto de *primers* típicos del LAMP formado por dos *primers* internos (FIP y BIP), dos *primers* externos (F3 y B3) y dos *loop primers* (LF y LB). **B)** Proceso de amplificación LAMP.

La amplificación a temperatura constante permite realizar la reacción en un termobloque o en un simple baño de agua, haciendo innecesario el uso de dispositivos sofisticados y más costosos [36]. Además, la posibilidad de estabilizar las mezclas de reacción por medio de protocolos de secado (*dry-LAMP*) o de liofilización, permite mantener todos los reactivos necesarios a temperatura ambiente hasta su uso, evitando de esta manera el mantenimiento de la cadena de frío. Todo ello contribuye a reducir

el equipamiento necesario sobre el terreno permitiendo acercar el diagnóstico molecular a zonas de bajos recursos [37–39].

La detección de los productos de amplificación del LAMP se puede realizar mediante métodos independientes de las secuencias amplificadas (no distinguen las secuencias que se amplifican), y métodos dependientes de las secuencias amplificadas (si distinguen el tipo de secuencia que se amplifica). Estos últimos, al permitir una detección específica de los productos amplificados serán útiles para el desarrollo de la metodología LAMP múltiplex, que se expondrá más adelante.

Los métodos de detección independientes de las secuencias amplificadas más empleados son los de detección de turbidez, detección colorimétrica y detección mediante electroforesis en gel de agarosa. La *turbidez* en el medio de reacción se produce por la generación de una elevada cantidad de precipitado insoluble de pirofosfato de magnesio, un subproducto de la reacción. Esta turbidez puede ser detectada a simple vista, tras una breve centrifugación para formar un *pellet* o bien mediante turbidímetros [40]. Los métodos de *detección colorimétrica* van a permitir la detección visual de los productos amplificados utilizando diferentes agentes colorantes (intercalantes o no) que producen un cambio de color al insertarse entre las hebras del ácido nucleico. El más utilizado es el SYBR Green I, que produce un cambio de color naranja (negativo) a verde (positivo), apreciable tanto a luz natural como bajo exposición a luz UV al generar fluorescencia. A ciertas concentraciones puede llegar a inhibir la amplificación y por ello se suele añadir al término de la reacción [41,42]. Los colorantes no intercalantes o indicadores de metal [43] originan un cambio de color por reacción química. Se añaden al inicio de la reacción y producirán un cambio de color en función de si se produce o no amplificación. Algunos de los más utilizados son el azul de hidroxinaftol (*hydroxynaphthol blue*; HNB) que genera un cambio de color violeta (negativo) a azul (positivo) [44], o el verde malaquita, que desencadena un cambio de color azul (positivo) a transparente (negativo) [45]. La *electroforesis en gel de agarosa* permite la resolución de los fragmentos amplificados de diferente tamaño en un característico patrón de bandas en escalera [32].

Algunos de estos métodos de detección también se pueden monitorizar a tiempo real a medida que se produce la amplificación, como la turbidez mediante turbidímetros [46], o utilizando equipos de lectura de la fluorescencia generada al añadir agentes intercalantes de ADN a bajas concentraciones, como el EvaGreen o el SYBR Green I [47,48].

1.2.1. LAMP y esquistosomosis

En el diagnóstico molecular de la esquistosomosis, tanto humana como animal, se han empleado desde hace tiempo numerosos ensayos de detección basados en la PCR [49], siendo especialmente valiosos en la detección e identificación simultánea de varias especies de *Schistosoma* [50]. Sin embargo, a pesar de su alta sensibilidad y precisión, los métodos basados en la PCR no se pueden utilizar de forma rutinaria en estudios de campo. La tecnología LAMP es mucho más aplicable a entornos de escasos recursos y ha sido utilizada previamente para el diagnóstico de esquistosomosis. De hecho, la esquistosomosis es una de las NTDs en las que más se ha trabajado en el desarrollo de la metodología LAMP para su estudio. Durante los últimos años se han diseñado y desarrollado varios ensayos LAMP para la detección de las tres principales especies causantes de la esquistosomosis humana (*S. haematobium*, *S. japonicum* y *S. mansoni*) basados en diferentes dianas moleculares específicas de cada especie. Tres grupos de secuencias son los más utilizados en los diseños de *primers*: secuencias mitocondriales, secuencias nucleares repetitivas y secuencias nucleares ribosómicas (ADNr). Las más utilizadas y evaluadas en estudios posteriores incluyen, para *S. haematobium*: una secuencia de 121 pares de bases (pb) repetida en tándem (DraI) [51] y el espaciador intergénico ribosómico (IGS) [52]; para *S. japonicum*: el retrotransposón repetitivo SjR2 [53] y el gen 28S ADNr [54]; para *S. mansoni*: una secuencia repetida en tándem Sm1-7 [51], el ADN minisatélite mitocondrial [55], el espaciador intergénico ribosómico 28S-18S rRNA [56], y el espaciador de transcripción interna del gen ADNr [57].

Todos estos métodos LAMP se han aplicado al estudio de caracoles hospedadores intermediarios, para el diagnóstico de la esquistosomosis intestinal y urogenital, y para evaluar la eficacia de la quimioterapia, tanto en modelos animales como en pacientes, con el fin de lograr el control y la eliminación de la esquistosomosis. La evaluación de los distintos métodos LAMP desarrollados para la detección de diferentes especies de esquistosomas en los contextos mencionados, así como su potencial como método diagnóstico POC, se trata de forma exhaustiva en una reciente revisión de nuestro grupo de investigación sobre ‘LAMP en esquistosomosis’ [58]. Como resumen, indicar que las aplicaciones clínicas del LAMP para el diagnóstico de la esquistosomosis siguen siendo limitadas y se aplican fundamentalmente en escenarios de investigación y no de forma rutinaria en la clínica. No obstante, los resultados del LAMP obtenidos para la esquistosomosis en los estudios analizados demostraron ser comparables o mejores que los de los métodos

de diagnóstico más comunes y podría ser un gran candidato para llevar finalmente las pruebas moleculares al campo como una verdadera prueba POC.

1.2.2. LAMP y estrogiloidosis

En el caso de la estrogiloidosis, sólo se han desarrollado dos ensayos LAMP para detectar ADN de *Strongyloides* spp. en diferentes tipos de muestras [59] [60]. El primer ensayo LAMP para detectar *Strongyloides stercoralis* se basó en una región de 184 pb del gen 28S rRNA utilizando *Strongyloides ratti* como fuente para determinar la sensibilidad analítica y el uso potencial para el diagnóstico de la infección humana en muestras de heces. El método de detección de los resultados es colorimétrico mediante la adición del colorante SYTO-82 al inicio de la reacción [59]. Posteriormente, este LAMP se comparó con la qPCR desarrollada por Verweij y colaboradores [61] (frecuentemente utilizada en la mayoría de estudios de estrogiloidosis) en el análisis de muestras humanas de heces, suero y líquido de lavado broncoalveolar, con un menor número de resultados LAMP-positivos [62].

Por otro lado, nuestro grupo ha desarrollado un método LAMP (denominado *Strong-LAMP*) basado en una región de 329 pb en el gen 18S rRNA utilizando *Strongyloides venezuelensis* como fuente para la detección molecular de ADN de *Strongyloides* spp. en muestras de heces y orina en un modelo de infección experimental en ratas. El método de detección de los resultados es colorimétrico mediante la adición del colorante SYBR Green I a término de la reacción [60]. En este estudio, además, se pudo demostrar la potencial aplicabilidad clínica del *Strong-LAMP* en varias muestras de heces humanas con estrogiloidosis confirmadas tanto parasitológicamente como por qPCR [60]. Más recientemente, el método *Strong-LAMP* ha demostrado su eficacia en la detección de ADN de *S. stercoralis* en muestras de orina de pacientes con estrogiloidosis confirmada y/o sospecha serológica de infección por el parásito [63].

Sin embargo, hasta la fecha, todas las evaluaciones de los dos métodos LAMP mencionados se han llevado a cabo solamente en el laboratorio, por lo que sería de gran interés evaluar y validar su utilidad como método de diagnóstico de la estrogiloidosis frente a las técnicas parasitológicas más frecuentemente utilizadas en condiciones reales de campo en una zona endémica de escasos recursos.

En la actualidad no se dispone de métodos LAMP para la detección de coinfecciones habituales en NTDs. Un formato LAMP múltiplex presentaría como

ventaja principal la posibilidad de detectar simultáneamente varios agentes infecciosos, con una implicación práctica fundamental en áreas endémicas donde en algunas comunidades se llega a alcanzar hasta un 80% de población multiparasitada [64,65].

1.3. LAMP múltiplex

La tecnología LAMP múltiplex permite la amplificación simultánea de varias dianas en una misma reacción, siendo necesarios métodos de detección dependientes de secuencias para su desarrollo, es decir, que permitan distinguir de forma específica las secuencias amplificadas durante la reacción. Dada la mayor complejidad de diseño *in silico* comparada con un LAMP convencional, no se dispone de una metodología estandarizada para el desarrollo de un ensayo LAMP múltiplex, sino que, hasta la fecha, se ha utilizado una gran variedad de métodos distintos, incluyendo: métodos que utilizan *primers* modificados, sondas universales, enzimas de restricción, nanopartículas, uso combinado del LAMP con otras técnicas, análisis de curvas de *melting*, electroforesis en gel de agarosa y uso de chips microfluídicos.

En los siguientes apartados se exponen estos métodos para el desarrollo de ensayos LAMP múltiplex, se ilustran con una representación esquemática de la técnica y se evalúa su aplicación práctica atendiendo a las siguientes características: *i*) detección a tiempo real y cuantificación de los resultados; *ii*) posibilidad de visualización de resultados a simple vista, que permita una fácil y rápida interpretación; *iii*) estabilización previa de los componentes de reacción, que permita prescindir de la cadena de frío y favorezca el uso POC; *iv*) número máximo de dianas específicas amplificadas y; *v*) validación de la técnica en muestras clínicas. Hay que destacar que, hasta la fecha, ninguno de los ensayos LAMP múltiplex desarrollado ha sido evaluado en estudios de campo en zona endémica.

1.3.1. Métodos que utilizan *primers* modificados

Estos métodos utilizan los *primers* específicos del ensayo LAMP que incorporarán alguna modificación que permita distinguir las dianas específicas que se pretenden amplificar. Generalmente, las modificaciones suelen ser incorporaciones de diferentes fluoróforos (con longitudes de onda de excitación y emisión específicas) y *quenchers* (atenuadores de señal) que desactivan las señales de fluorescencia

generadas [66]. Así, el uso de diferentes fluoróforos para cada LAMP específico permitirá la distinción de diferentes dianas. Algunas de las metodologías que utilizan *primers* modificados son: DARQ o ‘detección de la amplificación por liberación del *quencher*’ (del inglés, *Detection of Amplification by Release of Quenching*), QUASR o ‘detección de la amplificación por apagamiento de los *quenchers* no incorporados a la amplificación’ (del inglés, *Quenching of Unincorporated Amplification Signal Reporters*), FLOS o ‘fluorescencia del cebador de bucle por autoactivación’ (del inglés, *Fluorescence of Loop primer upon Self-dequenching*), Guanina *quenching* y Sondas de asimilación.

1.3.1.1. DARQ o ‘detección de la amplificación por liberación de *quencher*’

En esta técnica se modifica uno de los *primers* internos (FIP) en su extremo 5’ con un *quencher* (Q) y se diseña una secuencia complementaria (Fd) a una región del *primer* marcado (F1c), que se modifica con un fluoróforo (F) en el extremo 3’. La hibridación del *primer* marcado y la secuencia complementaria genera una sonda o estructura dúplex (QPD, *Quencher Probe Duplex*), que seguirá manteniendo su función como *primer*. Al producirse la amplificación durante el transcurso de la reacción, se libera la secuencia con el fluoróforo generando la señal de detección de la amplificación por separación del fluoróforo y el *quencher* [67–70] (Figura 2A). La señal de fluorescencia generada es detectada por dispositivos de lectura de fluorescencia a tiempo real que permiten la cuantificación de los resultados.

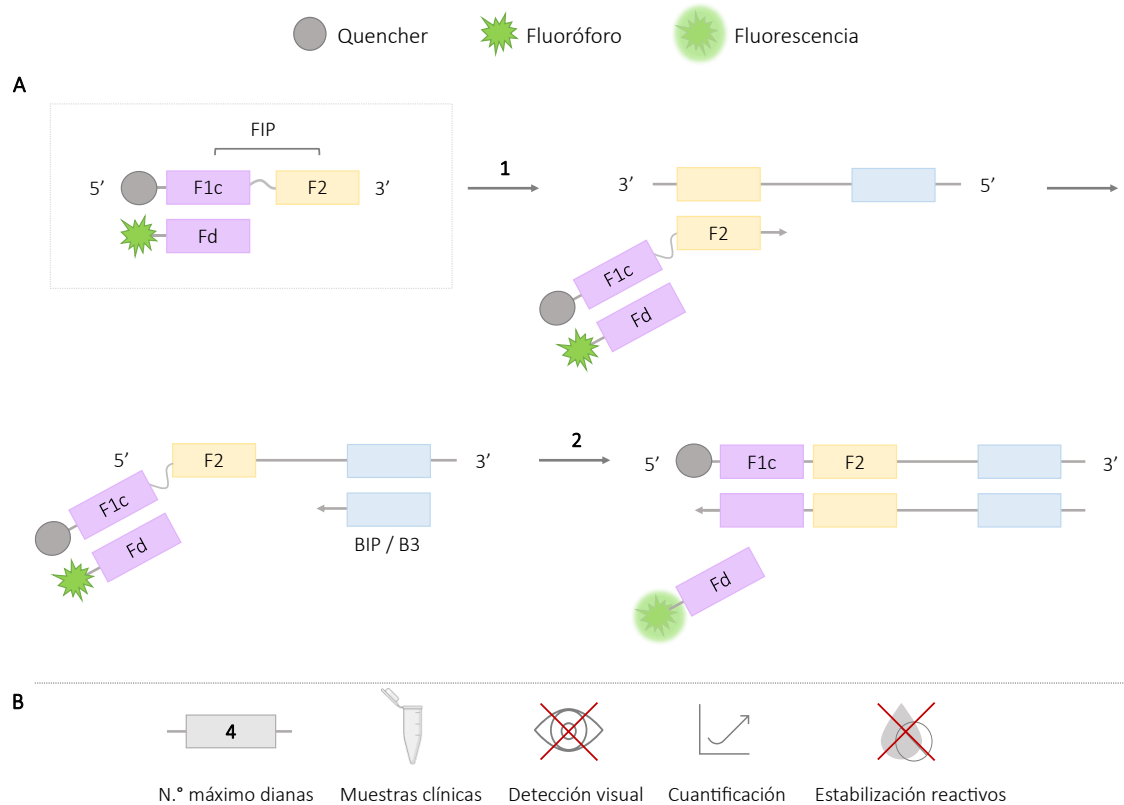


Figura 2. Metodología DARQ-LAMP. A) Representación esquemática del funcionamiento de la metodología DARQ. En el recuadro se representa el *primer* FIP marcado con el *quencher* en 5' y la sonda complementaria a F1c (Fd) marcada con el fluoróforo (QPD; *Quencher Probe Duplex*). 1. Unión de *primer* y Fd marcados y reacción LAMP. 2. Liberación de sonda Fd-fluoróforo y emisión de fluorescencia. B) Aplicación (nº máximo de dianas amplificadas y uso de muestras clínicas), detección de la amplificación (visual a término de reacción o cuantitativa a tiempo real) y adaptación a formato 'listo para el uso' (estabilización de reactivos).

La metodología DARQ-LAMP ha permitido la detección de hasta cuatro dianas para la amplificación simultánea de *Escherichia coli*, *Caenorhabditis elegans*, bacteriófago λ y gen hBRCA1 utilizando ADN genómico de los diferentes organismos [67], y también para *Plasmodium spp.*, *P. vivax*, *P. falciparum* y el gen de la actina humana en muestras de sangre de pacientes [71]. La detección simultánea de tres genes de resistencia a la meticilina de *Staphylococcus aureus* (fem B, mecA y spa) en muestras de ADN genómico [69], y también la detección única de *Salmonella spp.* en muestras de heces [70].

1.3.1.2. QUASR o ‘detección por apagamiento del quencher no incorporado a la amplificación’

En este método se modifica un *primer* interno o un *loop primer* en su extremo 5’ con un fluoróforo y se diseña una sonda complementaria a F1c (entre 7-13 pares de bases, pb) que se modifica en el extremo 3’ con un *quencher*. Ambas estructuras se incorporan por separado a la mezcla y su temperatura de hibridación debe ser inferior a la de reacción de LAMP, de modo que permanezcan disociadas durante la amplificación. Tras la reacción de amplificación, la mezcla se enfría a temperatura ambiente y si no hay amplificación (resultado negativo), se producirá la hibridación del *primer* y la sonda. Si hay amplificación (resultado positivo), el *primer* se encontrará unido al amplicón, siendo inaccesible para la estructura sonda-*quencher* y generando así una señal de fluorescencia [72,73] (Figura 3A).

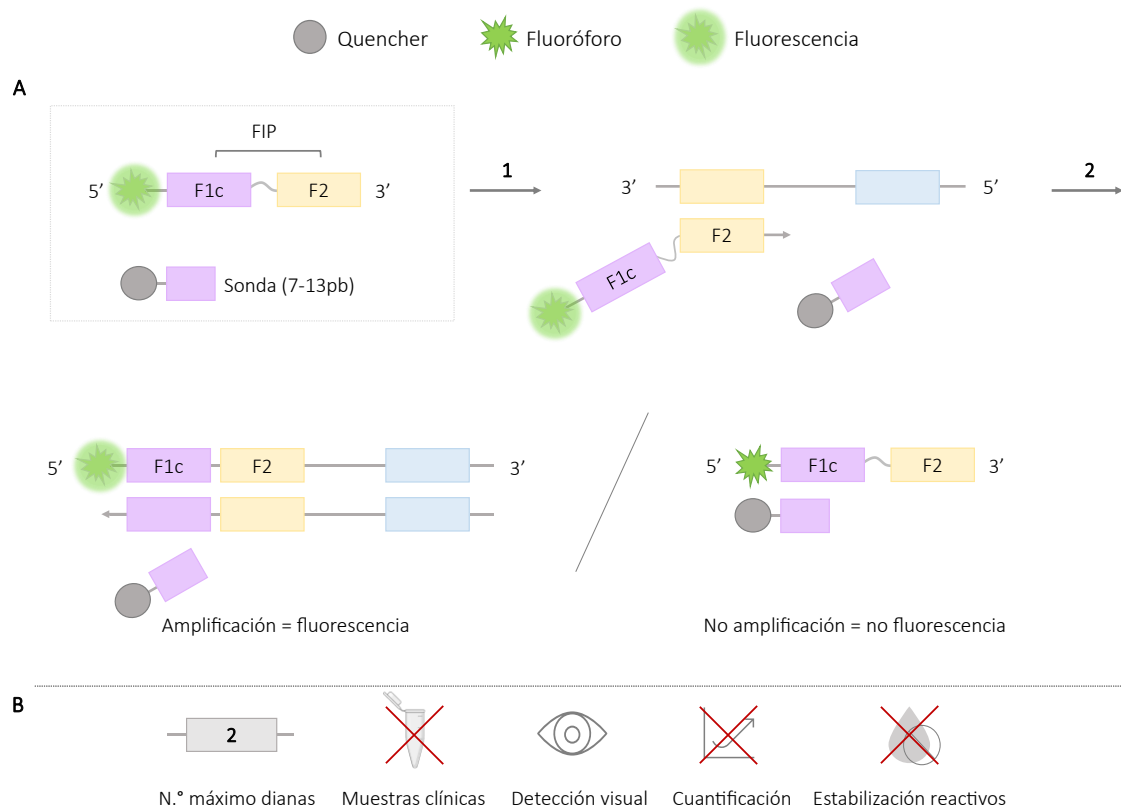


Figura 3. Metodología QUASR-LAMP. A) Representación esquemática del funcionamiento de la metodología QUASR. En el recuadro se representa el *primer* FIP marcado con el fluoróforo en extremo 5’ y la sonda (7-13 pb) complementaria a F1c marcada con el *quencher*. 1. Unión del *primer* FIP y reacción LAMP. 2. Descenso de temperatura de reacción a temperatura ambiente: si existe amplificación se genera señal de fluorescencia; si no existe amplificación no se genera señal de fluorescencia. B) Aplicación (nº máximo de dianas amplificadas y uso de muestras clínicas), detección de la amplificación (visual a término de reacción o cuantitativa a tiempo real) y adaptación a formato ‘listo para el uso’ (estabilización de reactivos).

La metodología QUASR-LAMP está limitada a una señal de punto final tras la amplificación, no permitiendo la detección a tiempo real. Los resultados son visualizados colorimétricamente al combinar la excitación de la mezcla de reacción con una luz tipo led de una determinada longitud de onda y el uso de diferentes filtros fotográficos [72,73]. Se han desarrollado aplicaciones para *smartphone* que consiguen mejorar la discriminación de los colores obtenidos para ayudar a la interpretación objetiva de los resultados [73,74].

El uso de esta técnica ha permitido la detección simultánea en una misma reacción de dos virus: Virus del Nilo Occidental y Chikungunya [72], Virus de la fiebre amarilla y Dengue [75], y Zika y Chikungunya [73]. La aplicación sobre un número mayor de dianas podría dificultar su diferenciación debido a la mezcla de colores que se genera por solapamiento de las señales de fluorescencia. La metodología QUASR aún no se ha aplicado en muestras clínicas.

1.3.1.3. FLOS o ‘fluorescencia del cebador de bucle por autoactivación’

Este método se basa en una autorregulación de la señal de fluorescencia. Inicialmente, un *primer* interno o *loop primer*, es modificado en su extremo 5’ con un fluoróforo, que al encontrarse libre en el medio de reacción se mantendrá ‘autoapagado’. Durante el proceso de amplificación, el *primer* modificado se incorpora al amplicón generado provocando un desacoplamiento del fluoróforo y generando una emisión de fluorescencia (Figura 4A). El mecanismo de extinción y autofluorescencia aún no se encuentra bien esclarecido, pero una posible explicación se basa en las interacciones con las nucleobases circulantes en el medio de reacción [76].

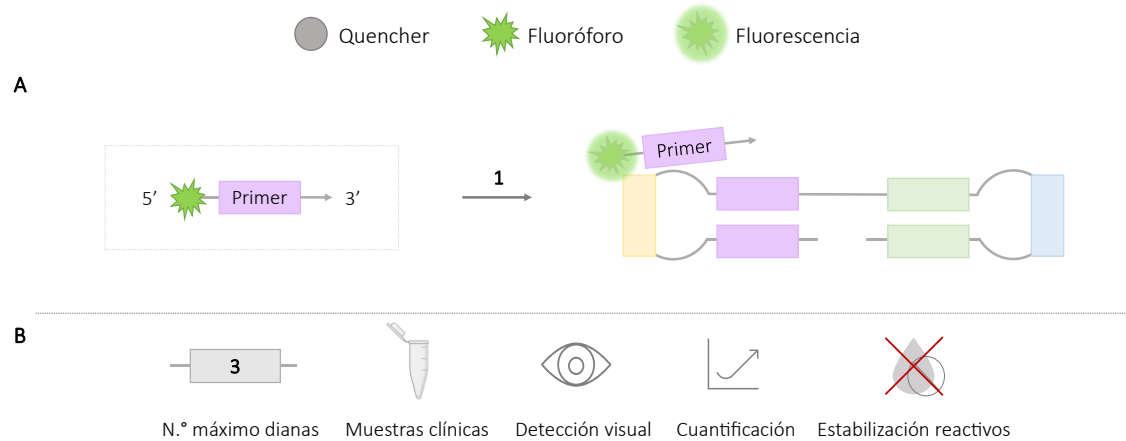


Figura 4. Metodología FLOS-LAMP. A) Representación esquemática del funcionamiento de la metodología FLOS. En el recuadro se representa el *primer* marcado con el fluoróforo de autorregulación. 1. Reacción LAMP; si existe amplificación se produce autoactivación del fluoróforo y genera fluorescencia. B) Aplicación (nº máximo de dianas amplificadas y uso de muestras clínicas), detección de la amplificación (visual a término de reacción o cuantitativa a tiempo real) y adaptación a formato ‘listo para el uso’ (estabilización de reactivos).

La emisión de fluorescencia se genera a medida que se produce la reacción permitiendo la monitorización a tiempo real. La capacidad para utilizar diferentes fluoróforos ha permitido la diferenciación de tres especies de mosca blanca, *Trialeurodes vaporariorum*, *Bemisia tabaci* (MEAM1) y *B. tabaci* (MED), en una misma reacción [77], y la detección simultánea de dos hongos *Fomitiporia torreyae* y *Fulviformes umbrinellus* [78]. A pesar de ser una metodología que no permite *per se* la detección colorimétrica de los resultados, se ha empleado la adición post-reacción del polímero polietilenimina (PEI) para precipitar los productos amplificados tras una breve centrifugación, generando un *pellet* de color apreciable a simple vista bajo emisión con luz UV [77,78]. Hasta la fecha, se ha utilizado esta metodología en diferentes muestras clínicas (líquido de lavado broncoalveolar, orina, saliva, lavado nasal, hisopos naso/orofaríngeos) para la detección del virus de la varicela-zóster [76].

1.3.1.4. Guanina quenching

Los *primers* elegidos para el marcaje han de presentar una citosina en el extremo 5' donde, adyacentemente, se colocará un fluoróforo (*QPrimer*). Cuando el *QPrimer* se hibrida con la secuencia nucleotídica diana, la fluorescencia se apaga por transferencia de electrones entre el fluoróforo y el residuo de guanina presente en la secuencia diana (Figura 5A). Esta disminución de la señal de fluorescencia puede

monitorizarse a tiempo real. La necesidad de *primers* con residuos de citosina en los extremos supone una limitación para la aplicación de esta metodología [79,80].

Esta metodología puede ser complementada con el uso de una secuencia competidora que permita cuantificar la cantidad de ADN. Así, la mezcla de reacción contendrá dos dianas a las que podrá unirse el *QPrimer*, la región diana que se pretende amplificar y una sonda complementaria al *Qprimer*, llamada competidor (Figura 3). El competidor tendrá una citosina en lugar de un residuo de guanina, para que cuando se produzca la unión al *Qprimer* no se apague la señal, permitiendo así calcular la cantidad de producto en función de la intensidad de fluorescencia generada [81].

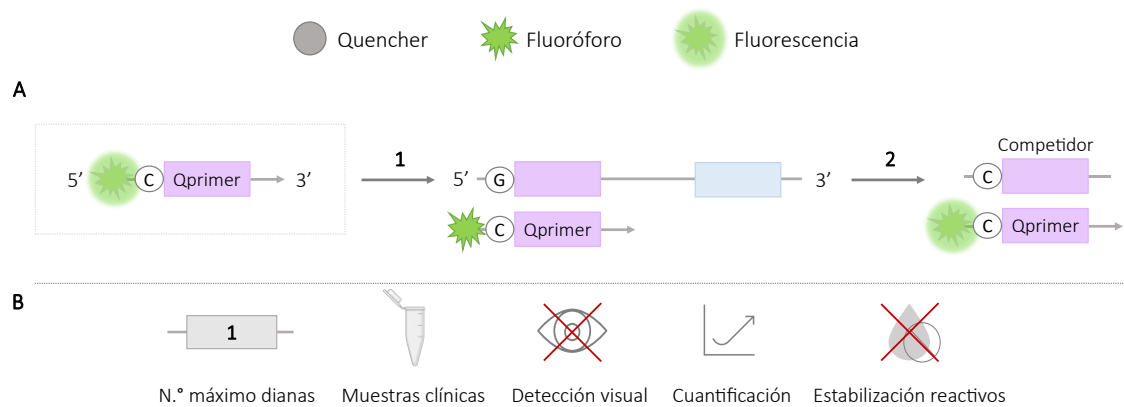


Figura 5. Metodología Guanina *quenching*-LAMP. A) Representación esquemática del funcionamiento de la metodología Guanina *quenching*. En el recuadro se representa el *Qprimer*: *primer* con residuo de citosina en 5' marcado con un fluoróforo. 1. Reacción LAMP, si hay amplificación se apaga la señal fluorescente al unirse el *primer* a la región diana con residuo de guanina. 2. Alternativa con uso de sonda complementaria al *Qprimer* (competidor), que mantiene la señal de fluorescencia al tener un residuo de citosina. B) Aplicación (nº máximo de dianas amplificadas y uso de muestras clínicas), detección de la amplificación (visual a término de reacción o cuantitativa a tiempo real) y adaptación a formato 'listo para el uso' (estabilización de reactivos).

Esta metodología se ha empleado para la detección de una única diana de amplificación para *Nitrosomonas europaea* en muestras de cultivo bacteriano [81], virus de la influenza (VI), virus sincitial respiratorio (VSR) [79] y Coronavirus del Síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV, del inglés *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus*) [82]. Para el VI y VSR [79] y para el MERS-CoV [82] se ha validado la técnica en muestras clínicas de pacientes (aspirados y secreciones nasales, e hisopos recogidos de muestras nasales de pacientes). La posibilidad de utilizar

diferentes fluoróforos en el marcaje de los *primers* hace pensar en su posible desarrollo futuro en formato múltiplex.

1.3.1.5. *Sondas de asimilación o fluorescencia de primers*

El proceso de marcaje de los *primers* es similar al de la tecnología DARQ (ver punto 1.3.1.1. En este caso, se marca el extremo 5' de los *primers* con una secuencia de menor número de bases (sonda) con un fluoróforo adyacente. Además, se diseña una sonda complementaria con un *quencher* en el extremo 3'. Esta estructura dúplex permanecerá hibridada y sin generar señal mientras no haya amplificación. Durante la amplificación, basándose en el principio de desplazamiento de cadena que lleva a cabo la *Bst* polimerasa, la sonda con el *quencher* es liberada y se genera una señal de fluorescencia monitorizada a tiempo real [83–86] (Figura 6A). La señal de fluorescencia generada post-reacción se puede observar a simple vista utilizando una luz de tipo led o luz UV utilizando filtros fotográficos de color [85,87,88]. Otra posibilidad es la adición post-reacción del polímero PEI que precipita los productos, generando un *pellet* observable bajo luz UV y que variará de color en función de los fluoróforos utilizados [89].

Siguiendo el mismo principio para el marcaje del *primer*, otra posibilidad consiste en añadir la sonda-*quencher* post-reacción. En ausencia de diana, el *primer* marcado se unirá a la sonda-*quencher* apagando la fluorescencia; por el contrario, cuando haya amplificación, el *primer* será inaccesible para la sonda-*quencher* y se mantendrá la señal de fluorescencia (Figura 6A; **Alternativa*). Sin embargo, esta opción no va a permitir realizar una lectura a tiempo real, puesto que el resultado se obtiene post-reacción [90–92].

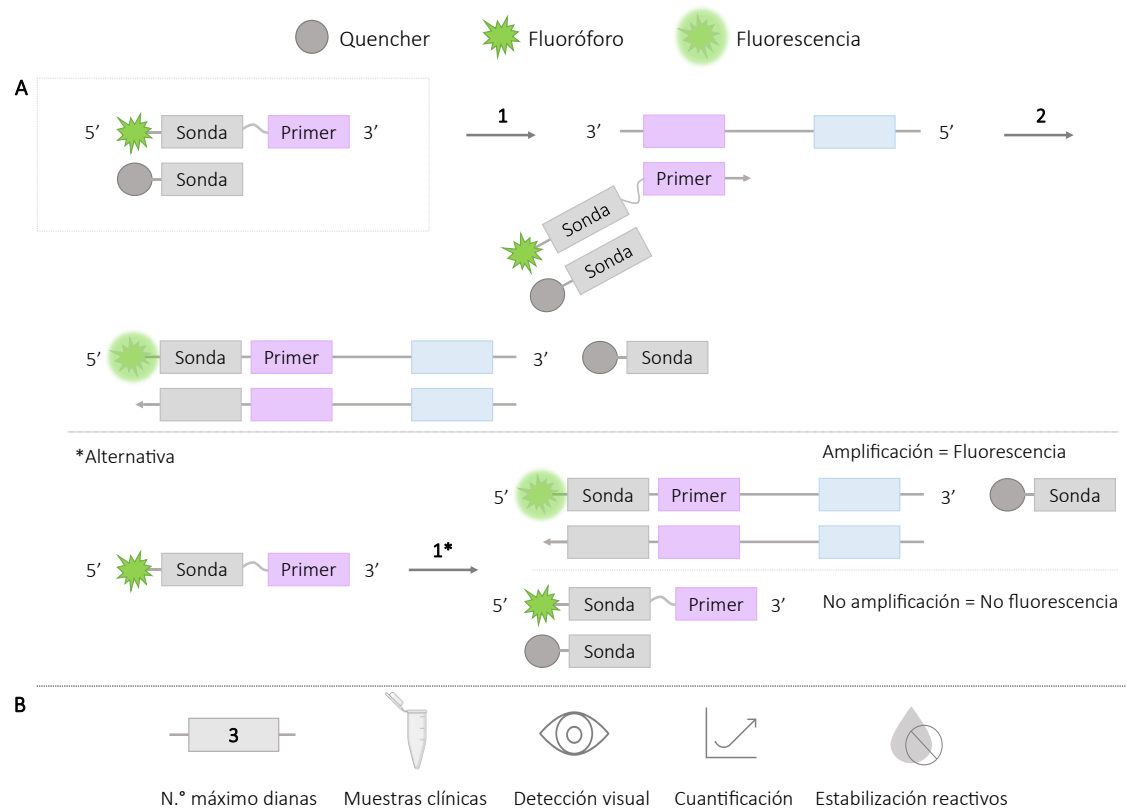


Figura 6. Metodología sondas de asimilación-LAMP. **A)** Representación esquemática del funcionamiento de la metodología sondas de asimilación-LAMP. En el recuadro se representa el *primer* marcado con una sonda y un fluoróforo en el extremo 5', y una sonda complementaria (a la sonda unida al *primer*) con un *quencher* en el extremo 3'; ambas estructuras están unidas al inicio de la reacción. 1. Unión del *primer* y sonda marcados y reacción LAMP. 2. Liberación de la sonda-*quencher* y emisión de fluorescencia. **Alternativa*: únicamente el *primer* marcado con una sonda y un fluoróforo en 5' se incorporan al inicio de la reacción. 1*. Reacción LAMP y adición sonda-*quencher* post-reacción. Si existe amplificación se genera señal de fluorescencia, si no existe amplificación no se genera señal de fluorescencia. **B)** Aplicación (nº máximo de dianas amplificadas y uso de muestras clínicas), detección de la amplificación (visual a término de reacción o cuantitativa a tiempo real) y adaptación a formato 'listo para el uso' (estabilización de reactivos).

Esta metodología ha permitido la detección de hasta tres virus en una misma reacción, incluyendo Zika, Dengue y Chikungunya [85,87], validando la técnica en muestras clínicas de orina [85]. También ha permitido la detección simultánea de dos dianas para *Salmonella enterica* y *Enterobacteria phago λ* en muestras de cultivo bacteriano [84], *Ralstonia solanacearum* y *R. solanacearum* R3B2 en muestras de cultivo bacteriano [83,84], SARS CoV-2 y gen humano ARNasa P, validando la técnica en muestras nasofaríngeas y saliva de pacientes [88], distinción del sexo (por regiones cromosómicas) de embriones de ganado vacuno [89] y distinción de leche de vaca y oveja (por gen citocromo b mitocondrial) [86]. Además, varios trabajos han

empleado esta metodología para la detección del VIH (Virus de la Inmunodeficiencia Humana) [90–92] en muestras clínicas de plasma y sangre de pacientes [90,92].

Por otra parte, algunos de los estudios que utilizan sondas de asimilación han logrado estabilizar los reactivos mediante procesos de liofilización permitiendo prescindir de la cadena de frío para su almacenamiento [85,87,88,91,92]; en algunos casos se ha conseguido mantener la funcionalidad de la reacción hasta un mes después del almacenamiento de los reactivos [91].

1.3.2. Métodos que utilizan sondas universales

Estos métodos emplean sondas o secuencias de ADN universales diferentes a las de los *primers* específicos diseñados para cada ensayo LAMP. Algunos de ellos son: Sondas OSD o ‘de desplazamiento de hebra en un paso’ (del inglés, *One-step Strand Displacement*), Balizas moleculares (en inglés, *Molecular Beacon*) y Sondas MD o ‘de desplazamiento del mediador’ (del inglés, *Mediator displacement*).

1.3.2.1. Sondas OSD o ‘sondas de desplazamiento de hebra en un paso’

Una sonda OSD está formada por dos secuencias complementarias, una de unión a la región de ADN diana marcada con un fluoróforo en uno de los extremos (5’ o 3’), y otra complementaria a la primera marcada con un *quencher*. Para favorecer la unión de la sonda-fluoróforo a la región diana y generar la separación de la sonda-*quencher*, la primera debe de tener un mayor número de pares de bases para favorecer la entalpía de unión a la diana (Figura 7A). Por ello, el diseño de este tipo de sondas debe tener en cuenta los valores de entalpía de unión de las secuencias para poder garantizar el intercambio de unión [93–95]. La señal de fluorescencia generada es monitorizada por equipos de lectura de fluorescencia a tiempo real.

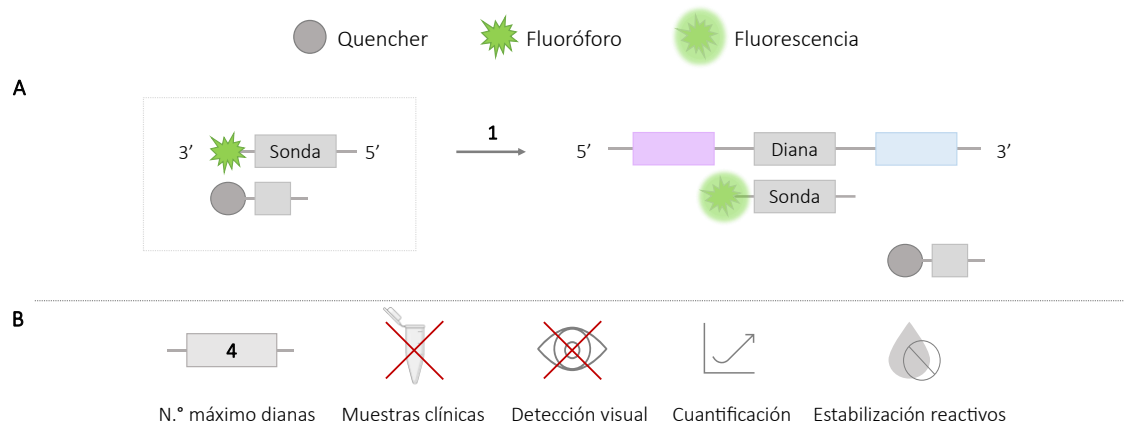


Figura 7. Metodología sondas OSD-LAMP. **A)** Representación esquemática del funcionamiento de la metodología sondas OSD. En el recuadro se representa la sonda universal marcada con un fluoróforo en 3' y la sonda complementaria marcada con un *quencher*. 1. Reacción LAMP; unión de la sonda-fluoróforo a la diana si existe amplificación y emisión de fluorescencia. **B)** Aplicación (nº máximo de dianas amplificadas y uso de muestras clínicas), detección de la amplificación (visual a término de reacción o cuantitativa a tiempo real) y adaptación a formato 'listo para el uso' (estabilización de reactivos).

El uso de la metodología sondas OSD-LAMP ha permitido la amplificación de una única diana para la detección polimórfica de un alelo mutante en el oncogen BRAF (V600E) [93], la detección de *Wolbachia* en ejemplares de mosquito *Aedes aegypti* [96], la detección de MERS-CoV en muestras de cultivo celular [97] y la detección del marcador bacteroides HF183 como indicador de contaminación fecal humana en muestras de agua [94]. También ha permitido la detección simultánea en una misma reacción de *Plasmodium falciparum* y Virus del herpes simplex (VHS1) en muestras artificiales preparadas con material genómico de ambos organismos [93] y la detección de hasta cuatro variantes genéticas del virus Zika a partir de ejemplares de mosquitos *Aedes aegypti* infectados [98].

El uso de reactivos estabilizados mediante procesos de liofilización ha sido probado con esta metodología consiguiendo una viabilidad de los reactivos de hasta cien días tras su almacenamiento [94].

1.3.2.2. *Molecular beacon o baliza molecular*

La sonda o baliza molecular (25-45 pb), específica para los amplicones, se modifica en un extremo con un fluoróforo y en el otro con un *quencher*. Ambos extremos son complementarios y generan una estructura en bucle o en forma de

horquilla que mantiene próximos el fluoróforo y el *quencher* apagando la señal de fluorescencia. Cuando la sonda hibrida con el producto de amplificación diana, se produce la apertura de la horquilla generando una señal de fluorescencia [99–102] (Figura 8A).

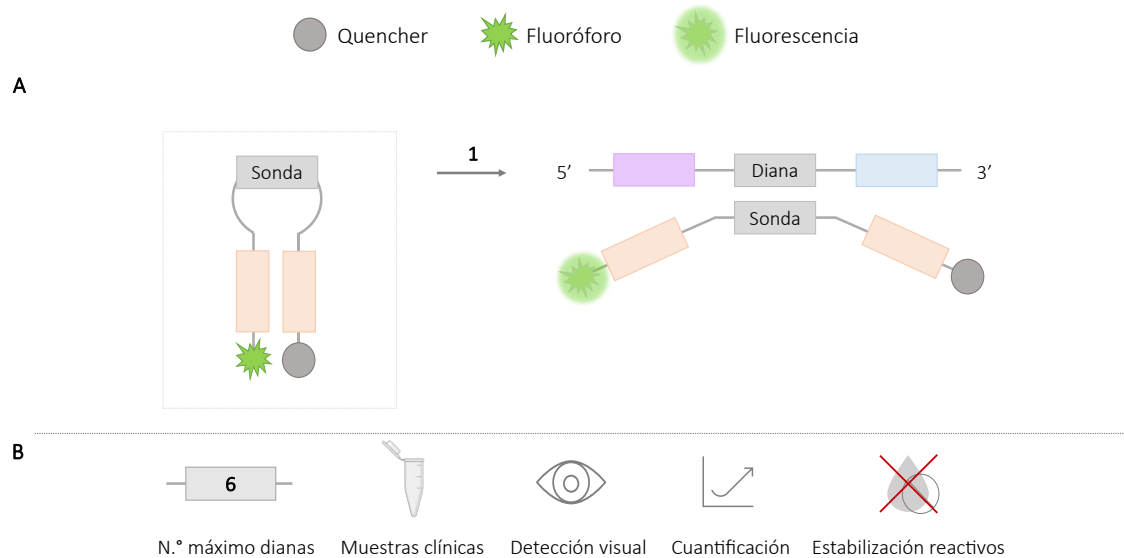


Figura 8. Metodología baliza molecular-LAMP. **A)** Representación esquemática del funcionamiento de la metodología baliza molecular. En el recuadro se representa una baliza molecular: una estructura en forma de horquilla con una sonda y dos secuencias complementarias marcadas en los extremos una con un *quencher* y otra con un fluoróforo. 1. Reacción LAMP; señal de fluorescencia si existe amplificación al abrirse la horquilla y separarse el fluoróforo y el *quencher*. **B)** Aplicación (nº máximo de dianas amplificadas y uso de muestras clínicas), detección de la amplificación (visual a término de reacción o cuantitativa a tiempo real) y adaptación a formato ‘listo para el uso’ (estabilización de reactivos).

Los resultados de los ensayos pueden ser monitorizados a tiempo real gracias a dispositivos de lectura de fluorescencia [99]. También se ha conseguido la detección visual de los resultados, bien mediante un análisis posterior de los patrones de bandas en gel de electroforesis que evidencian bandas específicas asociadas a las sondas marcadas [103], o bien, mediante el uso de chips microfluídicos tras las excitación de los fluoróforos con luz UV que evidencian un cambio de color apreciable a simple vista [101,102].

La aplicación de balizas moleculares hasta la fecha ha permitido la detección de una sola diana de amplificación utilizando plásmidos para *Vibrio cholerae* [99] y *Vibrio parahaemolyticus* [100] y del protozoo *Trypanosoma brucei* utilizando ADN genómico [102]. También la detección en formato LAMP dúplex del VIH y VHC (Virus de la hepatitis C) en muestras clínicas de plasma [101], y hasta la amplificación

de seis dianas diferentes para la detección del VIH, VHC, VHB (Virus de la hepatitis B), VHE (Virus de la hepatitis E), Virus del Dengue y Virus del Nilo Occidental en muestras clínicas de plasma [103].

1.3.2.3. Sonda MD o ‘de desplazamiento del mediador’

Esta metodología emplea una sonda dimérica bifuncional y una baliza molecular universal. La sonda está compuesta por una secuencia parcialmente complementaria a una región específica del ADN diana seguida por una secuencia universal en el extremo 5', y otra secuencia complementaria a la secuencia universal denominada ‘mediador universal de desplazamiento’ (MD). Durante la amplificación, se produce el desplazamiento del MD que hibrida con una secuencia específica de la baliza molecular provocando la apertura de ésta y, subsiguientemente, la generación de la señal de fluorescencia que es recogida por dispositivos de lectura de fluorescencia a tiempo real [104–106] (Figura 9A).

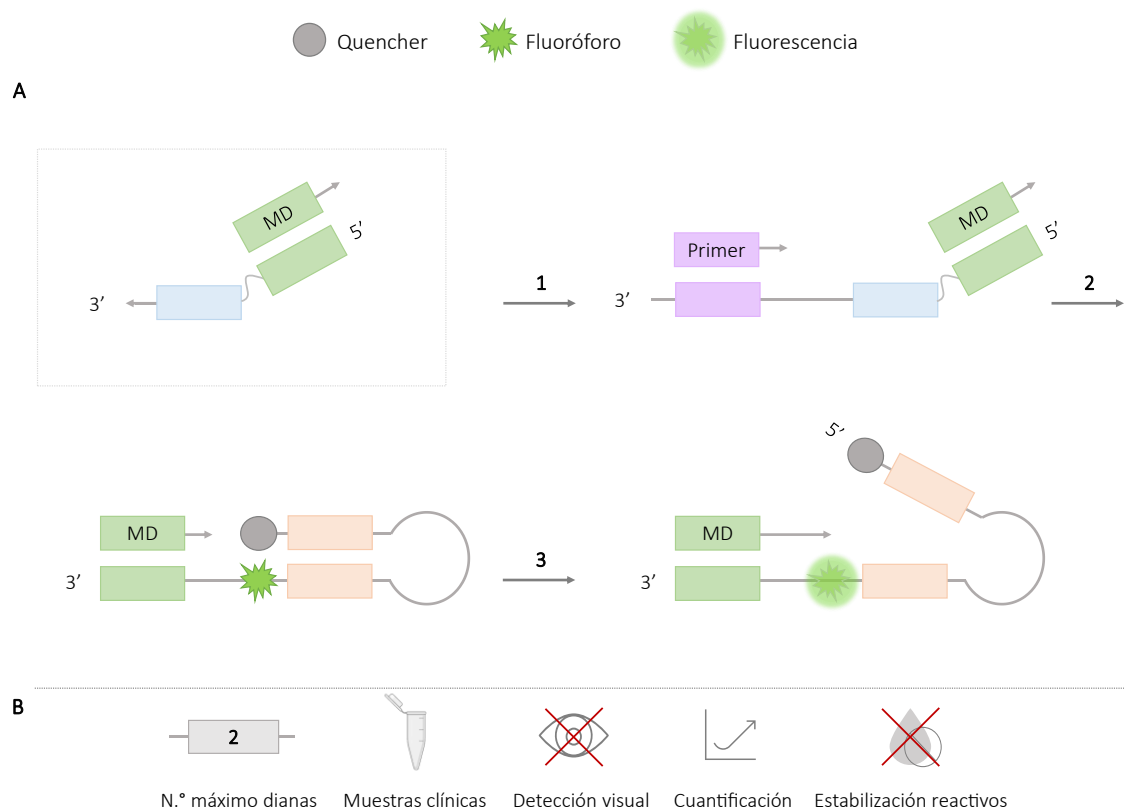


Figura 9. Metodología sondas MD-LAMP. A) Representación esquemática del funcionamiento de la metodología sonda MD. En el recuadro se representa una sonda dimérica bifuncional. 1. Reacción LAMP y unión de la sonda dimérica bifuncional. 2. Liberación del mediador (MD); 3. Apertura de la baliza molecular y emisión de fluorescencia. **B)** Aplicación (nº máximo de dianas amplificadas y uso

de muestras clínicas), detección de la amplificación (visual a término de reacción o cuantitativa a tiempo real) y adaptación a formato ‘listo para el uso’ (estabilización de reactivos).

La aplicación múltiplex de las sondas MD ha sido llevada a cabo para la amplificación simultánea de hasta un máximo de dos dianas para la detección del VIH-1 y HTLV-1 (virus linfotrópico humano de células T tipo 1, del inglés, *human T-lymphotropic virus 1*) [104], y de *Haemophilus ducreyi* y *Treponema pallidum* [104,105]. Además, en este último estudio para *H. ducreyi* y *T. pallidum*, validó la técnica en muestras clínicas de pacientes utilizando muestras de úlcera recogidas con hisopos [105].

1.3.3. Métodos que utilizan enzimas de restricción o endonucleasas

Una alternativa para la generación de ensayos de LAMP múltiplex es mediante el uso de enzimas de restricción o endonucleasas. Los *primers* del ensayo LAMP se diseñan añadiendo una secuencia de reconocimiento de endonucleasas o enzimas de restricción que durante la amplificación generarán amplicones que contendrán dichas secuencias. En consecuencia, el uso posterior de endonucleasas producirá la digestión de los productos amplificados. Siguiendo esta metodología se pueden utilizar diferentes mecanismos de reconocimiento de los productos digeridos y la detección simultánea de múltiples secuencias diana. Uno de estos mecanismos es la tecnología MERT-LAMP (del inglés, *Multiple Endonuclease restriction Real-Time LAMP technology*) o ‘tecnología LAMP a tiempo real con múltiples endonucleasas de restricción’. Esta tecnología consiste en el marcaje de la secuencia de reconocimiento de las endonucleasas con un fluoróforo y un *quencher* para que durante la digestión enzimática se produzca la separación de ambos y se genere una señal de fluorescencia detectada a tiempo real [107–109] (Figura 10A). Otro de los mecanismos es la realización de una electroforesis en gel de agarosa para distinguir visualmente los diferentes amplicones específicos, llevada a cabo una vez finalizada la amplificación y posterior digestión enzimática [110–112]. Este último mecanismo es el único sistema que permite la detección visual de los resultados para esta metodología.

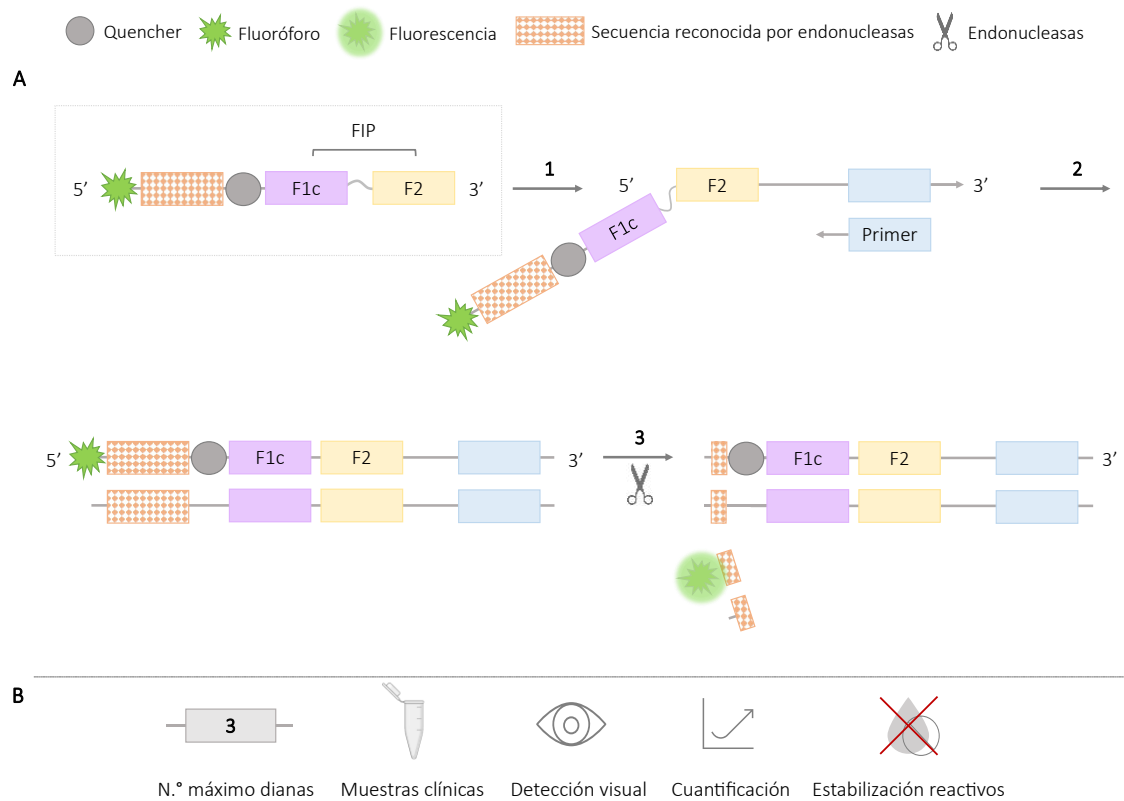


Figura 10. Metodología que emplea endonucleasas-LAMP. **A)** Representación esquemática del funcionamiento de la metodología que emplea endonucleasas de restricción. En el recuadro se representa el *primer* FIP marcado con una secuencia de reconocimiento de endonucleasas entre un fluoróforo y un *quencher*. 1. Reacción LAMP. 2. Amplificones generados en la amplificación que integran la secuencia de reconocimiento de endonucleasas; 3. Digestión por endonucleasas y emisión de la señal de fluorescencia. **B)** Aplicación (nº máximo de dianas amplificadas y uso de muestras clínicas), detección de la amplificación (visual a término de reacción o cuantitativa a tiempo real) y adaptación a formato ‘listo para el uso’ (estabilización de reactivos).

El uso de endonucleasas de restricción se puede combinar con técnicas de pirosecuenciación para la detección específica de secuencias. Así, los *primers* marcados con secuencias de reconocimiento de endonucleasas, también se modifican con la adición de secuencias ‘código de barras especie-específicas’ (en inglés, *target-specific barcodes*), que se incorporan a los amplicones durante la amplificación. Tras la digestión enzimática se realiza la decodificación de la “secuencia código de barras” mediante pirosecuenciación (Figura 11A), un método de secuenciación por síntesis de una región corta que permite determinar el orden de una secuencia de ADN mediante luminiscencia, permitiendo así la detección de diferentes dianas [113]. Los resultados obtenidos por esta metodología no permiten una lectura a tiempo real ni cuantificación de los productos de amplificación.

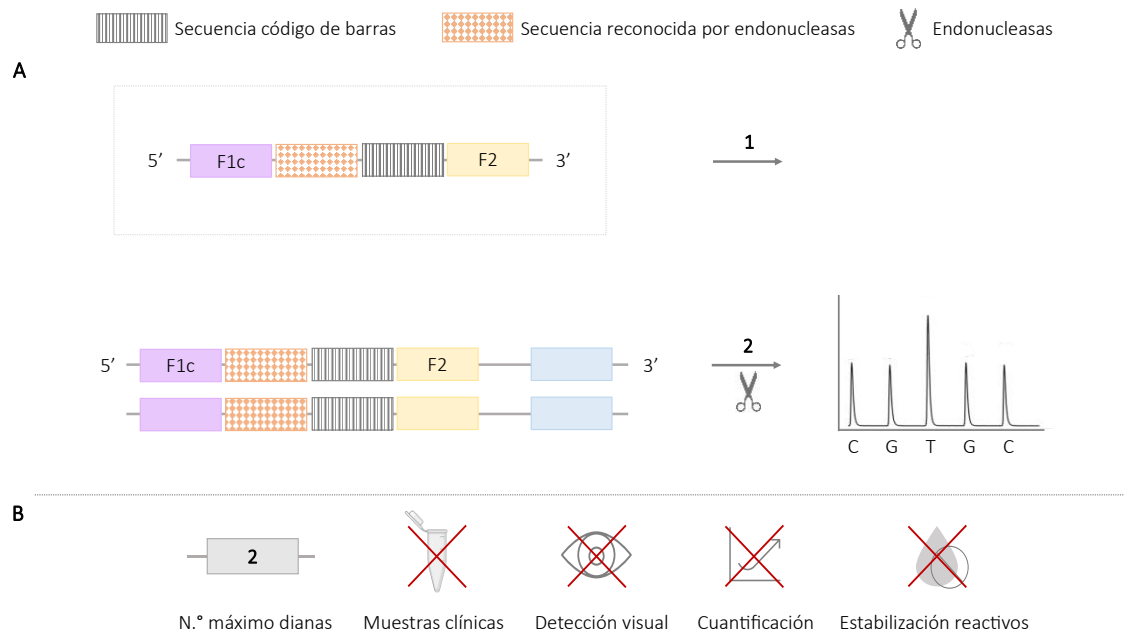


Figura 11. Metodología que emplea endonucleasas y pirosecuenciación-LAMP. **A)** Representación esquemática del funcionamiento de la metodología que emplea endonucleasas y pirosecuenciación. En el recuadro se representa el *primer* FIP marcado con una secuencia de reconocimiento de endonucleasas y una secuencia ‘código de barras especie-específica’. 1. Reacción LAMP y los amplicones generados integran la secuencia de reconocimiento de endonucleasas y la secuencia ‘código de barras especie-específica’. 2. Digestión por endonucleasas y pirosecuenciación. **B)** Aplicación (nº máximo de dianas amplificadas y uso de muestras clínicas), detección de la amplificación (visual a término de reacción o cuantitativa a tiempo real) y adaptación a formato ‘listo para el uso’ (estabilización de reactivos).

El empleo de endonucleasas para reacciones LAMP múltiplex, ha permitido la amplificación de tres dianas para la identificación de tres genes de resistencia a las sulfonamidas (*sul1*, *sul2*, *sul3*) en muestras clínicas aisladas de *Enterobacteriaceae* [111]; la identificación de dos dianas para la detección simultánea de *Listeria monocytogenes* y *Listeria ivanovii* validando el ensayo en carne cruda [108], de *Shigella* spp. y *Salmonella* spp. en leche [109], de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* en ostras contaminadas artificialmente [107], de *Babesia bigemina* y *B. bovis* en sangre de ganado bovino [110] y de los virus B del *Crysanthemum* (CVB) y del enanismo del *Crysanthemum* (CSVd) en tejido vegetal de crisantemo [112]. Además, el empleo adicional de métodos de pirosecuenciación ha permitido la detección de cuatro dianas simultáneamente para la detección del VIH, VHC, VHB y *Treponema pallidum*, validándose el análisis en muestras clínicas de sangre [113].

1.3.4. Métodos que utilizan nanopartículas

Estos métodos emplean nanopartículas (NPs) que modifican su superficie con sondas diana-específicas de los amplicones generados tras la amplificación mediante LAMP. Cuando existe amplificación, la hibridación de las sondas con los amplicones provoca la repulsión de las NPs que permanecerán distribuidas homogéneamente en la solución. Si no existe amplificación (no se produce hibridación sonda-amplicón) las NPs tenderán a autoagregarse y se producirá una señal colorimétrica (Figura 12A). Existen diferentes NPs, cada una de las cuales mostrará diferentes cambios de color en función de su estado de agregación o repulsión. Por lo general, las NPs más utilizadas son las de oro (AuNP), que producen un cambio de color rojo (en estado de repulsión) a azul/gris (en estado de agregación) apreciable a simple vista [114,115]. Otras NPs como las de plata (AgNPs; de color amarillo) o *nanorods* de oro (AuNRs; de color cian) son menos empleadas. El uso combinado de diferentes nanopartículas (AgNPs, AuNPs y AuNP) para la detección de tres dianas por diferenciación colorimétrica, aunque se ha ensayado de forma experimental, no se ha utilizado aún en ningún ensayo de amplificación [116]. Sin embargo, este estudio nos lleva a pensar en el potencial uso combinado de NPs para la aplicación en ensayos LAMP múltiple, dado que *a priori* el procedimiento metodológico es similar al del uso de un solo tipo de NPs.

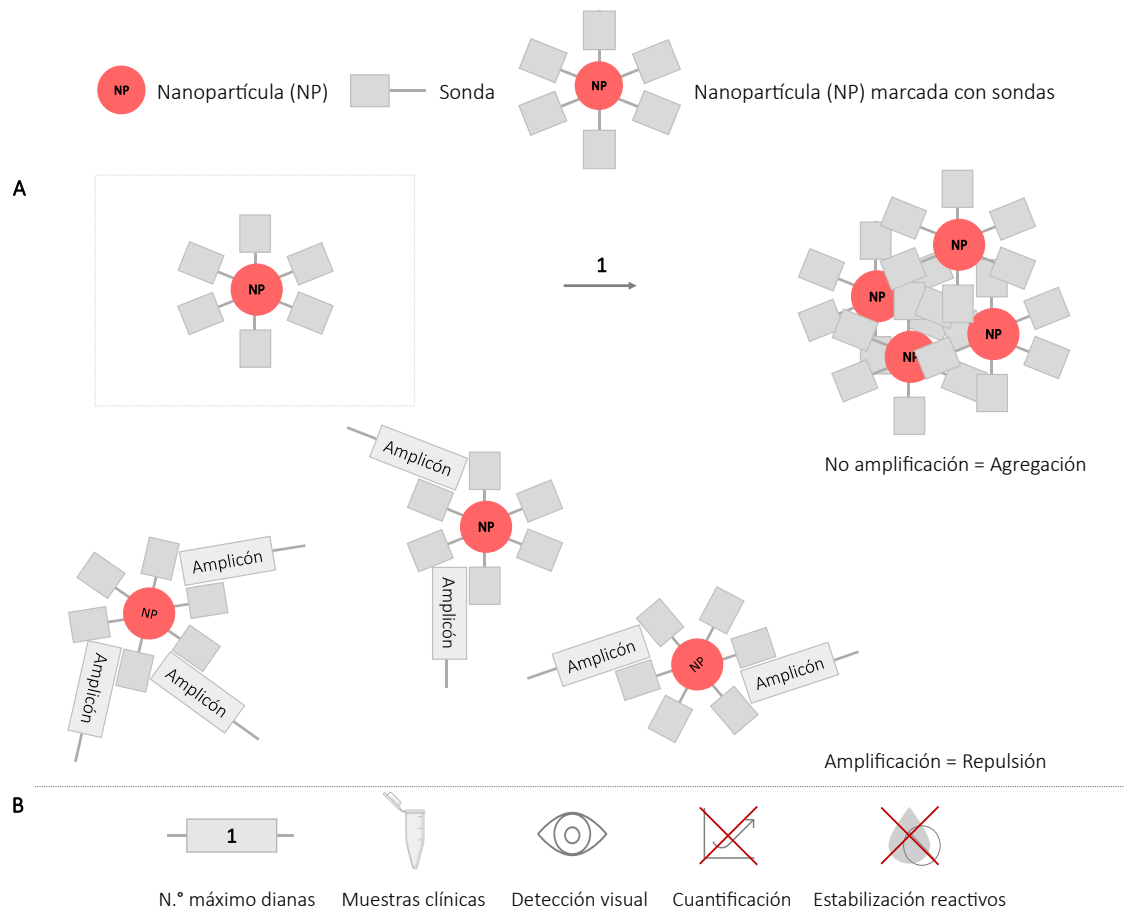


Figura 12. Metodología que emplea nanopartículas-LAMP. A) Representación esquemática del funcionamiento de la metodología que emplea nanopartículas. En el recuadro se representa una nanopartícula (NP) marcada con sondas especie-específica. 1. Reacción LAMP; si no existe amplificación se produce la agregación de las NPs; si existe amplificación se genera la unión de los amplicones a las sondas especie-específicas que recubren la NP y se produce la repulsión de las NPs. B) Aplicación (nº máximo de dianas amplificadas y uso de muestras clínicas), detección de la amplificación (visual a término de reacción o cuantitativa a tiempo real) y adaptación a formato ‘listo para el uso’ (estabilización de reactivos).

Para facilitar la aplicación múltiplex de esta metodología, se ha utilizado la combinación de NPs con tiras inmunocromatográficas o pruebas de flujo lateral. Los *primers* del ensayo LAMP se marcan con dos antígenos (Ag) diferentes que se incorporarán a los amplicones (Figura 13A). El antígeno 1 (Ag1), idéntico para todas las dianas, hibridará con los anticuerpos anti-Ag1 que están recubriendo las AuNPs. El antígeno 2 (Ag2) es específico de cada diana y presentará sus anticuerpos sobre la tira inmunocromatográfica. Por tanto, los amplicones marcados quedarán retenidos en las tiras inmunocromatográficas por la unión del Ag2 y el anticuerpo, quedando acumuladas las AuNPs unidas al Ag1, mostrando una banda roja observable a simple vista [117–121].

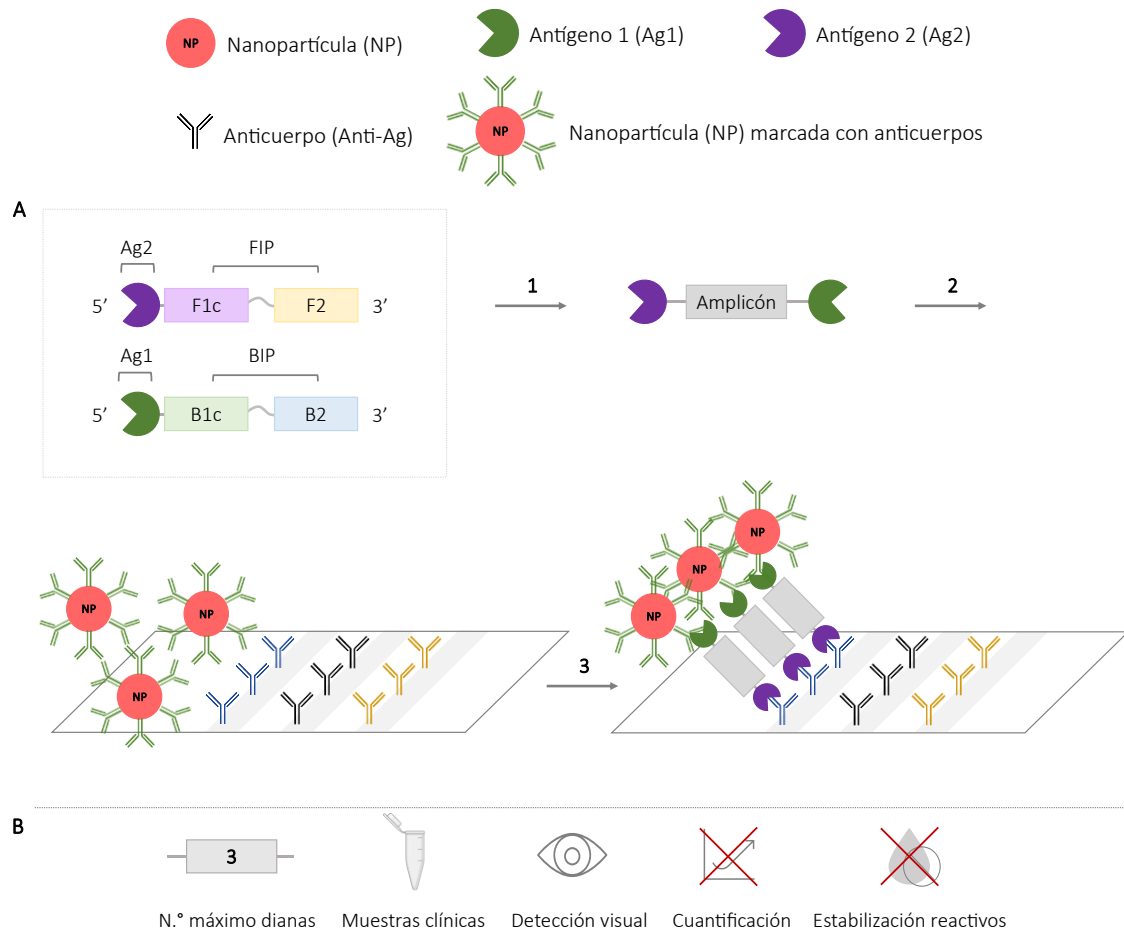


Figura 13. Metodología que emplea nanopartículas combinadas con tiras inmunocromatográficas-LAMP. **A)** Representación esquemática del funcionamiento de la metodología que emplea nanopartículas con tiras inmunocromatográficas. En el recuadro se representa el *primer* FIP marcado con antígeno 2 (Ag2) y el *primer* BIP marcado con antígeno 1 (Ag1), ambos antígenos situados en el extremo 5' del *primer*. 1. Reacción LAMP y generación de amplicones marcados con antígenos (Ag1 y Ag2). 2. Tira inmunocromatográfica con anticuerpos específicos (anti-Ag2) y NPs marcadas con anticuerpo anti-Ag1. 3. Unión de los amplicones generados en la reacción LAMP a las NPs (anti-Ag1), y sobre la tira inmunocromatográfica (anti-Ag2). **B)** Aplicación (nº máximo de dianas amplificadas y uso de muestras clínicas), detección de la amplificación (visual a término de reacción o cuantitativa a tiempo real) y adaptación a formato 'listo para el uso' (estabilización de reactivos).

Esta metodología no permite la detección a tiempo real ni cuantificación de los resultados, debido a que éstos se obtienen exclusivamente al término de la reacción. El número máximo de dianas amplificadas utilizando NPs ha sido tres, para la detección simultánea de *Pseudomonas aeruginosa* (ecfx) y dos de sus toxinas (ExoS y ExoU) [117]. También se ha realizado en formato LAMP dúplex para la detección de *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus* validando el ensayo en muestras de sangre

[118], la detección de dos genes del SARS-CoV-2 validado en muestras orofaríngeas [119] y la detección de dos subtipos de Influenzavirus A validado en muestras nasofaríngeas [120]. Otros trabajos han llevado a cabo esta metodología para la detección única de *Streptococcus iniae* en muestras de pez cebra infectado artificialmente [114], Virus del papiloma humano (HPV) en muestras de tejido cervical [115] y *Leptospira* spp. en muestras de cultivo bacteriano [121].

1.3.5. Métodos que utilizan combinación de varias técnicas

La combinación de la tecnología LAMP con otras técnicas de aplicación en el diagnóstico puede ayudar a la identificación específica de secuencias y, por consiguiente, la posible detección múltiplex de diferentes dianas. Algunos de ellos son: la combinación con la técnica ELISA o ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (del inglés, *Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay*) y la combinación con técnicas de secuenciación.

1.3.5.1. LAMP-ELISA o ‘ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima’

Los *primers* del LAMP se marcan con dos moléculas, digoxigenina y biotina, que se incorporarán a los amplicones. Tras la reacción LAMP, los productos generados se transfieren a una placa de ELISA previamente tapizada con estreptavidina (con alta afinidad por la biotina), quedando los amplicones marcados inmovilizados en la superficie de la placa. Tras realizar el protocolo de ELISA correspondiente, los resultados se detectan en un lector automático de placas que proporciona valores de absorbancia que se corresponden con el grado de hibridación de los amplicones con las sondas específicas fijadas en la placa [122–124]. El desarrollo del LAMP-ELISA requiere largos tiempos de procesamiento. La combinación de ambas técnicas ha permitido la detección específica de secuencias, aunque hasta la fecha no se ha empleado para un diagnóstico múltiplex. Algunos de los ensayos para la detección individual de una sola diana se han desarrollado para la detección de *Mycobacterium tuberculosis*, en muestras de esputo de pacientes [122], o para *Salmonella* spp., en muestras de sangre [124] y de carne [123] contaminadas artificialmente con el microorganismo.

Por otro lado, el uso combinado de la tecnologías LAMP y la alternativa Dot-ELISA [125,126], ha permitido la detección de *Taenia solium*, *T. saginata* y *T. asiatica*

en un mismo ensayo y se ha validado en muestras de heces [127]. El desarrollo es similar al expuesto anteriormente, pero se utilizan diferentes marcadores (digoxigenina o DIG, isotiocinato de fluoresceína o FITC y tetrametilrhodamina o TAMRA) que se integran en los diferentes amplicones especie-específicos. En lugar de una placa tapizada, se utiliza una membrana de nitrocelulosa tapizada con los anticuerpos específicos para DIG, FITC y TAMRA. El resultado positivo se observa como un punto de color visible en la membrana [127] (Figura 14A). En ninguno de los dos ensayos combinados, LAMP-ELISA ni LAMP-Dot-ELISA, se obtiene una señal que permita la detección y cuantificación de los resultados a tiempo real.

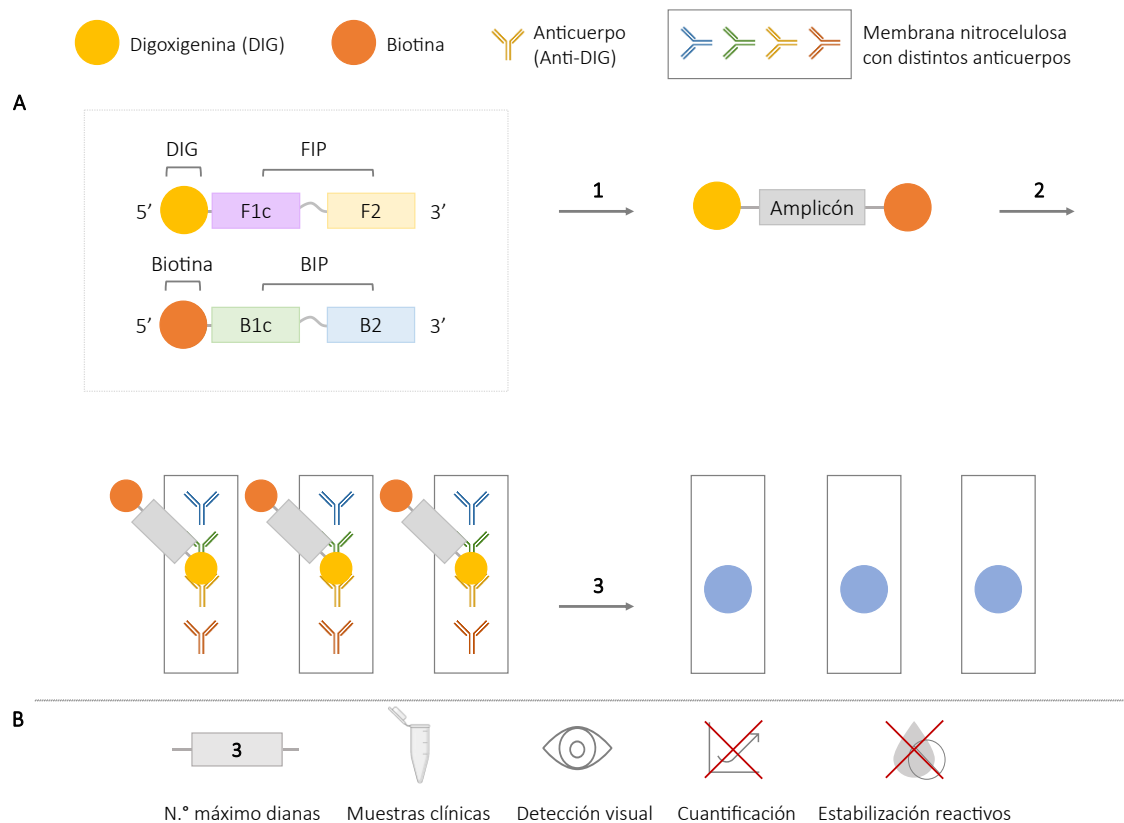


Figura 14. Metodología combinada LAMP-Dot-ELISA. A) Representación esquemática del funcionamiento de la metodología que combina LAMP y Dot-ELISA. En el recuadro se representa el *primer* FIP marcado con digoxigenina (DIG) y el *primer* BIP marcado con biotina, ambos marcados en el extremo 5'. 1. Reacción LAMP y generación de amplicones marcados con biotina y DIG. 2. Transferencia del producto del LAMP a la membrana de nitrocelulosa marcada con anticuerpo (anti-DIG). 3. Dot-ELISA. B) Aplicación (nº máximo de dianas amplificadas y uso de muestras clínicas), detección de la amplificación (visual a término de reacción o cuantitativa a tiempo real) y adaptación a formato ‘listo para el uso’ (estabilización de reactivos).

1.3.5.2. *LAMP–Secuenciación*

La secuenciación de los amplicones generados en los ensayos LAMP permite el análisis detallado de las secuencias que ayuda a la identificación de múltiples dianas. La técnica de pirosecuenciación mencionada anteriormente (ver punto 1.3.3.) requiere del marcaje de los amplicones específicos para su posterior identificación. Sin embargo, el uso de la secuenciación mediante nanoporos con un secuenciador portátil MinION™ (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, Reino Unido), no requiere ningún tipo de marcaje o uso de sondas adicionales para la identificación (Figura 15A). No obstante, este proceso requiere de largos periodos de tiempo ya que se necesita la preparación previa de una biblioteca de ADN y los protocolos de secuenciación pueden durar de 24 a 48 horas [128–132].

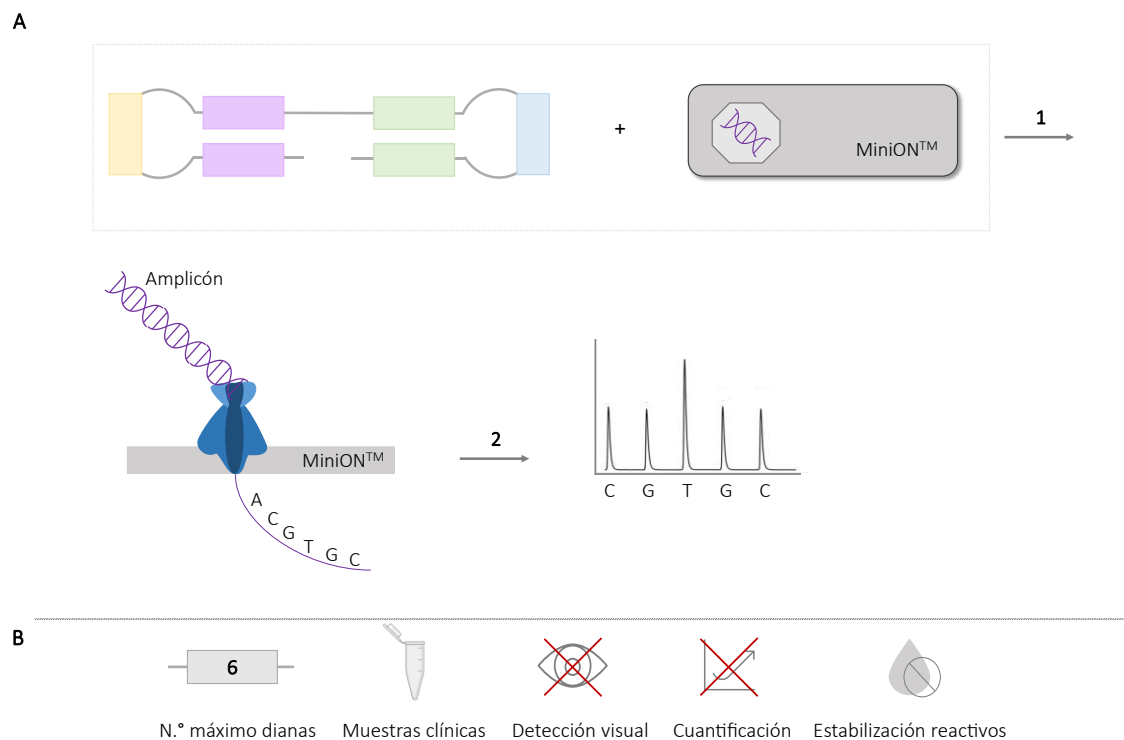


Figura 15. Metodología combinada LAMP-Secuenciación. A) Representación esquemática del funcionamiento de la metodología que combina LAMP con secuenciación mediante MinION™. En el recuadro se representa el LAMP y un secuenciador MinION™. 1. Reacción LAMP; los amplicones generados se transfieren al secuenciador MinION™. 2. Representación de los resultados obtenidos con la secuenciación. B) Aplicación (nº máximo de dianas amplificadas y uso de muestras clínicas), detección de la amplificación (visual a término de reacción o cuantitativa a tiempo real) y adaptación a formato ‘listo para el uso’ (estabilización de reactivos).

El uso de dispositivos MinION™ ha permitido la aplicación múltiplex para la amplificación simultánea de seis especies de *Plasmodium* en muestras de sangre de pacientes [132]; cuatro serotipos distintos de virus del Dengue en muestras de sangre de pacientes [129]; la mutación de resistencia a la artemisinina de *Plasmodium falciparum* en muestras de sangre de pacientes [131] y distintos genotipos del virus Chikungunya en muestras de suero de pacientes [130]. Además, este último trabajo se llevó a cabo con reactivos LAMP previamente estabilizados mediante un protocolo de secado y almacenados a temperatura ambiente durante dos meses [130].

1.3.6. Otros métodos

Existen otras alternativas más sencillas con capacidad de aplicación a un diagnóstico LAMP múltiplex, como el análisis de las curvas de *melting* o la electroforesis en gel de agarosa. La diferenciación de los productos amplificados mediante el análisis de las curvas de *melting* permite distinguir los diferentes productos amplificados por sus diferentes temperaturas de fusión. Los resultados van a depender de las temperaturas propias de los *primers*, que varían en función de su contenido en CG y que deberán ser suficientemente diferentes para que puedan ser diferenciados en la curva de *melting* obtenida al finalizar la reacción. Por ello, este tipo de análisis no siempre podrá llevarse a cabo [133,134]. Esta estrategia ha permitido la aplicación del LAMP en formato dúplex para la detección de *Salmonella* spp. y *Vibrio parahaemolyticus* en muestras de leche contaminadas artificialmente [133], y *Leishmania donovani* y *Mycobacterium leprae* en biopsias de tejido de pacientes [134].

La distinción de los productos amplificados para una detección LAMP múltiplex mediante electroforesis en gel de agarosa puede seguir dos estrategias. Por un lado, la diferenciación de los patrones de bandas de cada LAMP específico por el diferente bandeo en escalera. Este método ha servido para la detección simultánea de *Salmonella* spp. y *Shigella* spp. en muestras de leche contaminada artificialmente [135]. Por otro lado, mediante el marcaje de uno de los *primers* internos de cada set de *primers* con un fluoróforo diferente que permite la distinción del bandeo específico por colorimetría. Esta estrategia se ha aplicado para la detección simultánea de *Plasmodium berghei* y *Dirofilaria immitis* en mosquitos infectados [136].

Otras metodologías más complejas implican el desarrollo de chips microfluídicos integrados con ensayos LAMP, que tienen el potencial de proporcionar diagnósticos rápidos al combinar la extracción del material genético, el

procesamiento de reacción y la lectura a tiempo real y/o interpretación de los resultados [137–140]. Este tipo de ensayos se han utilizado para la detección LAMP múltiplex de hasta cinco especies, incluyendo *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis*, *Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans* y *Chlamydia trachomatis* en muestras del tracto genital inferior [140] y genes específicos de camello, vaca, yegua, yak y cabra para la identificación de especies a partir de muestras de leche [138]. También para la detección simultánea de *Streptococcus pneumoniae* y *Mycoplasma pneumoniae* en muestras orofaríngeas y broncoalveolares de pacientes [137] y del Bacteriófago λ y *Escherichia coli* utilizando ADN genómico [139].

En resumen, las diferentes metodologías expuestas han demostrado ser útiles para la detección simultánea de múltiplex dianas aplicando la tecnología LAMP (Tabla 2). Las dianas objeto de amplificación son muy diversas y varían en los diferentes trabajos consultados, aunque sobresalen en número las publicaciones de virus y bacterias. Los trabajos con protozoos se centran casi exclusivamente en *Plasmodium* spp. [71,93,131,136]. En lo referente a las consideradas como NTDs, también destacan los estudios relacionados con virus sobre el resto de enfermedades, concretamente Chikungunya y Dengue [72,73,75,85,103,129,130]. Solamente se ha llevado a cabo un estudio en 2021 por Joshi y colaboradores [134] para la detección en un mismo ensayo de *Leishmania donovani* y *Mycobacterium leprae*, agentes causales de la leishmaniosis y lepra, respectivamente. Los trabajos con helmintos son aún muy escasos a pesar de la variedad de especies que causan NTDs y la alta tasa de coinfecciones por varias especies en áreas endémicas. Un único estudio ha conseguido la amplificación simultánea de tres especies de *Taenia*: *Taenia solium*, *T. saginata* y *T. asiatica* [127]. También hay que destacar el escaso número de estudios que utilizan muestras clínicas. Su desarrollo y aplicación ayudaría a la validación de las diferentes técnicas e impulsarían su reproducibilidad por otros laboratorios y centros de investigación.

Por otra parte, la aplicabilidad *point-of-care* (POC) de la tecnología LAMP es una de sus cualidades más destacadas, pero aún se hace necesario el uso de instrumentación sencilla y, además, portátil. Las metodologías con capacidad de aplicación LAMP múltiplex van a requerir de sistemas adaptados o de elaboración *ad hoc* para su uso como método de diagnóstico POC, ya que la mayoría se basan en la detección de resultados mediante fluorescencia. Ante esta posible limitación, algunos trabajos ya se han basado en chips microfluídicos [137–140] o dispositivos tipo “cajas” para realizar LAMP de forma portátil (“*portable LAMP box*”) adaptados para una lectura sencilla de los resultados de fluorescencia a través del uso de filtros fotográficos

[72–74,85,87] e incluso desarrollando aplicaciones para *smartphone* que ayudan a la interpretación de los resultados [73,74]. Otros dispositivos comerciales, como los ofertados por la empresa OptiGene (Reino Unido), disponen de baterías para un uso autónomo sin necesidad de electricidad y son capaces de llevar a cabo la lectura de fluorescencia a tiempo real [84,86]. Por otro lado, el uso de tiras de flujo lateral favorece la aplicación de metodologías LAMP múltiplex, ya que facilita su realización e interpretación de los resultados [117–119]. Sin embargo, a pesar de la variedad de metodologías y estudios realizados, aún no se ha aplicado ningún método LAMP múltiplex en condiciones de campo.

Tabla 1. Métodos dependientes de secuencias para el desarrollo de LAMP múltiplex.

Método	Nº máximo dianas	Especies/dianas amplificadas	Aplicación muestras clínicas	Detección visual	Cuantificación	Estabilización reactivos
DARQ	4	<i>Escherichia coli</i> , <i>Caenorhabditis elegans</i> , bacteriófago λ , hBRCA1 [67] Genes <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina (femB, mecA, spa) [69] <i>Salmonella</i> spp. [70] <i>Plasmodium</i> spp, <i>P. vivax</i> , <i>P. falciparum</i> , Actina humana [71]	✓	✗	✓	✗
QUASR	2	Virus del Nilo Occidental, Chikungunya [72] Zika, Chikungunya [73] Virus de la fiebre amarilla, Dengue [75]	✓	✓	✗	✗
FLOS	3	Virus varicela-zóster [76] <i>Trialeurodes vaporariorum</i> , <i>Bemisia tabaco</i> (MEAM1) y <i>B. tabaci</i> (MED) [77] <i>Fulviformes umbrinellus</i> y <i>Fomitiporia torreyae</i> [78]	✓	✓	✓	✗
Guanina quenching*	1	VI [79] VSR [79] <i>Nitrosomonas europaea</i> [81] MERS-CoV [82]	✓	✗	✓	✗
Sondas de asimilación	3	Zika, Dengue, Chikungunya [85,87] SARS CoV-2 y hARNasa P [88] <i>Salmonella enterica</i> y <i>Enterobacteria phago</i> λ [84] <i>Ralstonia solanacearum</i> y <i>R. solanacearum</i> R3B2 [83,84] Citocromo b mitocondrial (oveja y vaca) [86] VIH-1 [90–92] Sexo embriones [89]	✓	✓	✓	✓
Sondas OSD	4	VHS-1 y <i>P. falciparum</i> [93] Detección polimórfica en gen BRAF [93] Contaminación fecal humana (<i>Bacteroides HF183</i>) [94] <i>Wolbachia</i> [96] MERS-CoV [97] Zika (4 genotipos) [98]	✗	✗	✓	✓

Método	Nº máximo dianas	Especies/dianas amplificadas	Aplicación muestras clínicas	Detección visual	Cuantificación	Estabilización reactivos
Baliza molecular	6	<i>Vibrio cholerae</i> [99] VIH, VHB, VHC, VHE, Dengue y Virus del Nilo Occidental [103] VIH y VHC [101] <i>Vibrio parahaemolyticus</i> [100]	✓	✓	✓	✗
Sonda MD	2	VIH-1 y HTLV-1 [104] <i>Haemophilus ducreyi</i> y <i>Treponema pallidum</i> [104] <i>T. pallidum</i> y <i>H. ducreyi</i> [105]	✓	✗	✓	✗
Endonucleasas	3	Genes resistencia sulfonamidas (sul1, sul2, sul3) [111] <i>Babesia bigemina</i> y <i>B. bovis</i> [110] Virus B del <i>Crysanthemum</i> (CVB) y Virus del enanismo del <i>Crysanthemum</i> (CSVd) [112] <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>L. invanovii</i> [108] <i>V. parahaemolyticus</i> y <i>Vibrio vulnificus</i> [107] <i>Shigella</i> spp. y <i>Salmonella</i> spp. [109]	✓	✓	✓	✗
Endonucleasas + pirosecuenciación	4	VHB, VHC, VIH y <i>T. pallidum</i> [113]	✓	✗	✗	✗
Nanopartículas *	1	VPH [115]	✗	✓	✗	✗
Nanopartículas + pruebas de flujo lateral	3	<i>Streptococcus iniae</i> [114] <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ecfx) y toxinas ExoS y ExoU [117] Influenzavirus A (dos subtipos) [120] <i>Leptospira</i> [121] <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>S. aureus</i> [118] SARS-CoV-2 (dos genes) [119]	✓	✓	✗	✗
LAMP-ELISA / dot-ELISA	3	<i>Salmonella</i> spp. [123,124] <i>Mycobacterium tuberculosis</i> [122] <i>Taenia solium</i> , <i>T. saginata</i> y <i>T. asiatica</i> [127]	✓	✓	✗	✗
LAMP-Secuenciación	6	Dengue (4 serotipos) [129] <i>P. falciparum</i> (mutación de resistencia a artemisinina) [131] <i>Plasmodium</i> (6 spp.) [132] Chikungunya (genotipos) [130]	✓	✗	✗	✓

Método	Nº máximo dianas	Especies/dianas amplificadas	Aplicación muestras clínicas	Detección visual	Cuantificación	Estabilización reactivos
Curva de <i>melting</i>	2	<i>Salmonella</i> spp. y <i>V. parahaemolyticus</i> [133] <i>Leishmania donovani</i> y <i>Mycobacterium leprae</i> [134]	✓	✗	✓	✗
Gel de electroforesis	2	<i>Salmonella</i> spp. y <i>Shigella</i> spp. [135] <i>Plasmodium berghei</i> y <i>Dirofilaria immitis</i> [136]	✓	✓	✗	✗
Chips microfluídicos	5	<i>Streptococcus pneumoniae</i> y <i>Mycoplasma pneumoniae</i> [137] Genes específicos vaca, camello, cabra, caballo y yak [138] <i>E. coli</i> y <i>Bacteriófago λ</i> [139] <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Gardnerella vaginalis</i> , <i>Candida albicans</i> y <i>Chlamydia trachomatis</i> [140]	✓	✓	✓	✗

BRCA1, gen humano cáncer de mama; VI, virus influenza; VSR, virus respiratorio sincitial; VHS1, virus herpes simple 1, VIH, virus de la inmunodeficiencia humana; VHB, virus de la hepatitis B; VHC, virus de la hepatitis C; VHE, virus de la hepatitis E; HTLV-1, virus linfotrófico de células T humanas tipo 1; VPH, virus del papiloma humano.

*métodos que no se han aplicado al formato múltiplex.

✓: indica que se ha probado en muestras clínicas, se detectan visualmente los resultados, permite la cuantificación de los resultados o se ha probado con reactivos estabilizados.

✗: indica que se no se ha probado en muestras clínicas, no hay detección visual de los resultados, no permite la cuantificación o no se ha probado con reactivos estabilizados.

1.4. Bibliografía

1. World Health Organization (WHO). Neglected tropical diseases (NTDs) Available online: <https://www.who.int/health-topics/neglected-tropical-diseases> (accessed on Feb 1, 2023).
2. Molyneux, D.H.; Hotez, P.J.; Fenwick, A. “Rapid-impact interventions”: How a policy of integrated control for Africa’s neglected tropical diseases could benefit the poor. *PLoS Med.* **2005**, *2*, 1064–1070, doi:10.1371/journal.pmed.0020336.
3. Hotez, P.J.; Molyneux, D.H.; Fenwick, A.; Ottesen, E.; Sachs, S.E.; Sachs, J.D. Incorporating a rapid-impact package for neglected tropical diseases with programs for HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria: A comprehensive pro-poor health policy and strategy for the developing world. *PLoS Med.* **2006**, *3*, 576–584, doi:10.1371/journal.pmed.0030102.
4. King, C.H.; Bertino, A.M. Asymmetries of poverty: Why global burden of disease valuations underestimate the burden of neglected tropical diseases. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2008**, *2*, doi:10.1371/journal.pntd.0000209.
5. Hotez, P.J. The neglected tropical diseases and the neglected infections of poverty: overview of their common features, global disease burden and distribution, new control tools, and prospects for disease elimination. In *The Causes and Impacts of Neglected Tropical and Zoonotic Diseases: Opportunities for Integrated Intervention Strategies*; 2011.
6. Engels, D.; Zhou, X.N. Neglected tropical diseases: An effective global response to local poverty-related disease priorities. *Infect. Dis. Poverty* **2020**, *9*, 1–9, doi:10.1186/s40249-020-0630-9.
7. García-Bernalt Diego, J.; Manzano-román, R.; Muro, A. Vacuna y enfermedades olvidadas ¿un reto complicado o una esperanza postpandemia? *An. la Real Acad. Nac. Farm.* **2022**, *88*, 565–577, doi:10.53519/analesranf.2022.88.05.22.
8. Hotez, P.J.; Kamath, A. Neglected tropical diseases in sub-Saharan Africa: Review of their prevalence, distribution, and disease burden. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2009**, *3*, 2–11, doi:10.1371/journal.pntd.0000412.
9. Buonfrate, D.; Baldissera, M.; Abrescia, F.; Bassetti, M.; Caramaschi, G.; Giobbia, M.; Mascarello, M.; Rodari, P.; Scattolo, N.; Napoletano, G.; et al. Epidemiology of *Strongyloides stercoralis* in northern Italy: Results of a multicentre case-control study, February 2013 to July 2014. *Eurosurveillance* **2016**, *21*, 1–8, doi:10.2807/1560-7917.ES.2016.21.31.30310.
10. Salvador, F.; Sulleiro, E.; Sánchez-Montalva, A.; Saugar, J.M.; Rodríguez, E.; Pahissa, A.; Molina, I. Usefulness of *Strongyloides stercoralis* serology in the management of patients with eosinophilia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2014**, *90*, 830–834,

doi:10.4269/ajtmh.13-0678.

11. Ramírez-Olivencia, G.; Espinosa, M.Á.C.; Martín, A.B.; Núñez, N.I.; de las Parras, E.R.; Núñez, M.L.; Puente, S.P. Imported strongyloidiasis in Spain. *Int. J. Infect. Dis.* **2014**, *18*, 32–37, doi:10.1016/j.ijid.2013.09.009.
12. Ostera, G.; Blum, J.; Cornejo, C.; Burgula, S.; Jeun, R.; Bryan, P.E.; Mejia, R. Strongyloidiasis in Latin American immigrants: A pilot study. *J. Helminthol.* **2017**, *91*, 262–266, doi:10.1017/S0022149X16000213.
13. Cabezas-Fernández, M.T.; Salas-Coronas, J.; Lozano-Serrano, A.B.; Vazquez-Villegas, J.; Cabeza-Barrera, M.I.; Cobo, F. Strongyloidiasis in immigrants in Southern Spain. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **2015**, *33*, 37–39, doi:10.1016/j.eimc.2014.06.010.
14. Asundi, A.; Beliavsky, A.; Liu, X.J.; Akaberi, A.; Schwarzer, G.; Bisoffi, Z.; Requena-Méndez, A.; Shrier, I.; Greenaway, C. Prevalence of strongyloidiasis and schistosomiasis among migrants: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob. Heal.* **2019**, *7*, e236–e248, doi:10.1016/S2214-109X(18)30490-X.
15. Marchese, V.; Beltrame, A.; Angheben, A.; Monteiro, G.B.; Giorli, G.; Perandin, F.; Buonfrate, D.; Bisoffi, Z. Schistosomiasis in immigrants, refugees and travellers in an Italian referral centre for tropical diseases. *Infect. Dis. Poverty* **2018**, *7*, 1–10, doi:10.1186/s40249-018-0440-5.
16. Boissier, J.; Grech-Angelini, S.; Webster, B.L.; Allienne, J.F.; Huyse, T.; Mas-Coma, S.; Toulza, E.; Barré-Cardi, H.; Rollinson, D.; Kincaid-Smith, J.; et al. Outbreak of urogenital schistosomiasis in Corsica (France): an epidemiological case study. *Lancet Infect. Dis.* **2016**, *16*, 971–979, doi:10.1016/S1473-3099(16)00175-4.
17. Salas-Coronas, J.; Bargues, M.D.; Lozano-Serrano, A.B.; Artigas, P.; Martínez-Ortí, A.; Mas-Coma, S.; Merino-Salas, S.; Abad Vivas-Pérez, J.I. Evidence of autochthonous transmission of urinary schistosomiasis in Almeria (southeast Spain): An outbreak analysis. *Travel Med. Infect. Dis.* **2021**, *44*, 102165, doi:10.1016/j.tmaid.2021.102165.
18. King, K.C.; Stelkens, R.B.; Webster, J.P.; Smith, D.F.; Brockhurst, M.A. Hybridization in Parasites: Consequences for Adaptive Evolution, Pathogenesis, and Public Health in a Changing World. *PLoS Pathog.* **2015**, *11*, 1–12, doi:10.1371/journal.ppat.1005098.
19. Leger, E.; Webster, J.P. Hybridizations within the Genus *Schistosoma*: Implications for evolution, epidemiology and control. *Parasitology* **2017**, *144*, 65–80, doi:10.1017/S0031182016001190.
20. Webster, J.P.; Gower, C.M.; Knowles, S.C.L.; Molyneux, D.H.; Fenton, A. One health - an ecological and evolutionary framework for tackling Neglected Zoonotic Diseases. *Evol. Appl.* **2016**, *9*, 313–333, doi:10.1111/eva.12341.
21. Da Silva Santos, L.; Wolff, H.; Chappuis, F.; Albajar-Viñas, P.; Vitoria, M.; Tran, N.T.; Baggio, S.; Togni, G.; Vuilleumier, N.; Girardin, F.; et al. Coinfections between persistent parasitic neglected tropical diseases and viral infections among prisoners

- from Sub-Saharan Africa and Latin America. *J. Trop. Med.* **2018**, 2018, doi:10.1155/2018/7218534.
22. Brodine, S.K.; Thomas, A.; Huang, R.; Harbertson, J.; Mehta, S.; LEake, J.; Nutman, T.; Moser, K.; Wolf, J.; Ramanathan, R.; et al. Community based parasitic screening and treatment of Sudanese refugees: application and assessment of Centers for Disease Control guidelines. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2009**, *80*, 425–430.
 23. McLellan, J.; Gill, M.J.; Vaughan, S.; Meatherall, B. *Schistosoma* and *Strongyloides* screening in migrants initiating HIV Care in Canada: A cross sectional study. *BMC Infect. Dis.* **2020**, *20*, 1–9, doi:10.1186/s12879-020-4779-4.
 24. Posey, D.L.; Blackburn, B.G.; Weinberg, M.; Flagg, E.W.; Ortega, L.; Wilson, M.; Secor, W.E.; Sanders-Lewis, K.; Won, K.; Maguire, J.H. High prevalence and presumptive treatment of schistosomiasis and strongyloidiasis among African refugees. *Clin. Infect. Dis.* **2007**, *45*, 1310–1315, doi:10.1086/522529.
 25. Zammarchi, L.; Vellere, I.; Stella, L.; Bartalesi, F.; Strohmeier, M.; Bartoloni, A. Spectrum and burden of neglected tropical diseases observed in an infectious and tropical diseases unit in Florence, Italy (2000–2015). *Intern. Emerg. Med.* **2017**, *12*, 467–477, doi:10.1007/s11739-016-1597-1.
 26. Salas-Coronas, J.; Cabezas-Fernandez, M.T.; Lozano-Serrano, A.B.; Soriano-Perez, M.J.; Vazquez-Villegas, J.; Cuenca-Gomez, J. Newly arrived african migrants to Spain: Epidemiology and burden of disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2018**, *98*, 319–325, doi:10.4269/ajtmh.17-0604.
 27. Belhassen-García, M.; Pardo-Lledías, J.; Pérez del Villar, L.; Velasco-Tirado, V.; Siller Ruiz, M.; Cordero-Sánchez, M.; Vicente, B.; Hernández Egido, S.; Muñoz Bellido, J.L.; Muro, A. Screening for parasite infections in immigrant children from low-income countries. *Enfermedades Infecc. y Microbiol. Clin. (English ed.)* **2017**, *35*, 27–32, doi:10.1016/j.eimce.2017.01.008.
 28. Glökler, J.; Lim, T.S.; Ida, J.; Frohme, M. Isothermal amplifications—a comprehensive review on current methods. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2021**, *56*, 543–586, doi:10.1080/10409238.2021.1937927.
 29. Zhao, Y.; Chen, F.; Li, Q.; Wang, L.; Fan, C. Isothermal Amplification of Nucleic Acids. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 12491–12545, doi:10.1021/acs.chemrev.5b00428.
 30. 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*, 717–746, doi:10.1039/c9ay02246e.
 31. 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*, 1–7, doi:10.1093/nar/28.12.e63.
 32. 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*, 62–69, doi:10.1007/s10156-009-0669-9.
33. Notomi, T.; Mori, Y.; Tomita, N.; Kanda, H. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *J. Microbiol.* **2015**, *53*, 1–5, doi:10.1007/s12275-015-4656-9.
 34. Parida, M.; Sannarangaiah, S.; Kumar Dash, P.; Rao, P.V.; Morita, K. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovate gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Rev. Med. Virol.* **2008**, *18*, 407–421, doi:10.1002/rmv.593.
 35. Nagamine, K.; Hase, T.; Notomi, T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol. Cell. Probes* **2002**, *16*, 223–229, doi:10.1006/mcpr.2002.0415.
 36. Curtis, K.A.; Rudolph, D.L.; Nejad, I.; Singleton, J.; Beddoe, A.; Weigl, B.; LaBarre, P.; Owen, S.M. Isothermal amplification using a chemical heating device for point-of-care detection of HIV-1. *PLoS One* **2012**, *7*, 1–6, doi:10.1371/journal.pone.0031432.
 37. 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**, *244*, 32–38, doi:10.1016/j.jviromet.2017.02.013.
 38. 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**, *9*, 1–11, doi:10.1038/s41598-019-51342-2.
 39. García-Bernalt Diego, J.; Fernández-Soto, P.; Muro, A. Lamp in neglected tropical diseases: A focus on parasites. *Diagnostics* **2021**, *11*, 1–23, doi:10.3390/diagnostics11030521.
 40. 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, doi:10.1006/bbrc.2001.5921.
 41. Zhang, X.; Lowe, S.B.; Gooding, J.J. Brief review of monitoring methods for loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *61*, 491–499, doi:10.1016/j.bios.2014.05.039.
 42. Le, T.H.; Nguyen, N.T.B.; Truong, N.H.; Van De, N. Development of mitochondrial loop-mediated isothermal amplification for detection of the small liver fluke *Opisthorchis viverrini* (opisthorchiidae; trematoda; platyhelminthes). *J. Clin. Microbiol.* **2012**, *50*, 1178–1184, doi:10.1128/JCM.06277-11.

43. Panno, S.; Matić, S.; Tiberini, A.; Caruso, A.G.; Bella, P.; Torta, L.; Stassi, R.; Davino, S. Loop mediated isothermal amplification: Principles and applications in plant virology. *Plants* **2020**, *9*, 1–28, doi:10.3390/plants9040461.
44. Goto, M.; Honda, E.; Ogura, A.; Nomoto, A.; Hanaki, K.I. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *Biotechniques* **2009**, *46*, 167–172, doi:10.2144/000113072.
45. Lucchi, N.W.; 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*, 1–9, doi:10.1371/journal.pone.0151437.
46. Mori, Y.; Kitao, M.; Tomita, N.; Notomi, T. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *J. Biochem. Biophys. Methods* **2004**, *59*, 145–157, doi:10.1016/j.jbbm.2003.12.005.
47. Maeda, H.; Koikeguchi, S.; Fujimoto, C.; Tanimoto, I.; Yoshizumi, W.; Nishimura, F.; Takashiba, S. Detection of periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* by loop-mediated isothermal amplification method. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2005**, *43*, 233–239, doi:10.1016/j.femsim.2004.08.005.
48. Ostorbin, I.P.; Belousova, E.A.; Zakabunin, A.I.; Boyarskikh, U.A.; Filipenko, M.L. Comparison of fluorescent intercalating dyes for quantitative loop-mediated isothermal amplification (qLAMP). *Biotechniques* **2016**, *61*, 20–25, doi:10.2144/000114432.
49. Weerakoon, K.G.; Gordon, C.A.; McManus, D.P. DNA diagnostics for schistosomiasis control. *Trop. Med. Infect. Dis.* **2018**, *3*, 1–20, doi:10.3390/tropicalmed3030081.
50. Schols, R.; Carolus, H.; Hammoud, C.; Mulero, S.; Mudavanhu, A.; Huyse, T. A rapid diagnostic multiplex PCR approach for xenomonitoring of human and animal schistosomiasis in a “One Health” context. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2019**, *113*, 722–729, doi:10.1093/trstmh/trz067.
51. Abbasi, I.; King, C.H.; Muchiri, E.M.; Hamburger, J. Detection of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* DNA by loop-mediated isothermal amplification: Identification of infected snails from early prepatency. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2010**, *83*, 427–432, doi:10.4269/ajtmh.2010.09-0764.
52. Gandasegui, J.; Fernández-Soto, P.; Carranza-Rodríguez, C.; Pérez-Arellano, J.L.; Vicente, B.; López-Abán, J.; Muro, A. The rapid-heat LAMPellet method: A potential diagnostic method for human urogenital schistosomiasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2015**, *9*, 1–23, doi:10.1371/journal.pntd.0003963.
53. Xu, J.; Rong, R.; Zhang, H.Q.; Shi, C.J.; Zhu, X.Q.; Xia, C.M. Sensitive and rapid detection of *Schistosoma japonicum* DNA by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Int. J. Parasitol.* **2010**, *40*, 327–331, doi:10.1016/j.ijpara.2009.08.010.
54. Kumagai, T.; Furushima-Shimogawara, R.; Ohmae, H.; Wang, T.P.; Lu, S.; Chen, R.;

- Wen, L.; Ohta, N. Detection of early and single infections of *Schistosoma japonicum* in the intermediate host snail, *Oncomelania hupensis*, by PCR and loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2010**, *83*, 542–548, doi:10.4269/ajtmh.2010.10-0016.
55. Fernández-Soto, P.; Gandasegui Arahuetes, J.; Sánchez Hernández, A.; López Abán, J.; Vicente Santiago, B.; Muro, A. A Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for Early Detection of *Schistosoma mansoni* in Stool Samples: A Diagnostic Approach in a Murine Model. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2014**, *8*, 1–11, doi:10.1371/journal.pntd.0003126.
56. Gandasegui, J.; Fernández-Soto, P.; Hernández-Goenaga, J.; López-Abán, J.; Vicente, B.; Muro, A. Biompha-LAMP: A New Rapid Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Detecting *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata* Snail Host. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2016**, *10*, 1–14, doi:10.1371/journal.pntd.0005225.
57. Caldeira, R.L.; Jannotti-Passos, L.K.; Dos Santos Carvalho, O. Use of Molecular Methods for the Rapid Mass Detection of *Schistosoma mansoni* (Platyhelminthes: Trematoda) in *Biomphalaria* spp. (Gastropoda: Planorbidae). *J. Trop. Med.* **2017**, *2017*, 1–6, doi:10.1155/2017/8628971.
58. 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*, 1–13, doi:10.3390/jcm10030511.
59. Watts, M.R.; James, G.; Sultana, Y.; Ginn, A.N.; Outhred, A.C.; Kong, F.; Verweij, J.J.; Iredell, J.R.; Chen, S.C.; Lee, R. 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. Clin. Pathol.* **2014**, *90*, 306–311, doi:10.4269/ajtmh.13-0583.
60. Fernández-Soto, P.; Sánchez-Hernández, A.; Gandasegui, J.; Bajo Santos, C.; López-Abán, J.; Saugar, J.M.; Rodríguez, E.; Vicente, B.; Muro, A. *Strong-LAMP*: A LAMP Assay for *Strongyloides* spp. Detection in Stool and Urine Samples. Towards the Diagnosis of Human Strongyloidiasis Starting from a Rodent Model. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2016**, *10*, 1–20, doi:10.1371/journal.pntd.0004836.
61. Verweij, J.J.; Canales, M.; Polman, K.; Ziem, J.; Brienens, E.A.T.; Polderman, A.M.; Lieshout, L. Van Molecular diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in faecal samples using real-time PCR. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2009**, *103*, 342–346, doi:10.1016/j.trstmh.2008.12.001.
62. Watts, M.R.; Kim, R.; Ahuja, V.; Robertson, G.J.; Sultana, Y.; Wehrhahn, M.C.; Bradbury, R.S.; Gilbert, G.; Lee, R. Comparison of Loop-Mediated Isothermal Amplification and Real-Time PCR Assays for Detection of *Strongyloides* Larvae in Different Specimen Matrices. *J. Clin. Microbiol.* **2019**, *57*, 1–9.
63. Fernández-Soto, P.; Celis-Giraldo, C.T.; Collar-Fernández, C.; Gorgojo, Ó.; Camargo,

- M.; Muñoz, J.; Salas-Coronas, J.; Patarroyo, M.A.; Muro, A. *Strong* -LAMP Assay Based on a *Strongyloides* spp.-Derived Partial Sequence in the 18S rRNA as Potential Biomarker for Strongyloidiasis Diagnosis in Human Urine Samples. *Dis. Markers* **2020**, *2020*, doi:10.1155/2020/5265198.
64. Hoarau, A.O.G.; Mavingui, P.; Lebarbenchon, C. Coinfections in wildlife: Focus on a neglected aspect of infectious disease epidemiology. *PLoS Pathog.* **2020**, *16*, 1–5, doi:10.1371/journal.ppat.1008790.
65. Pullan, R.; Brooker, S. The health impact of polyparasitism in humans: Are we underestimating the burden of parasitic diseases? *Parasitology* **2008**, *135*, 783–794, doi:10.1017/S0031182008000346.
66. Bio-Rad Fluorophore reference guide. Fluorophore excitation and emission data Available online: https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_2421.pdf (accessed on Mar 1, 2023).
67. Tanner, N.A.; Zhang, Y.; Evans, T.C. Simultaneous multiple target detection in real-time loop-mediated isothermal amplification. *Biotechniques* **2012**, *53*, 81–89, doi:10.2144/0000113902.
68. Tanner, N.A.; Evans, T.C. Loop-mediated isothermal amplification for detection of nucleic acids. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **2014**, 1–14, doi:10.1002/0471142727.mb1514s105.
69. Nanayakkara, I.A.; White, I.M. Demonstration of a quantitative triplex LAMP assay with an improved probe-based readout for the detection of MRSA. *Analyst* **2019**, *144*, 3878–3885, doi:10.1039/c9an00671k.
70. Mashooq, M.; Kumar, D.; Niranjana, A.K.; Agarwal, R.K.; Rathore, R. Development and evaluation of probe based real time loop mediated isothermal amplification for *Salmonella*: A new tool for DNA quantification. *J. Microbiol. Methods* **2016**, *126*, 24–29, doi:10.1016/j.mimet.2016.04.014.
71. Jang, W.S.; Lim, D.H.; Choe, Y.; Jee, H.; Moon, K.C.; Kim, C.; Choi, M.; Park, I.S.; Lim, C.S. Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification assay for diagnosis of *Plasmodium* spp., *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *Diagnostics* **2021**, *11*, 1950, doi:10.3390/diagnostics11111950.
72. Ball, C.S.; Light, Y.K.; Koh, C.Y.; Wheeler, S.S.; Coffey, L.L.; Meagher, R.J. 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*, 3562–3568, doi:10.1021/acs.analchem.5b04054.
73. Priye, A.; Bird, S.W.; Light, Y.K.; Ball, C.S.; Negrete, O.A.; Meagher, R.J. A smartphone-based diagnostic platform for rapid detection of Zika, chikungunya, and dengue viruses. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–11, doi:10.1038/srep44778.

74. Priye, A.; Ball, C.S.; Meagher, R.J. Colorimetric-Luminance Readout for Quantitative Analysis of Fluorescence Signals with a Smartphone CMOS Sensor. *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 12385–12389, doi:10.1021/acs.analchem.8b03521.
75. Meagher, R.J.; Priye, A.; Light, Y.K.; Huang, C.; Wang, E. Impact of primer dimers and self-amplifying hairpins on reverse transcription loop-mediated isothermal amplification detection of viral RNA. *Analyst* **2018**, *143*, 1924–1933, doi:10.1039/c7an01897e.
76. Gadkar, V.J.; Goldfarb, D.M.; Gantt, S.; Tilley, P.A.G. Real-time Detection and Monitoring of Loop Mediated Amplification (LAMP) Reaction Using Self-quenching and De-quenching Fluorogenic Probes. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1–10, doi:10.1038/s41598-018-23930-1.
77. 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*, 745–754, doi:10.1111/jen.12522.
78. Fukuta, S.; Nagai, H.; Suzuki, R.; Matsumoto, Y.; Kato, S.; Saka, N.; Horikawa, H.; Kato, S.; Miyake, N. Detection of *Fomitiporia torreyae* and *Fulviformes umbrinellus* by multiplex loop-mediated isothermal amplification (mLAMP) for diagnosis of Japanese pear dwarf. *Ann. Appl. Biol.* **2016**, *170*, 170–178, doi:10.1111/aab.12325.
79. Takayama, I.; Nakauchi, M.; Takahashi, H.; Oba, K.; Semba, S.; Kaida, A.; Kubo, H.; Saito, S.; Nagata, S.; Odagiri, T.; et al. Development of real-time fluorescent reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay with quenching primer for influenza virus and respiratory syncytial virus. *J. Virol. Methods* **2019**, *267*, 53–58, doi:10.1016/j.jviromet.2019.02.010.
80. Kurata, S.; Kanagawa, T.; Yamada, K.; Torimura, M.; Yokomaku, T.; Kamagata, Y.; Kurane, R. Fluorescent quenching-based quantitative detection of specific DNA/RNA using a BODIPY® FL-labeled probe or primer. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 1–5, doi:10.1093/nar/29.6.e34.
81. Tani, H.; Teramura, T.; Adachi, K.; Tsuneda, S.; Kurata, S.; Nakamura, K.; Kanagawa, T.; Noda, N. Technique for quantitative detection of specific DNA sequences using alternately binding quenching probe competitive assay combined with loop-mediated isothermal amplification. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 5608–5613, doi:10.1021/ac070041e.
82. Shirato, K.; Semba, S.; El-Kafrawy, S.A.; Hassan, A.M.; Tolah, A.M.; Takayama, I.; Kageyama, T.; Notomi, T.; Kamitani, W.; Matsuyama, S.; et al. Development of fluorescent reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) using quenching probes for the detection of the Middle East respiratory syndrome coronavirus. *J. Virol. Methods* **2018**, *258*, 41–48, doi:10.1016/j.jviromet.2018.05.006.
83. R. Kubota; A. M. Alvarez; W.W. Su; D. M. Jenkins FRET-Based Assimilating Probe for Sequence-Specific Real-Time Monitoring of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP). *Biol. Eng. Trans.* **2011**, *4*, 81–100, doi:10.13031/2013.38509.

84. Kubota, R.; Jenkins, D.M. Real-time duplex applications of loop-mediated AMPLification (LAMP) by assimilating probes. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 4786–4799, doi:10.3390/ijms16034786.
85. Yaren, O.; Alto, B.W.; Gangodkar, P. V.; Ranade, S.R.; Patil, K.N.; Bradley, K.M.; Yang, Z.; Phadke, N.; Benner, S.A. Point of sampling detection of Zika virus within a multiplexed kit capable of detecting dengue and chikungunya. *BMC Infect. Dis.* **2017**, *17*, 1–13, doi:10.1186/s12879-017-2382-0.
86. Kim, M.J.; Kim, H.Y. Direct duplex real-time loop mediated isothermal amplification assay for the simultaneous detection of cow and goat species origin of milk and yogurt products for field use. *Food Chem.* **2018**, *246*, 26–31, doi:10.1016/j.foodchem.2017.11.014.
87. Yaren, O.; Alto, B.W.; Bradley, K.M.; Moussatche, P.; Glushakova, L.; Benner, S.A. Multiplexed isothermal amplification based diagnostic platform to detect zika, chikungunya, and dengue 1. *J. Vis. Exp.* **2018**, *2018*, 1–13, doi:10.3791/57051.
88. Yaren, O.; McCarter, J.; Phadke, N.; Bradley, K.M.; Overton, B.; Yang, Z.; Ranade, S.; Patil, K.; Bangale, R.; Benner, S.A. Ultra-rapid detection of SARS-CoV-2 in public workspace environments. *PLoS One* **2021**, *16*, 1–17, doi:10.1371/journal.pone.0240524.
89. Khamlor, T.; Pongpiachan, P.; Parnpai, R.; Punyawai, K.; Sangsritavong, S.; Chokesajjawatee, N. Bovine embryo sex determination by multiplex loop-mediated isothermal amplification. *Theriogenology* **2015**, *83*, 891–896, doi:10.1016/j.theriogenology.2014.11.025.
90. Curtis, K.A.; Rudolph, D.L.; Owen, S.M. Sequence-specific detection method for reverse transcription, loop-mediated isothermal amplification of HIV-1. *J. Med. Virol.* **2009**, *81*, 966–972, doi:10.1002/jmv.21490.
91. Curtis, K.A.; Rudolph, D.L.; Morrison, D.; Guelig, D.; Diesburg, S.; McAdams, D.; Burton, R.A.; LaBarre, P.; Owen, M. Single-use, electricity-free amplification device for detection of HIV-1. *J. Virol. Methods* **2016**, *237*, 132–137, doi:10.1016/j.jviromet.2016.09.007.
92. Curtis, K.A.; Morrison, D.; Rudolph, D.L.; Shankar, A.; Bloomfield, L.S.P.; Switzer, W.M.; Owen, S.M. A multiplexed RT-LAMP assay for detection of group M HIV-1 in plasma or whole blood. *J. Virol. Methods* **2018**, *255*, 91–97, doi:10.1016/j.jviromet.2018.02.012.
93. Jiang, Y.S.; Bhadra, S.; Li, B.; Wu, Y.R.; Milligan, J.N.; Ellington, A.D. Robust Strand Exchange Reactions for the Sequence-Specific, Real-Time Detection of Nucleic Acid Amplicons. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 3314–3320, doi:10.1021/ac504387c.
94. Jiang, Y.S.; Riedel, T.E.; Popoola, J.A.; Morrow, B.R.; Cai, S.; Ellington, A.D.; Bhadra, S. Portable platform for rapid in-field identification of human fecal pollution in water. *Water Res.* **2018**, *131*, 186–195, doi:10.1016/j.watres.2017.12.023.

95. Tang, Y.; Lu, B.; Zhu, Z.; Li, B. Establishment of a universal and rational gene detection strategy through three-way junction-based remote transduction. *Chem. Sci.* **2018**, *9*, 760–769, doi:10.1039/c7sc03190d.
96. Bhadra, S.; Riedel, T.E.; Saldaña, M.A.; Hegde, S.; Pederson, N.; Hughes, G.L.; Ellington, A.D. Direct nucleic acid analysis of mosquitoes for high fidelity species identification and detection of *Wolbachia* using a cellphone. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2018**, *12*, 1–21, doi:10.1371/journal.pntd.0006671.
97. Bhadra, S.; Jiang, Y.S.; Kumar, M.R.; Johnson, R.F.; Hensley, L.E.; Ellington, A.D. Real-time sequence-validated loop-mediated isothermal amplification assays for detection of Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV). *PLoS One* **2015**, *10*, 1–21, doi:10.1371/journal.pone.0123126.
98. Bhadra, S.; Saldaña, M.A.; Han, H.G.; Hughes, G.L.; Ellington, A.D. Simultaneous detection of different zika virus lineages via molecular computation in a point-of-care assay. *Viruses* **2018**, *10*, 1–22, doi:10.3390/v10120714.
99. Liu, W.; Huang, S.; Liu, N.; Dong, D.; Yang, Z.; Tang, Y.; Ma, W.; He, X.; Ao, D.; Xu, Y.; et al. Establishment of an accurate and fast detection method using molecular beacons in loop-mediated isothermal amplification assay. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–9, doi:10.1038/srep40125.
100. Lee, J.E.; Mun, H.; Kim, S.R.; Kim, M.G.; Chang, J.Y.; Shim, W.B. A colorimetric Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay based on HRP-mimicking molecular beacon for the rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus*. *Biosens. Bioelectron.* **2020**, *151*, 1–8, doi:10.1016/j.bios.2019.111968.
101. Tan, Y.L.; Huang, A.Q.; Tang, L.J.; Jiang, J.H. Multiplexed droplet loop-mediated isothermal amplification with scorpion-shaped probes and fluorescence microscopic counting for digital quantification of virus RNAs. *Chem. Sci.* **2021**, *12*, 8445–8451, doi:10.1039/d1sc00616a.
102. Wan, L.; Chen, T.; Gao, J.; Dong, C.; Wong, A.H.H.; Jia, Y.; Mak, P.I.; Deng, C.X.; Martins, R.P. A digital microfluidic system for loop-mediated isothermal amplification and sequence specific pathogen detection. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–11, doi:10.1038/s41598-017-14698-x.
103. Nyan, D.C.; Swinson, K.L. A novel multiplex isothermal amplification method for rapid detection and identification of viruses. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 1–9, doi:10.1038/srep17925.
104. Becherer, L.; Bakheit, M.; Frischmann, S.; Stinco, S.; Borst, N.; Zengerle, R.; Von Stetten, F. Simplified Real-Time Multiplex Detection of Loop-Mediated Isothermal Amplification Using Novel Mediator Displacement Probes with Universal Reporters. *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 4741–4748, doi:10.1021/acs.analchem.7b05371.
105. Becherer, L.; Knauf, S.; Marks, M.; Lueert, S.; Frischmann, S.; Borst, N.; Von Stetten, F.; Bieb, S.; Adu-Sarkodie, Y.; Asiedu, K.; et al. Multiplex mediator displacement loop-

- mediated isothermal amplification for detection of *Treponema pallidum* and *Haemophilus ducreyi*. *Emerg. Infect. Dis.* **2020**, *26*, 282–288, doi:10.3201/eid2602.190505.
106. Zhang, D.Y.; Seelig, G. Dynamic DNA nanotechnology using strand-displacement reactions. *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 103–113, doi:10.1038/nchem.957.
 107. Wang, Y.; Li, D.; Wang, Y.; Li, K.; Ye, C. Rapid and sensitive detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* by multiple endonuclease restriction real-Time loop-Mediated isothermal amplification technique. *Molecules* **2016**, *21*, 1–16, doi:10.3390/molecules21010111.
 108. Wang, Y.; Wang, Y.; Lan, R.; Xu, H.; Ma, A.; Li, D.; Dai, H.; Yuan, X.; Xu, J.; Ye, C. Multiple endonuclease restriction real-time loop-mediated isothermal amplification: A novel analytically rapid, sensitive, multiplex loop-mediated isothermal amplification detection technique. *J. Mol. Diagnostics* **2015**, *17*, 392–401, doi:10.1016/j.jmoldx.2015.03.002.
 109. Wang, Y.; Wang, Y.; Luo, L.; Liu, D.; Luo, X.; Xu, Y.; Hu, S.; Niu, L.; Xu, J.; Ye, C. Rapid and sensitive detection of *Shigella* spp. and *Salmonella* spp. by multiple endonuclease restriction real-time loop-mediated isothermal amplification technique. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 1–13, doi:10.3389/fmicb.2015.01400.
 110. Iseki, H.; Alhassan, A.; Ohta, N.; Thekisoe, O.M.M.; Yokoyama, N.; Inoue, N.; Nambota, A.; Yasuda, J.; Igarashi, I. Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification (mLAMP) method for the simultaneous detection of bovine *Babesia* parasites. *J. Microbiol. Methods* **2007**, *71*, 281–287, doi:10.1016/j.mimet.2007.09.019.
 111. 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*, 413–419, doi:10.1089/fpd.2017.2410.
 112. Liu, X. liang; Zhao, X. ting; Muhammad, I.; Ge, B. bei; Hong, B. Multiplex reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the simultaneous detection of CVB and CSVd in chrysanthemum. *J. Virol. Methods* **2014**, *210*, 26–31, doi:10.1016/j.jviromet.2014.09.008.
 113. Liang, C.; Chu, Y.; Cheng, S.; Wu, H.; Kajiyama, T.; Kambara, H.; Zhou, G. Multiplex loop-mediated isothermal amplification detection by sequence-based barcodes coupled with nicking endonuclease-mediated pyrosequencing. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 3758–3763, doi:10.1021/ac3003825.
 114. Zhou, Y.; Xiao, J.; Ma, X.; Wang, Q.; Zhang, Y. An effective established biosensor of bifunctional probes-labeled AuNPs combined with LAMP for detection of fish pathogen *Streptococcus iniae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *102*, 5299–5308, doi:10.1007/s00253-018-9016-3.
 115. Kumvongpin, R.; Jearanaikool, P.; Wilailuckana, C.; Sae-ung, N.; Prasongdee, P.;

- Daduang, S.; Wongsena, M.; Boonsiri, P.; Kiatpathomchai, W.; Swangvaree, S.S.; et al. High sensitivity, loop-mediated isothermal amplification combined with colorimetric gold-nanoparticle probes for visual detection of high risk human papillomavirus genotypes 16 and 18. *J. Virol. Methods* **2016**, *234*, 90–95, doi:10.1016/j.jviromet.2016.04.008.
116. Heo, J.H.; Yi, G.S.; Lee, B.S.; Cho, H.H.; Lee, J.W.; Lee, J.H. A significant enhancement of color transition from an on-off type achromatic colorimetric nanosensor for highly sensitive multi-analyte detection with the naked eye. *Nanoscale* **2016**, *8*, 18341–18351, doi:10.1039/c6nr05919h.
117. Chen, Y.; Cheng, N.; Xu, Y.; Huang, K.; Luo, Y.; Xu, W. Point-of-care and visual detection of *P. aeruginosa* and its toxin genes by multiple LAMP and lateral flow nucleic acid biosensor. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *81*, 317–323, doi:10.1016/j.bios.2016.03.006.
118. Wang, Y.; Li, H.; Wang, Y.; Zhang, L.; Xu, J.; Ye, C. Loop-mediated isothermal amplification label-based gold nanoparticles lateral flow biosensor for detection of *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1–14, doi:10.3389/fmicb.2017.00192.
119. Zhu, X.; Wang, X.; Han, L.; Chen, T.; Wang, L.; Li, H.; Li, S.; He, L.; Fu, X.; Chen, S.; et al. Multiplex reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with nanoparticle-based lateral flow biosensor for the diagnosis of COVID-19. *Biosens. Bioelectron.* **2020**, *166*, 112437, doi:10.1016/j.bios.2020.112437.
120. Jung, J.H.; Oh, S.J.; Kim, Y.T.; Kim, S.Y.; Kim, W.; Jung, J.; Seo, T.S. Combination of multiplex reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification with an immunochromatographic strip for subtyping influenza A virus. *Anal. Chim. Acta* **2015**, *853*, 541–547, doi:10.1016/j.aca.2014.10.020.
121. Nurul Najian, A.B.; Engku Nur Syafirah, E.A.R.; Ismail, N.; Mohamed, M.; Yean, C.Y. Development of multiplex loop mediated isothermal amplification (m-LAMP) label-based gold nanoparticles lateral flow dipstick biosensor for detection of pathogenic *Leptospira*. *Anal. Chim. Acta* **2016**, *903*, 142–148, doi:10.1016/j.aca.2015.11.015.
122. Lee, M.F.; Chen, Y.H.; Peng, C.F. Evaluation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification in conjunction with ELISA-hybridization assay for molecular detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Microbiol. Methods* **2009**, *76*, 174–180, doi:10.1016/j.mimet.2008.10.005.
123. Ravan, H.; Yazdanparast, R. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method in conjunction with an enzyme-linked immunosorbent assay for specific detection of *Salmonella* serogroup D. *Anal. Chim. Acta* **2012**, *733*, 64–70, doi:10.1016/j.aca.2012.04.034.
124. Ravan, H.; Yazdanparast, R. Loop region-specific oligonucleotide probes for loop-mediated isothermal amplification-enzyme-linked immunosorbent assay truly

- minimize the instrument needed for detection process. *Anal. Biochem.* **2013**, *439*, 102–108, doi:10.1016/j.ab.2013.04.014.
125. Pappas, M.G.; Hajkowski, R.; Hockmeyer, W.T. Dot enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-ELISA): a micro technique for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. *J. Immunol. Methods* **1983**, *64*, 205–214, doi:10.1016/0022-1759(83)90399-X.
126. Pappas, M.G. Recent applications of the Dot-ELISA in immunoparasitology. *Vet. Parasitol.* **1988**, *29*, 105–129, doi:10.1016/0304-4017(88)90120-3.
127. 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*, 1318–1323, doi:10.4269/ajtmh.15-0829.
128. Check Hayden, E. Nanopore genome sequencer makes its debut. *Nature* **2012**, 1–2, doi:10.1038/nature.2012.10051.
129. Yamagishi, J.; Runtuwene, L.R.; Hayashida, K.; Mongan, A.E.; Thi, L.A.N.; Thuy, L.N.; Nhat, C.N.; Limkittikul, K.; Sirivichayakul, C.; Sathirapongsasuti, N.; et al. Serotyping dengue virus with isothermal amplification and a portable sequencer. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–10, doi:10.1038/s41598-017-03734-5.
130. Hayashida, K.; Orba, Y.; Sequeira, P.C.; Sugimoto, C.; Hall, W.W.; Eshita, Y.; Suzuki, Y.; Runtuwene, L.; Brasil, P.; Calvet, G.; et al. Field diagnosis and genotyping of chikungunya virus using a dried reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay and MinION sequencing. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2019**, *13*, 1–15, doi:10.1371/journal.pntd.0007480.
131. Imai, K.; Tarumoto, N.; Runtuwene, L.R.; Sakai, J.; Hayashida, K.; Eshita, Y.; Maeda, R.; Tuda, J.; Ohno, H.; Murakami, T.; et al. An innovative diagnostic technology for the codon mutation C580Y in kelch13 of *Plasmodium falciparum* with MinION nanopore sequencer. *Malar. J.* **2018**, *17*, 1–11, doi:10.1186/s12936-018-2362-x.
132. Imai, K.; Tarumoto, N.; Misawa, K.; Runtuwene, L.R.; Sakai, J.; Hayashida, K.; Eshita, Y.; Maeda, R.; Tuda, J.; Murakami, T.; et al. A novel diagnostic method for malaria using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and MinION™ nanopore sequencer. *BMC Infect. Dis.* **2017**, *17*, 1–9, doi:10.1186/s12879-017-2718-9.
133. Liu, N.; Zou, D.; Dong, D.; Yang, Z.; Ao, D.; Liu, W.; Huang, L. 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, doi:10.1038/srep45601.
134. Joshi, S.; Dixit, K.K.; 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*, 2085–2090, doi:10.4269/ajtmh.19-0313.

135. 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 milk. *Int. J. Food Microbiol.* **2011**, *148*, 75–79, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.05.004.
136. Aonuma, H.; Yoshimura, A.; Kobayashi, T.; Okado, K.; Badolo, A.; Nelson, B.; Kanuka, H.; Fukumoto, S. A single fluorescence-based LAMP reaction for identifying multiple parasites in mosquitoes. *Exp. Parasitol.* **2010**, *125*, 179–183, doi:10.1016/j.exppara.2009.12.023.
137. Wang, H.; Ma, Z.; Qin, J.; Shen, Z.; Liu, Q.; Chen, X.; Wang, H.; An, Z.; Liu, W.; Li, M. A versatile loop-mediated isothermal amplification microchip platform for *Streptococcus pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* testing at the point of care. *Biosens. Bioelectron.* **2019**, *126*, 373–380, doi:10.1016/j.bios.2018.11.011.
138. Yu, W.; Chen, Y.; Wang, Z.; Qiao, L.; Xie, R.; Zhang, J.; Bian, S.; Li, H.; Zhang, Y.; Chen, A. Multiple authentications of high-value milk by centrifugal microfluidic chip-based real-time fluorescent LAMP. *Food Chem.* **2021**, *351*, 129348, doi:10.1016/j.foodchem.2021.129348.
139. Wu, C.; Liu, L.; Ye, Z.; Gong, J.; Hao, P.; Ping, J.; Ying, Y. TriD-LAMP: A pump-free microfluidic chip for duplex droplet digital loop-mediated isothermal amplification analysis. *Anal. Chim. Acta* **2022**, *1233*, 340513, doi:10.1016/j.aca.2022.340513.
140. Xu, X.; Jia, Y.; Li, R.; Wen, Y.; Liang, Y.; Lao, G.; Liu, X.; Zhou, W.; Liu, H.; Xie, J.; et al. Rapid and simultaneous detection of multiple pathogens in the lower reproductive tract during pregnancy based on loop-mediated isothermal amplification-microfluidic chip. *BMC Microbiol.* **2022**, *22*, 1–16, doi:10.1186/s12866-022-02657-0.

CAPÍTULO II

Hipótesis y objetivos

2.1. HIPÓTESIS

Uno de los retos más importantes a los que se enfrentan las Enfermedades Tropicales Desatendidas (NTDs), principalmente la esquistosomosis y la estrongiloidosis, es la búsqueda de un diagnóstico alternativo a los métodos convencionales utilizados habitualmente en zonas endémicas de escasos recursos. En estas áreas son frecuentes las coinfecciones entre varias NTDs complicando aún más el diagnóstico tradicional. Además, existe un incremento de estas enfermedades en nuestro entorno, asociado al aumento de la migración y los viajes a zonas endémicas.

Es conocido que los métodos de diagnóstico convencionales carecen de sensibilidad y especificidad suficientes. La aparición de híbridos, principalmente entre diferentes especies de esquistosomas, dificulta aún más este tipo de diagnóstico. Por otro lado, la falta de recursos en las zonas donde estas enfermedades son endémicas complica la aplicación de métodos de diagnóstico moleculares como la PCR y sus variantes. La tecnología LAMP es una alternativa adecuada al presentar ventajas en cuanto a sensibilidad, rapidez, simplicidad y bajo coste.

Teniendo en cuenta la elevada prevalencia de coinfecciones en zona endémica y la reciente introducción de formas híbridas de esquistosomas en áreas no endémicas, sería de gran utilidad disponer de un LAMP múltiple que permitiera la detección simultánea de varios patógenos en un mismo ensayo. Idealmente, el desarrollo de nuevos ensayos tipo LAMP y sus variantes debería adaptarse al diagnóstico *point-of-care* de las NTDs.

2.2. OBJETIVOS

El **objetivo general** de esta Tesis Doctoral es aplicar la tecnología LAMP y adaptarla a un formato múltiple que permita su uso como diagnóstico *point-of-care* y la detección simultánea de varios patógenos.

Los **objetivos específicos** son:

1. Evaluar el método LAMP para la detección de formas híbridas de esquistosomas.

2. Desarrollar un método LAMP múltiplex para el diagnóstico de coinfecciones *Schistosoma/Strongyloides*.

3. Aplicar el método LAMP para el diagnóstico *point-of-care* de la estrongiloidosis en zona endémica.

CAPÍTULO III

Artículos de investigación

3.1

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

Beatriz Crego-Vicente, Pedro Fernández-Soto, Begoña Febrer-Sendra, Juan García-Bernalt Diego, Jérôme Boissier, Etienne K Angora, Ana Oleaga, Antonio Muro

Journal of Clinical Medicine. 2021 Mar 22;10(6):1308

RESUMEN

La esquistosomosis es una de las enfermedades parasitarias más importantes en términos de morbilidad y mortalidad que afecta fundamentalmente a países en vías de desarrollo de áreas tropicales y subtropicales. Está causada por trematodos digénidos del género *Schistosoma*. La aparición de híbridos naturales de *Schistosoma* spp. tiene el potencial de sustituir a las especies existentes, generar resistencias o afectar a nuevos hospedadores. Algunas formas híbridas como *S. haematobium/S. bovis* pueden infectar a humanos y animales, incrementando su potencial zoonótico.

Se ha descrito también la transmisión autóctona de la esquistosomosis en regiones no endémicas. En el año 2013 se detectó el primer brote de esquistosomosis urogenital autóctona en el río Cavu en Córcega (Francia), que afectó a más de 120 personas locales y turistas. Los análisis moleculares determinaron que las especies causantes de la infección fueron *Schistosoma haematobium*, *S. bovis* y formas híbridas de *S. haematobium/S. bovis*. Mas recientemente, también se ha descrito la transmisión autóctona de la enfermedad en España, en un grupo de agricultores que se bañaron en una balsa de riego en Almería. La aparición de nuevos parásitos híbridos puede tener consecuencias en el diagnóstico, en la transmisión y en la morbilidad de la enfermedad, poniendo de manifiesto un problema emergente de Salud Pública.

En trabajos anteriores a esta Tesis Doctoral, nuestro grupo de investigación desarrolló distintos métodos moleculares basados en la tecnología LAMP para la detección especie-específica de *S. mansoni*, *S. haematobium* y *S. bovis*, así como un método LAMP para la detección género-específica de diferentes especies de esquistosomas. En este trabajo nos propusimos evaluar el método LAMP género-específica de *Schistosoma* para la detección de ADN de esquistosomas híbridos *S. haematobium/S. bovis* (*Sh/Sb*) procedentes del brote de esquistosomosis urogenital autóctono detectado en Córcega y en estudios realizados en Costa de Marfil. El LAMP género-específico resultó eficaz tanto en la detección de ADN de especies puras como en la de las distintas formas híbridas *Sh/Sb* con distinta sensibilidad.

Ante la falta de disponibilidad de muestras clínicas, evaluamos el LAMP género-específico en muestras simuladas, esto es, utilizando muestras de orina de pacientes sanos contaminadas con diferentes concentraciones de ADN de los distintos perfiles de esquistosomas híbridos *Sh/Sb*. Los resultados de nuestro estudio evidenciaron que el LAMP género-específico puede ser una herramienta molecular útil en la detección de híbridos de *Schistosoma*.



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; beatrizcregovic@usal.es (B.C.-V.); begofebrer@usal.es (B.F.-S.); juanbernaltd95@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 (<https://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 livestock practices and deforestation have consequences in emerging infectious diseases (EIDs) [1–6]. Changes in biodiversity have the potential to either increase or reduce the incidence of infectious disease in humans because they involve interactions among species. The

appearance of diseases in non-endemic areas and the increase in encounters between different species, when ecological and geographic barriers are lost, lead to the emergence of new hybrid forms [4]. Hybridization of parasites is an emerging public health issue [6], mainly because hybrid forms have the potential to generate new resistances, pathologies, be more virulent as well as affect new hosts [4,6].

Schistosomiasis is one of the most important parasitic diseases of humans in terms of morbidity and mortality, ranking secondary to malaria. The World Health Organization (WHO) estimates that almost 240 million people are affected worldwide (up to 90% in Africa) with 700 million people living in tropical and subtropical endemic areas in over 78 countries [7–9]. The parasitic flatworms responsible of schistosomiasis are digenetic trematodes worms of the genus *Schistosoma* that infect both humans and animals. The three main species infecting humans are *S. haematobium*, *S. mansoni* (both in Africa and the Middle East; *S. mansoni* is also present in the Americas) and *S. japonicum* (Asia). Other schistosome species have been linked to human infections, including *S. intercalatum*, *S. guineensis* (both in West and Central Africa), *S. mekongi* (in Kong Island) [10,11] and *S. malayensis* (Malaysia) [12], or with potential to infect humans, such as *S. matthei* (in Africa) [13]. Livestock schistosomiasis due to *S. bovis*, *S. curassoni* and *S. matthei* in cattle, sheep and goats is a common parasitic infection in sub-Saharan Africa, and it is an important cause of animal mortality and morbidity [5,14]. The emergence of natural hybrids of *S. haematobium*-*S. guineensis* [15], *S. haematobium*-*S. intercalatum* [16,17], *S. haematobium*-*S. matthei* [18] and mainly *S. haematobium* and the cattle schistosome *S. bovis* [2,19–22] clearly indicate the risk of hybrids that can potentially infect humans and their zoonotic potential [23]. *Schistosoma bovis* is one of the most significant veterinary problems in Africa [24,25] and to date is considered as a possible emerging health threat after the molecular characterization of *S. haematobium*-*S. bovis* hybrids from children in Senegal [2], in Côte d'Ivoire [26], in Benin [23], in Niger [27], in Mali [28] and in a schistosomiasis outbreak in Corsica, France [19]. *S. bovis* is phylogenetically a close relative of *S. haematobium*, and their close relationship and overlapping geographical distribution allows these to hybridize in the wild, increasing their genetic diversity and the risk of zoonotic transmission from animal reservoirs to humans [22]. Moreover, zoonotic hybrids could replace existing species and parasite strains extending intermediate and definitive host ranges, complicating transmission or presenting and increasing infectivity and virulence [6]. Furthermore, hybrid schistosomes forms may confuse the serological, molecular and, especially, parasitological diagnostic because the presence of excreted ova with atypical morphology [29,30].

However, in endemic countries schistosomiasis is definitively diagnosed by microscopic examination of excreted eggs in stool (*S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. intercalum*, *S. guineensis* and *S. mekongi*) by the Kato-Katz method (KK) or in urine (*S. haematobium*) by filtration or sedimentation techniques. Typically, microscopy is relatively time-consuming and lacks in sensitivity, mainly in areas with low-intensity infections [7,31,32]. Numerous serological diagnostic approaches, including enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and indirect hemagglutination (IHA) tests, in addition to other assays based on the antibody and antigen detection have been widely evaluated, but cross-reactivity, differences in sensitivity and a lack of standardization have been reported [33–35]. To try to solve these disadvantages, a large number of more sensitive and accurate PCR-based molecular methods have also been developed both for the diagnosis of human and animal schistosomiasis [36], being especially valuable in simultaneous detection and identification of *Schistosoma* species [37]. However, the complex PCR-based techniques are expensive and difficult to apply routinely in field conditions in endemic areas of schistosomiasis. In this sense, loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technology [38] has been recently revealed as a versatile alternative, having great potential for molecular diagnosis in limited-resource settings in endemic areas [39,40]. To date, a number of LAMP approaches have been developed to detect specifically *S. haematobium*, *S. mansoni* and *S. japonicum* in urine, stool, and snails specimens, as recently summarized by Avendaño and Patarroyo [41]. In addition, a novel species-specific LAMP to detect *S. bovis* and a genus-specific LAMP to de-

tect different *Schistosoma* species (including *S. haematobium*, *S. intercalatum*, *S. mansoni* and *S. bovis*) have been recently reported by our group [42]. Due to the schistosome hybridization rapid emergence and spread, and the consequences for disease prevalence, pathological characteristics and treatment, a LAMP test to detect several *Schistosoma* species (including hybrids forms) would be very useful for the diagnosis and management of schistosomiasis.

Thus, in this study we examined the utility of our recently developed genus-specific LAMP assay to detect *Schistosoma* species in the detection of different hybrid schistosome molecular profiles. Moreover, we evaluated the *Schistosoma* spp.-LAMP in simulated human urine samples spiked with serially diluted DNA from hybrid specimens using both urine with and without prior DNA extraction.

2. Materials and Methods

2.1. *Schistosoma* Species DNA Samples

Genomic DNA (gDNA) samples from several hybrid schistosomes (miracidia) and pure adults *S. haematobium*, *S. mansoni*, and *S. bovis* species were used in our study. The gDNA of schistosome hybrids was obtained from parasites collected in previous studies carried out in Agboville (Côte d'Ivoire) by Angora et al. [26] and in Corsica, France, by Boissier et al. [19]. The schistosome hybrids profiles, according to the rapid diagnostic mitochondrial *cox1* analysis and by sequencing of the *cox1* and ITS regions, respectively, as described elsewhere [26], are specified in Table 1. Pure *S. haematobium* gDNA (Egyptian strain) was kindly provided by the Laboratoire Interactions Hôtes-Pathogènes-Environnements (IHPE), University Perpignan Via Domitia, Perpignan, France. The laboratory strain from Egypt is experimentally maintained in the culturing facilities at the University of Perpignan and was originally provided by the Biomedical Research Institute, Rockville, Maryland [43]. *S. bovis* was provided by the laboratory of Animal Parasitology of the Institute of Natural Resources and Agrobiology of Salamanca where it has been maintained in hamsters and sheep experimentally infected. *S. mansoni* is maintained by serial passages in mice routinely infected in the Laboratory of Parasitic and Molecular Immunology, CIETUS, University of Salamanca, Salamanca, Spain. *S. mansoni* gDNA (Brazilian strain) and *S. bovis* gDNA (Spanish strain) were obtained from frozen adult male and female worms using the NucleoSpin Tissue Kit (Macherey-Nagel, GmbH & Co., Dueren, Germany) following the manufacturers' instructions. All DNA samples were measured using a Nanodrop ND-100 spectrophotometer (Nanodrop Technologies) and then diluted to final 20 ng/μL and 10 ng/μL concentrations. Subsequently, from 10 ng/μL concentration serial 10-fold dilutions were prepared with ultrapure water ranging from 10⁻¹ to 10⁻⁶ and stored at -20 °C until use.

Table 1. Hybrid schistosomes genetic profiles according to the rapid diagnostic (RD-PCR) mitochondrial *cox1* analysis and by sequencing of the *cox1* and ITS regions, respectively, from studies in Agboville (Côte d'Ivoire) and Corsica (c), France. The abbreviations Sb/Sb, Sh/Sb or Sh/Sh indicate that at the diagnostic sites two chromatogram peaks were visible after sequencing.

Study Location	RD-PCR Analysis	Sequence Analysis	ITS2 alleles	Abbreviation
Agboville	<i>cox1</i>	<i>cox 1</i> haplotypes		
	<i>S. haematobium</i>	<i>S. haematobium</i>	<i>S. bovis</i> + <i>S. bovis</i>	Sh-Sb/Sb
	<i>S. bovis</i>	<i>S. bovis</i>	<i>S. haematobium</i> + <i>S. bovis</i>	Sb-Sh/Sb
	<i>S. bovis</i>	<i>S. bovis</i>	<i>S. haematobium</i> + <i>S. haematobium</i>	Sb-Sh/Sh
Corsica	<i>S. haematobium</i>	<i>S. haematobium</i>	<i>S. haematobium</i> + <i>S. bovis</i>	Sh-Sh/Sb
	<i>S. bovis</i>	<i>S. bovis</i>	<i>S. haematobium</i> + <i>S. haematobium</i>	Sb-Sh/Sh ^c

Sb-Sh/Sh^c: Hybrid schistosome from Corsica, France.

2.2. Urine Samples Spiked with gDNA from *Schistosoma* Species

Fresh urine was collected from healthy staff donors with no history of travel to endemic areas of schistosomiasis to assess both specificity and sensitivity of the *Schisto*-LAMP assays. Urine was divided into aliquots of 100 μ L each and then artificially spiked with 2 μ L of 10-fold serially diluted gDNA from *Schistosoma* species ranging from 20 ng/ μ L to 100 fg/ μ L, thus resulting in a set of artificial urine samples with a final hybrid schistosomes gDNA concentration ranging from 0.8 ng/ μ L to 4 fg/ μ L. These fresh simulated urine samples were prepared when required and analyzed in *Schisto*-LAMP assays following two procedures. In the first procedure, we used the “Rapid-Heat LAMP method” as described elsewhere by Gandasegui et al. [44]. In brief, each aliquot of urine was heated at 95 °C for 15 min and shortly spun to pellet the debris. Subsequently, 2 μ L of the supernatant was used directly as template for LAMP reactions. After analysis, the remaining volume of each aliquot was stored at -20 °C. In the second procedure, the frozen simulated urine samples were thawed and DNA was extracted using the i-genomic Urine DNA Extraction Mini Kit (Intron Biotechnology, UK) following the manufacturers’ instructions. DNA obtained from aliquots was stored at -20 °C until use in a second LAMP screening.

2.3. *Schisto*-LAMP Assays

LAMP assays were accomplished using the reaction mixtures and specific primer sets previously described elsewhere by our group for detection of species-specific *S. mansoni* based on a mitochondrial minisatellite DNA region [45], *S. haematobium*, based on the ribosomal intergenic spacer (IGS) [44], and *S. bovis*, based on the mitochondrial NADH subunit 1 [42]. A genus-specific LAMP assay designed on the internal transcribed spacer 1 (ITS-1) for the simultaneous detection of different species, including *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. intercalatum* and *S. bovis*, was also applied [42]. The reactions were carried out using previously described conditions, with the exception of the final reaction volume, which was reduced from 25 μ L to 15 μ L. Briefly, LAMP reaction mixtures (15 μ L) contained 40 pmol each of FIP and BIP primers, 5 pmol each of F3 and B3 primers, 0.4 μ M of each LB and LF primers (if applicable) (Table 2), 1.4 mM of each dNTP (Bioron), 1x Isothermal Amplification Buffer—20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 50 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0.1% Tween20 (New England Biolabs Ltd., Ipswich, MA, USA)—supplementary with 6 mM MgSO₄ and 8 U of *Bst* 2.0 WarmStart DNA polymerase (New England Biolabs Ltd., Ipswich, MA, USA) with 2 μ L of template. *Schisto*-LAMP reactions were performed in 0.5 mL tubes that were incubated in a heat block at 65 °C for 60 min and then heated at 80 °C for 5–10 min to stop the reaction.

2.4. Specificity and Sensibility of *Schisto*-LAMP Assays in Detecting Schistosome Hybrids

The specificity of *Schisto*-LAMP assays to amplify both pure *Schistosoma* species (*S. haematobium*, *S. mansoni* and *S. bovis*) and hybrids was tested against parasite DNA samples used as controls, as mentioned above. To determine the lower detection limit of the *Schisto*-LAMP assays, gDNA from hybrid schistosomes 10-fold serially diluted was used as template for amplification. Moreover, the sensitivity was also assayed with the simulated urine samples artificially spiked with hybrid schistosomes gDNA both without prior DNA extraction and after DNA extraction by using the commercial kit.

2.5. Detection of LAMP Products

LAMP results were visually detected by the naked eye by adding 2 μ L (1:10, 10,000x) SYBR Green I fluorescent dye (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) to each reaction tube post-amplification. Green fluorescence was observed in LAMP-positive reactions and original orange in LAMP-negative reactions. In addition, the LAMP products (3–5 μ L) were visualized by Midori Green Advance DNA (Nippon Genetics Europe GmbH, Dueren, Germany) staining in 1.5% agarose gels to corroborate the colorimetric results. The LAMP amplifications showed a characteristic ladder-like band pattern.

Table 2. Primer sets used in this work for *Schisto*-LAMP assays. For *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. bovis* and *Schistosoma* spp.: F3, forward outer primer; B3, backward outer primer; FIP, forward inner primer (comprising F1c and F2 sequences); BIP, backward inner primer (comprising B1c and B2 sequences); LF, loop forward primer; LB = loop backward primer. bp, base pairs.

<i>Schisto</i> -LAMP	Primer Sets	Sequence 5'→3'	Length (bp)	Ref.
<i>S. mansoni</i>	F3	TTATCGTCTATAGTACGGTAGG	22	[45]
	B3	ATACTTTAACCCCCACCAA	19	
	FIP	GCCAAGTAGAGACACAAACATCTT-TGGGTAAGGTAGAAAATGTTGT	47	
	BIP	AGAAGTGTTTAACTTGATGAAGGGG-AAACAAAACCGAAACCACTA	45	
<i>S. haematobium</i>	F3	CTTCTAAGCCCCGCGATA	18	[44]
	B3	GCGCATTACACTTGGTCT	18	
	FIP	TACCCCTAACTTCGTGGTCTCC-CCCCCTATTTTAGGGTGC	41	
	BIP	CTCCCTATATAACATGGCGAGTAAG-ACTATGAAATCAGTGTTTTTCGG	48	
<i>S. bovis</i>	F3	TTCATTGTTAGGTTGCGT	18	[42]
	B3	TCTATATTCTACTCTAATCCCTCT	24	
	FIP	TCAGTATCATCTCAAACATCACACT-AGTAGTATGTTCTGTCTTAAGTT	48	
	BIP	TTTGTAGTACCTCTGGTTTACATCA-TTCACTCTCAGACTCTACAT	45	
	LF	ACTTAGACCATGAACATCAACCTAT	25	
	LB	TACTAAGTGAGAGTAATCGAACACC	25	
<i>Schistosoma</i> spp.	F3	TTGACCGGGGTACCTAGC	18	[42]
	B3	CGTGAATGGCAAGCCAAAC	19	
	FIP	ATCGCCCTTGGCAGATCAGG-CTGTGCTATGCCCTGATGG	39	
	BIP	ATATGCATGCAAATCCGCCCCG-CGGATCGCTTCAACAGTGTA	43	
	LF	CAGATCAGGCAACCCGAAAG	22	

3. Results

3.1. *Schisto*-LAMP Assays Performance

The results obtained in testing the different *Schisto*-LAMP assays against both the hybrid schistosomes gDNA and pure *Schistosoma* species used as controls are shown in Figure 1. All DNA samples tested positive by the genus-specific LAMP. The species-specific LAMP for detecting *S. haematobium* amplified all DNA samples with the exception of *S. bovis* and *S. mansoni* DNA. As expected, the species-specific LAMP for *S. mansoni* only amplified DNA from this parasite. Finally, the species-specific LAMP for *S. bovis* amplified both pure *S. bovis* DNA and *S. bovis*-*S. haematobium* x *S. bovis* hybrid parasite DNA.

3.2. Sensitivity of Genus-Specific-LAMP Assay in Detection of Hybrid Schistosomes

The genus-specific LAMP assay detection limit was different for the different hybrid schistosomes tested (Figure 2). The hybrids Sb-Sh/Sh and Sh-Sh/Sb DNA amplification detection limit was 0.1 ng/μL, whereas the hybrids Sh-Sb/Sb and Sb-Sh/Sh (Corsican hybrid) detection limit was 0.01 ng/μL. The lowest limit of detection was 0.001 ng/μL for hybrid Sb-Sh/Sb.

3.3. Detection Limit of Genus-Specific LAMP Assay in Simulated Human Urine Samples

The detection limit of genus-specific LAMP for hybrid schistosomes in simulated urine samples spiked with serial dilutions of gDNA is shown in Figure 3. As observed by colorimetric change, the sensitivity was generally lower when using the urine samples without prior extraction of DNA (for Sh-Sb/Sb: 0.1 ng/ μ L; Sh-Sh/Sb and Sb-Sh/Shc: 1 ng/ μ L) than when using a commercial kit for extraction (for Sh-Sb/Sb: 0.01 ng/ μ L; Sh-Sh/Sb: 0.001 ng/ μ L and Sb-Sh/Sh^c: 0.1 ng/ μ L). It should be noted that we obtained the same detection limit of genus-specific LAMP assay for hybrid Sb-Sh/Sb using both procedures for analysis (0.001 ng/ μ L). Unexpectedly, hybrid Sb-Sh/Sh did not amplify using the simple heat method but did when a prior DNA extraction was carried out, reaching a limit of detection of 0.001 ng/ μ L.

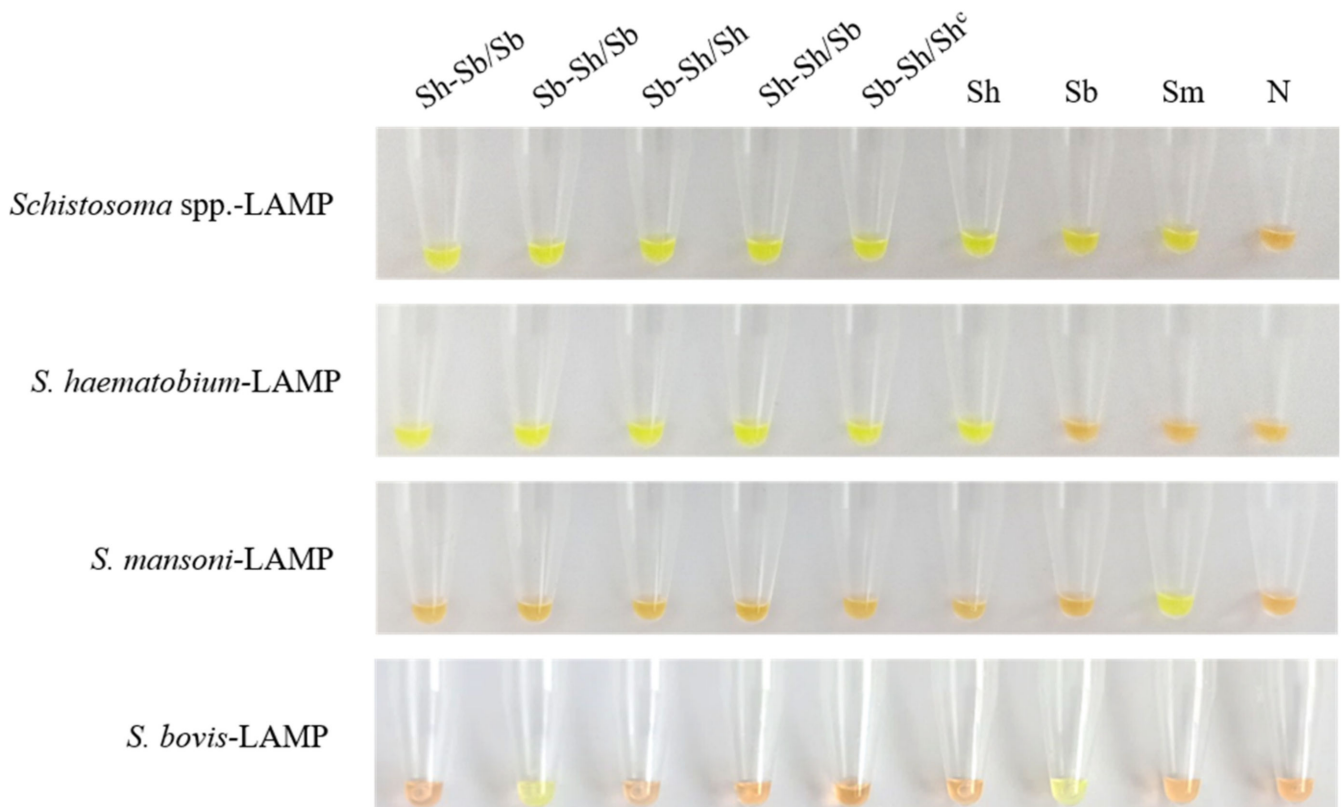


Figure 1. Schisto-LAMP assays performance in testing DNA samples from both pure *Schistosoma* species and hybrids. *Schistosoma* spp.-LAMP, the genus-specific LAMP for detecting several schistosome species; *S. haematobium*-LAMP, *S. mansoni*-LAMP and *S. bovis*-LAMP, the species-specific LAMP assays for detecting *S. haematobium*, *S. mansoni* and *S. bovis*, respectively. Sh-Sb/Sb, Sb-Sh/Sb, Sb-Sh/Sh, Sh-Sh/Sb, DNA from schistosomes hybrids from Agboville. Sb-Sh/Sh^c, corsican hybrid schistosome. Sh, Sb, Sm, DNA from pure *S. haematobium*, *S. bovis* and *S. mansoni*, respectively. N, negative control (no DNA template).

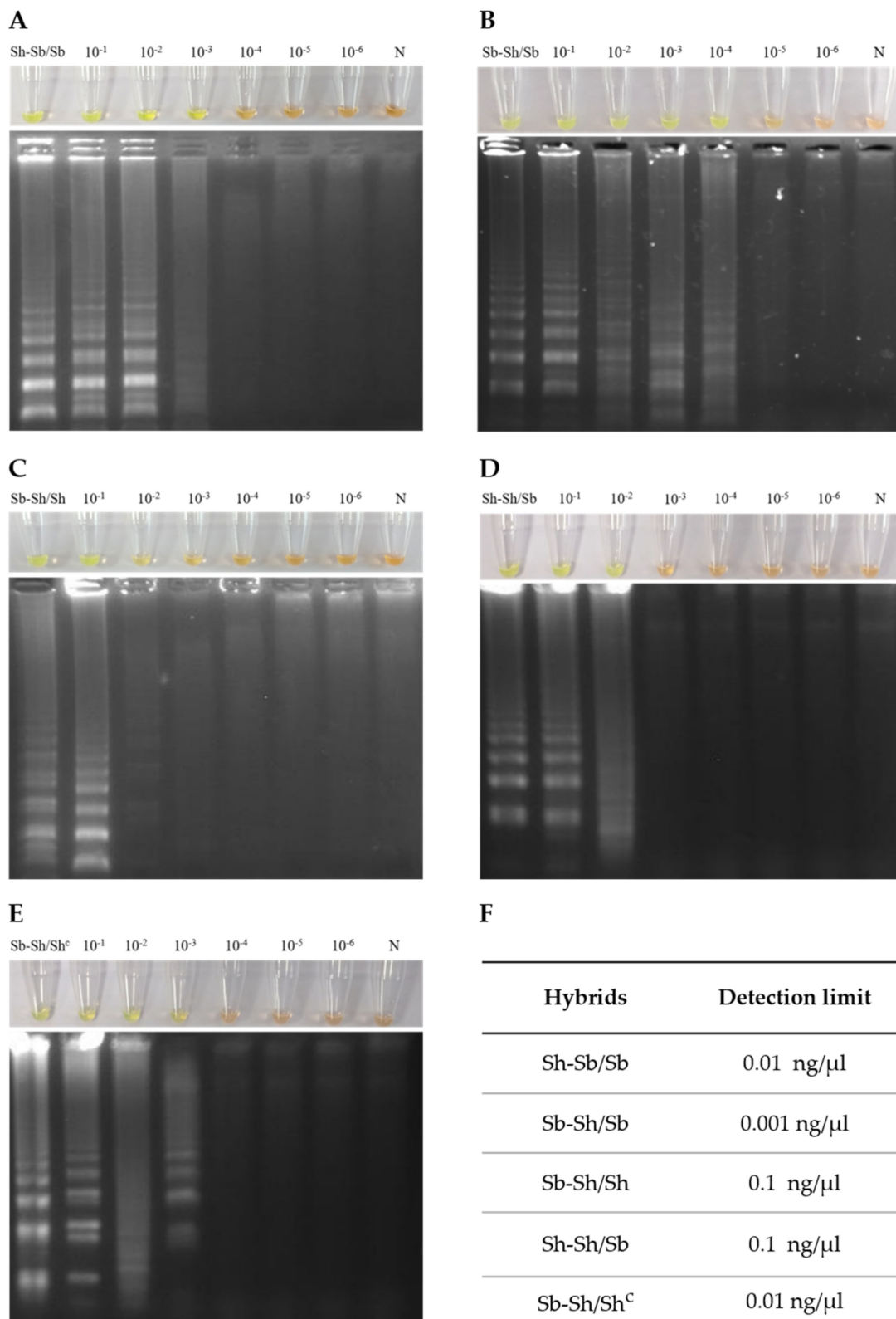


Figure 2. Assessment of genus-specific LAMP analytical sensitivity for hybrid schistosomes using gDNA serial dilutions. The figure shows the genus-specific LAMP results by color change (top) and in agarose electrophoresis (bottom) for each hybrid schistosome tested: (A) Sh-Sb/Sb; (B) Sb-Sh/Sb; (C) Sb-Sh/Sh; (D) Sh-Sh/Sb and (E) Sb-Sh/Sh^c. (F) Summary table indicating the genus-specific LAMP detection limit for detecting each hybrid. Lanes 10⁻¹–10⁻⁶: 10-fold serial dilutions. N, negative control (no DNA template).

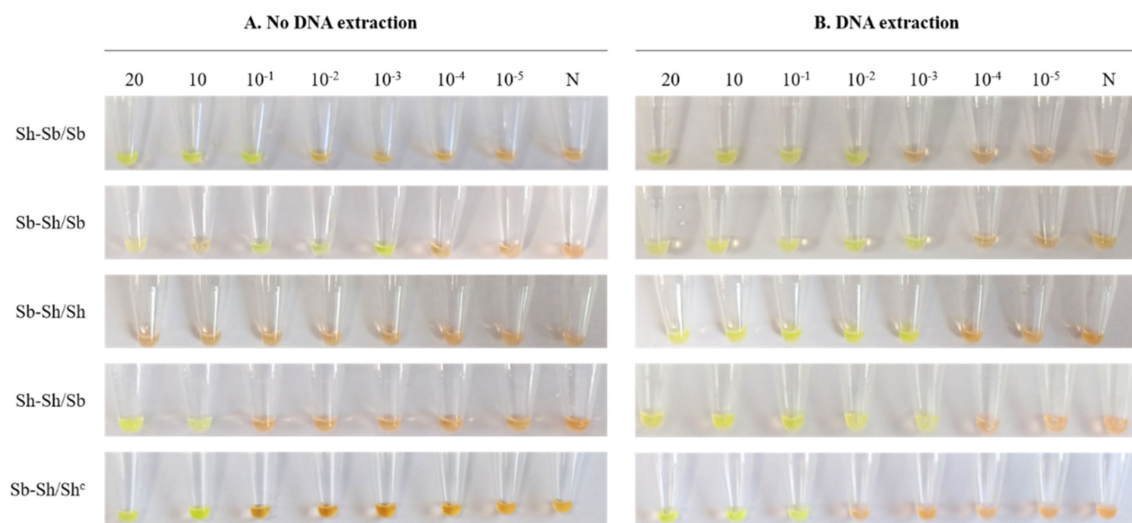


Figure 3. Sensitivity of the genus-specific LAMP assay in simulated human urine samples artificially spiked with gDNA from different hybrid schistosomes. **(A)** Sensitivity assessment of LAMP when performing a simple heating method from serial dilutions of hybrid schistosomes gDNA. **(B)** Sensitivity assessment of LAMP when performing the DNA extraction with the i-genomic Urine DNA Extraction Mini Kit (Intron Biotechnology, UK) from serial dilutions of hybrid schistosomes gDNA. Lanes 20, 10 and 10^{-1} – 10^{-5} : 20 ng, 10 ng and 10-fold serial dilutions, respectively; Sh-Sb/Sb, Sb-Sh/Sb, Sb-Sh/Sh, Sh-Sh/Sb, and Sb-Sh/Sh^c: gDNA from hybrid schistosomes; N: negative controls (no DNA template).

4. Discussion

Schistosoma species hybridization in nature is an emergent issue for public health [4,6]. Molecular data from hybridizations between schistosome collections have identified new species distributions [46], interspecies both human-specific and animal-specific hybridization [22,47–49], and surprising host associations and multi-host transmission [23,50,51]. Molecular detection of the hybrid schistosomes adds a new perspective to the diagnosis, epidemiology and control of schistosomiasis.

In this work, we tested our previously developed species-specific LAMP assays for *S. haematobium* [44], *S. mansoni* [45], *S. bovis* and also the genus-specific LAMP for the simultaneous detection of several *Schistosoma* species [42] against both gDNA from pure and, for the first time, hybrid schistosomes. These hybrids were obtained in studies conducted in Côte d’Ivoire [26] and Corsica, France [19], and subsequently well characterized by amplification and sequencing of a partial fragment of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 (cox1) and the complete nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS).

As expected, in our trials, species-specific LAMP for *S. mansoni* only amplified DNA from pure parasite but not from other schistosomes nor hybrids *S. bovis*-*S. haematobium* or *S. haematobium*-*S. bovis*, thus corroborating again its high specificity in detection of *S. mansoni*. The *S. mansoni*-LAMP was originally designed on a 620 bp sequence corresponding to a specific mitochondrial *S. mansoni* minisatellite DNA region [52] and has been already specifically tested by our group in stool samples from experimentally infected mice [45], in both human stool and snail samples in field conditions [53], and also in human urine samples [54]. Notwithstanding, it should be very interesting to assess this *S. mansoni*-LAMP in *S. mansoni*-*S. haematobium* hybrid parasites detection since these hybrid forms have been already described in a study carried out in schoolchildren from northern Senegal [49] and, more recently, in a migrant boy from Côte d’Ivoire entering France [55].

The species-specific LAMP for *S. bovis* amplified gDNA from pure *S. bovis* but not from *S. haematobium* nor *S. mansoni*, showing its high specificity in detecting only that species. The two hybrids with a *S. haematobium* mitochondrial (cox1) profile (Sh-Sb/Sb and Sh-Sh/Sb) did not amplify. Unexpectedly, among those hybrids with a *S. bovis* mitochondrial (cox1) profile (Sb-Sh/Sb, Sb-Sh/Sh, and Sb-Sh/Sh^c), the only one amplified was *S. bovis*-*S.*

haematobium/*S. bovis* but not those with a *S. haematobium* double-banded ITS rDNA profile. Our *S. bovis*-LAMP is based on a 678 bp sequence derived from mitochondrial NADH subunit 1 (NADH-1) first reported by Xiao et al. (2010). Sequences generated from the mitochondrial (mt) DNA, including *cox1* and NADH 1, are the most commonly used mitochondrial markers for studies on flatworms helping to establish the population and genetic relationship among *Schistosoma* species [56]. mtDNA is usually maternally inherited in almost all metazoans and is considered to be clonal and rarely or never undergoes recombination. Nevertheless, mtDNA rapidly accumulate mutations over time and shows a higher level of divergence among species relative to intra-specific variation [47,57]. This could be a possible explanation for lack of amplification in both hybrid Sb-Sh/Sh (from Côte d'Ivoire) and Sb-Sh/Sh^c (from Corsica) profiles. The fact that only the hybrid Sb-Sh/Sb was amplified by *S. bovis*-specific LAMP may be interpreted because the hybrid line is the result of an initial cross between a male *S. haematobium* and a female *S. bovis*, leading to introgression of *S. bovis* mtDNA into *S. haematobium* [2], most likely favoring the amplification of the *S. bovis* profile.

As expected, the genus-specific LAMP achieved DNA amplification of pure *Schistosoma* species (*S. mansoni*, *S. haematobium* and *S. bovis*) as verified previously by our group [42], but also, and very interestingly, all hybrid schistosomes tested. The *Schistosoma* spp.-LAMP design is based on a 457 bp ITS-1 sequence type from *S. haematobium* [58]. ITS-1 and ITS-2 are sequences of non-functional RNA situated between structural ribosomal RNAs on a common precursor transcript. ITS-2 has been widely used in trematode identification because it is usually conserved within species but more variable among species [59,60]. The schistosome ITS-2 is particularly powerful marker to detect introgression. This region can retain both parental copies for several generations before they are homogenized by concerted evolution, the nuclear DNA profiles resulting in double chromatogram peaks at the species-specific mutation sites [6]. On the other hand, the schistosome ITS-1 contains an original main repeating sequence unit from the 3' end of the 18S rRNA gene which, in turn, contains a sub-repeat that varies slightly in size and composition [61]. There is a high degree of sequence conservation between the repeats, but variation in sequence patterns and their number occur both within and between species. For example, the ITS-1 region of *S. haematobium* contains two tandemly repeated elements, whereas *S. japonicum* group of species contains as many as seven repeats [62]. In general, multiple repeats and intra-individual variation in numbers and abundance of these is a feature of the Asian schistosomes (*S. japonicum* and *S. indicum* groups), but not generally of African schistosomes (*S. mansoni* and *S. haematobium* groups), in which an absence of intra-individual variation in the ITS-1 was reported [63]. In this regard, since the hybrid schistosomes tested has been molecularly characterized by analysis of mitochondrial *cox1* as *S. haematobium*/*S. bovis* species designation (hence, African schistosomes), our genus-specific LAMP could detect the hybrids probably because of that lack of intra-individual variation in the ITS-1 type targeted sequence. Additionally, processes such as hybridization could cause the sharing of different ITS types among *Schistosoma* species [57], which would likely affect the sensitivity in detecting gDNA from the different hybrid specimens. In this sense, using *Schistosoma* spp.-LAMP, we previously reported a limit of detection for pure *S. haematobium* and *S. bovis* species of 0.1 pg and 10 pg, respectively [42]; however, a lower sensitivity ranging from 100 pg to 1 pg was now obtained when testing the different crossing of *S. haematobium* and *S. bovis* species. Interestingly, for hybrid Sb-Sh/Sb a limit of detection 10 times higher than for pure *S. bovis* was obtained (1 pg vs. 10 pg). Despite the variation in sensitivity of the *Schistosoma* spp.-LAMP between the detection of pure *Schistosoma* species and hybrid forms, it is very important to highlight the possibility of amplifying both pure and hybrid schistosomes in order to use LAMP as a single molecular tool for the diagnosis and surveillance of schistosomiasis, mainly in endemic areas of the disease. As mentioned above for *S. mansoni*-LAMP, it would also be very interesting to test if the *Schistosoma* spp.-LAMP assay (that detects pure *S. mansoni*) could amplify the more surprising hybridization between *S. mansoni* and *S. haematobium* that infect humans [6,55].

Similarly remarkably, the species-specific LAMP for *S. haematobium* amplified all gDNA from hybrid forms in addition to the pure *S. haematobium* gDNA. Our *S. haematobium*-LAMP is based on a 2522 bp sequence of *S. haematobium* ribosomal intergenic spacer (IGS) DNA (GenBank: AJ223838) [64] that amplifies a highly specific sub-sequence target of 199 bp of that species [44]. The IGS of *Schistosoma* species contains many repeats, and recombination is a relatively frequent event, although sequences of *S. haematobium* are well conserved within the IGS [64]. Since the molecular characterization of the hybrids showed a *S. haematobium* signature (either by *cox1* or ITS-2 genetic profiles), amplification of the *S. haematobium* IGS sequence could be possible in all hybrid schistosomes tested.

Regarding urine samples analysis, we are aware that our *Schistosoma* spp.-LAMP has not been tested with clinical specimens, but results obtained in simulated human urine samples indicate that, although with some differences, the LAMP test is sensitive enough to detect hybrid schistosomes at a low level in urine. Better results were obtained when applying a commercial kit for DNA extraction than heated urine, because of the well-known effectiveness of this procedure to isolate genomic DNA from urine samples suitable for further molecular analyses [65]. However, amplification (with the unexplainable exception in hybrid Sb-Sh/Sh) was also obtained just with heated whole urine without prior DNA extraction at an acceptable level. This inexpensive and simple rapid-heating procedure could be potentially very useful under certain circumstances when a large number of samples must be tested, mainly in low-resource settings in endemic areas.

5. Conclusions

In conclusion, the results of this preliminary study demonstrated that the genus-specific LAMP assay could be a potential molecular tool to be used for detection, not only for different pure schistosome species, but also for hybrids *S. haematobium*-*S. bovis* in urine samples. Although further research for evaluation of the assay for the application in clinical samples is required, the method is potentially adaptable for field diagnosis and disease surveillance in schistosomiasis endemic areas where human infections by schistosome hybrids are increasingly common.

Author Contributions: Conceptualization, B.C.-V., P.F.-S. and A.M.; Methodology, B.C.-V., P.F.-S., B.F.-S. and J.G.-B.D.; Investigation, B.C.-V., P.F.-S., B.F.-S. and J.G.-B.D.; Project administration, P.F.-S.; Resources, J.B., E.K.A. and A.O.P.; writing—original draft preparation, B.C.-V., P.F.-S. and A.M.A.; writing—review and editing, B.C.-V., P.F.-S., A.M., J.B., E.K.A. and A.O.; Funding acquisition, P.F.-S. and A.M. 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.), PI19/01727 (P.F.-S.), European Union cofinancing 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 cofinancing by Santander Bank, and Predoctoral Fellowship Program of Junta de Castilla y León cofinancing by Fondo Social Europeo.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

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. Jones, K.E.; Patel, N.G.; Levy, M.A.; Storeygard, A.; Balk, D.; Gittleman, J.L.; Daszak, P. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* **2008**, *451*, 990–993. [[CrossRef](#)]
2. Huyse, T.; Webster, B.L.; Geldof, S.; Stothard, J.R.; Diaw, O.T.; Polman, K.; Rollinson, D. Bidirectional introgressive hybridization between a cattle and human schistosome species. *PLoS Pathog.* **2009**, *5*, e1000571. [[CrossRef](#)]

3. Keesing, F.; Belden, L.K.; Daszak, P.; Dobson, A.; Harvell, C.D.; Holt, R.D.; Hudson, P.; Jolles, A.; Jones, K.E.; Mitchell, C.E.; et al. Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. *Nature* **2010**, *468*, 647–652. [CrossRef]
4. King, K.C.; Stelkens, R.B.; Webster, J.P.; Smith, D.F.; Brockhurst, M.A. Hybridization in parasites: Consequences for adaptive evolution, pathogenesis, and public health in a changing world. *PLoS Pathog.* **2015**, *11*, 1–12. [CrossRef]
5. Webster, J.P.; Gower, C.M.; Knowles, S.C.L.; Molyneux, D.H.; Fenton, A. One health—An ecological and evolutionary framework for tackling Neglected Zoonotic Diseases. *Evol. Appl.* **2016**, *9*, 313–333. [CrossRef] [PubMed]
6. Leger, E.; Webster, J.P. Hybridizations within the genus *Schistosoma*: Implications for evolution, epidemiology and control. *Parasitology* **2017**, *144*, 65–80. [CrossRef] [PubMed]
7. Colley, D.G.; Bustinduy, A.L.; Secor, W.E.; King, C.H. Human schistosomiasis. *Lancet* **2014**, *383*, 2253–2264. [CrossRef]
8. GBD 2016 Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980–2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet* **2017**, *390*, 1151–1210. [CrossRef]
9. World Health Organization. 2018. Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis> (accessed on 18 November 2020).
10. Ohmae, H.; Sinuon, M.; Kirinoki, M.; Matsumoto, J.; Chigusa, Y.; Socheat, D.; Matsuda, H. Schistosomiasis mekongi: From discovery to control. *Parasitol. Int.* **2004**, *53*, 135–142. [CrossRef]
11. Webster, B.L.; Southgate, V.R.; Timothy, D.; Littlewood, J. A revision of the interrelationships of *Schistosoma* including the recently described *Schistosoma guineensis*. *Int. J. Parasitol.* **2006**, *36*, 947–955. [CrossRef] [PubMed]
12. Latif, B.; Heo, C.C.; Razuin, R.; Shamalaa, D.V.; Tappe, D. Autochthonous human schistosomiasis, Malaysia. *Emerg. Infect. Dis.* **2013**, *19*, 1340–1341. [CrossRef]
13. Weyher, A.H.; Phillips-Conroy, J.E.; Fischer, K.; Weil, G.J.; Chansa, W.; Fischer, P.U. Molecular identification of *Schistosoma mattheei* from feces of kinda (*Papio cynocephalus kindae*) and grayfoot baboons (*Papio ursinus griseipes*) in Zambia. *J. Parasitol.* **2010**, *96*, 184–190. [CrossRef]
14. De Bont, J.; Vercruysse, J. The epidemiology and control of cattle schistosomiasis. *Parasitol. Today* **1997**, *13*, 255–262. [CrossRef]
15. Webster, B.L.; Tchuem Tchuenté, L.A.; Jourdan, J.; Southgate, V.R. The interaction of *Schistosoma haematobium* and *S. guineensis* in Cameroon. *J. Helminthol.* **2005**, *79*, 193–197. [CrossRef] [PubMed]
16. Southgate, V.R.; van Wijk, H.B.; Wright, C.A. Schistosomiasis at Loum, Cameroun; *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma haematobium*, *S. intercalatum* and their natural hybrid. *Z. Parasitenkd.* **1976**, *49*, 145–159. [CrossRef] [PubMed]
17. Webster, B.L.; Southgate, V.R.; Tchuem Tchuenté, L.-A. Isoenzyme analysis of *Schistosoma haematobium*, *S. intercalatum* and their hybrids and occurrences of natural hybridization in Cameroon. *J. Helminthol.* **2003**, *77*, 269–274. [CrossRef]
18. Webster, B.L.; Alharbi, M.H.; Kayuni, S.; Makaula, P.; Halstead, F.; Christiansen, R.; Juziwelo, L.; Stanton, M.C.; LaCourse, E.J.; Rollinson, D.; et al. Schistosome interactions within the *Schistosoma haematobium* group, Malawi. *Emerg. Infect. Dis.* **2019**, *25*, 1245–1247. [CrossRef]
19. Boissier, J.; Grech-Angelini, S.; Webster, B.L.; Allienne, J.F.; Huyse, T.; Mas-Coma, S.; Toulza, E.; Barré-Cardi, H.; Rollinson, D.; Kincaid-Smith, J.; et al. Outbreak of urogenital schistosomiasis in Corsica (France): An epidemiological case study. *Lancet Infect. Dis.* **2016**, *16*, 971–979. [CrossRef]
20. De la Torre-Escudero, E.; Pérez-Sánchez, R.; Manzano-Román, R.; Oleaga, A. *Schistosoma bovis*-host interplay: Proteomics for knowing and acting. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2017**, *215*, 30–39. [CrossRef] [PubMed]
21. Kincaid-Smith, J.; Rey, O.; Toulza, E.; Berry, A.; Boissier, J. Emerging Schistosomiasis in Europe: A need to quantify the risks. *Trends Parasitol.* **2017**, *33*, 600–609. [CrossRef]
22. Oey, H.; Zakrzewski, M.; Gravermann, K.; Young, N.D.; Korhonen, P.K.; Gobert, G.N.; Nawaratna, S.; Hasan, S.; Martínez, D.M.; You, H.; et al. Whole-genome sequence of the bovine blood fluke *Schistosoma bovis* supports interspecific hybridization with *S. haematobium*. *PLoS Pathog.* **2019**, *15*, 1–16. [CrossRef]
23. Savassi, B.A.E.S.; Mouahid, G.; Lasica, C.; Mahaman, S.D.K.; Garcia, A.; Courtin, D.; Allienne, J.F.; Ibikounlé, M.; Moné, H. Cattle as natural host for *Schistosoma haematobium* (Bilharz, 1852) Weinland, 1858 x *Schistosoma bovis* Sonsino, 1876 interactions, with new cercarial emergence and genetic patterns. *Parasitol. Res.* **2020**, *119*, 2189–2205. [CrossRef]
24. De Bont, J.; Vercruysse, J.; Southgate, V.R.; Rollinson, D.; Kaukas, A. Cattle Schistosomiasis in Zambia. *J. Helminthol.* **1994**, *68*, 295–299. [CrossRef] [PubMed]
25. Charlier, J.; van der Voort, M.; Kenyon, F.; Skuce, P.; Vercruysse, J. Chasing helminths and their economic impact on farmed ruminants. *Trends Parasitol.* **2014**, *30*, 361–367. [CrossRef] [PubMed]
26. Angora, E.K.; Allienne, J.F.; Rey, O.; Menan, H.; Touré, A.O.; Coulibaly, J.T.; Raso, G.; Yavo, W.; N’Goran, E.K.; Utzinger, J.; et al. High prevalence of *Schistosoma haematobium* x *Schistosoma bovis* hybrids in schoolchildren in Côte d’Ivoire. *Parasitology* **2020**, *147*, 287–294. [CrossRef] [PubMed]
27. Pennance, T.; Allan, F.; Emery, A.; Rabone, M.; Cable, J.; Garba, A.D.; Hamidou, A.A.; Webster, J.P.; Rollinson, D.; Webster, B.L. Interactions between *Schistosoma haematobium* group species and their *Bulinus* spp. intermediate hosts along the Niger River Valley. *Parasites Vectors* **2020**, *13*, 1–15. [CrossRef] [PubMed]
28. Soentjens, P.; Cnops, L.; Huyse, T.; Yansouni, C.; De Vos, D.; Bottieau, E.; Clerinx, J.; Van Esbroeck, M. Diagnosis and clinical management of *Schistosoma haematobium*-*Schistosoma bovis* hybrid infection in a cluster of travelers returning from Mali. *Clin. Infect. Dis.* **2016**, *63*, 1626–1629. [CrossRef]

29. Holtfreter, M.C.; Moné, H.; Müller-Stöver, I.; Mouahid, G.; Richter, J. *Schistosoma haematobium* infections acquired in Corsica, France, August 2013. *Eurosurveillance* **2014**, *19*, 2013–2015. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Moné, H.; Holtfreter, M.C.; Mouahid, G.; Richter, J. Difficulties in Schistosomiasis assessment, Corsica, France. *Emerg. Infect. Dis.* **2016**, *22*, 762–763. [[CrossRef](#)]
31. Bärenbold, O.; Raso, G.; Coulibaly, J.T.; N’Goran, E.K.; Utzinger, J.; Vounatsou, P. Estimating sensitivity of the Kato-Katz technique for the diagnosis of *Schistosoma mansoni* and hookworm in relation to infection intensity. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2017**, *11*, 1–14. [[CrossRef](#)]
32. Chuah, C.; Gobert, G.N.; Latif, B.; Heo, C.C.; Leow, C.Y. Schistosomiasis in Malaysia: A review. *Acta Trop.* **2019**, *190*, 137–143. [[CrossRef](#)]
33. Weerakoon, K.G.A.D.; Gobert, G.N.; Cai, P.; McManus, D.P. Advances in the diagnosis of human schistosomiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **2015**, *28*, 939–967. [[CrossRef](#)]
34. Hinz, R.; Schwarz, N.G.; Hahn, A.; Frickmann, H. Serological approaches for the diagnosis of schistosomiasis—A review. *Mol. Cell. Probes* **2017**, *31*, 2–21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. McManus, D.P.; Dunne, D.W.; Sacko, M.; Utzinger, J.; Vennervald, B.J.; Zhou, X.N. Schistosomiasis. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2018**, *4*, 1–19. [[CrossRef](#)]
36. Weerakoon, K.G.; Gordon, C.A.; McManus, D.P. DNA diagnostics for schistosomiasis control. *Trop. Med. Infect. Dis.* **2018**, *3*, 81. [[CrossRef](#)]
37. Schols, R.; Carolus, H.; Hammoud, C.; Mulero, S.; Mudavanhu, A.; Huyse, T. A rapid diagnostic multiplex PCR approach for xenomonitoring of human and animal schistosomiasis in a “One Health” context. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2019**, *113*, 722–729. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. 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](#)]
39. Wong, Y.P.; Othman, S.; Lau, Y.L.; Radu, S.; Chee, H.Y. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A versatile technique for detection of micro-organisms. *J. Appl. Microbiol.* **2018**, *124*, 626–643. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Mori, Y.; Notomi, T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): Expansion of its practical application as a tool to achieve universal health coverage. *J. Infect. Chemother.* **2020**, *26*, 13–17. [[CrossRef](#)]
41. Avendaño, C.; Patarroyo, M.A. Loop-mediated isothermal amplification as point-of-care diagnosis for neglected parasitic infections. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 7981. [[CrossRef](#)]
42. 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, M.A.; et al. Molecular markers for detecting *Schistosoma* species by Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Dis. Markers* **2020**, *2020*, 1–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Lewis, F.A.; Liang, Y.S.; Raghavan, N.; Knight, M. The NIH-NIAID schistosomiasis resource center. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2008**, *2*, 1–4. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Gandasegui, J.; Fernández-Soto, P.; Carranza-Rodríguez, C.; Pérez-Arellano, J.L.; Vicente, B.; López-Abán, J.; Muro, A. The rapid-heat LAMP pellet method: A potential diagnostic method for human urogenital schistosomiasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2015**, *9*, 1–23. [[CrossRef](#)]
45. Fernández-Soto, P.; Gandasegui Arahuetes, J.; Sánchez Hernández, A.; López Abán, J.; Vicente Santiago, B.; Muro, A. A Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) assay for early detection of *Schistosoma mansoni* in stool samples: A diagnostic approach in a murine model. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2014**, *8*, e3126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Pennance, T.; Ame, S.M.; Amour, A.K.; Suleiman, K.R.; Allan, F.; Rollinson, D.; Webster, B.L. Occurrence of *Schistosoma bovis* on Pemba Island, Zanzibar: Implications for urogenital schistosomiasis transmission monitoring. *Parasitology* **2018**, *145*, 1732. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Webster, B.L.; Diaw, O.T.; Seye, M.M.; Webster, J.P.; Rollinson, D. Introgressive hybridization of *Schistosoma haematobium* group species in Senegal: Species barrier break down between ruminant and human schistosomes. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2013**, *7*, e2110. [[CrossRef](#)]
48. Léger, E.; Garba, A.; Hamidou, A.A.; Webster, B.L.; Pennance, T.; Rollinson, D.; Webster, J.P. Introgressed animal schistosomes *Schistosoma curassoni* and *S. bovis* naturally infecting humans. *Emerg. Infect. Dis.* **2016**, *22*, 2212–2214. [[CrossRef](#)]
49. Huyse, T.; Van Den Broeck, F.; Hellemans, B.; Volckaert, F.A.M.; Polman, K. Hybridisation between the two major African schistosome species of humans. *Int. J. Parasitol.* **2013**, *43*, 687–689. [[CrossRef](#)]
50. Catalano, S.; Sène, M.; Diouf, N.D.; Fall, C.B.; Borlase, A.; Léger, E.; Bâ, K.; Webster, J.P. Rodents as natural hosts of zoonotic *Schistosoma* species and hybrids: An epidemiological and evolutionary perspective from West Africa. *J. Infect. Dis.* **2018**, *218*, 429–433. [[CrossRef](#)]
51. Catalano, S.; Léger, E.; Fall, C.B.; Borlase, A.; Diop, S.D.; Berger, D.; Webster, B.L.; Faye, B.; Diouf, N.D.; Rollinson, D.; et al. Multihost transmission of *Schistosoma mansoni*. *Emerg. Infect. Dis.* **2020**, *26*, 1234–1242.
52. Pena, H.B.; De Souza, C.P.; Simpson, A.J.G.; Pena, S.D.J. Intracellular promiscuity in *Schistosoma mansoni*: Nuclear transcribed DNA sequences are part of a mitochondrial minisatellite region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 915–919. [[CrossRef](#)]
53. Gandasegui, J.; Fernández-Soto, P.; Muro, A.; Simões Barbosa, C.; Lopes de Melo, F.; Loyo, R.; de Souza Gomes, E.C. 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*, 1–16. [[CrossRef](#)]

54. Fernández-Soto, P.; Gandasegui, J.; Rodríguez, C.C.; Pérez-Arellano, J.L.; Crego-Vicente, B.; García-Bernalt Diego, J.; López-Abán, J.; Vicente, B.; Muro, A. Detection of *Schistosoma mansoni*-derived DNA in human urine samples by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0214125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Le Govic, Y.; Kincaid-Smith, J.; Allienne, J.F.; Rey, O.; de Gentile, L.; Boissier, J. *Schistosoma haematobium*- *Schistosoma mansoni* hybrid parasite in migrant boy, France, 2017. *Emerg. Infect. Dis.* **2019**, *25*, 365–367. [[CrossRef](#)]
56. Zhao, G.H.; Mo, X.H.; Zou, F.C.; Li, J.; Weng, Y.B.; Lin, R.Q.; Xia, C.M.; Zhu, X.Q. Genetic variability among *Schistosoma japonicum* isolates from different endemic regions in China revealed by sequences of three mitochondrial DNA genes. *Vet. Parasitol.* **2009**, *162*, 67–74. [[CrossRef](#)]
57. Vilas, R.; Criscione, C.D.; Blouin, M.S. A comparison between mitochondrial DNA and the ribosomal internal transcribed regions in prospecting for cryptic species of platyhelminth parasites. *Parasitology* **2005**, *131*, 839–846. [[CrossRef](#)]
58. Webster, B.L.; Culverwell, C.L.; Khamis, I.S.; Mohammed, K.A.; Rollinson, D.; Stothard, J.R. DNA barcoding of *Schistosoma haematobium* on Zanzibar reveals substantial genetic diversity and two major phylogenetic groups. *Acta Trop.* **2013**, *128*, 206–217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Nolan, M.J.; Cribb, T.H. The use and implications of ribosomal DNA sequencing for the discrimination of digenean species. *Adv. Parasitol.* **2005**, *60*, 101–163. [[CrossRef](#)]
60. Cutmore, S.C.; Bennett, M.B.; Cribb, T.H. *Staphylorchis cymatodes* (Gorgoderidae: Anaporrhutinae) from carcharhiniform, orectolobiform and myliobatiform elasmobranchs of Australasia: Low host specificity, wide distribution and morphological plasticity. *Parasitol. Int.* **2010**, *59*, 579–586. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Kane, R.A.; Rollinson, D. Repetitive sequences in the ribosomal DNA internal transcribed spacer of *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma intercalatum* and *Schistosoma mattheei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1994**, *63*, 153–156. [[CrossRef](#)]
62. Dvořák, J.; Vaňáčková, Š.; Hampl, V.; Flegr, J.; Horák, P. Comparison of European *Trichobilharzia* species based on ITS1 and ITS2 sequences. *Parasitology* **2002**, *124*, 307–313. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Van Herwerden, L.; Blair, D.; Agatsuma, T. Intra- and inter-specific variation in nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 of the *Schistosoma japonicum* species complex. *Parasitology* **1998**, *116*, 311–317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Kane, R.A.; Rollinson, D. Comparison of the intergenic spacers and 3' end regions of the large subunit (28S) ribosomal RNA gene from three species of *Schistosoma*. *Parasitology* **1998**, *117*, 235–242. [[CrossRef](#)]
65. El Bali, L.; Diman, A.; Bernard, A.; Roosens, N.H.C.; Dekeersmaecker, S.C.J. Comparative study of seven commercial kits for human DNA extraction from urine samples suitable for DNA biomarker-based public health studies. *J. Biomol. Tech.* **2014**, *25*, 96–110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

3.2

*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, Antonio Muro

International Journal of Molecular Sciences. 2023 Jan 3;24(1):893

RESUMEN

En el conjunto de las NTDs, aquellas causadas por parásitos son las más prevalentes y representan un importante problema de Salud Pública en muchos países en desarrollo. Dada la necesidad de nuevas herramientas de diagnóstico, existe un desarrollo continuo de técnicas rápidas, asequibles, específicas, sensibles, robustas y fáciles de usar, que pueden ayudar al control y eliminación de estas enfermedades. Teóricamente, la tecnología LAMP satisface estas características y ya se ha ensayado con éxito para el diagnóstico de diferentes NTDs causadas por parásitos como una alternativa tanto para el diagnóstico parasitológico tradicional como para el molecular mediante la PCR y sus variantes.

Por otra parte, hay que considerar que hasta el 30% de las infecciones humanas pueden ser coinfecciones y llegando a alcanzar el 80% en algunas comunidades de áreas endémicas. La esquistosomosis causada, entre otras especies, por *Schistosoma mansoni*, y la geohelmintosis, concretamente la estrongiloidosis causada por *Strongyloides stercoralis*, son las infecciones causadas por parásitos helmintos más comunes del mundo. Además, las áreas de transmisión se solapan geográficamente en regiones endémicas, aumentando la posibilidad de su coinfección. También, resulta elevada esta coinfección en viajeros, emigrantes y refugiados.

Teniendo en cuenta lo anterior, en nuestro trabajo nos planteamos la posibilidad de desarrollar un método LAMP múltiplex, que nos permitiera detectar ambos parásitos en una misma reacción. La tecnología LAMP múltiplex permite la amplificación simultánea de varias dianas en una misma reacción, haciéndose necesario para su desarrollo la utilización de distintos métodos de detección que permitan distinguir de forma específica las secuencias que se amplifican. Su complejidad es mayor que un ensayo de LAMP convencional, dependiendo de su diseño *in silico* (mayor número de dianas y, por tanto, mayor número de *primers* a utilizar) y del sistema de detección de las secuencias amplificadas (complejos y muy variables) que dificultan la estandarización de la metodología para su desarrollo. Algunos de los métodos actuales que se utilizan en la detección están basados en la incorporación de diferentes fluoróforos (con longitudes de onda de excitación y emisión específicas) y *quenchers* (atenuadores de señal) que desactivan las señales de fluorescencia generadas. El empleo de diferentes fluoróforos y *quenchers* específicos permitirá distinguir diferentes dianas en una misma reacción. La señal de fluorescencia que se genera es detectada por dispositivos de lectura a tiempo real que permiten la cuantificación de los resultados. El método DARQ (*detection of amplification by release of quenching*) o detección de la amplificación por liberación de

quencher, es uno de los métodos de detección descritos para el desarrollo de LAMP múltiplex que presenta menor complicación en su diseño al modificar con fluoróforos y *quenchers* los *primers* específicos del propio ensayo LAMP sin necesidad de utilizar sondas complejas.

En nuestro trabajo, para la detección simultánea de *S. mansoni* y *Strongyloides* spp., optamos por adaptar la tecnología DARQ-LAMP a una combinación de ensayos LAMP (SMIT-LAMP y *Strong*-LAMP) ya desarrollados y evaluados con éxito por nuestro grupo para la detección de ambos parásitos en modelos experimentales de esquistosomosis y estrongiloidosis, así como en el análisis de muestras clínicas tanto en laboratorio como en campo. Se realizaron pruebas de optimización de las amplificaciones DARQ-LAMP utilizando simultáneamente ADN genómico de *S. mansoni* y *S. venezuelensis* procedentes de ciclos experimentales de infección de nuestro laboratorio. Se comprobó también su funcionamiento con reactivos previamente estabilizados y almacenados a temperatura ambiente.

De este trabajo se derivan algunas conclusiones relevantes: *i*) se ha desarrollado por primera vez un método LAMP basado en la metodología DARQ para la detección simultánea de *S. mansoni* y *Strongyloides* spp.; *ii*) se puede realizar en un dispositivo de lectura de fluorescencia portátil de fácil lectura e interpretación de los resultados; *iii*) se puede realizar con reactivos previamente estabilizados a temperatura ambiente; *iv*) la metodología utilizada es potencialmente adaptable en el desarrollo de otros LAMP múltiplex para la detección de otros patógenos. El que se pueda realizar en un dispositivo portátil y con reactivos estabilizados, hace pensar en su potencial uso diagnóstico en condiciones reales de campo.

No obstante, nuestro trabajo presenta una serie de limitaciones que hay que señalar. En primer lugar, la ligera disminución de la sensibilidad de los ensayos DARQ-LAMP múltiplex en comparación con los ensayos LAMP individuales convencionales. También, el aumento del tiempo de reacción cuando se utilizan los reactivos previamente estabilizados. Por último, cabe destacar que se requiere de próximos estudios para llevar a cabo la validación de la eficacia del método DARQ-LAMP múltiplex en la detección de coinfecciones en muestras clínicas.



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

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



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/>).

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

have gained attention because the advantages compared to PCR-based methods due to their point-of-care (POC) use adaptation by providing simple, fast and low-cost devices to be performed potentially in low-resource settings [1,2]. A chronological development of isothermal amplification methods as well as amplification mechanisms has been reviewed and discussed recently by Glökler et al. [3]. In that timeline, amongst the most frequent and promising isothermal amplification methods applied as potential POC tools are: strand displacement amplification (SDA) [4], helicase dependent amplification (HDA) [5], rolling circle amplification (RCA) [6], recombinase polymerase amplification (RPA) [7], nucleic acid sequence based amplification (NASBA) [8] and loop-mediated isothermal amplification (LAMP) [9].

Since its original report in 2000, LAMP has been the most popular technology among researchers in terms of development and implementation, accounting for roughly 60% of all isothermal amplification assays publications [10]. LAMP allows exponential DNA amplification by strand-displacing polymerase using four to six specific primers to recognize up to six to eight sequences on the DNA template in the same reaction, compared to only two in typical PCR [9]. In combination with reverse transcriptase, LAMP can also be used for RNA amplification (RT-LAMP) [11]. Amplification and detection of nucleic acid (DNA or RNA) by LAMP has important advantages compared to PCR-based methods such as shorter reaction time (30 min vs. 3 h for PCR protocol) [12–15] and the possibility of using LAMP in POC devices, thus reducing or eliminating the use of electric power, technical equipment and expertise [16,17]. Moreover, there are a large number of possibilities and systems for reading and analyzing the results of LAMP amplifications. On the one hand, readout methods include the typical end-point analysis by agarose gel electrophoresis [9], simple naked eye colorimetric visualization by intercalating dyes [18] or metal indicators [19]. On the other hand, real-time detection is also possible in different devices by turbidity [20], adding color-change of fluorescence metal-sensitive indicators [18], unselective DNA fluorescent intercalating dyes [21] or target specific-fluorogenic probes [10]. Other approaches such as lateral flow assays (LFA) [22] and novel combinations with CRISPR-Cas Systems [23] have also been developed.

At present, real-time fluorescence is a widely used method for the detection of LAMP results, because it is very sensitive, compatible with most standard isothermal amplification devices available in labs and very useful for optimizing and checking the kinetics of amplification reactions. More specifically, target sequence-specific detection using fluorogenic probes ensures outstanding specificity towards the target, thus avoiding the detection of unspecific products accountable for false positives. Besides, this method opens the possibility for the simultaneous detection of multiple targets (multiplexing) in one LAMP assay [10]. The main application of multiplex LAMP (mLAMP) is the rapid and accurate diagnosis of infectious diseases, allowing differentiation not only of multiple species of pathogens, but also of strains or closely related species in a single assay [18,24]. Currently, a number of methods exist for multiplexing LAMP which use fluorophore-labelled probes attached to oligonucleotide sequences complementary to the target nucleic acid, including methylation-specific LAMP (MS-LAMP), assimilating probe-LAMP, fluorescence of loop primer upon self-enriching-LAMP (FLOS-LAMP), detection of amplification by release of quenching (DARQ), quenching of unincorporated amplification signal reporters (QUASR) and molecular beacon LAMP (MB-LAMP). These multiplexed LAMP methods based on fluorogenic probes have been extensively reviewed by Becherer et al. [10]. In general, in such approaches, the type of fluorophore used and the interactions between fluorophores and primers can negatively affect to the fluorescence emission, therefore the fluorophore-labelled probes must be adapted to different target sequences. This is possibly a weakness of the methodology as it requires time-consuming work for primers optimization and probe design to fine-tune the mLAMP assay. Possibly, this is the reason why published studies on multiplexed fluorescence-based detection of LAMP are still scarce and poorly reproduced.

Tanner et al. [25] reported the DARQ technique, in which multiplex detection of LAMP amplification does not need additional primer optimization or probe design, requiring only

the use of a 5'-quencher modified LAMP primer (Q-FIP; forward internal primer) annealed to 3'-fluorophore-labelled (Fd) acting as detection oligonucleotide. The strand displacement activity of the *Bst* DNA polymerase displaces the fluorophore-labelled strand from the quencher-labelled primer (or vice versa) during polymerization, allowing a colour real-time multiplexed LAMP assay. The DARQ method can potentially inhibit polymerization, thereby requiring careful titration of the amount of probe used.

As mentioned, the importance of a mLAMP lies in the possibility of specifically detecting multiple strains or genotypes of the same infectious agents as well as different co-infecting pathogens in a single reaction, thus saving time and resources in the diagnosis of infectious diseases. Approximately 30% of human infections may actually be coinfections and this rate could be as high as 80% in some human communities [26,27]. Coinfections with at least two genetically different infectious agents in the same host have been mainly studied in humans, with a special concern for parasite helminths worms [26,28]. Human helminth infections are among the most common infectious diseases, particularly in developing countries. Schistosomiasis, caused among other species by *Schistosoma mansoni* and soil-transmitted helminths, specifically strongyloidiasis caused by *Strongyloides stercoralis*, is the most common helminth infections worldwide [29]. Moreover, the transmission areas of schistosomiasis and strongyloidiasis largely overlap in tropical and subtropical regions in the human population [30–33]. Therefore, the possibility of coinfections is high, not only to people living in endemic areas, but also in travelers, migrants and refugees [34–37]. An early diagnosis accompanied by good treatment helps to limit complications. Thus, it would be of great interest to develop a mLAMP to detect both pathogens in the same reaction.

In this study, we investigate the use of our previously well-established conventional LAMP assays for *Schistosoma mansoni* DNA detection [38] and for *Strongyloides* spp. DNA detection [39] in a new duplex real-time eight-primer system based on a modified DARQ probe method. The duplex DARQ-LAMP can be performed and readout accomplished 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 POC diagnostics for schistosomiasis and strongyloidiasis.

2. Results

2.1. Setting up and Operation of DARQ-LAMP

Figure 1 shows the results of setting up the simplex DARQ-LAMP reaction for amplification of gDNA from *Schistosoma mansoni* (5 ng/ μ L) and *Strongyloides venezuelensis* (5 ng/ μ L) using different percentages of quencher probe duplex (QPD) in relation to the total amount of unlabeled FIP and supplementary $MgSO_4$ concentrations. Best results for amplification of *S. mansoni* (Figure 1A) and *S. venezuelensis* (Figure 1B) gDNA were obtained when both QPD percentages of 10% (90:10) and 15% (85:15) in relation to the total amount of unlabeled FIP in combination with total $MgSO_4$ 6 mM were used at 61 °C. Amplification trials using different QPD/ $MgSO_4$ combinations at 63 °C, 65 °C and 70 °C showed irregular and non-reproducible amplifications. Overall, the combination of 15% QPD/ $MgSO_4$ 6 mM produced a better amplification than 10% QPD/ $MgSO_4$ 6 mM, in terms of time-to-positivity (Tp) (33 min vs. 35 min for *S. mansoni* and 22 min vs. 27 min for *S. venezuelensis*) and in relative fluorescence units (RFU) values in fluorescence intensity measurements (8 RFU vs. 5.8 RFU for *S. mansoni* and 45 RFU vs. 35 RFU for *S. venezuelensis*). In general, for *S. venezuelensis* gDNA amplification, Tp was shorter and fluorescence intensity higher than those for *S. mansoni*. The combination of 15% QPD/ $MgSO_4$ 6 mM in the presence of *Bst* 2.0 WS at 61 °C was chosen as the most suitable to incorporate into all successive DARQ-LAMP mixtures for *S. mansoni* and *S. venezuelensis* amplification.

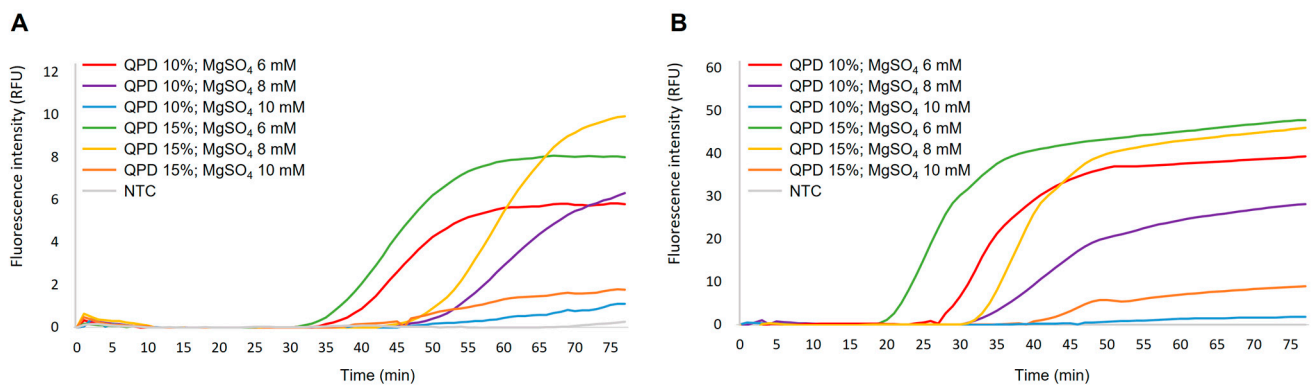


Figure 1. Setting up simplex DARQ-LAMP assays. (A) *Schistosoma mansoni* DARQ-LAMP. (B) *Strongyloides venezuelensis* DARQ-LAMP. Evaluation of 15% and 10% percentages of quencher probe duplex (QPD) in relation to the total amount of unlabeled FIP and different supplementary MgSO₄ concentrations (4, 6 and 8 mM) to obtain final MgSO₄ concentrations of 6, 8 and 10 mM are indicated. NTC, non-template control (ultrapure water instead gDNA); RFU, relative fluorescence units.

2.2. Sensitivity Assessment of Simplex DARQ-LAMP Assays

Figure 2 shows the different amplification time and fluorescence intensity in sensitivity tests using 10-fold serial dilutions of gDNA from *S. mansoni* and *Strongyloides venezuelensis*. The limit of detection in *S. mansoni* gDNA DARQ-LAMP amplification was 5 fg/μL at 116 min (Figure 2A). The limit of detection in *S. venezuelensis* gDNA DARQ-LAMP amplification was 50 pg/μL at 52 min (Figure 2B). In general, Tp and RFU values were clearly shorter and higher, respectively, for amplification of *S. venezuelensis* gDNA than for *S. mansoni*. As expected, higher concentrations of parasite gDNA were amplified more quickly, but in any case always with longer amplification times for *S. mansoni* than for *S. venezuelensis*.

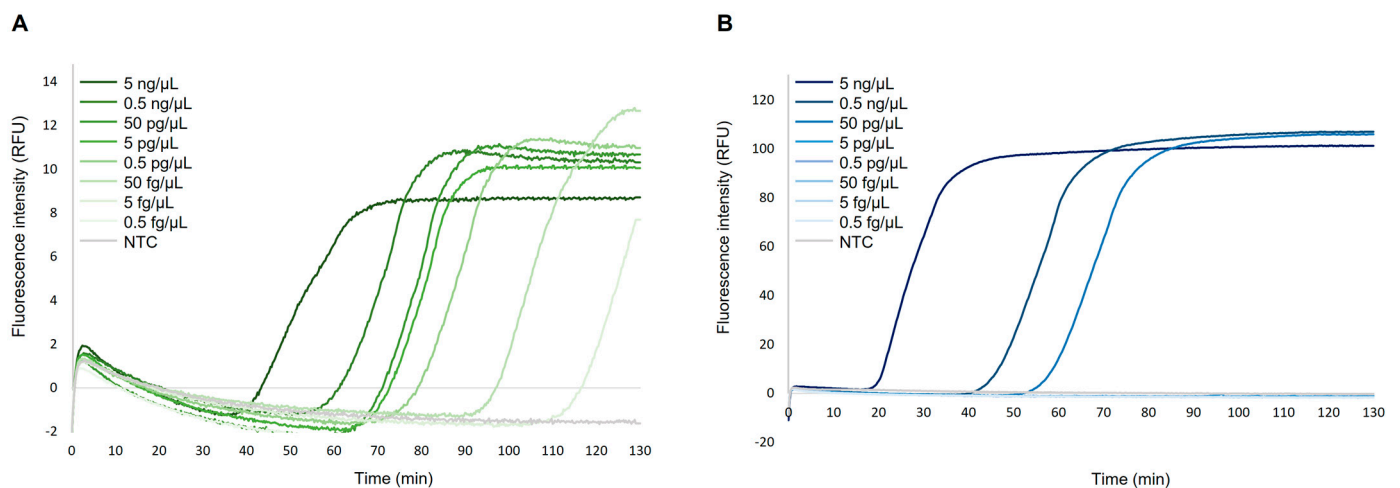


Figure 2. Sensitivity assessment of simplex DARQ-LAMP assays using the Genie III handheld device. (A) Analytical sensitivity for *Schistosoma mansoni* DARQ-LAMP reaction. (B) Analytical sensitivity for *Strongyloides venezuelensis* DARQ-LAMP reaction. The 10-fold serial dilutions (5 ng/μL to 5 fg/μL) of gDNA from parasites are represented by different shades of green (for *Sm*) and blue (for *Sv*). NTC, non-template control (ultrapure water instead gDNA) is represented by grey lines in both cases. RFU, relative fluorescence units.

2.3. Operation of Duplex DARQ-LAMP Assay

Duplex DARQ-LAMP worked well, allowing amplification of both parasites' gDNA simultaneously when using different combinations of gDNA concentrations in different volumes of master mixes (Figure 3). In the duplex assays carried out with a reaction

volume of 25 μL (Figure 3A) and 20 μL (Figure 3B), the amplification profile was very similar for both parasites to that obtained in simplex DARQ-LAMP reactions, showing for *S. venezuelensis* values of T_p and fluorescence intensity shorter and higher, respectively, than for *S. mansoni*. A slight decrease in fluorescence intensity for both parasites was observed when the minimum volume of 15 μL (Figure 3C) was used for the reaction mixtures; in any case, amplification occurred and, moreover, distinguished well between the two parasites. Notwithstanding this, the T_p for *S. venezuelensis*-specific amplification increased in at least 20 min.

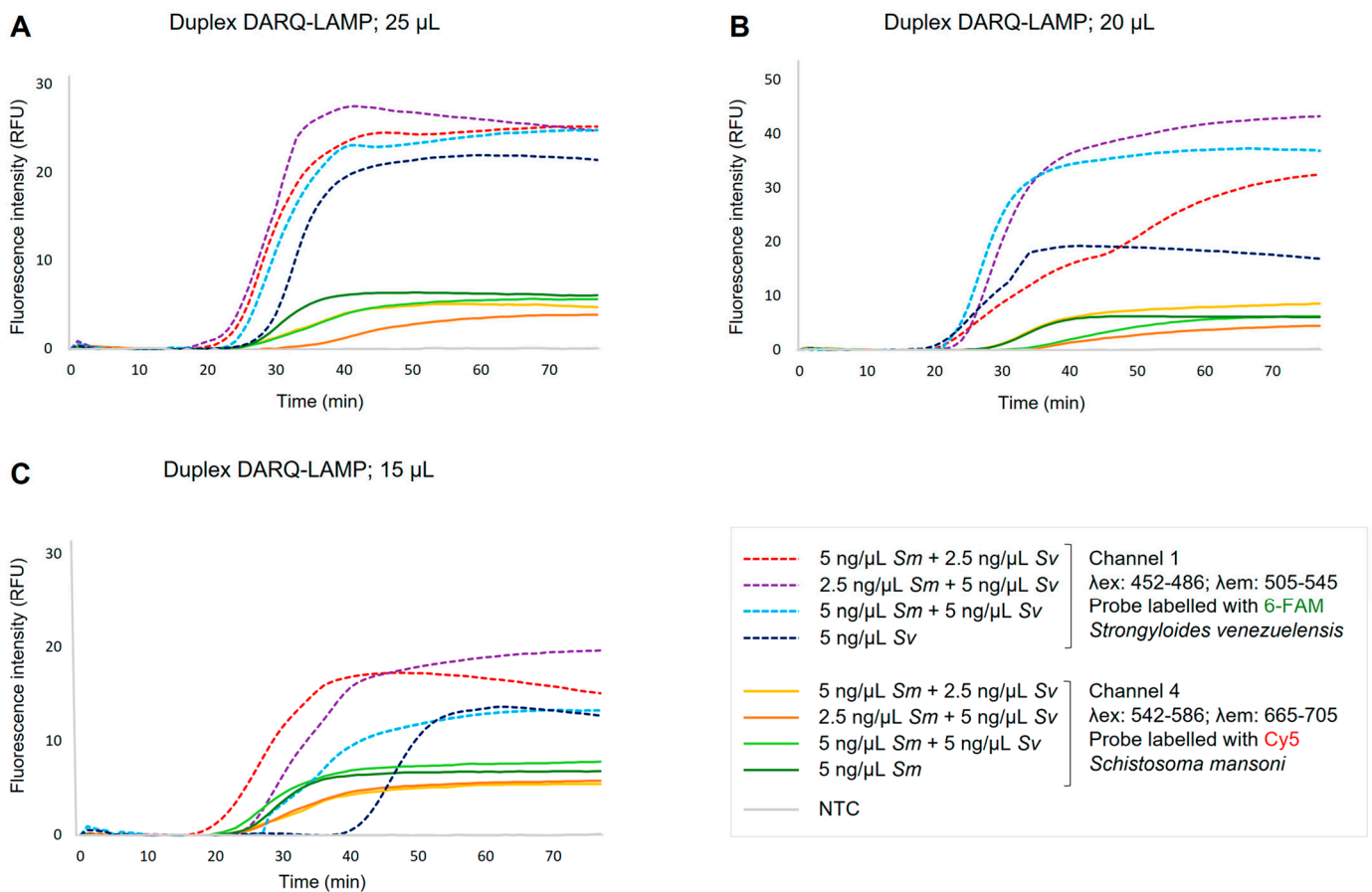


Figure 3. Duplex DARQ-LAMP for simultaneous amplification of gDNA from *Schistosoma mansoni* and *Strongyloides venezuelensis* using different combinations of gDNA concentrations as template in different volumes of master mixes. (A) Duplex DARQ-LAMP in 25 μL . (B) Duplex DARQ-LAMP in 20 μL . (C) Duplex DARQ-LAMP in 15 μL . Combinations of gDNA concentrations of the two parasites used as templates are indicated on the right panel. NTC, non-template control (ultrapure water instead gDNA). The reactions were carried out in a PCR max Eco 48 Real Time PCR System. Dotted lines indicate fluorescence reading in channel 1 for *Strongyloides venezuelensis* amplification (probe labelled with 6-FAM) and continuous lines indicate fluorescence reading in channel 4 for *Schistosoma mansoni* amplification (probe labelled with Cy5).

2.4. Sensitivity Assessment of Duplex DARQ-LAMP Assay

Once the proper operation of duplex DARQ-LAMP assay was verified, the sensitivity was attempted in the Genie III handheld device using 10-fold serial dilutions prepared by mixing those 10-fold serial dilutions used in the simplex DARQ-LAMP sensitivity assays (Figure 4). When running the duplex DARQ-LAMP, the limit of detection for *S. mansoni* gDNA was 5 fg/ μL (T_p ~77 min) and for *S. venezuelensis* gDNA resulted in 50 fg/ μL (T_p ~36 min). For a better visualization of the 10-fold serial dilution amplifications in dual excitation and emission channels in Genie III handheld device, the measured fluorescence

of QPDs is represented in two separate graphs: one for fluorescence reading in channel 1 for *Strongyloides venezuelensis* (Figure 4B) and another for fluorescence reading in channel 2 for *Schistosoma mansoni* (Figure 4C). As in the evaluation of sensitivity in simplex DARQ-LAMP reactions, when performing the duplex DARQ-LAMP assay, the T_p and RFU values were clearly shorter and higher, respectively, for *S. venezuelensis* amplification than for *S. mansoni*. It should be noted that the detection limit for each parasite in the duplex DARQ-LAMP assay was identical to that obtained individually in the simplex DARQ-LAMP assays.

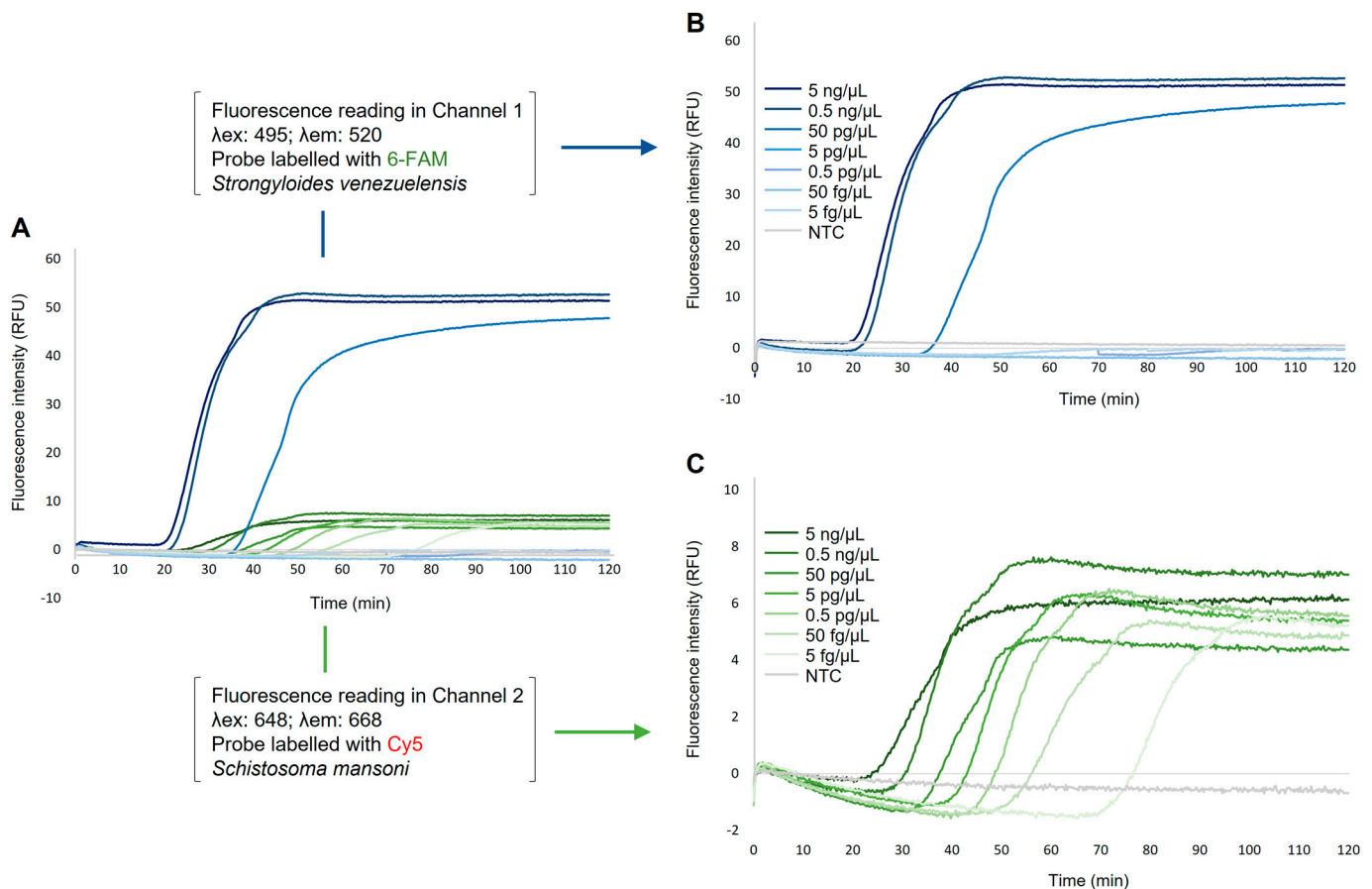


Figure 4. Sensitivity assessment of duplex DARQ-LAMP assay using the Genie III handheld device. (A) Analytical sensitivity for simultaneous detection of *Schistosoma mansoni* gDNA and *Strongyloides venezuelensis* gDNA using 10-fold serial dilutions. (B) Analytical sensitivity for *S. venezuelensis* in duplex DARQ-LAMP reaction. Only the excitation (λ_{ex} = 495) and emission (λ_{em} = 520) channel 1 for fluorescence measurement of 6-FAM is represented. (C) Analytical sensitivity for *S. mansoni* in duplex DARQ-LAMP reaction. Only the excitation (λ_{ex} = 648) and emission (λ_{em} = 668) channel 2 for fluorescence measurement of Cy5 is represented. The 10-fold serial dilutions (5 ng/ μ L to 5 fg/ μ L) of gDNA from parasites are represented by different shades of blue (for *S. venezuelensis*) and green (for *S. mansoni*). NTC, non-template control (ultrapure water instead gDNA) is represented by grey lines in both cases. RFU, relative fluorescence units.

2.5. Stability and Functionality over Time of Duplex Dry-DARQ-LAMP

The results obtained after the reconstitution of duplex Dry-DARQ-LAMP master mixes for simultaneous amplification of *S. mansoni* and *S. venezuelensis* are shown in Figure 5. In general, after storage for 0, 15, 30 and, 60 days post-desiccation at RT, the reconstitution of dry master mixes was found to be functional for duplex amplifications, although a delay in amplification time during the reaction for dried components was observed in comparison to fresh duplex DARQ-LAMP mixtures. As a general rule, irrespective of the concentration of amplified gDNA from the two parasites, there was an increase in T_p values as storage

time increased. Just after drying of the mixtures (on day 0) an increase in T_p was observed for the amplification of *S. mansoni*. This increase was even greater for the amplification of *S. venezuelensis* despite amplifying with much shorter T_p than *S. mansoni* in fresh DARQ-LAMP duplex. The amplification of *S. mansoni* using the duplex dry-DARQ-LAMP format was reasonably stable during 60 days of storage and did not undergo a large increase in T_p over time. Furthermore, amplification was obtained up to 60 days post-desiccation with the lowest gDNA concentration tested (2.5 ng/mL). For *S. venezuelensis*, the lowest DNA concentrations did not show amplification after 30 days of storage (2.5 ng/ μ L) and 60 days of storage (5 ng/ μ L and 2.5 ng/ μ L).

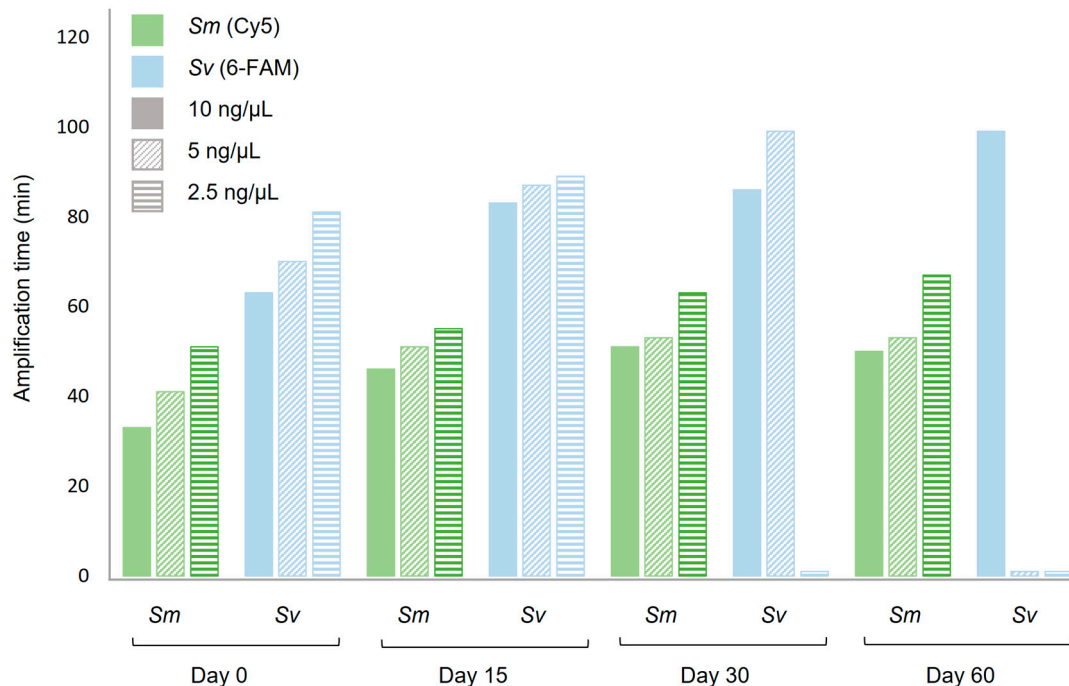


Figure 5. Amplification time of duplex Dry-DARQ-LAMP assays as a function of storage time at ambient temperature. Amplification times of different concentrations of gDNA (10 ng/ μ L, 5 ng/ μ L and 2.5 ng/ μ L) from both *Schistosoma mansoni* (*Sm*) and *Strongyloides venezuelensis* (*Sv*) in duplex DARQ-LAMP assays performed with dry mixtures containing sets of primers and fluorescence labelled-probes tested at 0, 15, 30 and 60-days post-desiccation are represented. All reactions were performed in a Genie III portable instrument.

3. Discussion

In this study, we have developed a duplex LAMP assay for the simultaneous specific detection of *Schistosoma mansoni* and *Strongyloides* spp. infection, based on a modified DARQ probe method [25]. The duplex DARQ-LAMP was based on two well-established conventional LAMP assays previously described by our group and successfully tested on samples from an experimental model of schistosomiasis [38] and strongyloidiasis [39] as well as on clinical samples, including application in field conditions [40–42].

First, in standardization of simplex DARQ-LAMP reactions, the best amplification results in terms of T_p and RFU values for both *S. mansoni* and *Strongyloides* spp. were obtained with a combination of 15% QPD (85:15 unlabelled primer to QPD) and $MgSO_4$ 6 mM in the presence of *Bst* 2.0 WS at 61 °C. In the DARQ-LAMP method, the QPD has been previously reported to show amplification inhibition because of the hybridization of the complementary quencher to the incorporating primer prior to the start of the reaction to be displaced during the course of amplification, therefore generating a signal [25,43,44]. As pointed out by Tanner et al. [25,43] and later by Nanayakkara et al. [45], DARQ-LAMP reactions using a 1:1 ratio of unlabeled inner primer (FIP) and QPD result in an inhibition

of the amplifications. In order to avoid this inhibition, we conducted a titration of the QPD (15% and 10%) into LAMP reactions with both the *S. mansoni* and *Strongyloides* spp. primer sets to determine optimal conditions for the assays. In addition, as also noted by Tanner et al. (2014) [43], some amount of unlabeled inner primer (FIP) must be present in the reaction to prevent full inhibition of amplification. Thus, regardless of the QPD and FIP ratio used (15% or 10%), a concentration of 1.6 μM was always maintained at in all reactions tested.

With 15% QPD, but also with 10% QPD, in combination with higher concentrations than MgSO_4 6 mM, we observed either an increase in amplification times (when using MgSO_4 8 mM) or a near-total inhibition of amplification (when using MgSO_4 10 mM). With 10% QPD in combination with MgSO_4 6 mM, an optimal amplification was also obtained, but we observed a small decline in the amplification curve (just over two RFU units: 5.8 RFU vs. 8 RFU for *S. mansoni* and up to ten RFU units: 45 RFU vs. 35 RFU for *Strongyloides* spp.) and a slight increase in T_p (2 min: 33 min vs. 35 min for *S. mansoni* and 5 min: 22 min vs. 27 min for *Strongyloides* spp.) in comparison to the best values obtained with 15% QPD and MgSO_4 6 mM. Curiously, a different effect of the titration of QPD was observed by Nanayakkara & White [45] in amplification of three genes present in the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MSRA) genome using DARQ-LAMP method. In that work, using 15% QPD, an increase in amplification time in comparison to 10% QPD was observed. In addition, the authors concluded that the DARQ-LAMP is best suited for assays that require a high Mg^{2+} concentration. By contrast, in our work, our DARQ-LAMP assays performed better with lower MgSO_4 concentrations (6 mM) than those used in the conventional original LAMP assays (8 mM) described by us for the detection of the two parasites [38,39]. Thus, for a proper DARQ-LAMP operation, it is very important not only to determine the optimal amount of QPD but also the MgSO_4 concentration for each type of LAMP test to be used.

In sensitivity tests for simplex DARQ-LAMP assays, the *S. mansoni* DARQ-LAMP showed a limit of detection of 5 fg/ μL , whereas the *Strongyloides* spp. DARQ-LAMP showed a limit of detection of 50 pg/ μL . The sensitivity of amplification based on DARQ probe method was lower than the conventional colorimetric LAMP assays using SYBR green I as intercalator dye originally described by us for *S. mansoni* (1 fg) [38] or *Strongyloides* spp. (10 pg) [39]. This decrease in sensitivity could be due to the inhibitory effect described for DARQ method, as previously observed in the amplification of several other targets [45]. To reduce inhibition in the DARQ technique, other versions of this approach have been used, moving the quencher and fluorophore to a loop primer [46,47] or incorporated into the amplification products and detected after the reaction, giving rise to the QUASR method [44].

When the two set of DARQ-LAMP primers were combined in the same reaction for the duplex DARQ-LAMP assay, we obtained a very satisfactory performance, with no detectable cross-reactivity or non-specific amplifications of the negative controls and with amplification times and fluorescence signals virtually identical to those obtained in the simplex DARQ-LAMP assays. In addition, it should be noted that specificity for the two conventional LAMP assays was previously proven in the original studies in which they were first described [38,39]. Moreover, the duplex DARQ-LAMP was shown to be operative in different reaction volumes as 25 μL , 20 μL and even 15 μL (in the latter case with a slight decrease in fluorescence intensity for *Strongyloides* spp., but well distinguishable from *S. mansoni*). The advantage of operating at such low volumes is that the amount of reagents is reduced and, therefore, the cost per reaction is significantly lower. Furthermore, with regard to the sensitivity of the duplex DARQ-LAMP assays, despite the slight decrease in sensitivity obtained in each of the simplex DARQ-LAMP assays compared to the conventional LAMP assays, these sensitivity values were maintained when combining the two sets of primers and labelled probes in the same reaction in duplex format. Accordingly, the duplex assay had the same amplification yield as the separate singleplex assays.

Once the proper operation was verified, in order to develop a duplex DARQ-LAMP method as simply as possible to carry out detection in any condition for *S. mansoni* and *Strongyloides* spp., we tried to preserve all necessary components in a non-reactive state using standard tubes containing dry master mixes (duplex dry-DARQ-LAMP). To do so, we applied a simple and optimized one-step dry-up desiccation procedure previously reported by our group for drying LAMP reagents adapted for conventional and real-time amplification assays [14,48]. The one-step dry-up protocol was applied for DARQ-LAMP mixtures containing the sets of primers for *S. mansoni* and *Strongyloides* spp., resulting in functional amplifications of both gDNAs after storage at ambient temperature (25 °C) for up to 15, 30 and 60-days post-desiccation. Nevertheless, an increase in amplification times and a reduction in fluorescence signals were observed compared to the fresh liquid DARQ-LAMP mixtures. Although the reactions were functional, it should be noted that the longer dry components are stored at ambient temperature, the longer the reaction incubation time to achieve amplification. This result has already been noted by our group when working with dry-LAMP mixtures [14,48].

Interestingly, in the dry-DARQ-LAMP duplexes tested, this effect was much more remarkable in *Strongyloides* spp. amplification than for *S. mansoni*. For the same concentrations of gDNA from the two parasites, *Strongyloides* spp. amplification required longer amplification time with a lower signal intensity than *S. mansoni* amplification. In addition, amplification was no longer achieved at the lowest *Strongyloides* spp. gDNA concentrations (2.5 ng/μL and 5 ng/μL) at 30 and 60-days post-desiccation, respectively. In any case, very reasonable amplification time of 99 min was observed (for 10 ng/μL) after storage in dry format for 60 days. This is a very surprising result considering that in duplexed DARQ-LAMP using fresh mixtures, for *Strongyloides* spp. the Tps were shorter and the RFUs higher than those obtained for *S. mansoni*. The absence of information on this or similar event in the already published data does not allow us to compare our results. At the moment, we can only speculate on the possibility that some features related to quenched primer or fluorophore-labeled probe used for *Strongyloides* spp. amplification may be affected more by the drying process of the mixtures than those used for *S. mansoni*. This issue needs to be studied further. Despite this, maintaining functionality for at least 60 days without the need for a cold chain would allow us to prepare and distribute within several weeks a set of dry-DARQ-LAMP mixtures in a ready-to-use format for use in portable devices with real-time fluorescence readout useful in field diagnostic tests for schistosomiasis and strongyloidiasis in resource-limited areas. Having dry mixes in a single tube greatly facilitates work in the field and avoids possible contamination. To the best of our knowledge, this is the first time that pre-mixed dried LAMP assays using the DARQ-LAMP technology are developed for simultaneous detection of two different human pathogens. This methodology could be used to develop other duplex DARQ-LAMP formats useful in the detection of other infectious agents.

4. Materials and Methods

4.1. Parasites DNA Standard Samples

For amplification trials, genomic DNA (gDNA) from *Schistosoma mansoni* (*Sm*) and *Strongyloides venezuelensis* (*Sv*) was extracted from frozen adult worms and infective third-stage larvae (iL3), respectively, using NucleoSpin Tissue Kit (Macherey-Nagel, GmbH & Co., Düren, Germany) following the manufacturers' instructions. These parasites are routinely maintained by serial passages in laboratory mice (for *Sm*) and rats (for *Sv*) experimentally infected in the Laboratory of Parasitic and Molecular Immunology, CIETUS, University of Salamanca, Salamanca, Spain. The gDNA concentration of the parasites was measured three times by spectrophotometry using a Nanodrop ND-100 spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA) to obtain an average concentration and subsequently 10-fold diluted with ultrapure water to different concentrations for all experiments, as further indicated for each situation. The gDNA samples used for simplex-LAMP reactions only contained gDNA from one species, either *Sm* or *Sv*. For duplex-LAMP reactions, a

combination of both parasites gDNA (*Sm* + *Str*) was used. All gDNA samples were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use.

4.2. DARQ LAMP Primer Design

LAMP primer sets used were those previously described elsewhere by our group for detection of species-specific *Schistosoma mansoni* based on a 620 base pair (bp) sequence corresponding to a mitochondrial minisatellite DNA region (GenBank Accession No. L27240) [38] and for *Strongyloides* spp., based on a 329 bp sequence corresponding to a linear genomic DNA partial sequence in the 18S rRNA gene from *Strongyloides venezuelensis* (GenBank Accession No. AJ417026.1), which has 94–99% similarity with other sequences reported for *Strongyloides* spp., including the species causing human strongyloidiasis, *S. stercoralis* and *S. fuelleborni* [39].

From each set of primers, both FIP primers (comprising F1c + F2 sequences) were labelled at 5' end by adding a dark quencher (Q-FIP): Iowa Black RQ (IAbRQ) for *S. mansoni*-FIP primer and Iowa Black FQ (IAbFQ) for *Strongyloides*-FIP primer. F1c sequences complementary probes were designed and labelled with a fluorophore at 3' end: Cyanine 5 (Cy5) and 6-Carboxyfluorescein (6-FAM) for amplification of *S. mansoni* and *Strongyloides* spp., respectively. Q-FIP primers and their complementary dye labelled probes were synthesized by Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA) and F3 and B3 primers were synthesized by Eurofins Genomics (GmbH, Ebersberg, Germany). All DNA oligonucleotides (listed in Table 1) were of HPLC grade. The lyophilized primers were resuspended in ultrapure water to a final concentration of 100 μM and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use. A schematical illustration of customized primers and the principle of the DARQ-LAMP technique are showed in Figure 6.

Table 1. LAMP primer and probe sequences.

Species	Target	Primers	Sequence (5 → 3)	Reference
<i>Sm</i>	MIT-Sm	F3	TTATCGTCTATAGTACGGTAGG	Fernández-Soto et al. [38]
		B3	ATACTTTAACCCCAACAA	
		BIP	AGAAGTGTTAACTTGATGAAGGGGAAACAAAACCGAAACCACTA	
		FIP	GCCAAGTAGAGACTACAAACATCTTTGGGTAAGGTAGAAAATGTTGT	This study
		FIP*	IAbRQ -GCCAAGTAGAGACTACAAACATCTTTGGGTAAGGTAGAAAATGTTGT	
		Probe	AAGATGTTGTAGTCTCTACTTGGC— Cy5	
<i>Str</i> spp.	18S rDNA	F3	ACACGCTTTTATACCACATT	Fernández-Soto et al. [39]
		B3	GTGGAGCCGTTTATCAGG	
		BIP	ATCAACTTCGATGGTAGGGTATTGCCTATCCGGAGTCGAACC	
		FIP	ACCAGATACACATACGGTATGTTTGGATTGATGAAACCATTTTTTCG	This study
		FIP*	IAbFQ -ACCAGATACACATACGGTATGTTTGGATTGATGAAACCATTTTTTCG	
		Probe	AAAACATACCGTATGTGTATCTGGT— 6-FAM	

Sm: *Schistosoma mansoni*; MIT-Sm: mitochondrial *S. mansoni* minisatellite DNA region (GenBank Accession No. L27240). *Str*: *Strongyloides* spp.; 18S rDNA: linear genomic DNA partial sequence in 18S rDNA from *Strongyloides venezuelensis* (GenBank Accession No. AJ417026.1). F3, B3: forward and backward external primers; BIP: backward inner primer (comprising B1c and B2 sequences); FIP, forward inner primer (comprising F1c and F2 sequences); FIP*, forward inner primer (comprising F1c and F2 sequences) labeled at 5' end with an Iowa Black RQ (for *Sm*) or Iowa Black FQ (for *Str*) quencher. Probe: the probe sequences have the designated fluorophore labelled at the 3' end (Cy5 for *Sm*; 6-FAM for *Str*).

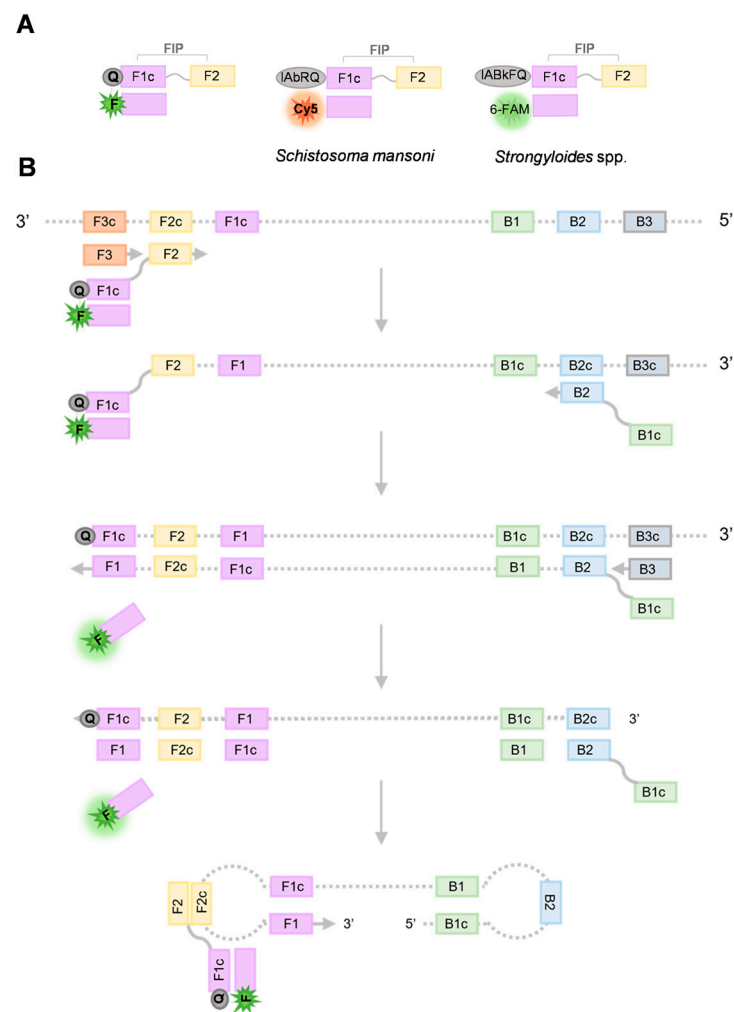


Figure 6. Schematic illustration of customized primers and the principle of the DARQ-LAMP technique. **(A)** Schematic illustration of a Quencher Probe Duplex (QPD), with a 5'-quencher FIP (Q-F1c + F2 sequence) annealed to a sequence complementary to F1c labeled at the 3' end with fluorophore (Fd). In this study, from each set of primers used, both FIP primers (comprising F1c + F2 sequences) were labelled at 5' end by adding a dark quencher (Q-FIP): Iowa Black RQ (IABRQ) for *Schistosoma. mansoni*-FIP primer and Iowa Black FQ (IABkFQ) for *Strongyloides* spp.-FIP primer. F1c sequences complementary probes were designed and labelled with a fluorophore at 3' end: Cyanine 5 (Cy5) and 6-Carboxyfluorescein (6-FAM) for amplification of *S. mansoni* and *Strongyloides* spp., respectively. **(B)** Schematic diagram of DARQ-LAMP operation, with LAMP inner primers FIP (F1c + F2) and BIP (B1c + B2) and outer primers F3 and B3 and the QPD (Q-FIP + Fd). (1) LAMP is initiated at the F2c sequence of the DNA target, with the Fd probe turned off by hybridization to Q-FIP. This new strand is displaced by upstream synthesis from the external primer F3. (2) The BIP primer (B1c + B2) is anchored to the B2c sequence on the newly synthesized strand. (3) Synthesis from the primer annealed to the B2c sequence displaces the Fd probe. This releases the quenching generating a fluorescent signal. The newly synthesized strand is displaced by the extension from the external primer B3. (4) The resulting structure undergoes exponential amplification in the LAMP reaction. Successive initiations at primer FIP result in additional release of Fd, resulting in exponential detection of the signal.

4.3. DARQ-LAMP Reactions

Set up of DARQ-LAMP reactions were based on original protocols previously described by Tanner et al. [25] and Nanayakkara et al. [45].

First, quenched FIP primer and fluorophore-labelled probe were hybridized (quencher probe duplex, QPD) by incubating the sequences at 50 μ M at 95 $^{\circ}$ C for 2 min at a heat block

and slow cooled to room temperature (RT). This stock of QPD was stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use in the different LAMP assays.

Since each LAMP assay must be optimized to use each modified primer set (by incorporating the additional FIP* primers and the labelled probes into the master mix), different reaction conditions were tested for fine-tuning. On one hand, simplex DARQ-LAMP reactions (i.e., including gDNA from only one parasite, either *Schistosoma mansoni* or *Strongyloides venezuelensis*) were carried out in the presence of *Bst* 2.0 WarmStart DNA Polymerase (*Bst* 2.0 WS) (NEW ENGLAND BIOLABS Ltd., Ipswich, UK) in a volume of 25 μL containing 1.4 mM of each dNTP (BIORON GmbH, Römerberg, Germany), $1\times$ Amplification Buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 50 mM KCl, 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mM MgSO_4 , 0.1% Tween20), 0.2 μM outer F3/B3 primers, 1.6 μM inner primer BIP and 1.6 μM of a mix including non-labelled inner primer FIP and QPD (FIP* and labelled probe). Reactions were tested with supplementary MgSO_4 (ranging 6, 8, or 10 mM). Different temperatures ($61\text{ }^{\circ}\text{C}$, $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $70\text{ }^{\circ}\text{C}$) and reaction times (60 min, 90 min) were also tested in two different devices with real-time fluorescence reading, a Genie III portable instrument (OPTIGENE Ltd., Horsham, UK) and a PCRmax Eco 48 Real Time qPCR System. The excitation and emission channels for these two devices for real-time fluorescence reading and corresponding fluorophores and quenchers used in DARQ-LAMP reactions are showed in Table 2. To test proper operation of DARQ-LAMP reactions, positive amplification controls (consisting in 5 ng/ μL of gDNA template from parasites) and negative controls (consisting in ultrapure water instead gDNA) were used in each trial.

Table 2. Excitation and emission channels in Genie III portable instrument and PCRmax Eco 48 Real Time qPCR System used for real-time amplifications and corresponding fluorophores and quenchers used in DARQ-LAMP assays.

Device	Channel	λ_{ex}	λ_{em}	Fluorophore	Quencher
Genie [®] III	1	470	510–560	6-FAM (λ_{ex} 495– λ_{em} 520)	IAbFQ (420–620)
	2	590	>620	Cy5 (λ_{ex} 648– λ_{em} 668)	IAbRQ (500–800)
PCR max Eco48	1	452–486	505–545	6-FAM (λ_{ex} 495– λ_{em} 520)	IAbFQ (420–620)
	2	452–486	604–644		
	3	542–586	562–596	Cy5 (λ_{ex} 648– λ_{em} 668)	IAbRQ (500–800)
	4	542–586	665–105		

Genie III instrument and PCR max Eco 48 Real Time qPCR System include dual channel and four channel fluorescence measurement, respectively. For DARQ-LAMP assays in PCRmax Eco 48 Real Time qPCR System only channels 1 and 4 were used. λ_{ex} , fluorescence excitation wavelength; λ_{em} , fluorescence emission wavelength. Fluorophore: 6-FAM, 6-Carboxyfluorescein; Cy5, Cyanine 5. Quencher: IAbFQ, Iowa Black FQ for *Strongyloides*-FIP primer; IAbRQ, Iowa Black RQ for *S. mansoni*-FIP primer. λ_{ex} , λ_{em} and quenching range are expressed in nanometers (nm).

Once simplex DARQ-LAMP reactions were standardized for duplex DARQ-LAMP reactions (i.e., for simultaneous amplification of gDNA from both parasites, *Schistosoma mansoni* and *Strongyloides venezuelensis*), the proportion of primer sets used was 50:50 and the final concentration of the two sets of primers was maintained at 3.6 μM . Thus, to assess first the proper operation of duplex DARQ-LAMP, different combinations of gDNA concentrations in different volumes of master mixes were tested to evaluate the simultaneous amplification of both parasites. We tested combinations of: *Sm* 5 ng/ μL + *Sv* 2.5 ng/ μL ; *Sm* 2.5 ng/ μL + *Sv* 5 ng/ μL ; *Sm* 5 ng/ μL + *Sv* 5 ng/ μL , and also individual *Sm* 5 ng/ μL and *Sv* 5 ng/ μL , in different volumes of 25 μL , 20 μL and 15 μL .

In addition, we performed QPD titration in LAMP reactions with the *Schistosoma mansoni* and *Strongyloides* spp. primer sets to determine the optimal assay conditions. For this, from the stock of QPD at 50 μM , a QPD dilution at 5 μM was prepared and percentages of 10% (90:10) and 15% (85:15) in relation to the total amount of unlabeled inner primer (FIP) were used in DARQ-LAMP reactions. Regardless of the ratio of QPD and FIP used, a concentration of 1.6 μM was always maintained in all reactions tested.

4.4. Sensitivity of Simplex and Duplex DARQ-LAMP Reactions

The lower detection limit of simplex DARQ-LAMP assays for *S. mansoni* and *S. venezuelensis* gDNA detection was established by using 10-fold serial dilutions of gDNA from each parasite, ranging from 5 ng/μL to 0.5 fg/μL.

Sensitivity of duplexed DARQ-LAMP for *Sm* and *Sv* gDNA detection was established using 10-fold serial dilutions prepared by mixing those 10-fold serial dilutions used to establish the sensitivity of simplex tests, thus ranging from mixtures containing 5 ng/μL of *Sm* gDNA and 5 ng/μL of *Sv* gDNA to 5 fg/μL of *Sm* gDNA and 5 fg/μL of *Sv* gDNA.

The tests for the establishment of sensitivity of DARQ-LAMP reactions were carried out in the Genie III handheld device scheduled at 61 °C for 120–130 min.

4.5. Stabilization of DARQ-LAMP Reaction Mixes for Room-Temperature Storage: Dry-DARQ-LAMP

For potential ready-to-use DARQ-LAMP multiplex tests, we carried out the stabilization of the master mixes for long-term RT storage following the methodology previously described in our group by García-Bernalt Diego et al. [14]. The stabilization is based in a one-step dry-up vacuum process without centrifugation (so called, desiccation) in a Concentrator Plus (EPPENDORF, Hamburg, Germany) at RT for 30 min. Briefly, DARQ-LAMP master mixes were dried in open 8-tube Genie Strips (OPTIGENE, Horsham, UK) separately in two partial mixes: one containing Isothermal Buffer 10×, MgSO₄ in the tube cap in the presence of trehalose 2M, the other containing both sets of primers for *S. mansoni* and *Strongyloides* spp., non-labelled inner primers FIP, QPD, dNTPs and *Bst* 2.0 WS polymerase in the bottom of the tube in the presence of trehalose 2M. After the desiccation process, two small, stable and well-adhered pellets in both cap and bottom of the tubes were obtained and, subsequently, the tubes were kept at RT until use. Afterwards, rehydration was carried out with ultrapure water (for negative controls) or ultrapure water containing both *S. mansoni* and *S. venezuelensis* gDNA (for positive controls) and DARQ-LAMP reactions performed with Genie III portable instrument at 61 °C for up to 120 min at 0, 7, 15, 30 and 60-days post-desiccation.

5. Conclusions

In summary, a duplex LAMP assay for simultaneous detection of two high prevalent human pathogens, *Schistosoma mansoni* and *Strongyloides* spp., was developed. The differentiation of the multiple amplified targets, based on DARQ technology, was optimized for easily readout in a handheld isothermal fluorimeter. In addition, our one-step dry-up protocol for the stabilization of multiplexed master mixes produces ready-to-use functional formats that can be easily prepared, distributed and applied in resource-limited field settings by untrained personnel, therefore increasing its potential as point-of-care diagnostic method. Further studies are needed to prove its efficiency in the analysis of clinical samples.

Author Contributions: Conceptualization, B.C.-V., P.F.-S. and A.M.; methodology, B.C.-V., P.F.-S., B.F.-S. and J.G.-B.D.; validation, B.C.-V. and P.F.-S.; formal analysis, B.C.-V., P.F.-S. and A.M.; investigation, B.C.-V., P.F.-S., B.F.-S. and J.G.-B.D.; resources, P.F.-S.; data curation, B.C.-V. and P.F.-S.; writing—original draft preparation, B.C.-V. and P.F.-S.; writing—review and editing, B.C.-V., P.F.-S. and A.M.; visualization, B.C.-V. and P.F.-S.; supervision, P.F.-S.; project administration, P.F.-S. and A.M.; funding acquisition, P.F.-S. and A.M. 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) grant number PI19/01727 (P.F.-S., A.M.), 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.): 487971, B.C.-V.; BDNS (Identif.): 422058, B.F.-S.) and Predoctoral Fellowship Program of University of Salamanca and co-financing by Santander Bank (J.G.-B.D.)

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

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. Njiru, Z.K. Loop-mediated isothermal amplification technology: Towards point of care diagnostics. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2012**, *6*, e1572. [[CrossRef](#)]
2. Gong, P.; Zhang, T.; Chen, F.; Wang, L.; Jin, S.; Bai, X. Advances in loop-mediated isothermal amplification: Integrated with several point-of-care diagnostic methods. *Anal. Methods* **2014**, *6*, 7585–7589. [[CrossRef](#)]
3. Glökler, J.; Lim, T.S.; Ida, J.; Frohme, M. Isothermal amplifications—a comprehensive review on current methods. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2021**, *56*, 543–586. [[CrossRef](#)]
4. Walker, G.T.; Little, M.C.; Nadeau, J.G.; Shank, D.D. Isothermal in vitro amplification of DNA by a restriction enzyme/DNA polymerase system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 392–396. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Vincent, M.; Xu, Y.; Kong, H. Helicase-dependent isothermal DNA amplification. *EMBO Rep.* **2004**, *5*, 795–800. [[CrossRef](#)]
6. Ali, M.M.; Li, F.; Zhang, Z.; Zhang, K.; Kang, D.K.; Ankrum, J.A.; Le, X.C.; Zhao, W. Rolling circle amplification: A versatile tool for chemical biology, materials science and medicine. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 3324–3341. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Li, J.; Macdonald, J.; Von Stetten, F. Review: A comprehensive summary of a decade development of the recombinase polymerase amplification. *Analyst* **2019**, *144*, 31–67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Compton, J. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature* **1991**, *350*, 91–92. [[CrossRef](#)]
9. 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](#)]
10. 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*, 717–746. [[CrossRef](#)]
11. 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](#)]
12. Rako, L.; Agarwal, A.; Semeraro, L.; Broadley, A.; Rodoni, B.C.; Blacket, M.J. A LAMP (loop-mediated isothermal amplification) test for rapid identification of Khapra beetle (*Trogoderma granarium*). *Pest Manag. Sci.* **2021**, *77*, 5509–5521. [[CrossRef](#)]
13. Lee, S.H.; Ahn, G.; Kim, M.S.; Jeong, O.C.; Lee, J.H.; Kwon, H.G.; Kim, Y.H.; Ahn, J.Y. Poly-adenine-Coupled LAMP Barcoding to Detect Apple Scar Skin Viroid. *ACS Comb. Sci.* **2018**, *20*, 472–481. [[CrossRef](#)]
14. García-Bernalt, J.; Fernández-Soto, P.; Domínguez-Gil, M.; Belhassen-García, M.; Muñoz, J.L.; Muro, A. A Simple, Affordable, Rapid, Stabilized, Colorimetric, Versatile RT-LAMP Assay to Detect SARS-CoV-2. *Diagnostics* **2021**, *11*, 438. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Kreft, R.; William Costerton, J.; Ehrlich, G.D. PCR is changing clinical diagnostics. *Microbe* **2013**, *8*, 15–20. [[CrossRef](#)]
16. Zhang, H.; Xu, Y.; Fohlerova, Z.; Chang, H.; Iliescu, C.; Neuzil, P. LAMP-on-a-chip: Revising microfluidic platforms for loop-mediated DNA amplification. *Trends Anal. Chem.* **2019**, *113*, 44–53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Augustine, R.; Hasan, A.; Das, S.; Ahmed, R.; Mori, Y.; Notomi, T.; Kevadiya, B.D.; Thakor, A.S. Loop-mediated isothermal amplification (Lamp): A rapid, sensitive, specific, and cost-effective point-of-care test for coronaviruses in the context of COVID-19 pandemic. *Biology* **2020**, *9*, 182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Wong, Y.P.; Othman, S.; Lau, Y.L.; Radu, S.; Chee, H.Y. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A versatile technique for detection of micro-organisms. *J. Appl. Microbiol.* **2018**, *124*, 626–643. [[CrossRef](#)]
19. Goto, M.; Honda, E.; Ogura, A.; Nomoto, A.; Hanaki, K.I. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *Biotechniques* **2009**, *46*, 167–172. [[CrossRef](#)]
20. Mori, Y.; Kitao, M.; Tomita, N.; Notomi, T. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *J. Biochem. Biophys. Methods* **2004**, *59*, 145–157. [[CrossRef](#)]
21. Osorbin, I.P.; Belousova, E.A.; Zakabunin, A.I.; Boyarskikh, U.A.; Filipenko, M.L. Comparison of fluorescent intercalating dyes for quantitative loop-mediated isothermal amplification (qLAMP). *Biotechniques* **2016**, *61*, 20–25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Agarwal, S.; Warnt, C.; Henkel, J.; Schrick, L.; Nitsche, A.; Bier, F.F. Lateral flow-based nucleic acid detection of SARS-CoV-2 using enzymatic incorporation of biotin-labeled dUTP for POCT use. *Anal. Bioanal. Chem.* **2022**, *414*, 3177–3186. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Selvam, K.; Najid, M.A.; Khalid, M.; Mohamad, S.; Palaz, F.; Ozsoz, M.; Aziah, I. RT-LAMP CRISPR-Cas12/13-Based SARS-CoV-2 Detection Methods. *Diagnostics* **2021**, *11*, 1646. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Garg, N.; Ahmad, F.J.; Kar, S. Recent advances in loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid and efficient detection of pathogens. *Curr. Res. Microb. Sci.* **2022**, *3*, 100120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Tanner, N.A.; Zhang, Y.; Evans, T.C. Simultaneous multiple target detection in real-time loop-mediated isothermal amplification. *Biotechniques* **2012**, *53*, 81–89. [[CrossRef](#)]

26. Petney, T.N.; Andrews, R.H. Multiparasite communities in animals and humans: Frequency, structure and pathogenic significance. *Int. J. Parasitol.* **1998**, *28*, 377–393. [[CrossRef](#)]
27. Vaumourin, E.; Vourc'h, G.; Gasqui, P.; Vayssier-Taussat, M. The importance of multiparasitism: Examining the consequences of co-infections for human and animal health. *Parasites Vectors* **2015**, *8*, 545. [[CrossRef](#)]
28. Cox, F.E.G. Concomitant infections, parasites and immune responses. *Parasitology* **2001**, *122*, S23–S38. [[CrossRef](#)]
29. Gazzinelli-Guimaraes, P.H.; Nutman, T.B. Helminth parasites and immune regulation [version 1; peer review: 2 approved]. *F1000Research* **2018**, *7*, 1685. [[CrossRef](#)]
30. Gryseels, B. Schistosomiasis. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* **2012**, *26*, 383–397. [[CrossRef](#)]
31. Colley, D.G.; Bustinduy, A.L.; Secor, W.E.; King, C.H. Human schistosomiasis. *Lancet* **2014**, *383*, 2253–2264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Schär, F.; Trostorf, U.; Giardina, F.; Khieu, V.; Muth, S.; Marti, H.; Vounatsou, P.; Odermatt, P. *Strongyloides stercoralis*: Global Distribution and Risk Factors. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2013**, *7*, e2288. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Buonfrate, D.; Bisanzio, D.; Giorli, G.; Odermatt, P.; Fürst, T.; Greenaway, C.; French, M.; Reithinger, R.; Gobbi, F.; Montresor, A.; et al. The global prevalence of *Strongyloides stercoralis* infection. *Pathogens* **2020**, *9*, 468. [[CrossRef](#)]
34. Da Silva Santos, L.; Wolff, H.; Chappuis, F.; Albajar-Viñas, P.; Vitoria, M.; Tran, N.T.; Baggio, S.; Togni, G.; Vuilleumier, N.; Girardin, F.; et al. Coinfections between persistent parasitic neglected tropical diseases and viral infections among prisoners from Sub-Saharan Africa and Latin America. *J. Trop. Med.* **2018**, *2018*, 7218534. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Agbata, E.N.; Morton, R.L.; Bisoffi, Z.; Bottieau, E.; Greenaway, C.; Biggs, B.A.; Montero, N.; Tran, A.; Rowbotham, N.; Arevalo-Rodríguez, I.; et al. Effectiveness of screening and treatment approaches for schistosomiasis and strongyloidiasis in newly-arrived migrants from endemic countries in the EU/EEA: A systematic review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2019**, *16*, 11. [[CrossRef](#)]
36. Abruzzi, A.; Fried, B. Coinfection of *Schistosoma* (Trematoda) with Bacteria, Protozoa and Helminths. *Adv. Parasitol.* **2011**, *77*, 1–85.
37. Posey, D.L.; Blackburn, B.G.; Weinberg, M.; Flagg, E.W.; Ortega, L.; Wilson, M.; Secor, W.E.; Sanders-Lewis, K.; Won, K.; Maguire, J.H. High prevalence and presumptive treatment of schistosomiasis and strongyloidiasis among African refugees. *Clin. Infect. Dis.* **2007**, *45*, 1310–1315. [[CrossRef](#)]
38. Fernández-Soto, P.; Gandasegui Arahuetes, J.; Sánchez Hernández, A.; López Abán, J.; Vicente Santiago, B.; Muro, A. A Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for Early Detection of *Schistosoma mansoni* in Stool Samples: A Diagnostic Approach in a Murine Model. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2014**, *8*, e3126. [[CrossRef](#)]
39. Fernández-Soto, P.; Sánchez-Hernández, A.; Gandasegui, J.; Bajo Santos, C.; López-Abán, J.; Saugar, J.M.; Rodríguez, E.; Vicente, B.; Muro, A. Strong-LAMP: A LAMP Assay for *Strongyloides* spp. Detection in Stool and Urine Samples. Towards the Diagnosis of Human Strongyloidiasis Starting from a Rodent Model. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2016**, *10*, e0004836. [[CrossRef](#)]
40. Gandasegui, J.; Fernández-Soto, P.; Muro, A.; Simões Barbosa, C.; Lopes de Melo, F.; Loyo, R.; de Souza Gomes, E.C. 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*, e0006314. [[CrossRef](#)]
41. Fernández-Soto, P.; Gandasegui, J.; Rodríguez, C.C.; Pérez-Arellano, J.L.; Crego-Vicente, B.; Diego, J.G.B.; López-Abán, J.; Vicente, B.; Muro, A. Detection of *Schistosoma mansoni*-derived DNA in human urine samples by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0214125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Fernández-Soto, P.; Celis-Giraldo, C.T.; Collar-Fernández, C.; Gorgojo, Ó.; Camargo, M.; Muñoz, J.; Salas-Coronas, J.; Patarroyo, M.A.; Muro, A. Strong-LAMP Assay Based on a *Strongyloides* spp.-Derived Partial Sequence in the 18S rRNA as Potential Biomarker for Strongyloidiasis Diagnosis in Human Urine Samples. *Dis. Markers* **2020**, *2020*, 5265198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Tanner, N.A.; Evans, T.C. Loop-mediated isothermal amplification for detection of nucleic acids. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **2014**, *105*, 1–14. [[CrossRef](#)]
44. Ball, C.S.; Light, Y.K.; Koh, C.Y.; Wheeler, S.S.; Coffey, L.L.; Meagher, R.J. 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*, 3562–3568. [[CrossRef](#)]
45. Nanayakkara, I.A.; White, I.M. Demonstration of a quantitative triplex LAMP assay with an improved probe-based readout for the detection of MRSA. *Analyst* **2019**, *144*, 3878–3885. [[CrossRef](#)]
46. Curtis, K.A.; Morrison, D.; Rudolph, D.L.; Shankar, A.; Bloomfield, L.S.P.; Switzer, W.M.; Owen, S.M. A multiplexed RT-LAMP assay for detection of group M HIV-1 in plasma or whole blood. *J. Virol. Methods* **2018**, *255*, 91–97. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Yaren, O.; McCarter, J.; Phadke, N.; Bradley, K.M.; Overton, B.; Yang, Z.; Ranade, S.; Patil, K.; Bangale, R.; Benner, S.A. Ultra-rapid detection of SARS-CoV-2 in public workspace environments. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0240524. [[CrossRef](#)]
48. 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**, *9*, 14744. [[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 study using Strong-LAMP for diagnosis of strongyloidiasis in Cubal, Angola

Beatriz Crego-Vicente, Begoña Febrer-Sendra, Arlette Nindia, Agostinho Pessela, Sandra Aixut, Joan Martínez-Campreciós, Alejandro Mediavilla, Aroa Silgado, Elena Sulleiro, Begoña Treviño, Israel Molina, Antonio Muro, Fernando Salvador, Pedro Fernández-Soto

PLoS Neglected Tropical Diseases. Submitted, 2023

RESUMEN

La estrongiloidosis es una infección parasitaria causada mayoritariamente por el nematodo *Strongyloides stercoralis*. Su distribución es cosmopolita, localizándose fundamentalmente en regiones tropicales y subtropicales. La infección crónica suele ser asintomática, pero puede provocar un síndrome de hiperinfección grave o estrongiloidosis diseminada en pacientes inmunodeprimidos con elevada tasa de mortalidad. Se estima que más de 600 millones de personas están infectadas a nivel mundial, aunque la prevalencia real en zonas endémicas se desconoce. Esto es debido, fundamentalmente, a la dificultad en su diagnóstico por tres factores principales: la presencia de casos subclínicos o levemente sintomáticos, la carga parasitaria generalmente baja con excreción irregular de larvas y la falta de una prueba diagnóstica de referencia o *gold standard*. Los métodos tradicionales de diagnóstico parasitológico tienen escasa sensibilidad, los serológicos carecen de especificidad y los moleculares (generalmente basados en la PCR), aunque muy sensibles y específicos, presentan discrepancias en su precisión y son difícilmente aplicables en entornos de recursos limitados por su grado de especialización y elevado coste. Una alternativa podría ser el uso de la tecnología LAMP de más fácil aplicación en condiciones de campo.

En trabajos previos a esta Tesis Doctoral, nuestro grupo de investigación desarrolló un método LAMP (denominado *Strong-LAMP*) como técnica simple, sensible y fácil de realizar. El método demostró su eficacia en la detección de ADN de *Strongyloides venezuelensis* utilizando muestras de heces y orina de un modelo de infección experimental en ratas. Se comprobó también su potencial aplicación clínica en un pequeño número de muestras de heces de pacientes con estrongiloidosis confirmada. En un estudio más reciente, nuestro grupo comprobó la utilidad del *Strong-LAMP* en muestras de orina de pacientes con estrongiloidosis confirmada y/o sospecha serológica de la infección por el parásito.

Sin embargo, hasta la fecha, todas las evaluaciones del método *Strong-LAMP* se habían llevado a cabo exclusivamente en condiciones de laboratorio, por lo que nos planteamos en este trabajo evaluar y validar su utilidad como método de diagnóstico de la estrongiloidosis en condiciones reales de campo en una zona endémica de escasos recursos.

Para ello, se realizó un estudio en el Hospital Nossa Senhora da Paz en Cubal (Angola), en colaboración con miembros de los departamentos de Microbiología y Enfermedades Infecciosas del Hospital Universitario Vall d'Hebron de Barcelona. Se

analizaron un total de 192 muestras de heces de pacientes mediante análisis parasitológico: observación microscópica directa con solución salina (DSM) y técnica de Baermann. De cada muestra se obtuvo también el ADN mediante un método de extracción de ADN comercial y se analizó mediante *Strong-LAMP*, con resultados muy superiores (35,94%) a los obtenidos mediante DSM (5,21%) y Baermann (9,28%). Todos los resultados parasitológicamente positivos resultaron también positivos por *Strong-LAMP*. Tras los estudios en condiciones de campo, nos propusimos comprobar la reproducibilidad de la técnica en condiciones de laboratorio. Para ello, las muestras de ADN se enviaron a nuestro laboratorio en el CIETUS (Salamanca) para ser reanalizadas de nuevo mediante *Strong-LAMP* y, además, comparar los resultados con una qPCR habitualmente utilizada en los estudios de estrogiloidosis. En el laboratorio se obtuvo una coincidencia de los resultados obtenidos en condiciones de campo del 76,04%. El posible deterioro de la calidad del ADN por un ineficaz almacenamiento durante el estudio en zona endémica y en su envío al laboratorio de referencia pudo haber sido la causa más probable del descenso en la eficacia del *Strong-LAMP* en condiciones de laboratorio. Por otra parte, el *Strong-LAMP* demostró mayor sensibilidad diagnóstica que la técnica qPCR.

Aunque el estudio presentado tiene ciertas limitaciones, como el análisis de una única muestra de heces por paciente (que puede afectar a la estimación de la prevalencia mediante análisis parasitológicos) o el inadecuado almacenamiento y posterior transporte de las muestras, en conclusión, podemos decir que: *i*) este es el primer estudio en el que se ha evaluado el *Strong-LAMP* en muestras clínicas en condiciones de campo en una zona endémica de estrogiloidosis de escasos recursos; *ii*) la técnica tiene una mayor sensibilidad en condiciones de campo que las pruebas parasitológicas tradicionales, *iii*) la técnica tiene un mayor rendimiento diagnóstico que la qPCR en condiciones de laboratorio. La eficacia, sencillez de uso e interpretación de los resultados colorimétricos, sugieren que el método *Strong-LAMP* puede ser una herramienta molecular muy útil para mejorar el diagnóstico de la estrogiloidosis, simplificando los complejos análisis parasitológicos de los estudios de campo y contribuyendo a mejorar la estimación de la prevalencia de la estrogiloidosis. Además, teniendo en cuenta nuestra experiencia previa, la posibilidad de utilizar el *Strong-LAMP* con reactivos estabilizados en dispositivos portátiles, nos hace pensar en su posible uso como un diagnóstico *point-of-care* de la estrogiloidosis.

CAPÍTULO IV

Conclusiones

- I. El método LAMP para la amplificación género-específica de ADN de *Schistosoma* permite la detección de híbridos de *S. haematobium/S. bovis*.
- II. Se ha desarrollado, por primera vez, un método LAMP múltiplex que detecta simultáneamente y a tiempo real *Schistosoma mansoni* y *Strongyloides* spp.
- III. La técnica LAMP múltiplex desarrollada resulta eficaz con reactivos estabilizados y almacenados a temperatura ambiente, con potencial uso en estudios de campo.
- IV. El método *Strong*-LAMP presenta mayor sensibilidad que los métodos parasitológicos clásicos y que la qPCR en el diagnóstico de la estrongiloidosis.
- V. El método *Strong*-LAMP es útil como método de diagnóstico *point-of-care* de la estrongiloidosis en zona endémica.

- I.** *O método LAMP para a amplificação específica do género do ADN de Schistosoma permite a detecção de híbridos S. haematobium/S. bovis.*
- II.** *Pela primeira vez, foi desenvolvido um método LAMP multiplex que detecta simultaneamente Schistosoma mansoni e Strongyloides spp. em tempo real.*
- III.** *A técnica LAMP multiplex desenvolvida é eficaz com reagentes estabilizados e armazenados à temperatura ambiente, com potencial utilização em estudos de campo.*
- IV.** *O método Strong-LAMP é mais sensível do que os métodos parasitológicos clássicos e a qPCR no diagnóstico da estrogiloidose.*
- V.** *O método Strong-LAMP é útil como método de diagnóstico point-of-care para a estrogiloidose em áreas endémicas.*

ANEXO I

Anexo metodológico

AI.1. Muestras biológicas

En los distintos artículos de investigación recogidos en este trabajo se utilizaron diferentes muestras: muestras de parásitos y muestras de origen humano como orina y heces.

En el **primer artículo de investigación** (*Application of a A Genus-Specific LAMP Assay for Schistosome Species to Detect Schistosoma haematobium x Schistosoma bovis Hybrids*), se utilizaron muestras de ADN genómico de esquistosomas híbridos procedentes de parásitos recogidos en estudios anteriores de Agboville (Costa de Marfil) y de Córcega (Francia); ADN genómico de *S. haematobium* facilitado por el Laboratorio de Interacciones Huésped-Patógeno-Entorno (IHPE) de la Universidad de Perpignan Via Dominita (Perpignan, Francia); gusanos adultos de *S. bovis* proporcionados por el laboratorio de Parasitología Animal del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA-Salamanca, España); gusanos adultos de *S. mansoni* procedentes del ciclo biológico que se mantiene en el laboratorio de Parasitología, CIETUS, Universidad de Salamanca. Las muestras artificiales de orina fueron realizadas en el CIETUS.

En el **segundo artículo de investigación** (*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*), se utilizaron muestras de ADN genómico de dos parásitos: *S. mansoni* y *S. venezuelensis*, utilizando como material de partida adultos de ambos parásitos almacenados a -20°C. Los adultos de *S. mansoni* y las larvas infectivas L3 de *S. venezuelensis* se obtuvieron a partir de los ciclos de vida que se mantienen en el laboratorio de Parasitología, CIETUS, Universidad de Salamanca.

En el **tercer artículo de investigación** (*First field study using Strong-LAMP for diagnosis of strongyloidiasis in Cubal, Angola*), se trabajó con muestras de heces de 192 pacientes recogidas en el Hospital Nossa Senhora da Paz, Cubal (Angola). Para este estudio se obtuvo permiso del comité de Bioética del Ministerio de Salud de Angola. El ADN genómico utilizado de *S. venezuelensis* se obtuvo a partir del ciclo biológico que se mantiene en el laboratorio de Parasitología, CIETUS, Universidad de Salamanca.

AI.2. Procesamiento de muestras y extracción de ADN

Durante la realización de este trabajo, se han utilizado diferentes kits de extracción de ADN para diferentes muestras (Tabla AI.1).

Tabla AI.1. Tipos de muestra y kits utilizados para la extracción de ADN.

Tipo de muestra	Kit de extracción
Parásito	NucleoSpin Tissue Kit (Macherey-Nagel, GmH & Co., Düren, Alemania)
Orina	i-genomic Urine DNA Extraction Mini Kit (Intron Biotechnology, UK)
Heces	NZY Soil gDNA Isolation Kit (NZYTECH, Lisboa, Portugal)

A continuación, se describen de manera detallada los diferentes protocolos utilizados.

AI.2.1. Purificación de ADN genómico de parásitos

La extracción de ADN de todos los parásitos, *S. mansoni*, *S. venezuelensis* y *S. bovis*, se realizó utilizando el kit NucleoSpin Tissue Kit (Macherey-Nagel, GmH & Co., Düren, Alemania) siguiendo el protocolo que se describe a continuación:

1. Se seleccionaron muestras de adultos de *S. mansoni* (entre 20 y 40 esquistosomas) o iL3 de *S. venezuelensis* (entre 10.000 y 20.000), almacenadas a -20°C en nuestro laboratorio. Se lisaban en 180 µL de *buffer* T1 y 25 µL de Proteinasa K para la pre-lisis. Todo se mezcló utilizando el vórtex.
2. A continuación, se incubaban a 56°C durante 3 horas o bien *overnight* para mejorar los resultados. El proceso de incubación se puede mantener en agitación para favorecer la lisis.
3. Tras el proceso de incubación se llevó a cabo el proceso final de lisis añadiendo 200 µL de *buffer* B3, mezclando mediante vórtex e incubando a 70°C durante 10 minutos.
4. Para ajustar las condiciones de la muestra para la unión del ADN a la membrana, se añadían 210 µL de etanol absoluto o al 96% y se mezclaba por vórtex.
5. Para cada muestra se utilizaba una columna de extracción con tubo colector. La mezcla se pasaba a través de la columna de purificación, donde el ADN se

une a la membrana. Se realizaba una centrifugación de 1 minuto a 11.000 x g y se descartaba el tubo colector con el eluido y colocaba la columna sobre uno nuevo.

6. Tras la unión del ADN a la membrana, se realizaron dos lavados. El primero con 500 µL de *buffer* BW y el segundo con 600 µL de *buffer* B5. Ambos se siguieron de centrifugaciones de 1 minuto a 11.000 x g tras las que se descartaba el volumen que había pasado a través de la columna.
7. Para obtener un mayor grado de pureza del ADN la membrana se secaba mediante una centrifugación a 11.000 x g durante 1 minuto.
8. Por último, se añadían 100 µL de *buffer* de elución, se mantenía a temperatura ambiente 1 minuto y se centrifuga a 11.000 x g durante un 1 minuto.

Tras la extracción del ADN genómico se procedió a la medición de su concentración y pureza utilizando un Nanodrop (ND-1000; THERMO FISHER SCIENTIFIC, Estados Unidos). Posteriormente, se diluyó en las concentraciones de trabajo.

AI.2.2. Purificación de ADN genómico de muestras de orina

Las muestras de orina que fueron utilizadas en el primer artículo de investigación se contaminaron artificialmente con ADN del parásito a la concentración deseada. Posteriormente se realizó la extracción del ADN.

Para la purificación de ADN a partir de muestras de orina se utilizó el kit i-genomic Urine DNA Extraction Mini Kit (Intron Biotechnology, UK) siguiendo el protocolo expuesto a continuación:

1. Se tomó un volumen de entre 1,5 mL a 2 mL de orina y se centrifugó a 4.000 x g durante 15 minutos. Tras la centrifugación, se retiró el sobrenadante quedándonos con 100 µL que contendrían el *pellet* urinario y se resuspendió para homogeneizar.
2. Posteriormente se añadían 200 µL de *buffer* UG, 20 µL de Proteínasa K y 5 µL de RNasa a la muestra para llevar a cabo el paso de lisis. Se mezclaba mediante vórtex e incubaba a 65°C durante 15 minutos. Durante la incubación se fue agitando manualmente la mezcla o con agitación mecánica.
3. Tras la incubación, se añadían 250 µL de *buffer* UB y se mezclaba invirtiendo los tubos o mediante pipeteo para no dañar el material genético.

4. A continuación, se añadían 250 μL de etanol al 80% para ajustar las condiciones de la mezcla y se mezclaba mediante pipeteo para de nuevo no dañar el ADN.
5. Después se transfería la mezcla a la columna de purificación, se centrifugaba a 13.000 x g durante 1 minuto y se descartaba el tubo colector. La columna se colocaba en un nuevo tubo colector.
6. Consecutivamente se hacían dos lavados. Un primer lavado con 700 μL de *buffer* UWA y un segundo lavado con 700 μL de *buffer* UWB. Después de añadir el *buffer* en las dos ocasiones se realizaba una centrifugación de 1 minuto a 13.000 x g y se descartaba el eluido.
7. Tras los lavados se secaba la membrana de la columna mediante una nueva centrifugación a 13.000 x g durante un minuto.
8. Finalmente, se eluyó el ADN purificado en 50 μL de *buffer* UE. Tras añadir el *buffer* se incubaba a temperatura ambiente durante 2 minutos y se realizaba una centrifugación final a 13.000 x g durante 1 minuto.

AI.2.3. Purificación de ADN genómico de muestras de heces

La purificación de ADN a partir de muestras de heces se realizó utilizando el kit NZY Soil gDNA Isolation Kit (NZYTECH, Lisboa, Portugal) siguiendo el siguiente protocolo:

1. En un primer paso de preparación de la muestra, se tomaban entre 250-500 mg de heces y se añadían a un tubo con perlas. Seguidamente, se añadían 700 μL de *buffer* NSL1 o del *buffer* NSL2.
2. Para el proceso de lisis se añadían 150 μL de NS *Enhancer* y se mezclaba mediante vórtex durante 5 minutos para homogeneizar toda la muestra.
3. Posteriormente, para eliminar la espuma producida por el detergente se centrifugaba a 11.000 x g durante 2 minutos. A continuación, se añadía 150 μL del *buffer* NSL3, se agitaba en vórtex durante 5 segundos y se incubaba durante 5 minutos a 0°C o 4°C.
4. Tras la incubación se realizaba una centrifugación durante 1 minuto a 11.000 x g y se tomaban 700 μL del sobrenadante tratando de no coger nada del fondo que pudiera contener restos de la muestra. El sobrenadante se cargaba en una columna de eliminación de los inhibidores para su filtración, y se centrifugaba

- a 11.000 x g durante 1 minuto. Posteriormente, se descartaba la columna y nos quedábamos con el sobrenadante.
5. Después, para ajustar las condiciones de la muestra se añadían 250 µL del *buffer* NSB y se mezclaba mediante vórtex durante 5 segundos. Se tomaban 550 µL de la muestra y añadían en una columna de purificación, donde el ADN se une a la membrana. Se llevaba a cabo una centrifugación de 1 minuto a 11.000 x g y se descartaba el eluido.
 6. Tras la unión del ADN a la membrana, se realizaban 3 lavados, el primero con 500 µL de *buffer* NSB, el segundo con 550 µL de *buffer* NSW1 y el tercero con 700 µL de *buffer* NSW2. Los tres lavados se siguieron de centrifugaciones de 1 minuto a 11.000 x g y se descartaba el eluido.
 7. Para obtener el mayor grado de pureza del ADN se secaba la membrana. Para ello, se realizaba una última centrifugación de 2 minutos a 11.000 x g sin añadir ningún *buffer* de lavado.
 8. Por último, se añadían 50 µL de *buffer* NSE y se incubaba durante 1 minuto a temperatura ambiente. Finalmente, se realizaba una centrifugación de 1 minuto a 11.000 x g.

AI.3. Selección de secuencias

A lo largo del desarrollo de esta Tesis Doctoral se han realizado ensayos LAMP utilizando *primers* diseñados por nuestro grupo para la detección de *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma bovis*, *Schistosoma* spp. y *Strongyloides* spp. Las secuencias, su longitud y la diana específica para cada uno de ellos se recogen en la tabla AI.2.

Tabla AI.2. Sets de *primers* utilizados en los distintos trabajos recogidos en esta Tesis Doctoral.

Diana	Primer	Secuencia	Longitud (bases)	Referencia
<i>S. mansoni</i>	F3	TTATCGTCTATAGTACGGTAGG	22	Fernández-Soto <i>et al.</i> 2014 [1]
	B3	ATACTTTAACCCCAACCAA	19	
	FIP	GCCAAGTAGAGACTACAAACATCTT- TGGGTAAGGTAGAAAATGTTGT	47	
	BIP	AGAAGTGTTTAACTTGATGAAGGGG- AAACAAAACCGAAACCTACTA	45	
<i>S. haematobium</i>	F3	CTTICTAAGCCCGCGATA	18	Gandasegui <i>et al.</i> 2015 [2]
	B3	GCGCATTACACTTGGTCT	18	
	FIP	TACCCCTAACTTCGTGGTCTCC- CCCCCTTATTTTAGGGTGC	41	
	BIP	CTCCCTATATAACATGGCGAGTAAG- ACTATGAAATCAGTGTTTTTCGG	48	
	LF	GGTGCGCTTTGTTTTCCGT	19	
	LB	ACCATGTGTAAAGCGCGTCAAA	22	
<i>Strongyloides</i> spp.	F3	ACACGCTTTTTATACCACATT	21	Fernández-Soto <i>et al.</i> 2016 [3]
	B3	GTGGAGCCGTTTATCAGG	18	
	FIP	ACCAGATACACATACGGTATGTTTT- GGATTTGATGAAACCATTTTTTCG	49	
	BIP	ATCAACTTTCGATGGTAGGGTATTG- CCTATCCGGAGTCGAACC	43	
<i>S. bovis</i>	F3	TTCATTGTTAGGTTGCGT	18	Fernández-Soto <i>et al.</i> 2020 [4]
	B3	TCTATATTCTACTCTAATCCCTCT	24	
	FIP	TCAGTATCATCTCAAACATCACACT- AGTAGTATGTTCTGTCTTAAGTT	48	
	BIP	TTTGTAGTACCTCTGGTTTACATCA- TTCACTCTCAGACTCTACAT	45	
	LF	ACTTAGACCATGAACATCAACCTAT	25	
	LB	TACTAAGTGAGAGTAATCGAACACC	25	
<i>Schistosoma</i> spp.	F3	TTGACCGGGGTACCTAGC	18	Fernández-Soto <i>et al.</i> 2020 [4]
	B3	CGTGAATGGCAAGCCAAAC	19	
	FIP	ATCGCCCTTGGCAGATCAGG- CTGTCGTATGCCCTGATGG	39	
	BIP	ATATGCATGCAAATCCGCCCCG- CGGATCGCTTCAACAGTGTA	42	
	LF	CAGATCAGGCAACCCGAAAG	20	

AI.4. Amplificación de ADN

El trabajo realizado para cualquier técnica de amplificación de ADN se siguió acompañado de unas normas de buenas prácticas de laboratorio. Así, antes de comenzar a trabajar se realizó una limpieza con etanol al 70 % de todo el material a utilizar y las áreas de trabajo. Se trabajó en áreas totalmente separadas para cada procedimiento: las mezclas de reacción se prepararon en una habitación libre de ADN o en una cabina de flujo laminar previamente descontaminadas e 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 de uso en cada localización es exclusivo de la misma y no se extrae ni emplea para otra actividad.

AI.4.1. PCR a tiempo real (qPCR)

El tercer artículo de investigación incluye el uso de qPCR para la detección de ADN de *S. stercoralis*. Para este procedimiento se utilizó un kit comercial NZYSupreme qPCR Green Master Mix (2x) (NZYTECH, Lisboa, Portugal) y reactivos de PCR dirigidos al gen 18S rARN de *S. stercoralis* [5]. Se siguieron las instrucciones del fabricante utilizando las mezclas de reacción y los ciclos que se muestran en la tabla AI.3 y la tabla AI.4. Todas las reacciones fueron llevadas a cabo en un volumen final de 20 μL , utilizando de ADN 2 μL .

Tabla AI.3. Mezcla de reacción qPCR.

Componente	Volumen
Master Mix	10 μL
<i>Forward primer</i>	0.8 μL
<i>Reverse primer</i>	0.8 μL
H ₂ O mQ	Hasta completar 20 μL
Muestra/Control	2 μL

Tabla AI.4. Ciclos de amplificación de la qPCR.

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo	Etapa
1	95	3 minutos	Activación de la polimerasa
35	95	5 segundos	Desnaturalización
	60	25 segundos	Anillamiento/Extensión

Todas las reacciones fueron realizadas en el dispositivo PCRmax ECO 48 real time PCR system (PCRmax, Stone, Reino Unido).

AI.4.2. LAMP colorimétrico

A lo largo de este trabajo se realizan diferentes ensayos LAMP para diferentes patógenos, con mezclas de reacción análogas para todos ellos, por lo que se describe de forma general a continuación.

La mezcla de reacción LAMP convencional se realizó en un volumen final de 15 μ L y se compone de los siguientes reactivos: *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) y 8U de polimerasa *Bst* 2.0 WarmStart (NEW ENGLAND BIOLABS, Reino Unido); dNTPs (1,4 mM de cada uno); 0,4 μ M LF/LB (de cada uno, si se incluyen), 1,6 μ M FIP/BIP (de cada uno) y 0,2 μ M F3/B3 (de cada uno). En la tabla AI.5 aparecen detallados los volúmenes y concentraciones para cada uno de los reactivos.

La incubación de los tubos de reacción se realizó a 65°C durante 60 minutos y posteriormente 5-10 minutos a 80°C para inactivar la enzima y finalizar la reacción. La detección de los productos amplificados se realiza de manera visual una vez la reacción ha concluido a través de la adición de 2 μ L de SYBR Green I (dilución 1:10). Si la reacción es positiva se produce un cambio de color de naranja a verde, o se mantiene de color naranja cuando hay un resultado negativo. El resultado también se puede observar realizando una electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % observando el patrón de bandas de amplificación en escalera.

Tabla AI.5. Componentes de una reacción LAMP colorimétrica, volúmenes y concentraciones utilizadas.

Componente	Volumen	Concentración final
H ₂ O mQ	Hasta completar 15 µL	-
dNTPs	2,1 µL	1,4 mM
<i>Isothermal buffer</i> 10x	1,5 µL	1x
MgSO ₄ adicional	0,9 µL	6 mM
LF/LB	0,6 µL	0,4 µM
F3/B3	0,3 µL	0,2 µM
FIP/BIP	0,24 µL	1,6 µM
Bst 2.0	0,6µL	8 U
Muestra/Control	2 µL	-

AI.5. Sensibilidad

En el primer artículo de investigación se evalúa la sensibilidad del LAMP de *Schistosoma* spp. para la detección de diferentes perfiles moleculares de híbridos de *Schistosoma*. Para ello se utilizó ADN procedente de muestras de diferentes híbridos a partir de las cuales se realizaron diluciones seriadas (1:10) en agua ultrapura.

En el segundo artículo de investigación se evalúa la sensibilidad de la técnica DARQ-LAMP. Para los diferentes ensayos se utilizó ADN genómico de los parásitos *S. mansoni* y *S. venezuelensis*. Para la sensibilidad del simplex DARQ-LAMP de *S. mansoni* y *S. venezuelensis* se hicieron diluciones seriadas 1:10 a partir de una concentración inicial de cada uno de los parásitos de 5 ng/µL hasta 0.5 fg/µL. Mientras que para evaluar la sensibilidad del dúplex DARQ-LAMP para la detección simultánea de ADN de *S. mansoni* y *S. venezuelensis* se utilizaron diluciones seriadas 1:10 preparadas a partir de las mezclas utilizadas para establecer la sensibilidad de las pruebas simplex.

La sensibilidad analítica de los otros métodos LAMP utilizados, descritos para la amplificación de ADN de *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. bovis*, *Schistosoma* spp. y *Strongyloides* spp. se establece en las publicaciones originales de nuestro grupo de investigación.

AI.6. Diseño y puesta a punto de la tecnología DARQ-LAMP

En el segundo artículo de investigación de esta Tesis Doctoral, se llevó a cabo el diseño y puesta a punto de la tecnología DARQ-LAMP para la aplicación múltiple de los LAMP de *S. mansoni* y *Strongyloides* spp. Todo ello se puede estructurar en tres niveles: (i) elección de fluoróforo y marcaje de *primers*; (ii) puesta a punto; (iii) evaluación de sensibilidad.

AI.6.1. Elección de fluoróforos y marcaje de *primers*.

Lo primero a tener en cuenta fueron los canales de excitación (λ_{ex}) y emisión (λ_{em}) de fluorescencia de los dispositivos disponibles en el laboratorio, Genie® III (OptiGene) y termociclador PCRmax Eco 48. La elección de los fluoróforos se seleccionó en base a los diferentes canales de ambos dispositivos, es decir, fluoróforos con λ_{ex} y λ_{em} capaces de detectarse en diferentes canales tanto de la Genie III (dos canales) como del Eco 48 (cuatro canales) (Tabla AI.6). Los diferentes fluoróforos y *quencher* aparecen en diferentes guías [6].

Una vez seleccionados los fluoróforos y *quencher* adecuados, se procedió al marcaje de los *primers*. De cada conjunto de *primers*, los dos *primers* FIP (que comprenden las secuencias F1c + F2) fueron marcados en los extremos 5' con un *quencher* (Q-FIP): Iowa Black RQ (IAbRQ) para *S. mansoni* y Iowa Black FQ (IAbFQ) para *Strongyloides* spp. Además, se diseñaron sondas complementarias a las regiones F1c de cada *primer* y se marcaron con el fluoróforo correspondiente en el extremo 3' (Fd): Cianina-5 (CY5) para *S. mansoni* y 6-Carboxifluoresceína (6-FAM) para *Strongyloides* spp. Todos estos *primers* modificados, Q-FIP y Fd, fueron sintetizados por la empresa Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, IA, USA), dado que este tipo de marcaje no es posible en todas las empresas de síntesis de *primers*. El resto de *primers* necesarios para la reacción fueron sintetizados por la empresa Eurofins Genomics (GmbH, Ebersberg, Germany). La tabla AI.7. recoge los *primers* empleados.

Tabla AI.6. Canales de excitación y emisión de los dispositivos Genie® III y PCRmax ECO 48 para la amplificación a tiempo real y los correspondientes fluoróforos y *quencher*s.

Dispositivo	Canal	λ_{ex}	λ_{em}	Fluoróforo	Quencher
Genie® III	1	470	510-560	6-FAM (495 λ_{ex} -520 λ_{em})	IAbFQ (420-620 nm)
	2	590	>620	CY5 (649 λ_{ex} -670 λ_{em})	IAbRQ (500-800 nm)
PCR max Eco 48	1	452-486	505-545	6-FAM (495 λ_{ex} -520 λ_{em})	IAbFQ (420-620 nm)
	2	452-486	604-644	Texas Red (596 λ_{ex} - 615 λ_{em})	IAbRQ (500-800 nm)
	3	542-586	562-596	CY3 (552 λ_{ex} - 570 λ_{em})	IAbFQ (420-620 nm)
	4	542-586	665-105	CY5(649 λ_{ex} -670 λ_{em})	IAbRQ (500-800 nm)

λ_{ex} , longitud de onda de excitación de fluorescencia; λ_{em} , longitud de onda de emisión de fluorescencia; nm, nanómetros; 6-FAM, 6-Carboxifluoresceína; Cy5, Cianina-5; Cy3, Cianina-3; IAbRQ, Iowa Black RQ; IAbFQ, Iowa Black FQ.

Tabla AI.7. *Primers* y sondas para LAMP de *Schistosoma mansoni* y *Strongyloides* spp.

Especie	Diana	Primers	Secuencia (5' → 3')	Referencia
<i>Sm</i>	MIT-Sm	F3	TTATCGTCTATAGTACGGTAGG	Fernández-Soto <i>et al.</i> 2014 [1]
		B3	ATACTTTAACCCCAACAA	
		BIP	AGAAGTGTTTAACTTGATGAAGGGG-AAACAAAACCGAAACCACTA	
		FIP	GCCAAGTAGAGACTACAAACATCTTTGGGTAAGGTAGAAAATGTTGT	
		FIP*	IAbRQ -GCCAAGTAGAGACTACAAACATCTTTGGGTAAGGTAGAAAATGTTGT	
		Sonda	AAGATGTTTGTAGTCTCTACTTGGC - Cy5	Este trabajo
<i>Str</i> spp.	18S rDNA	F3	ACACGCTTTTTATACCACATT	Fernández-Soto <i>et al.</i> 2016 [3]
		B3	GTGGAGCCGTTTATCAGG	
		BIP	ATCAACTTTTCGATGGTAGGGTATTCCTATCCGGAGTCGAACC	
		FIP	ACCAGATACACATACGGTATGTTTTGGATTTGATGAAACCATTTTTTCG	
		FIP*	IAbFQ - ACCAGATACACATACGGTATGTTTTGGATTTGATGAAACCATTTTTTCG	
		Sonda	AAAACATACCGTATGTGTATCTGGT - 6-FAM	Este trabajo

Sm, *Schistosoma mansoni*; *Str* spp; *Strongyloides* spp.; MIT-Sm, región ADN mitocondrial minisatellite *S.mansoni*; 18S rDNA, secuencia parcial de ADN genómico lineal en 18S rADN de *Strongyloides venezuelensis*; FIP*, *primer* interno FIP marcado con un *quencher*.

AI.6.2. Puesta a punto.

En este punto se detallan los pasos que se llevaron a cabo para optimizar las condiciones de reacción para los ensayos DARQ-LAMP simplex y dúplex.

- El primer paso tras la síntesis de los *primers* fue la hibridación del primer Q-FIP y la sonda marcada con fluoróforo. Esta hibridación se llevó a cabo mediante incubación de las secuencias (50 μ M) a 95°C durante 2 minutos y

- dejándolo enfriar a temperatura ambiente. El resultado de la hibridación pasará a llamarse QPD, del inglés *quencher probe duplex*.
- b) Todas las pruebas iniciales se evaluaron para reacciones DARQ-LAMP simplex, en un volumen final de reacción de 25 μ L y una misma concentración de ADN (5ng/ μ L) para los controles positivos.
 - c) Las concentraciones de *primers* para reacciones simplex fueron: 0,2 μ M para F3 y B3, 1,6 μ M para BIP y 1,6 μ M para la mezcla que incluye el FIP no marcado y el QPD (FIP* y sonda marcada).
 - d) Tras la generación del producto hibridado QPD, se probaron diferentes condiciones de reacción para evaluar cual era la más apropiada para llevar a cabo los ensayos: concentraciones de MgSO₄ suplementario (6 nm, 8 nm y 10nm); temperaturas de reacción (61 $^{\circ}$ C, 65 $^{\circ}$ C y 70 $^{\circ}$ C); tiempos de reacción (60 minutos y 90 minutos).
 - e) Además, se realizó la valoración de las concentraciones de QPD óptimas para los ensayos. A partir del stock de 50 μ M se preparó una dilución de QPD a 5 μ M para uso. Se valoraron diluciones del 10% (90:10) y del 15% (85:15) de QPD en reacción con la cantidad total de cebador interno FIP no marcado. Independientemente de las proporciones de QPD y FIP, siempre se utilizó una concentración final de 1,6 μ M en las reacciones.
 - f) Las condiciones óptimas para la reacción simplex se establecieron en: una concentración de 6mM MgSO₄ suplementario, 61 $^{\circ}$ C de temperatura de reacción, 15% de QPD (15 QPD : 85 FIP no marcado).
 - g) Una vez estandarizadas las reacciones DARQ-LAMP simplex, se evaluó para reacciones DARQ-LAMP dúplex, es decir, para la amplificación simultánea de ADNg de ambos parásitos, *S. mansoni* y *S. venezuelensis*. La proporción de cada conjunto de cebadores utilizado fue del 50:50, manteniendo la concentración final de *primers* (de los dos sets) en 3,6 μ M.
 - h) Las reacciones dúplex se probaron en diferentes volúmenes finales de reacción: 25 μ L, 20 μ L y 15 μ L. Todos ellos resultaron adecuados para las reacciones dúplex.
 - i) Se probaron diferentes combinaciones de concentraciones de ADNg para evaluar la amplificación simultánea de ambos parásitos. Sm 5 ng/ μ L + Sv 2.5 ng/ μ L; Sm 2.5 ng/ μ L + Sv 5 ng/ μ L; Sm 5 ng/ μ L + Sv 5 ng/ μ L, e individuales Sm 5 ng/ μ L y Sv 5 ng/ μ L.

AI.6.3. Evaluación de sensibilidad

Primero se estableció la sensibilidad de las reacciones DARQ-LAMP simplex y para ello se utilizó como controles positivos ADN genómico de los parásitos, *S. mansoni* y *S. venezuelensis*, a una concentración de 5ng/ μ L y se hicieron diluciones seriadas 1:10 hasta una concentración final de 0,5fg/ μ L. Para las reacciones dúplex, la sensibilidad se estableció mezclando las diluciones seriadas empleadas para establecer la sensibilidad de las pruebas simplex. Se utilizaron por tanto mezclas que contenían ADNg de *S. mansoni* y *S. venezuelensis*.

AI.7. Estabilización de reactivos DARQ-LAMP

La estabilización de los reactivos DARQ-LAMP que se lleva a cabo en el segundo artículo de la Tesis, se realizó siguiendo la metodología descrita por *García-Bernalt y colaboradores* en el 2021 [7]. La estabilización se basa en un proceso de secado al vacío en un solo paso sin centrifugación, denominado desecación, en presencia de trehalosa y llevado a cabo en un Concentrador Plus (EPPENDORF, Alemania). Esta metodología se presenta a continuación:

1. La mezcla de reacción se separaba en dos mezclas parciales: una colocada en la tapa del tubo y que contenía el *isothermal buffer* 10x, el $MgSO_4$ y trehalosa 2M, y la otra colocada en el fondo del tubo y contenía ambos sets de *primers* para *S. mansoni* y *Strongyloides* spp., dNTPs, la polimerasa *Bst* 2.0 WS y trehalosa 2M.
2. Ambas mezclas separadas en el tubo se expusieron al vacío en un Concentrador Plus (EPPENDORF, Alemania) sin centrifugación (modo D-AQ) a temperatura ambiente durante 30 minutos.
3. El procedimiento de desecación produjo dos *pellets* estables y bien adheridos tanto en la tapa como en el fondo de los tubos. Los tubos se almacenaron a temperatura ambiente hasta su uso.
4. Para la reacción posterior se rehidrataban las mezclas simplemente añadiendo agua ultrapura o agua ultrapura y la muestra correspondiente, hasta un volumen final de 25 μ L. Los tubos se colocaban boca abajo durante 2 minutos para favorecer el proceso de rehidratación.

Este protocolo provoca una ralentización de la reacción, aumentando los tiempos de reacción en aproximadamente media hora.

AI.8. Técnicas parasitológicas

Las técnicas parasitológicas, observación microscópica directa con solución salina y Baermann, fueron empleadas en el tercer artículo.

AI.8.1. Observación microscópica directa con solución salina

La observación directa se realizó a partir de heces frescas de pacientes para la búsqueda de parásitos en las mismas. Se realizó siguiendo los siguientes pasos:

1. Se tomaba una porción de la muestra de heces y se situaba sobre un portaobjetos.
2. Se añadían unas gotas de suero fisiológico sobre la muestra y, a continuación, se mezclaba y distribuida la mezcla sobre el portaobjetos.
3. Finalmente se observaba al microscopio en busca de parásitos.

AI.8.2. Técnica Baermann

La técnica Baermann se empleó para la detección de larvas de *S. stercoralis* a partir de heces frescas de pacientes. Esta metodología pretende concentrar las posibles larvas presentes en las muestras de heces gracias al tropismo de las larvas. Los pasos empleados fueron los siguientes:

1. Las muestras individuales de heces se recogieron en frascos de orina y el análisis se realizó en las 12 horas siguientes a la deposición. Aquellas muestras muy líquidas se les añadió vermiculita, un mineral poroso, para hacer la muestra más consistente.
2. Posteriormente las heces se colocaron sobre 4-6 gasas, en función de la cantidad de muestra, y se formó un hatillo.
3. Sobre un soporte adaptado a la técnica, se colocaba un embudo al que se adaptaba un trozo de goma y se cerraba el extremo inferior con una pinza. Se añadía agua previamente calentada y sin que sobrepasara los 50°C.
4. A continuación, el hatillo se situaba sobre el embudo y se dejaba reposar un mínimo de 45 minutos bajo la luz del sol.
5. Pasado el tiempo necesario se retiraba el hatillo, y se situaba un tubo de ensayo al final de la goma y se abría la pinza hasta llenar el tubo.

6. Una vez llenos, los tubos se centrifugaban o se dejaban reposar durante media hora.
7. Por último, se descartaba el sobrenadante y se observaba al microscopio el resto del sedimento en busca de larvas.

AI.9. Bibliografía

1. Fernández-Soto, P.; Gandasegui Arahuetes, J.; Sánchez Hernández, A.; López Abán, J.; Vicente Santiago, B.; Muro, A. A Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for Early Detection of *Schistosoma mansoni* in Stool Samples: A Diagnostic Approach in a Murine Model. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2014**, *8*, 1–11, doi:10.1371/journal.pntd.0003126.
2. Gandasegui, J.; Fernández-Soto, P.; Carranza-Rodríguez, C.; Pérez-Arellano, J.L.; Vicente, B.; López-Abán, J.; Muro, A. The rapid-heat LAMPellet method: A potential diagnostic method for human urogenital schistosomiasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2015**, *9*, 1–23, doi:10.1371/journal.pntd.0003963.
3. Fernández-Soto, P.; Sánchez-Hernández, A.; Gandasegui, J.; Bajo Santos, C.; López-Abán, J.; Saugar, J.M.; Rodríguez, E.; Vicente, B.; Muro, A. Strong-LAMP: A LAMP Assay for *Strongyloides* spp. Detection in Stool and Urine Samples. Towards the Diagnosis of Human Strongyloidiasis Starting from a Rodent Model. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2016**, *10*, 1–20, doi:10.1371/journal.pntd.0004836.
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, M.A.; et al. Molecular Markers for Detecting *Schistosoma* Species by Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Dis. Markers* **2020**, *2020*, 1–11, doi:10.1155/2020/8042705.
5. Verweij, J.J.; Canales, M.; Polman, K.; Ziem, J.; Brienen, E.A.T.; Polderman, A.M.; van Lieshout, L. Molecular diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in faecal samples using real-time PCR. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2009**, *103*, 342–346, doi:10.1016/j.trstmh.2008.12.001.
6. Bio-Rad Fluorophore reference guide. Fluorophore excitation and emission data Available online: https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_2421.pdf (accessed on Mar 1, 2023).

7. García-Bernalt, J.; Fernández-Soto, P.; Domínguez-Gil, M.; Belhassen-García, M.; Muñoz, J.L.; Muro, A. A Simple, Affordable, Rapid, Stabilized, Colorimetric, Versatile RT-LAMP Assay to Detect SARS-CoV-2. *Diagnostics* **2021**, *11*, 438, doi:10.3390/diagnostics11030438.

ANEXO II

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

AII.1. Otras publicaciones científicas

En esta sección se recogen otros artículos de investigación en los que también se ha colaborado durante el tiempo de formación predoctoral en la Universidad de Salamanca. Se detalla una lista de los mismos y se incluye la primera página de cada uno de los artículos, en la que aparece su resumen.

1. Fernández-Soto P, Gandasegui J, Carranza Rodríguez C, Pérez-Arellano JL, **Crego-Vicente B**, García-Bernalt Diego J, López-Abán J, Vicente B, Muro A. Detection of *Schistosoma mansoni*-derived DNA in human urine samples by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). PLoS One. 2019. 26;14(3):e0214125.
2. 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
3. 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 Oct 14;9(1):14744.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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 Feb 1;10(3):511.
 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 Dec 29;11(1):158.
 10. Febrer-Sendra B, Fernández-Soto P, **Crego-Vicente B**, García-Bernalt Diego J, Ta-Tang TH, Berzosa P, Nguema R, Ncogo P, Romay-Barja M, Herrador Z, Benito A, Muro A. Colorimetric and real-time loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of *Loa loa* DNA in human blood samples. *Diagnostics (Basel)*. 2022. 25;12(5):1079.
 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 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 Jun 16;12(6):424.
 12. Febrer-Sendra B, Fernández-Soto P, García-Bernalt Diego J, **Crego-Vicente B**, Negrodo A, Muñoz-Bellido JL, Belhassen-García M, Sánchez-Seco MP, 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 Mar 29;24(7):6411.

RESEARCH ARTICLE

Detection of *Schistosoma mansoni*-derived DNA in human urine samples by loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

Pedro Fernández-Soto^{1*}, Javier Gandasegui¹, Cristina Carranza Rodríguez^{2,3}, José Luis Pérez-Arellano^{2,3}, Beatriz Crego-Vicente¹, Juan García-Bernalt Diego¹, Julio López-Abán¹, Belén Vicente¹, 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, Salamanca, Spain, **2** Department of Medical and Surgical Sciences, University of Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria, Spain, **3** Unit of Infectious Diseases, Maternal and Child Insular University Hospital Complex, Las Palmas de Gran Canaria, Spain

* pfsoto@usal.es (PFS); ama@usal.es (AM)



OPEN ACCESS

Citation: Fernández-Soto P, Gandasegui J, Carranza Rodríguez C, Pérez-Arellano JL, Crego-Vicente B, García-Bernalt Diego J, et al. (2019) Detection of *Schistosoma mansoni*-derived DNA in human urine samples by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). PLoS ONE 14(3): e0214125. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214125>

Editor: Fela Mendlovic, Universidad Nacional Autónoma de México, MEXICO

Received: July 27, 2018

Accepted: March 7, 2019

Published: March 26, 2019

Copyright: © 2019 Fernández-Soto et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.

Funding: This study was supported by the Institute of Health Carlos III, ISCIII, Spain (www.isciii.es), grants: RICET RD16/0027/0018 (AM), DTS16/00207 (AM), PI16/01784 (PFS), European Union cofinancing by FEDER (Fondo Europeo de Desarrollo Regional) "Una manera de hacer Europa". The funders had no role in study design,

Abstract

Background

Schistosoma mansoni is the main species causing hepatic and intestinal schistosomiasis in Sub-Saharan Africa, and it is the only species in South America. Adult stages of the parasite reside in the mesenteric venous plexus of infected hosts, and eggs are shed in feces. Collecting patient stool samples for *S. mansoni* diagnostic purposes is difficult in large-scale field trials. Urine samples would be an alternative approach for molecular *S. mansoni* detection since they have several advantages over stool samples, including better handling, management and storage. Additionally, loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technology is a powerful molecular diagnostic tool for infectious diseases, particularly under field conditions in developing countries. The present study aimed to assess the effectiveness of our previously developed LAMP assay (SmMIT-LAMP) for *S. mansoni*-specific detection in clinical urine samples.

Methodology/Principal findings

The sensitivity of SmMIT-LAMP in urine was established in simulated fresh human urine samples artificially spiked with genomic DNA from *S. mansoni*. LAMP for 120 min instead of 60 min improved the sensitivity, reaching values of 0.01 fg/μL. A set of well-defined frozen stored human urine samples collected from Sub-Saharan immigrant patients was selected from a biobank to evaluate the diagnostic validity of SmMIT-LAMP. The set included urine samples from patients with microscopy-confirmed infections with *S. mansoni*, *S. haematobium* and other nonschistosome parasites, as well as urine samples from patients with microscopy-negative eosinophilia without a confirmed diagnosis. The SmMIT-LAMP was incubated for 60 and 120 min. A longer incubation time was shown to increase the LAMP-positive results in patient urine samples. We also tested urine samples from mice experimentally infected with *S. mansoni*, and LAMP-positive results were obtained from the third

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)

Research Article

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

Diego Ordóñez ¹, Pedro Fernández-Soto ², Ana M. Fernández-Martín,²
Beatriz Crego-Vicente ², Begoña Febrer-Sendra,² Juan García-Bernalt Diego ²,
Belén Vicente,² Julio López-Abán ², Moncef Belhassen-García,² Antonio Muro ²,
and Manuel A. Patarroyo ^{3,4}

¹Animal Science Faculty, Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales (U.D.C.A), 111166 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, 112111 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

Research Article

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

Pedro Fernández-Soto ¹, Catalina Avendaño ², Anna Sala-Vizcaíno,¹
Beatriz Crego-Vicente ¹, Begoña Febrer-Sendra,¹ Juan García-Bernalt Diego ¹,
Ana Oleaga,³ Julio López-Abán ¹, Belén Vicente,¹ Manuel A. Patarroyo ^{4,5}
and Antonio Muro ¹

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].

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

*Correspondence: pfsoto@usal.es; ama@usal.es

[†]Pedro Fernández-Soto and Carlos Fernández-Medina contributed equally to this work

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



© 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 [✉]

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; juanbernalt95@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

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



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/>).

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

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 Luís 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.); hlorenzojuan@usal.es (H.L.J.); jpendones@saludcastillayleon.es (J.P.); jamarot@usal.es (J.A.M.O.); ffgc@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; jandaluz10_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.); beatrizcregovic@usal.es (B.C.-V.); carbonell@usal.es (C.C.); alopezb@saludcastillayleon.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.)

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



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/>).

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

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.); juanbernalt95@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,

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; juanbernalt95@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 1+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



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



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/>).

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

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

AII.2. Comunicaciones en congresos

Se recogen en esta sección las comunicaciones en congresos nacionales e internacionales presentadas a lo largo del periodo de formación predoctoral. Se detalla una lista de las comunicaciones, ordenadas por congresos, incluyendo si fueron presentadas como comunicación oral o como póster.

1. 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.**
2. 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.**
3. **Crego-Vicente B**, Fernández Soto P, Sempere MA, García-Bernalt Diego J, Febrer-Sendra B, Ramos Montesdeoca M, Saugar JM, Rubio JM, Gómez Sanchez 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 Ó, 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 (SEM-TSI). 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 (SEM-TSI). 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 (SEM-TSI). 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 (SEM-TSI). Retos en Salud Global. Ávila (España). 2019. **Comunicación oral.**
 9. **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 eosinofilia importada de difícil tipificación. XII Congreso de la Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional (SEM-TSI). Pamplona (España). 2022. **Comunicación oral.**
 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 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 (SEM-TSI). Pamplona (España). 2022. **Comunicación oral.**

11. 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 (SEM-TSI). 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 (SEM-TSI). Pamplona (España). 2022. **Póster.**
13. M.P. Luzón García, **B. Crego Vicente**, J. Salas Coronas, B. Febrer Sendra, M.J. Soriano Pérez, P. Fernández Soto. Utilidad de la técnica LAMP en orina en pacientes inmigrantes con eosinofilia sin diagnóstico etiológico. XXV Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 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

BEATRIZ CREGO VICENTE 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 como 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.



Raúl Iglesias Blanco,
Secretario del XXI Congreso de la SOCEPA



Sociedad Española
de Parasitología



XXI Congreso SOCEPA

Pontevedra
3-5 JULIO 2019

BEATRIZ CREGO VICENTE es coautora del trabajo *Detección de ADN de Loa loa en muestras clínicas mediante LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) a tiempo real*, presentado en formato póster 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



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-Aban 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 POCT 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, P16/01784 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 PODOCNIOSIS PATIENTS; A PILOT STUDY

Temesgen A.^{1,2,4}, Chatwin C.³, Fekadu A.^{1,4}, Dixon B.⁵, 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 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

**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 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

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-Bermalt 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 BARGUES 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
Museo Universidad de
Navarra, Pamplona,
del 8 al 10 de marzo de 2022
SEM-TSI



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



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



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



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 BARGUES CASTELLÓ
Presidenta de la SEM-TSI

Santiago MAS-COMAS
Presidente del Comité Científico

www.semtsi.org



XXV SEIMC | 2 - 4
CONGRESO NACIONAL | JUNIO
Sociedad Española de Enfermedades
Infecciosas y Microbiología Clínica | 2022



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?ccf=A749-C168775-PCAG659-PDI989-V1>

Dr. Antonio Rivero
Presidente de la SEIMC

Dra. Carmen Fariñas
Presidenta Comité Científico Congreso

1013



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.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'C. del Águila'.

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 que se ha colaborado durante el tiempo de formación predoctoral en la Universidad de Salamanca. A continuación, se detalla una lista de las publicaciones y se adjunta la primera página de cada una de ellas.

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 SYBR™ Green y EvaGreen®, e indicadores de metal como calceína y verde de malaquita; **florescencia 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

Se incluyen dos premios de investigación otorgados por el Decanato de la Facultad de Farmacia a las mejores publicaciones científicas presentadas por estudiantes de doctorado en las convocatorias del año 2019 y del año 2021.

 UNIVERSIDAD DE SALAMANCA <small>CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL</small>	 800 años 1218 - 2018		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, D^a. Beatriz Crego Vicente, D. Sergio Alonso Castrillejo, D^a. Begoña Febrer Sendra, D^a. Ana Gómez Sánchez, D^a. 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 V^o B^o del Decano, en Salamanca a diez de diciembre de dos mil diecinueve.

<p>V^oB^o El Decano</p>  Antonio Muro Álvarez	<p>La Secretaria</p>  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^a. 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.^a 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^a. Begoña Febrer-Sendra, D. Juan García-Bernalt Diego, D. Jérôme Boissier, D. Etienne K. Angora, D^a. 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 MARTIN
ANA ISABEL -
11764194Q
Firmado digitalmente por
MORALES MARTIN ANA
ISABEL - 11764194Q
Fecha: 2022.01.12
14:57:20 +01'00'

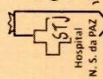
Fdo.: Ana Isabel Morales Martín

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



PROVINCIA
NOSSA SENHORA RAINHA
Companhia de Santa Teresa de Jesus
*Nada é impossível sem trabalho e sacrifício
virtude e agraça/cuidado sem etc. (Henrique do Ocho)*

HNSP

Certificado

A Direcção do Hospital Nossa Senhora da Paz, - Cubal, vem por este meio certificar que a Sra. **Beatriz Grego Vicente, com passaporte nº PAN275703** emitido pela Polícia nacional do Reino de Espanha, esteve connosco 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 assinado e carimbado pela direcção desta instituição hospitalar.


Cubal, Agosto de 2022

O DIRECTOR CLÍNICO
Daniel B. Sumbelelo
Dr. Daniel Bandeira Sumbelelo

Cubal, Agosto de 2022

O DIRECTOR PEDAGÓGICO E CIENTÍFICO
Nicolau Mallengue Sikaleta
Dr. Nicolau Mallengue Sikaleta

O DIRECTOR GERAL
Maria Rosalina Praia
Dra. Maria Rosalina Praia



MISSONÁRIO NOSSA SENHORA RAINHA
HOSPITAL
NOSSA S. DA PAZ
NIF: 5000344834

