



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO

**DESARROLLO DE UNA TÉCNICA PARA
EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE
Escherichia coli ENTEROTOXIGÉNICA
(ETEC) EN MUESTRAS DE HECES
BASADA EN LA AMPLIFICACIÓN
ISOTÉRMICA CON RECOMBINASA Y
POLIMERASA (RPA)**

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO
EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

LUIS ESTEBAN CABRERA SOSA

LIMA – PERÚ

2017

Asesora: Dra. Theresa Ochoa Woodell

Co-asesora: Dra. Vanessa Adai Sichi

A mis padres: mamá Carmen y papá Tito

“Science is a horizon to search for,
not a prize to hold in your hand”

Waddles, *Gravity Falls*

Agradecimientos

Este trabajo no ha podido ser posible sin la ayuda de varias personas.

En primer lugar, a la Dra. Theresa Ochoa, quien no solo me aceptó a formar parte de su equipo de trabajo, sino también ha sido una gran maestra, tanto en lo académico como en lo profesional. Estaré siempre agradecido por la oportunidad brindada.

En segundo lugar, a la Dra. Vanessa Adauí, quien a pesar de sus ocupaciones y la distancia, siempre ha tenido tiempo y buena disposición de ayudarme y aclararme las dudas que he tenido. También, gracias por los ánimos cuando eran necesarios.

También quiero agradecer al Dr. Alejandro Castellanos y al Dr. Clinton White, University of Texas Medical Branch, por su apoyo inicial en la metodología y su generosidad y paciencia por colaborarnos con los materiales. Quiero aprovechar en agradecer a todos los que, con riesgos, me ayudaron a traer los reactivos a Perú.

Quiero reconocer a FONDECYT por financiar mis estudios de maestría, al igual que los de mis compañeros y muchos proyectos científicos en el país. Gracias por meternos presión para culminar toda la maestría.

Asimismo, quiero agradecer a David Durand, Erik Mercado y Giovanni López, por su ayuda técnica y sus consejos en la parte experimental a lo largo de toda la tesis.

Gracias a los miembros del Laboratorio de Infectología Pediátrica y del Laboratorio de Enfermedades Entéricas, Nutrición y Resistencia Antibiótica, quienes a pesar de dudar a veces en la técnica y muchas otras cosas más, estuvieron ahí.

No quiero olvidar de mencionar a mi familia; en especial a mis padres, por apoyarnos y acompañarnos en todo lo que nos proponemos. Con ellos también estaré eternamente agradecido.

Finalmente, quiero agradecer a mis amigos de la universidad: Viviana Sánchez-Aizcorbe, Juan Blume, José Alberto Nakamoto, Jovanka Gencel, Iván Condori, Andrés Posadas, Fabiola Valdivia, Anika Eca, entre otros. En especial a los dos primeros, por estar cuando los necesité y por tener las palabras indicadas en los momentos precisos.

Una vez más, muchas gracias a todos.

Luis Cabrera

Fuentes de financiamiento

Los estudios de Maestría y gran parte de los gastos de investigación fueron financiados con un aporte de FONDECYT, de conformidad al Convenio de Gestión N° 031-2015-FONDECYT.

Índice

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
III.	MARCO TEÓRICO	7
3.1	<i>Escherichia coli</i> diarrogénicas (DEC)	7
3.2	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (ETEC)	8
3.2.1	Generalidades	8
3.2.2	Epidemiología	8
3.2.3	Patogénesis	10
3.2.4	Diagnóstico	19
3.3	Técnicas de amplificación isotérmica	23
3.3.1	Amplificación isotérmica mediada por lazos (LAMP)	23
3.3.2	Amplificación con recombinasa y polimerasa (RPA)	25
IV.	JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	37
V.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	39
VI.	METODOLOGÍA	40
6.1	Diseño del estudio	40
6.2	Población, muestra y tamaño muestral	40
6.3	Operacionalización de Variables	42
6.4	Procedimientos y Técnicas	47
6.4.1	Crecimiento bacteriano	47
6.4.2	Extracción de ADN bacteriano y de muestras de heces infectadas	47
6.4.3	Diseño de <i>primers</i>	49
6.4.4	Selección de <i>primers</i> para RPA	50
6.4.5	Optimización del ensayo	53
6.4.6	Especificidad analítica	53
6.4.7	PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR) para ETEC	54

6.4.8	Sensibilidad analítica (Límite de detección)	55
6.4.9	Análisis de muestras de heces	56
6.5	Consideraciones éticas	59
6.6	Plan de análisis	59
VII.	RESULTADOS	62
7.1	Análisis de secuencias nucleotídicas	62
7.2	Diseño de <i>primers</i>	63
7.3	Crecimiento de la cepa <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica H10407	66
7.4	Concentración de bacterias y extracción de ADN bacteriano	67
7.5	Selección de <i>primers</i> para RPA	67
7.6	Optimización del ensayo de RPA	76
7.7	Especificidad analítica	79
7.8	PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR) para ETEC	80
7.9	Sensibilidad analítica (Límite de detección)	86
7.10	Análisis de muestras	88
VIII.	DISCUSIÓN	94
8.1	Desempeño diagnóstico del ensayo de RPA	95
8.2	Análisis de las muestras de heces	99
8.3	Optimización y especificidad analítica del ensayo de RPA	101
8.4	Los sistemas de PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR) y el límite de detección para el ensayo de RPA para ETEC	105
8.5	Dificultades en el diseño y selección de <i>primers</i> adecuados para RPA	109
8.6	Ventajas en el uso de RPA	112
8.7	Limitaciones del estudio	114
IX.	CONCLUSIONES	117
X.	RECOMENDACIONES	118
XI.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119

Lista de Figuras

Figura 1. Mecanismo de acción de la <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (ETEC).	14
Figura 2. La amplificación con recombinasa y polimerasa (RPA).	27
Figura 3. Curva de crecimiento de <i>E. coli</i> enterotoxigénica H10407.	66
Figura 4. Detección individual de los genes de ETEC con RPA.	68
Figura 5. Detección simultánea de los genes de ETEC con RPA.	69
Figura 6. Detección individual y simultánea con RPA de los genes de ETEC en heces infectadas.	70
Figura 7. Amplificación del gen para LT en heces con RPA y PCR.	71
Figura 8. Elección de los <i>primers</i> para la toxina LT.	73
Figura 9. Detección simultánea de LT y ST (ST-Ia y/o ST-Ib) con RPA.	75
Figura 10. Efecto del paso de agitación en la RPA.	76
Figura 11. Efecto del tiempo de reacción en la RPA.	77
Figura 12. Efecto de la temperatura de reacción en la RPA.	79
Figura 13. Especificidad analítica del ensayo de RPA.	80
Figura 14. PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR) para LT usando los <i>primers</i> LT-F4 y LT-R5 y ADN bacteriano.	81
Figura 15. PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR) para LT usando los <i>primers</i> LT-F y LT-R y ADN de heces infectadas.	83
Figura 16. Límite de detección del ensayo de RPA.	87
Figura 17. Análisis de muestras con el estándar de oro.	89
Figura 18. Análisis de muestras con RPA.	90

Lista de Tablas

Tabla 1. Sistemas de PCR en tiempo real cuantitativo para <i>E. coli</i> enterotoxigénica.	22
Tabla 2. Rango de temperaturas reportadas para ensayos de RPA.	31
Tabla 3. Tiempos mínimos (y óptimos) de reacción reportados para RPA.	32
Tabla 4. Evaluación en muestras clínicas de ensayos de RPA.	34
Tabla 5. Definición y características de las variables usadas en este estudio.	43
Tabla 6. <i>Primers</i> diseñados para amplificar los genes codificantes para las toxinas LT, STIa y STIb.	64
Tabla 7. Parámetros de PCR cuantitativo en tiempo real para ETEC.	84
Tabla 8. Comparación de resultados totales para el diagnóstico de ETEC en las muestras de heces por PCR en tiempo real y RPA.	91
Tabla 9. Desempeño diagnóstico del ensayo de RPA vs. PCR en tiempo real en muestras de heces (n = 298).	92

Lista de Abreviaturas

%GC	Porcentaje de guanidina y citosina
ΔG	Energía libre de Gibbs
aa	Aminoácido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosin difosfato
AIEC	<i>Escherichia coli</i> de adherencia invasiva
ARN	Ácido ribonucleico
CAEV	Virus de la artritis-encefalitis caprina
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
CF	Factor de colonización
CFTR	Canal relacionado a fibrosis quística
cGMP	Guanosín monofostato cíclico
Cq	Ciclo umbral
DAEC	<i>Escherichia coli</i> de adherencia difusa
DEC	<i>Escherichia coli</i> diarrogénica
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
dTTP	Desoxitimidina trifosfato
dUTP	Desoxiuridina trifosfato
E	Eficiencia de reacción
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EAST1	Toxina termoestable 1 enteroagregativa
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogénica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
ExoIII	Exonucleasa III
FAM	Carboxifluoresceína
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de

	EEUU
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GCc	Guanilil ciclasa C
GEMS	<i>Global Enteric Multicenter Study</i>
GTP	Guanosin trifosfato
IC 95%	Intervalo de confianza al 95%
LAMP	Amplificación isotérmica basada en lazos
LB	Luria Bertani
LID	Laboratorios de Investigación y Desarrollo
Log	Logaritmo natural
LT	Toxina termolábil
m	Pendiente de la recta
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
OD	Densidad óptica
pb	Pares de bases
PBS	<i>Buffer</i> fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PKA	Protein kinasa A
PKC	Protein kinasa C
qPCR	PCR cuantitativo en tiempo real
R ²	Coefficiente de determinación
RIQ	Rango intercuartílico
RPA	Amplificación con recombinasa y polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
SNP	Polimorfismo de nucleótido simple
	Serin proteasa autotransportadora de
SPATE	Enterobacteriaceae
SSB	Proteínas de unión a hebra simple

ST	Toxina termoestable
STEC	<i>Escherichia coli</i> productora de Shiga-toxina
ST-ETEC	ETEC productora de toxina ST
THF	Tetrahidrofurano
Tm	Temperatura de fusión
U	Unidades de enzima
UFC	Unidad formadora de colonia
UFC/rxn	Unidad formadora de colonia por reacción
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
VPN	Valor predictivo negativo
VPP	Valor predictivo positivo

RESUMEN

Introducción: La *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) causa diarrea principalmente en niños menores de 5 años. Su diagnóstico se basa en la detección de las toxinas termolábil (LT) y/o termoestable (ST). Actualmente, se usan técnicas moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), pero su aplicación en el punto de atención al paciente es difícil. La amplificación isotérmica con recombinasa y polimerasa (RPA) es una técnica isotérmica reciente que se viene evaluando en la detección de varios patógenos y tiene potencial para su uso en zonas de bajos recursos.

Objetivo: El objetivo de este trabajo fue desarrollar un método para el diagnóstico de ETEC en muestras de heces mediante la detección simultánea de los genes para las toxinas LT y ST usando RPA.

Métodos: Se diseñaron y seleccionaron *primers* para los genes codificantes de las toxinas LT y ST (ST-Ia y ST-Ib) adecuados para su detección simultánea por RPA. Se determinaron las condiciones de reacción óptimas (temperatura y tiempo) y se evaluaron la especificidad (ausencia de reacción cruzada con otros patógenos) y la sensibilidad (límite de detección) analíticas. Se determinó la sensibilidad y la especificidad diagnóstica de la técnica de RPA en 298 muestras de heces previamente recolectadas usando la PCR en tiempo real como estándar de oro.

Resultados: Se diseñaron 32 *primers* para las tres toxinas de ETEC. Para la amplificación con RPA, se seleccionaron 2 *primers* para LT, mientras que se usaron

primers previamente reportados para ST-Ia y ST-Ib. Los tres genes pudieron ser amplificados con RPA; sin embargo, no se pudo secuenciar los productos para corroborar. Solo se logró la detección simultánea para LT y ST-Ia. La RPA funcionó entre 30°C y 50°C y el tiempo mínimo de reacción fue de 5 min. No hubo reacción cruzada con otros enteropatógenos. El límite de detección para los genes de las toxinas LT y ST-Ia fue 10 y 100 UFC/rxn, respectivamente. La sensibilidad de la RPA para la detección de ETEC fue 91.57% (intervalo de confianza al 95% [IC 95%]: 87.52 – 94.64%) y la especificidad fue 94.59% (IC 95%: 81.81 – 99.34%).

Conclusiones: Se desarrolló una técnica para la detección de ETEC en heces usando RPA. La sensibilidad y especificidad analíticas son óptimas. La alta sensibilidad y especificidad diagnósticas hacen que la técnica sea adecuada para su uso. Su implementación en el punto de atención requiere algunas modificaciones a la técnica reportada en este estudio, así como la validación por secuenciación.

Palabras claves: *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), Amplificación con recombinasa y polimerasa (RPA), Diagnóstico, Diarrea.

ABSTRACT

Background: Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) is an important cause of diarrhea in children under 5 years of age. Diagnosis of ETEC requires the detection of the heat-stable enterotoxin (ST) and/or heat-labile toxin (LT). Nowadays, polymerase chain reaction (PCR)-based molecular techniques are used, but their application at point-of-care is difficult. Recombinase polymerase amplification (RPA) is a novel isothermal technique being evaluated for detection of many pathogens and has great potential for use at resource-poor settings.

Objective: The aim of this study was to develop a diagnostic assay for ETEC in stool samples by simultaneous detection of LT and ST enterotoxin-encoding genes using RPA.

Methods: *Primers* for LT and ST (ST-Ia and ST-Ib) enterotoxin-encoding genes suitable for their simultaneous detection by RPA were designed and selected. Optimal reaction conditions (temperature, and time) were determined. Analytical specificity (absence of cross-reaction with other pathogens) and sensibility (limit of detection) were tested. Diagnostic sensitivity and specificity of the RPA assay for ETEC detection were evaluated in 298 previously collected stool samples using real-time PCR as the gold standard.

Results: Thirty two *primers* were designed for the three toxin-encoding genes. For the RPA assay, two of them were selected for amplification of LT gene, whereas previously reported *primers* were used for ST-Ia and ST-Ib. RPA was capable of

amplified all of three genes, however, sequencing couldn't be performed as validation. Simultaneous detection was achieved only for LT and ST-Ia. The RPA worked between 30 and 50°C, and the minimum reaction time was 5 min. There was no-cross reaction with other enteropathogens. The limit of detection for the LT and ST-Ia toxin-encoding gene were 10 and 100 CFU/rxn, respectively. The sensitivity of the RPA assay for ETEC detection was 91.57% (95% confidence interval [95% IC]: 87.52 – 94.64%), and the specificity was 94.59% (95% IC: 81.81 – 99.34%).

Conclusions: A diagnosis assay for ETEC in stool samples using RPA was developed. Analytical sensitivity and specificity were optimal. The high diagnostic sensitivity and specificity make the RPA assay suitable for its use. Its application at point-of-care requires some modifications of the assay reported in this study and the validation by sequencing.

Keywords: Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC), Recombinase polymerase amplification (RPA), Diagnosis, Diarrhea.

I. INTRODUCCIÓN

La diarrea es una condición muy frecuente y de gran impacto en los humanos. Está definida clínicamente como la presencia de 3 o más deposiciones de heces acuosas o al menos una deposición de heces acuosa y con sangre al día (OMS, 2013) y puede estar presente en todas las etapas de la vida. La diarrea cobra importancia en los primeros años de vida, siendo la tercera causa de muerte en niños menores de 5 años. Durante 2013, aproximadamente 6.5 millones de niños fallecieron, de los cuales, el 9.2% de las muertes fue por diarrea (Liu *et al.*, 2015). Las regiones en vías de desarrollo, como África, sur de Asia y Latinoamérica, son las más afectadas por este mal (Lanata *et al.*, 2013). Además, el efecto perjudicial de la diarrea en el desarrollo intelectual y crecimiento de los niños ha sido reportado en estas regiones: hay una mayor probabilidad de que el niño tenga un menor tamaño, menor coeficiente intelectual y menor peso a los 7 a 9 años si tuvo episodios de diarrea repetitivos o de larga duración durante los 2 primeros años de vida (Guerrant *et al.*, 2013).

Los agentes causantes de la diarrea incluyen virus, parásitos y bacterias. A nivel mundial, se ha estimado que los principales patógenos implicados en diarrea en niños son rotavirus, calcivirus y *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) y enterotoxigénica (ETEC) (Lanata *et al.*, 2013). La frecuencia de los patógenos causantes de diarrea varía según el grupo de edad, la región geográfica y otros factores (Riveros y Ochoa, 2015). Por ejemplo, el estudio GEMS (del inglés “*Global Enteric Multicenter Study*”) evaluó los patógenos más frecuentes en diarrea severa en

África y Asia; y encontró que estos fueron rotavirus, *Cryptosporidium* sp. y ETEC (Kotloff *et al.*, 2013). Entre las bacterias, los agentes etiológicos más comunes en países en vías en desarrollo son las *E. coli* diarrogénicas o DEC (OMS, 2013), los cuales representan aproximadamente el 30% de los casos (Ochoa *et al.*, 2011).

Las *E. coli* diarrogénicas (DEC) son una clase de *E. coli* patogénicas asociadas a cuadros de diarrea (Nataro y Kaper, 1998). Las DEC se clasifican en seis patotipos según sus factores de virulencia y sus manifestaciones clínicas (Kaper *et al.*, 2004). La frecuencia de los patotipos de las DEC en diarrea varía por los países analizados, la edad de los pacientes y otros factores. Por ejemplo, en el Perú, la *E. coli* enteroagregativa (EAEC), la EPEC y la ETEC son los 3 patotipos con mayor incidencia en diarrea infantil en zonas periurbanas (Ochoa *et al.*, 2011).

La ETEC es aquel patotipo que presenta las enterotoxinas termolábil (LT) y/o termoestable (ST), cuya presencia es usada en su diagnóstico (Croxen *et al.*, 2013). Diversos métodos para diagnosticar ETEC han sido empleados en el tiempo, entre los que se encuentran técnicas fisiológicas, inmunológicas y moleculares. Actualmente, estas últimas son las más usadas por su alta sensibilidad y especificidad (Qadri *et al.*, 2005). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real es considerada como el estándar de oro para la detección de la ETEC y los otros patotipos de DEC. No obstante, implementar esta técnica en zonas rurales es difícil y costoso debido a la necesidad de infraestructura especializada y personal capacitado.

Las técnicas de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos tienen potencial para ser usadas en el diagnóstico en el punto de atención a pacientes (“*point-of-care*”) ya que no requieren el uso de un termociclador (Li y Macdonald, 2015). La amplificación con recombinasa y polimerasa (RPA, del inglés “*Recombinase Polymerase Amplification*”) es una técnica de amplificación isotérmica reciente que usa principalmente tres proteínas (una recombinasa, proteínas de unión a hebras de cadena simple y una ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de hebras) para llevar a cabo la síntesis de ADN.

La detección del producto amplificado por RPA puede darse mediante distintos métodos (electroforesis, fluorescencia u oligocromatografía) (Piepenburg *et al.*, 2006). Asimismo, la temperatura y el tiempo de reacción de la RPA son menores en comparación a otras técnicas de amplificación isotérmica y a la PCR. Además, los reactivos pueden ser almacenados sin necesidad de refrigeración. Todas estas características hacen que la RPA sea apta para una aplicación en el punto de atención al paciente, incluso en zonas alejadas (Daher *et al.*, 2016).

En este trabajo, se propuso desarrollar una técnica de diagnóstico molecular de ETEC en muestras de heces usando RPA como método de amplificación de los genes que codifican para las toxinas LT y ST. Una vez estandarizada, la técnica fue evaluada en muestras de heces previamente recolectadas de niños en zonas periurbanas de Lima (Ochoa *et al.*, 2013) y se comparó con los resultados de la PCR en tiempo real.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La ETEC se encuentra entre los patotipos de DEC más frecuentes en diarrea infantil en diversos países en vías de desarrollo, entre ellos, el Perú (Ochoa *et al.*, 2011). Además, la cantidad de muertes en casos de diarrea asociados a ETEC varía entre 37800 y 59000 al año (Kovacs *et al.*, 2015; Lanata *et al.*, 2013). La presencia de ETEC no solo abarca los primeros años de vida, pues es la principal causa de la diarrea del viajero, que afecta sobre todo a países desarrollados (Steffen *et al.*, 2015); y en diarreas de adolescentes y adultos (Fischer Walker *et al.*, 2010). Asimismo, la ETEC ha sido encontrada como una causa importante en brotes de diarrea producidos por aguas y alimentos contaminados (MacDonald *et al.*, 2015), por desastres naturales (Ahmed y Qadri, 2008) y en diarrea de militares asignados en países en vías de desarrollo (Monteville *et al.*, 2006).

A pesar de su importancia, el diagnóstico de ETEC, basado en detectar la presencia de las toxinas LT o ST, es complejo o costoso (Qadri *et al.*, 2005). Anteriormente, se ha usado métodos fisiológicos e inmunológicos, mientras que actualmente se usan técnicas moleculares (Qadri *et al.*, 2005). La PCR es la más usada, no solo para el diagnóstico de la ETEC, sino también para varios otros patógenos. Se ha llegado a desarrollar sistemas de PCR en tiempo real para la detección simultánea de las DEC (Guion *et al.*, 2008), sistemas de PCR cuantitativo en tiempo real basado en SYBR-Green (Youmans *et al.*, 2014) o en sondas TaqMan (Pattabiraman *et al.*, 2016); e incluso, paneles de detección simultánea de enteropatógenos han sido desarrollados y

aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de EEUU (Khare *et al.*, 2014).

No obstante, todas solo se dan en laboratorios de referencia o en trabajos de investigación, debido a la necesidad de personal capacitado y de infraestructura especializada (termociclador), lo que complica la implementación de estas técnicas en centros de salud o zonas rurales de países en vías de desarrollo. Las técnicas de amplificación isotérmica pueden aliviar estos problemas, facilitando así su aplicación en el punto de atención al paciente (Li y Macdonald, 2015).

Para la ETEC, se ha reportado el uso de la amplificación isotérmica basada en lazos (LAMP, del inglés “*Loop-mediated isothermal amplification*”) para la detección de las toxinas LT y ST (Yano *et al.*, 2007). No obstante, ninguna de ellas ha sido aplicada en campo. Además, la LAMP presenta algunas dificultades, como la presencia de resultados falsos positivos (Wang *et al.*, 2016).

La amplificación con recombinasa y polimerasa (RPA) es otra técnica de amplificación isotérmica que usa los componentes de la recombinación del fago T4 para facilitar la síntesis de ADN con una polimerasa con actividad de desplazamiento de hebras. La RPA presenta diversas características que favorecen su aplicación en campo: la versatilidad en la detección del producto amplificado, las bajas temperaturas y corto tiempo de reacción respecto a otras técnicas de amplificación isotérmica, y la facilidad en el almacenamiento de los reactivos (Daher *et al.*, 2016).

Se ha desarrollado técnicas de diagnóstico basadas en RPA para diversos patógenos, que incluyen virus ADN, virus ARN, protistas, hongos, bacterias Gram positivo y negativo (James y Macdonald, 2015; Daher *et al.*, 2016). Incluso, ya se ha aplicado algunas de estas técnicas en zonas alejadas de África y Asia (Escadafal *et al.*, 2014; Abd El Wahed *et al.*, 2013; Magro *et al.*, 2017).

No obstante, aún no se ha reportado una técnica de diagnóstico de la ETEC mediante la RPA, cuyo desarrollo es el objetivo principal de este trabajo. Un método de diagnóstico rápido y práctico, es necesario para realizar ensayos clínicos que permitan recomendar el tratamiento adecuado en diarrea de niños; y de esta manera, se pueda disminuir la mortalidad causada por esta bacteria (Medina *et al.*, 2015).

III. MARCO TEÓRICO

3.1 *Escherichia coli* diarrogénicas (DEC)

Las *E. coli* diarrogénicas (DEC) son una clase de *E. coli* patogénicas asociadas a diarrea (Kaper *et al.*, 2004). Seis patotipos han sido descritos hasta el momento: la *E. coli* enteropatógena (EPEC), enterotoxigénica (ETEC), enteroagregativa (EAEC), enteroinvasiva (EIEC), de adherencia difusa (DAEC) y productora de Shiga-toxina (STEC) (Nataro y Kaper, 1998). No obstante, recientemente se ha propuesto a la *E. coli* de adherencia invasiva (AIEC) como un nuevo patotipo (Clements *et al.*, 2012).

La patogénesis de estas bacterias es similar, y consiste en la colonización de la mucosa intestinal, la multiplicación y el daño al hospedero (Kaper *et al.*, 2004). Sin embargo, cada patotipo usa diferentes factores de virulencia en estos procesos, lo cual genera la diferencia entre ellos. Estos factores son adquiridos por transferencia horizontal; principalmente por islas de patogenicidad, plásmidos o provenientes de fagos, aunque existen algunos factores que son cromosómicos (Croxen *et al.*, 2013).

La frecuencia de las DEC en diarrea varía según los países analizados, la edad de los pacientes y otros factores. Por ejemplo, en niños menores de 5 años, la EPEC y ETEC son las más frecuentes a nivel mundial (Lanata *et al.*, 2013). En el Perú, la EAEC, EPEC y ETEC son los 3 patotipos con mayor incidencia en diarrea infantil en zonas periurbanas (Ochoa *et al.*, 2011); mientras que la EAEC, EPEC y DAEC, en zonas rurales como Moyobamba y Urubamba (Acosta *et al.*, 2016).

3.2 *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC)

3.2.1 Generalidades

Entre las DEC, la ETEC es una de más destacables. La ETEC se diferencia de las otras DEC porque produce la toxina termolábil (LT), la toxina termoestable (ST) o ambas (Qadri *et al.*, 2005). La presentación clínica de la diarrea producida por ETEC es una diarrea acuosa que va de moderada a severa. Otros síntomas que pueden acompañar son fiebre, dolor abdominal, náuseas y vómitos. El periodo de incubación es de 1 a 2 días post-ingesta. Las infecciones son transmitidas por la ruta fecal-oral y la dosis infecciosa varía entre 10^6 y 10^8 bacterias (Croxen *et al.*, 2013).

Diversos estudios han comprobado el efecto de la ETEC en el crecimiento los niños. Así, se ha encontrado una asociación estadística (Black *et al.*, 1984) o una tendencia (Lee *et al.*, 2014) entre el porcentaje de días con la presencia de ETEC y una disminución en la ganancia de peso en niños de Bangladesh y Perú, respectivamente.

Mediante filogenia de genoma completo, se ha podido comprobar que la mayoría de cepas de ETEC se encuentra en los filogrupos B1 y A; además que en el 83% de los casos, las cepas secretadas en diarrea son una población clonal (Sahl *et al.*, 2015).

3.2.2 Epidemiología

En el 2010, a nivel mundial y tomando en cuenta la población adulta y pediátrica, se estimó que ocurrieron 4.6 billones de casos de diarrea y 1.6 millones de muertes asociadas a estas. De estos, la ETEC estuvo presente en 233 millones de casos y

causó entre 55500 y 97000 muertes. Además, a nivel regional, la ETEC fue una importante causa de muerte por diarrea en África y América (Pires *et al.*, 2015).

La ETEC se encuentra entre las tres DEC más comunes en diarrea infantil en diversos países en vía de desarrollo como el Perú (Ochoa *et al.*, 2011). Además, la cantidad de muertes en casos de diarrea infantil asociados a ETEC varía entre 37800 y 59000 al año (Kovacs *et al.*, 2015; Lanata *et al.*, 2013). Incluso, se asocia a un mayor riesgo de muerte, principalmente si la ETEC produce la toxina ST (ST-ETEC) (Kotloff *et al.*, 2013). De hecho, la ST-ETEC es uno de los patógenos que presentó una asociación entre la cantidad de bacterias y la presencia de diarrea severa (Liu *et al.*, 2016).

La presencia de ETEC no solo abarca los primeros años de vida. Este patógeno es la principal causa de la diarrea del viajero (Steffen *et al.*, 2015). A nivel regional, representa el 42% de los casos de diarrea del viajero en Latinoamérica y el 28% en Asia, siendo el patógeno más identificado en cada región (Jiang y DuPont, 2017). En viajeros que visitaron Perú, la ETEC representó el 11% de casos de diarrea, siendo la principal bacteria aislada (Jennings *et al.*, 2017).

Por otro lado, la ETEC es la DEC más común en diarreas de niños mayores de 5 años, adolescentes y adultos. A nivel mundial en esas edades, la cantidad de muertes por ETEC es 82100 (Lozano *et al.*, 2012). Además, la incidencia de diarrea por ETEC es 15 y 28.7 millones de episodios en África y en el sur de Asia, respectivamente. En tanto, la cantidad de muertes por ETEC en esas regiones fue 43000 y 45700, respectivamente (Lamberti *et al.*, 2014).

Asimismo, la ETEC puede ser encontrada en aguas o alimentos (Singh *et al.*, 2014), lo cual ha generado casos epidémicos (MacDonald *et al.*, 2015). Finalmente, también es comúnmente encontrada (entre 8 y 16%) en diarrea en condiciones de desastres naturales (Charles *et al.*, 2014) y diarrea en militares asignados en países en vías de desarrollo (Monteville *et al.*, 2006).

3.2.3 Patogénesis

El proceso de la enfermedad inicia cuando la ETEC coloniza el epitelio del intestino delgado, principalmente mediante los factores de colonización (CF). Una vez adherido, la ETEC secreta las enterotoxinas termolábil (LT) y/o la termoestable (ST), las cuales generan la diarrea acuosa característica de esta bacteria.

3.2.3.1 Factores de Colonización

Los CF son estructuras proteicas que permiten la adhesión de la bacteria al epitelio del intestino delgado. Los CF son estructural y antigénicamente diversos. Se ha podido identificar hasta 26 tipos diferentes de CF en ETEC (Fleckenstein *et al.*, 2013) y según su morfología, se los puede clasificar en 4 tipos: fimbria o pili, fibrilar, helicoidal y afrimbrial. La longitud de los CF varía de 1 a más de 20 μm , siendo los pili más rígidos y grandes en comparación a los CF fibrilares (Madhavan y Sakellaris, 2015, Fleckenstein *et al.*, 2010). Aunque los receptores naturales de CF en el intestino delgado son desconocidos, se sabe que pueden unirse a glicoproteínas y glicoesfingolípidos derivados de intestino (Madhavan y Sakellaris, 2015). Incluso, se conoce que ETEC puede aglutinar eritrocitos, lo cual se ha atribuido a los CF.

Además, la especificidad del hospedero de distintas cepas de ETEC se debe a la presencia o ausencia de CF particulares (Nagy y Fekete, 2005). A pesar de su importancia, no se ha podido identificar un CF conocido entre 30% a 50% de cepas de ETEC (Clements *et al.*, 2012). A nivel mundial, los CF más comunes son CFA/I, CFA/II y CFA/IV (Croxen *et al.*, 2010).

Debido a que son antigénicos, los CF han sido candidatos para vacunas contra ETEC. De esta manera, se ha propuesto subunidades de CS6 como vacuna. Asimismo, se ha tratado de desarrollar vacunas que tengan CF y las toxinas como antígenos a la vez. Debido a la variabilidad en los factores de virulencias de las cepas de ETEC, incluyendo que en algunas no se ha identificado un CF conocido, el desarrollo de vacunas en ETEC es complicado (O’Ryan *et al.*, 2015).

3.2.3.2 Otras proteínas de adherencia

Los genes *tia* y *tib* codifican para proteínas adhesivas en ETEC. Tia es una proteína de la membrana externa y TibA es un autotransportador glicosilado (Clements *et al.*, 2012). Ambas están involucradas en la invasión y adherencia al epitelio. En tanto, Tia participa en la autoagregación y la formación de biopelículas (“*biofilm*”) e interactúa con los proteoglicanos heparán sulfato (Croxen *et al.*, 2013).

Por otro lado, EtpA es secretada por ETEC y se une al lado distal del flagelo, permitiendo ser un “puente” con la célula hospedera, hasta una distancia de 10 μ m.

Luego del contacto, la expresión de EtpA disminuye; mientras que la expresión de la fimbria tipo 1 y la adhesina EaeH aumentan (Fleckenstein *et al.*, 2010).

EtpA es degradada por EatA, una serin proteasa autotransportadora de Enterobacteriaceae (SPATE), con lo cual se modula la adhesión y se aumenta la secreción de la toxina LT. Se ha propuesto que el flagelo con EtpA acerca la bacteria al epitelio para ayudar a la interacción de los CF. Luego, EatA degrada a EtpA y finalmente, Tia y TibA realizan una adherencia más cercana (Clements *et al.*, 2012).

3.2.3.3 La toxina termolábil (LT)

La toxina LT es una proteína del tipo AB₅ que es homóloga a la toxina colérica. Consiste de una subunidad A y 5 subunidades B. La subunidad A consiste de dos dominios unidos por un puente disulfuro: A1, que tiene la actividad toxigénica y A2, una porción helicoidal de la molécula que se ancla al pentámero de subunidades B. Este pentámero tiene forma de un anillo y puede unirse a GM1, GD1b y algunas glicoproteínas intestinales (Mudrak y Kuehn, 2010). La toxina LT es polimórfica: se han encontrado hasta 44 polimorfismos de nucleótido simple (SNP) en ambas subunidades, siendo la subunidad A la que presentó más SNPs. Estos representan hasta 28 variedades de la toxina (Joffré *et al.*, 2015; Joffré y Sjöling, 2016).

A nivel mundial, aproximadamente el 27% de cepas de ETEC expresan solo la toxina LT, mientras que el 33%, la expresan junto con la toxina ST. No obstante, existe una gran variabilidad si se toma en cuenta las regiones geográficas (Isidean *et al.*, 2011).

El mecanismo de acción de LT está bien estudiado (Croxen y Finlay, 2010, Fig. 1). La subunidad B se une a su receptor y la holotoxina es endocitada. El puente disulfuro de la subunidad es cortado, separando A1 y A2. Aunque se sabe que la tripsina puede realizar este corte *in vitro*, la proteína que lo realiza *in vivo* es desconocida (Mudrak y Kuehn, 2010). El péptido A1 transfiere un grupo ADP-ribosil del NAD⁺ a la subunidad α de la proteína de unión a GTP estimulador (Gs) en la membrana basolateral del enterocito. Esta reacción activa la adenilato ciclasa e incrementa los niveles de AMP cíclico (cAMP). El cAMP activa la protein kinasa A (PKA) que fosforila el canal relacionado a fibrosis quística (CFTR). La fosforilación de CFTR incrementa la secreción del ion Cl⁻. El incremento de la cantidad de iones en el lumen intestinal ocasiona un transporte pasivo de agua, lo que resulta en diarrea. Por otro lado, LT puede estimular la síntesis de prostanglandinas, que estimula el transporte de electrolitos y la movilidad intestinal; y el sistema nervioso entérico, relacionado a una inhibición de la absorción (Kaper *et al.*, 2004). Asimismo, LT disminuye la respuesta innata del hospedero, inhibiendo la expresión de péptidos antimicrobianos como las defensinas; e incrementa la adherencia y colonización en el intestino delgado (Fleckenstein *et al.*, 2010). Además, puede activar las rutas de MAP kinasas y NF- κ B (Wang *et al.*, 2012).

LT es secretado por la bacteria en dos pasos. El primero es un transporte dependiente de Sec que ocurre de la membrana interna al periplasma y está mediado por el corte del péptido señal en el extremo N-terminal. El segundo paso involucra el transporte a través de la membrana externa a través del sistema de secreción tipo II (Fleckenstein

et al., 2010). La secreción de la toxina LT se inhibe en condiciones ácidas y en presencia de glucosa, y se favorece en presencia de sales y en alta osmolaridad. (Joffré y Sjöling, 2016; Gonzales-Siles *et al.*, 2017).

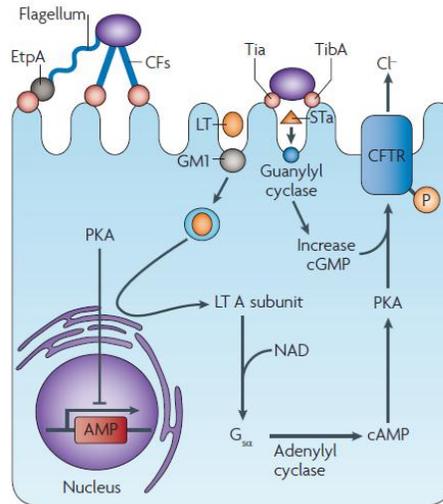


Figura 1. Mecanismo de acción de la *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC). La adherencia es mediada por factores de colonización (CF) y otras adhesinas (EtpA, Tia y TibA). Las toxinas termolábil (LT) y termoestable (STa) tienen diferentes formas de ocasionar diarrea (Tomado de Croxen y Finlay, 2010).

Existen dos tipos de LT, LT-I y LT-II, que no tienen reacción inmunológica cruzada. LT-I puede ser aislada en humanos y animales; mientras que LT-II, en animales principalmente, y aunque hay algunos reportes en aislados humanos, no se asocia a casos de diarrea (Nataro y Kaper, 1998). LT-I es una toxina de 86kDa y tiene un 80% de identidad de aminoácidos con la toxina colérica (Kaper *et al.*, 2004). Hay dos variantes de LT-I, LTp y LTh; los cuales fueron aislados por primera vez en porcinos y humanos, respectivamente. Ambas se unen principalmente a receptores GM1

(Fleckenstein *et al.*, 2010). Los genes que codifican para LT-I se encuentran en plásmidos y están flanqueados por elementos de inserción, organizados como operon (*eltA* y *eltB*, para la subunidad A y B, respectivamente) (Jobling, 2016).

Por otro lado, LT-II es antigénicamente distinto a LT-I y comparten 41% de identidad de aminoácidos (Dubreuil *et al.*, 2016). LT-II ha sido aislada de cepas de humanos, ganado vacuno, porcino, búfalos y avestruces; aunque solo se ha reportado como causa de diarrea en el ganado vacuno (Dubreuil *et al.*, 2016). Las cepas con LT-II producen la toxina hasta 5 veces más que aquellas con LT-I (Joffré *et al.*, 2015).

A su vez, existen tres variantes de LT-II: LTII-a, LT-IIb y LT-IIc (Nawar *et al.*, 2010). LT-II aumenta la concentración intracelular de cAMP, de manera similar a LT-I, pero tiene diferentes receptores (Nataro y Kaper, 1998). LT-IIa y LT-IIb se unen principalmente a GD1b y GD1a, respectivamente; mientras que LT-IIc se une a GD1a y GM1 (Nawar *et al.*, 2010). Los genes que codifican para LT-II son cromosómicos y se encuentran en profagos tipo λ (Jobling, 2016).

3.2.3.4 La toxina termoestable (ST)

Las toxinas ST son polipéptidos monoméricos que se caracterizan por la presencia de varias cisteínas, las cuales forman puentes disulfuros que estabilizan a la toxina en temperaturas altas (Nataro y Kaper, 1998). Se ha podido demostrar la acción sinérgica *in vitro* de ST y LT (Read *et al.*, 2014). A nivel mundial, aproximadamente el 40% de las cepas de ETEC producen solo ST. Este valor se incrementa en regiones como Latinoamérica, norte de África y sur de Asia (Isidean *et al.*, 2011).

Se reportan dos tipos de ST: ST-I y ST-II. ST-I es asociado a diarrea en humanos, aunque también es encontrada en cerdos y terneros. El gen que codifica para ST-I (*estA*) se encuentra en plásmidos y en el transposón Tn1681 (Nagy y Fekete, 2005) y contiene un alto porcentaje de AT (70%) (Dubreuil *et al.*, 2016).

El mecanismo de acción de ST-I se describe a continuación (Fig. 1). La toxina se une a receptores guanilil ciclase C (GCc) de la membrana apical del enterocito. Esto incrementa los niveles de GMP cíclico (cGMP) que activa la proteína quinasa II (Fleckenstein *et al.*, 2010). Esta fosforila CFTR, lo que resulta en una menor absorción de Na^+ y una mayor secreción de Cl^- y HCO_3^- (Croxen y Finlay, 2010). Asimismo, la elevación de cGMP inhibe la fosfodiesterasa 3, que conlleva a un incremento de cAMP, a la activación de PKA y la fosforilación de CFTR y del intercambiador Na^+/H^+ (Dubreuil *et al.*, 2016).

Se ha reportado dos variantes de ST-I: ST-Ia o STp y ST-Ib o STth, las cuales fueron inicialmente encontradas en porcinos y humanos, respectivamente (Nataro y Kaper, 1998). ST-Ia ha sido aislada de cepas en ganado bovino, ganado porcino y humanos; mientras que ST-Ib, solo en humanos (Joffré *et al.*, 2016). Hasta ahora se han reportado 6 variantes para ST-I: 3 para ST-Ia (STa1, STa6 y STa5) y 3 para ST-Ib (STa2, STa3/4, STa5) (Joffré *et al.*, 2016).

Aunque la distribución de cepas con ST-Ia y ST-Ib no es frecuentemente analizada, puesto que se reporta solo como ST-I, los estudios existentes demuestran que hay una mayor cantidad de cepas con ST-Ib que con ST-Ia. Esta distribución se ha visto tanto

a nivel de países como China (Li *et al.*, 2017), Nicaragua (Vílchez *et al.*, 2014), entre otros; como en colecciones a nivel mundial (Joffré *et al.*, 2016; Pattabiraman *et al.*, 2016). A pesar de esto, existen trabajos en países como Japón (Konishi *et al.*, 2011), Guatemala y México (Nicklasson *et al.*, 2010) en donde la cantidad de cepas con ST-Ib es mayor que aquellas con ST-Ia. No hay estudios en Perú sobre la distribución de ST-Ia y ST-Ib en cepas de ETEC.

Cada variante de ST-I se sintetiza como un precursor y luego es cortada hacia la forma activa. El precursor de 72aa es cortado por la peptidasa 1 a un péptido de 53aa que es llevado al periplasma por un transporte dependiente de Sec. En este lugar, los puentes disulfuros son formados por la proteína DsbA. El proceso por el cual el péptido de 53 aa es cortado a la forma activa de 18 (ST-Ib) o 19 (ST-Ia) aa es desconocido. Finalmente, la forma activa es transportada fuera de la membrana externa por la proteína exportadora TolC (Fleckenstein *et al.*, 2010). La forma activa de ambos ST-I es soluble en metanol (Weiglmeier *et al.*, 2010) y su producción es disminuida en presencia de glucosa, mientras que la presencia de bilis aumenta la de ST-Ib, pero no de ST-Ia (Roussel *et al.*, 2017).

Por otro lado, ST-II es asociado a infecciones exclusivamente en cerdos, aunque también se ha podido encontrar en terneros, pollos y en humanos sin diarrea (Dubreuil *et al.*, 2016). El gen que codifica para ST-II (*estB*) se encuentra en plásmidos y en el transposón Tn4521. Asimismo, el precursor de 71 aa de ST-II es cortado en el periplasma a la forma activa de 48 aa. Esta forma es insoluble en metanol y no tiene homología con la forma activa de ST-I (Fleckenstein *et al.*, 2010).

El efecto de ST-II es rápido, pero moderado. ST-II puede unirse con una alta afinidad a sulfátidos en la membrana de los enterocitos y luego es endocitado (Nagy y Fekete, 2005). Luego, ST-II estimula una proteína reguladora de unión a GTP, lo cual aumenta la concentración intracelular de Ca^{2+} . Debido a esto, se activa la proteína quinasa C (PKC) que fosforila la CFTR e inhibe el ingreso de Na^+ . Asimismo, la acumulación de Ca^{2+} aumenta la actividad de las fosfolipasas A2 y C. Esto estimula la secreción de prostaglandina E2 y serotonina, que finalmente llevan a un aumento de la secreción de iones al lumen (Dubreuil *et al.*, 2016). Además, se sabe que ST-II estimula la secreción de iones HCO_3^- , eleva los niveles de ácido araquidónico (Nataro y Kaper, 1998). Asimismo, puede dañar el epitelio intestinal, llegando a estimular la apoptosis (Syed y Dubreuil, 2012), y puede incrementar los movimientos espontáneos de los músculos del intestino, que conlleva contracciones (Dubreuil *et al.*, 2016).

3.2.3.5 Otras toxinas

Se ha descrito la presencia de otros factores de virulencia en ETEC, aunque su rol en la producción de diarrea aún es discutido. La SPATE EatA, además de degradar EtpA, puede cortar la catepsina G y se ha demostrado que puede incrementar la secreción de fluidos en un modelo de íleon de conejo (Croxen *et al.*, 2013). Por otro lado, la citotoxina formadora de poro ClyA y la toxina termoestable 1 enteroagregativa (EAST1), que pueden tener funciones similares a ST-I, han sido encontradas en cepas de ETEC, pero sin asociárselas a diarrea (Clements *et al.*, 2012). Finalmente, se sugiere que la proteína secretada CxeE cumple una función similar a la dispersina de EAEC (Croxen *et al.*, 2013).

3.2.4 Diagnóstico

A pesar de su importancia, el diagnóstico de ETEC es complejo, largo o costoso. Este se basa en encontrar la presencia de las toxinas LT o ST. Inicialmente, se usaban ensayos fisiológicos para la detección. Para LT se usaba el ensayo en células adrenales Y1 o en ovario de hámster. En ambos casos, se añadía el sobrenadante del cultivo de las cepas aisladas de las heces y se analizaba cambios morfológicos que indicaban la presencia de la toxina (Donta *et al.*, 1974; Guerrant *et al.*, 1974). Por otro lado, para ST se usaba el ensayo en ileón ligado de conejo y de ratón. En estos, se inyectaba el sobrenadante y se esperaba un aumento en el flujo intestinal por la presencia de la toxina (Giannella, 1976; Evans *et al.*, 1973).

Posteriormente, se pasó a métodos inmunológicos debido a la complejidad de los cultivos celulares (Qadri *et al.*, 2005). Entre los más destacables se encuentran el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) para LT y ST (Svennerholm y Wilkhund, 1983; Svennerholm *et al.*, 1986), la coaglutinación con *Staphylococcus* (Brill *et al.*, 1979) y el test de Biken (Honda *et al.*, 1981). De ellos, el ELISA fue el más empleado (Sjöling *et al.*, 2007).

No obstante, la sensibilidad de este tipo de prueba no es alta, por lo que se comenzó a desarrollar métodos moleculares para detectar los genes que codifican las toxinas. Las primeras técnicas usaron sondas de hibridización marcadas radioactivamente (Moseley *et al.*, 1982). Posteriormente, aparecieron las primeras técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Olive, 1989). El uso de la PCR fue

perfeccionado, a tal punto que se pudo detectar otros patógenos junto con ETEC o hacerlo en tiempo real mediante la detección de fluorescencia (Reischl *et al.*, 2004). Incluso, se ha desarrollado diversas técnicas de PCR en tiempo real capaces de discriminar los 6 patotipos de DEC en una sola reacción (Guion *et al.*, 2008).

Asimismo, se han reportado sistemas de PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR) basados en SYBR-Green o en sondas (Tabla 1). La mayoría de estos se desarrollaron para cada gen por separado; y se obtuvo valores altos de eficiencia y linealidad, así como límites de detección adecuados.

Por otro lado, se han ido desarrollando paneles de detección múltiple a partir de muestras de heces directas. La FDA ha aprobado el uso de dos paneles para el diagnóstico de patógenos entéricos: el “FilmArray GI panel” (BioFire Inc.) y el “Luminex xTag GI pathogen panel” (Luminex Corporation). El primero usa PCR en tiempo real con análisis de curva de *melting* y es capaz de detectar 22 patógenos, incluyendo los patotipos de DEC, excepto la DAEC. En tanto, el segundo utiliza PCR en tiempo real con *beads* fluorescentes y detecta 11 patógenos, incluyendo la ETEC y STEC. Ambos presentan una alta sensibilidad y especificidad, lo que explica por qué detecta más infecciones múltiples que los métodos convencionales. Sin embargo, su costo supera los \$30,000, lo que complica un uso cotidiano (Khare *et al.*, 2014).

Las técnicas basadas en PCR solo se dan en laboratorios de referencia o en trabajos de investigación. Esto es debido a la necesidad de un termociclador, cuyo costo e implementación hacen complicado la aplicación de la PCR en centros de salud o zonas rurales, sobre todo en países en vías de desarrollo (Li y Macdonald, 2015).

Existen controversias en cuanto al uso de técnicas moleculares para el diagnóstico. Si bien está probado que estas tienen más sensibilidad y especificidad que los métodos microbiológicos y basados en cultivos (Sjöling *et al.*, 2007), una limitación es que no pueden distinguir entre infección y colonización (Vila *et al.*, 2017). No obstante, trabajos recientes demuestran que los sistemas de qPCR permiten distinguir patógenos en los que existe asociación entre su cantidad (carga bacteriana) y la presencia de diarrea, como el caso de ST-EPEC para diarrea infantil en Ruanda (Kabayiza *et al.*, 2014) o en el estudio GEMS (Liu *et al.*, 2016). Aunque se haya usado los valores de corte (“*cut-off*”) del ciclo umbral (Cq) de la reacción de PCR para determinar dicha asociación, estos pueden variar entre laboratorios (Elfving *et al.*, 2014) y es recomendable optar por una cuantificación relativa usando un gen de referencia (Kabayiza *et al.*, 2014).

Por otro lado, otra dificultad en el diagnóstico de ETEC es que la presencia del gen no correlaciona con la expresión *in vivo*. Esto puede deberse a que los genes estén silenciados o que el nivel de expresión es tan bajo que la proteína producida no puede ser detectada en técnicas como el ELISA. Todo esto puede ser causado por el tiempo de almacenamiento de las muestras biológicas colectadas y por la pérdida de genes reguladores o eventos post-transcripcionales o traduccionales (Sjöling *et al.*, 2007). Incluso, estos métodos que evalúan la expresión, al ser realizados en condiciones de laboratorio, podrían no reflejar lo que pasa *in vivo* (Isidean *et al.*, 2011).

Tabla 1. Sistemas de PCR cuantitativo en tiempo real para *E. coli* enterotoxigénica

Referencia	Forma de detección	Genes	Eficiencia (%)	Linealidad (R ²)	Límite de detección	Límite de cuantificación
Liu <i>et al.</i> , 2017	Sonda de hidrólisis (TaqMan)	LT, ST-Ia, ST-Ib	85.6	0.966	10 ⁴ UFC/g de heces	SD
Pattabiraman <i>et al.</i> , 2016	Sonda de hidrólisis (TaqMan)	LT	98	0.99	0.1 pg/μl	0.1 pg/ μl
		ST-Ia	96	0.99	0.1 pg/μl	0.1 pg/ μl
		ST-Ib	83	0.99	1 pg/μl	1 pg/ μl
Lindsay <i>et al.</i> , 2014	SYBR Green	LT	SD	0.988 - 1	100 UFC/200 g de heces	SD
Youmans <i>et al.</i> , 2014	SYBR Green	LT	99.69	0.999	10 copias de gen/rxn	100 copias de gen/rxn
		ST-Ia	98.25	0.9996	10 copias de gen/rxn*	100 copias de gen/rxn
		ST-Ib	95.02	0.9996	10 copias de gen/rxn*	100 copias de gen/rxn
Liu <i>et al.</i> , 2013	Sonda de hidrólisis (TaqMan)	LT	95.8	0.998	10 ⁵ UFC/g de heces	10 copias de gen/rxn
		ST-Ia, ST-Ib	95.5	0.998	10 ⁵ UFC/g de heces	10 copias de gen/rxn
Antikainen <i>et al.</i> , 2013	Sonda de hidrólisis (TaqMan)	LT, ST-Ia, ST-Ib	SD	SD	1 ng/ml	1 ng/ml
Patel <i>et al.</i> , 2011	SYBR Green	LT	99.17	0.9907	1 UFC/rxn	1 UFC/rxn
		ST-Ia	98.27	0.9947	1 UFC/rxn	1 UFC/rxn
Ram <i>et al.</i> , 2008	Sonda de baliza molecular ("molecular beacon")	LT	99.8	0.997	2 UFC/ml	2 UFC/ml

SD: Sin datos.

UFC/rxn: Unidad formadora de colonia por reacción.

* Cuando se usa ADN de heces, el límite de detección es 100 copias de gen/rxn.

3.3 Técnicas de amplificación isotérmica

Las técnicas de amplificación isotérmica permiten la replicación de ácidos nucleicos *in vitro* a una sola temperatura durante la reacción (Li y Macdonald, 2015). Se las puede clasificar en 4 grupos: aquellas que se basan (i) en la transcripción del ARN, (ii) en la replicación del ADN y con alineamiento de cebadores (“*primers*”) mediada enzimáticamente (en lugar de calor), (iii) en el uso de ADN polimerasa con desplazamiento de hebras a partir de secuencias lineales o circulares y (iv) en el uso de ese tipo de polimerasa más un evento de corte de hebra (Li y Macdonald, 2015). Algunas de ellas requieren un paso de pre-calentamiento, por lo que estas no son “verdaderamente” isotérmicas.

Estas técnicas tienen múltiples aplicaciones, como la detección de ADN, genotipificación de SNPs, detección de ADN metilado, detección de micro ARN, entre otros. Incluso, con ciertas modificaciones, pueden ayudar a detectar proteínas, moléculas pequeñas (como ATP y NAD^+) e iones metálicos. Además, pueden ser adaptadas en sistemas con microfluidos, con capilares o plataformas basadas en papel y plástico (Zhao *et al.*, 2015).

3.3.1 Amplificación isotérmica mediada por lazos (LAMP)

La amplificación isotérmica mediada por lazos (LAMP, del inglés “Loop-mediated Isothermal Amplification”) es una de las primeras de este tipo en ser desarrollada y ha sido muy usada en técnicas de diagnóstico. LAMP usa 4 a 6 *primers* y una ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de hebras para generar productos de

amplificación de distintos tamaños que tienen varias repeticiones del gen amplificado (Notomi *et al.*, 2000). Los *primers*, dos internos y dos externos, reconocen 6 sitios diferentes del ADN blanco. La primera amplificación radica en que los *primers* externos, en cada hebra por separado, hibridizan con la región complementaria en el ADN blanco y sintetizan el ADN por medio de la ADN polimerasa; mientras que la hebra desplazada por esta última sirve como blanco para los *primers* internos. Luego, los *primers* internos se autohibridizan y forman una estructura con doble lazo. Esta estructura permite que la amplificación sea cíclica, usando principalmente los *primers* internos (Notomi *et al.*, 2000).

La amplificación se da entre 60°C y 65°C, no necesita paso de pre-calentamiento y puede producir 10^9 copias del gen en una hora (Notomi *et al.*, 2000). La detección del producto puede darse por electroforesis (en donde los amplicones aparecen en forma de escalera), por turbidez con la precipitación de pirofosfato de magnesio o a tiempo real por medición de fluorescencia usando caseína o azul de hidrox-naftol. Además, la técnica puede tolerar la presencia de inhibidores en muestras clínicas mejor que la PCR (Li y Macdonald, 2015). No obstante, se ha reportado que la técnica puede producir resultados falsos positivos, debido a contaminación cruzada por aerosoles o por artefactos de *primers* (Senerath *et al.*, 2014).

Con respecto a ETEC, se ha desarrollado técnicas basadas en LAMP para detectar las toxinas LT-I y ST-I usando ADN extraído de cepas como ADN molde. El límite de detección fue de 4 y 40 UFC/rxn, respectivamente (Yano *et al.*, 2007). Además, también se puede detectar la fimbria F5, una adhesina importante en cepas de ETEC

provenientes de cerdos, utilizando LAMP y con un límite de detección de 72 UFC/rxn (Jiang *et al.*, 2012). Finalmente, se ha reportado una técnica de detección de LT-I que utiliza ADN extraído de muestra de leche para consumo humano, cuyo límite de detección fue 574 UFC/ml (Yang *et al.*, 2014).

3.3.2 Amplificación con recombinasa y polimerasa (RPA)

Una técnica de amplificación isotérmica más reciente y que está siendo evaluada en diagnóstico es la amplificación con recombinasa y polimerasa (RPA, del inglés “*recombinase polymerase amplification*”). La RPA utiliza tres proteínas principales: una recombinasa, proteínas de unión a ADN de cadena simple y una ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de hebras (Piepenburg *et al.*, 2006).

La forma de amplificar del RPA está esquematizada en la Fig. 2. Los *primers* son recubiertos por la recombinasa usvX del fago T4 con ayuda de la proteína usvY y el Carbowax 20M, un agente “*crowding*”. Este complejo nucleoproteico es capaz de identificar la región complementaria en el ADN molde y la recombinasa cataliza el intercambio de hebras, formando un loop en forma de D. La hebra desplazada es estabilizada por proteínas gp32 del fago T4, que son proteínas de unión a hebra simple (SSB). Luego, la recombinasa se separa de los *primers* usando una reacción de hidrólisis de ATP y la ADN polimerasa Bsu de *Bacillus subtilis* puede comenzar a sintetizar usando el extremo 3' de los *primers*. La actividad de desplazamiento de hebras de Bsu permite continuar la síntesis en ambos sentidos, mientras que la hebra desplazada se estabiliza con proteínas gp32. Cuando las polimerasas se encuentran, el

ADN molde se separa por efectos estéricos y se forman dos complejos de amplificación. Después, las polimerasas pueden terminar la extensión para generar dos copias del ADN original. Nuevos complejos nucleoproteicos de *primers* y recombinasa se forman e invaden las nuevas copias para iniciar otro ciclo de amplificación. Todo el proceso se inicia con la presencia de Mg^{2+} , que es el cofactor de la recombinasa y la ADN polimerasa. El ATP es obtenido y regenerado mediante una sistema de fosfocreatina y creatina kinasa (Piepenburg *et al.*, 2006).

Los componentes de la reacción son comercializados por la empresa TwistDx (www.twistdx.co.uk) y la formulación actual usa la recombinasa RecA de *Escherichia coli*, la ADN polimerasa Sau de *Staphylococcus aureus*, y el polietilenglicol (PEG) como agente “*crowding*”. Además, se puede adaptar la RPA para que pueda detectar ARN incorporando una transcriptasa reversa a la reacción que funciona a una sola temperatura (Daher *et al.*, 2016).

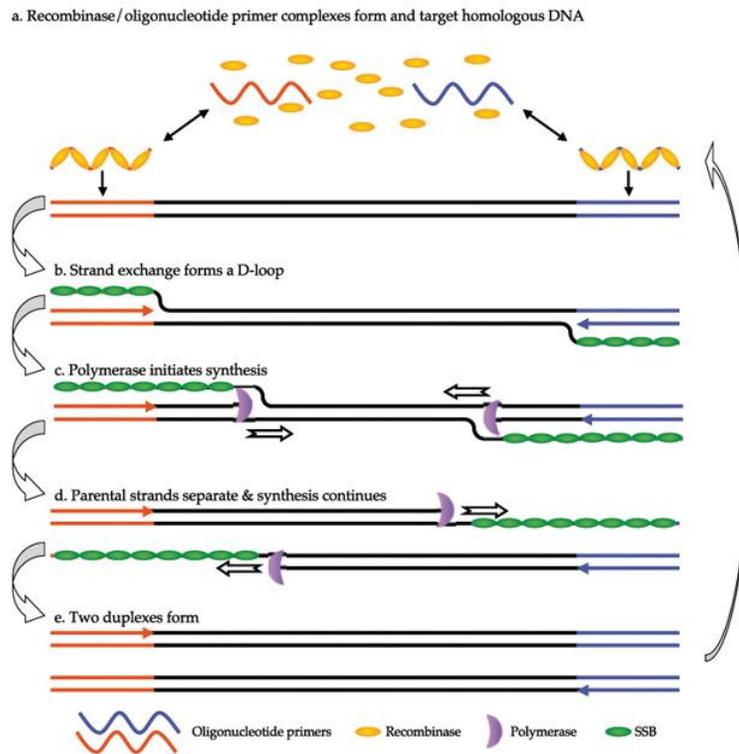


Figura 2. La amplificación con recombinasa y polimerasa (RPA). Los *primers* son recubiertos con recombinasa para invadir el ADN molde. Luego, el ADN polimerasa comienza la síntesis y las hebras desplazadas son estabilizadas con SSB. Las nuevas copias de ADN pueden iniciar otro ciclo de amplificación. Tomado de TwistDx (<http://www.twistdx.co.uk/>).

La presentación comercializada de los reactivos de RPA contiene acetato de magnesio 280 mM, el tampón (“*buffer*”) de rehidratación (PEG 35K 1.5%, acetato de potasio 100mM, *buffer* Tris-acetato 35mM pH 8.3 y acetato de magnesio 14mM) y un “*pellet*” liofilizado que consiste en gp32 900ng/μL, uvsX 120ng/μL, uvsY 30 ng/μL, Sau 0.25U, creatina kinasa 100ng/μL, PEG 35K 5.5%, trehalosa 6%, ATP 2.5mM, fosfocreatina 50mM y 240μM de cada dNTP (Chandu *et al.*, 2016). En

primer lugar, el “*pellet*” es disuelto con el *buffer* y luego se agregan los *primers*, sondas, agua y el ADN molde. El acetato de magnesio es agregado al final para evitar amplificación temprana (Daher *et al.*, 2016).

Posteriormente, las reacciones son incubadas a la temperatura elegida y luego de 4 min, TwistDx recomienda un paso de agitación breve antes de terminar la incubación (TwistDx, 2014). Si bien se ha probado que el paso de agitación genera una eficiencia de amplificación adecuada, también se ha reportado que obviar este paso no afecta la reacción (Vinelli, 2011). Finalmente, parece que este paso es importante cuando la cantidad de ADN es baja en la muestra y que puede evitarse cuando se usa pequeños volúmenes de reacción (1 – 5 μ l) (Lillis *et al.*, 2016).

La detección de producto amplificado se puede realizar con electroforesis en gel de agarosa, a tiempo real por medición de fluorescencia y por oligocromatografía usando tiras de flujo lateral (“*lateral flow strips*”). Usualmente, los ensayos son desarrollados para ser detectados por electroforesis y posteriormente, son adaptados a la detección a tiempo real o con tiras de flujo lateral. En ambos casos, se necesita del diseño de una sonda para el gen de interés y de proteínas adicionales, los cuales también son proporcionados por TwistDx (James y Macdonald, 2015; Daher *et al.*, 2016).

Para la detección en tiempo real se usan sondas *exo*, las cuales son oligonucleótidos de 46 a 52 bases con un fluoróforo y un extintor (“*quencher*”) separados por un sitio abásico; es decir, que la base nitrogenada es reemplazada por tetrahidrofurano (THF) en el medio de la secuencia (aproximadamente a 15 nt del extremo 3’ que está bloqueado

con fosfato). Una vez que la sonda hibridiza con ayuda de las recombinasas, la exonucleasa III (ExoIII) de *E. coli* reconoce y corta el sitio de THF, lo que libera el “*quencher*” y permite la detección de fluorescencia (Daher *et al.*, 2016).

Por otro lado, para la detección por oligocromatografía se usan sondas *nfo*, también de 46 a 52 bases. En estas, los extremos 5' y 3' deben estar marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) o carboxifluoresceína (FAM) y un bloqueador (fosfato o un espaciador C3), respectivamente. Además, la sonda debe contener un sitio abásico de tal forma que se forme un *mismatch* y el primer *reverse* es modificado de tal forma que está marcado con biotina en su extremo 5'. Con los *primers reverse* marcados, se inicia la amplificación que da como productos ADN marcados con biotina por un extremo. Usando estos como ADN molde, la sonda también es recubierta con recombinasas, lo que permite la invasión y la formación del loop en forma de D. La endonucleasa *nfo* reconoce el *mismatch* en el sitio del THF y corta la sonda en esa posición. Esta escisión genera un grupo hidroxilo en posición 3' que puede ser usado por la ADN polimerasa para iniciar la síntesis. El producto de amplificación final estará marcado a la vez por biotina y el fluoróforo en extremos opuestos. Este producto doblemente marcado puede ser capturado por tiras de flujo lateral, las cuales tienen una región con estreptavidina que tiene una altísima afinidad por la biotina. El otro extremo del producto amplificado es capturado por anticuerpos contra el fluoróforo unido a partículas de oro, las cuales permiten la detección mediante una banda de color rojizo (James y Macdonald, 2015; Daher *et al.*, 2016).

La detección con oligocromatografía es más práctica que la detección a tiempo real, puesto que no se necesita de un equipo adicional y el resultado se define por observación directa. Sin embargo, la detección a tiempo real es más rápida y permite cuantificar el gen amplificado (James y Macdonald, 2015; Daher *et al.*, 2016).

Diversas características hacen que el RPA pueda ser aplicado en campo. En primer lugar, la RPA puede llevarse a cabo entre 30° y 45°C (James y Macdonald, 2015; Tabla 2). Para lograr la temperatura de reacción, se puede usar una incubadora, un baño María e incluso, el calor corporal del puño o de la axila (Crannell *et al.*, 2014b; Wang *et al.*, 2017). Además, los reactivos se pueden almacenar en seco y sin necesidad de refrigeración: son estables por 12 semanas a 25°C y por 3 semanas a 45°C, lo cual facilita el transporte a zonas rurales o alejadas (Lillis *et al.*, 2016).

Tabla 2. Rango de temperaturas reportadas para ensayos de RPA.

Referencia	Patógeno	Temperatura de reacción (°C)
Yang <i>et al.</i> , 2017	Circovirus porcino tipo 2	30 – 45
Kappagantu <i>et al.</i> , 2017	Viroide del enanismo del lúpulo ("Hop stunt viroid")	37 - 42
Wang <i>et al.</i> , 2017	Soya GTS "40-3-2"	33.9 - 40
Yang <i>et al.</i> , 2017	Herpesvirus porcino 1	30 ¹ - 45
Yin <i>et al.</i> , 2017	<i>Theileria annulata</i>	30 - 45
Yang <i>et al.</i> , 2017	Virus de la peste de los pequeños rumiantes	37 - 45
Sun <i>et al.</i> , 2016	<i>Schistosoma japonicum</i>	30 ¹ - 45
Wang <i>et al.</i> , 2016	Circovirus porcino tipo 2	34 – 42
Prescott <i>et al.</i> , 2016	Herpesvirus 3 de la carpa	33 - 41
Chandu <i>et al.</i> , 2016	Soya "Genuity® Roundup Ready 2 Yield®"	37 - 41
Wu <i>et al.</i> , 2016	<i>Cryptosporidium</i> spp.	30 - 45
Yang <i>et al.</i> , 2016	Orf virus	30 ¹ - 45
Rosser <i>et al.</i> , 2015	<i>Schistosoma haematobium</i>	30 - 45
Santiago-Felipe <i>et al.</i> , 2015	<i>Salmonella typhimurium</i> y <i>Cronobacter sakazakii</i>	37 - 42
Jaroenram <i>et al.</i> , 2014	Densovirus de <i>Penaeus stylirostris</i>	35 - 40
Kersting <i>et al.</i> , 2014	<i>Plasmodium falciparum</i>	30 - 45

¹ Detección débil

Asimismo, el tiempo esperado de reacción es 15 minutos, habiéndose reportado ensayos con 5 min (Tabla 3). El tiempo esperado disminuye si se usa la detección a tiempo real (James y Macdonald, 2015). Por otro lado, la técnica se ha adaptado para su realización en aparatos hechos de papel y plástico y en sistema de fases sólidas; los cuales abaratan los costos, permiten el análisis de varias muestras al mismo tiempo y automatiza el proceso (Mayboroda *et al.*, 2016). Además, se ha demostrado que la RPA es tolerable a suero sanguíneo diluido, heparina, hemoglobina y etanol, los

cuales son inhibidores de PCR (Kersting *et al.*, 2014). Incluso, la RPA tiene ventajas sobre la LAMP, como la menor cantidad de *primers*, el menor tiempo y la menor temperatura, lo cual lleva a un menor consumo de energía (Escadafal *et al.*, 2014).

Tabla 3. Tiempos mínimos (y óptimos) de reacción reportados para RPA.

Referencia	Patógeno	Tiempo mínimo de reacción (óptimo) ¹ , min
Yang <i>et al.</i> , 2017	Circovirus porcino tipo 2	10
Kappagantu <i>et al.</i> , 2017	Viroide del enanismo del lúpulo ("Hop stunt viroid")	10 (20)
Yang <i>et al.</i> , 2017	Herpesvirus porcino 1	10
Yin <i>et al.</i> , 2017	<i>Theileria annulata</i>	5 (10)
Yang <i>et al.</i> , 2017	Virus de la peste de los pequeños rumiantes	10 (15)
Tu <i>et al.</i> , 2017	Virus de la artritis-encefalitis caprina (CAEV)	20 (30)
Sun <i>et al.</i> , 2016	<i>Schistosoma japonicum</i>	5 (10)
Wu <i>et al.</i> , 2016	<i>Cryptosporidium</i> spp.	10
Yang <i>et al.</i> , 2016	Orf virus	10 (15)
Wang <i>et al.</i> , 2016	Parvovirus tipo 2 canino	20
Rosser <i>et al.</i> , 2015	<i>Schistosoma haematobium</i>	5 (10)
Jaroenram <i>et al.</i> , 2014	Densovirus de <i>Penaeus stylirostris</i>	20 (30)
Kersting <i>et al.</i> , 2014	<i>Plasmodium falciparum</i>	5 (10)
Krölov <i>et al.</i> , 2014	<i>Chlamydia trachomatis</i>	10

¹ El número en paréntesis indica el tiempo óptimo

Por estas características, recientemente se ha comenzado a aplicar RPA en técnicas de diagnóstico de diversos patógenos; incluyendo el virus de inmunodeficiencia humana (Rohrman y Richards-Kortum, 2012), *Cryptosporidium parvum* (Crannell *et al.*, 2014b), *Leishmania infantum* (Castellanos-Gonzalez *et al.*, 2015), *Giardia lamblia* (Crannell *et al.*, 2015), *Mycobacterium tuberculosis* (Boyle *et al.*, 2014), la STEC

(Murinda *et al.*, 2014); entre otros muchos. De estos trabajos, el formato en tiempo real es el más frecuente (Daher *et al.*, 2016).

Asimismo se ha podido aplicar la RPA para diagnóstico en zonas rurales alejadas. Por ejemplo, en Senegal se aplicó esta técnica para detectar el virus de la fiebre amarilla (Escadafal *et al.*, 2014), el virus de la fiebre aftosa del ganado Egipto (Abd El Wahed *et al.*, 2013) y el virus del Ébola en Guinea (Magro *et al.*, 2017). Además, muchos otros estudios han logrado probar sus ensayos de RPA en muestras clínicas para poder calcular el desempeño diagnóstico (“*diagnostic performance*”) de sus técnicas (Tabla 4).

Tabla 4. Evaluación en muestras clínicas de ensayos de RPA.

Referencia	Patógeno	Tamaño muestral	Sensibilidad (% , IC 95%)	Especificidad (% , IC 95%)	VPP (% , IC 95%)	VPN (% , IC 95%)
Wambua <i>et al.</i> , 2017	<i>Candidatus Phytoplasma oryzae</i>	66	100 (93.9 - 100)	57.1 (18.4 – 90.1)	93.6 (84.5 – 98.2)	100 (39.8 - 100)
Wang <i>et al.</i> , 2017	Parpovirus porcino	115	100 (96.2 – 100)	100 (83.9 – 100)	100 (96.2 – 100)	100 (83.9 – 100)
Raja <i>et al.</i> , 2017	Bacterias ITU	50	89 (75 - 96)	100 (78 - 100)	100 (89.1 - 100)	77.7 (52.4 - 93.6)
Magro <i>et al.</i> , 2017	Virus del ébola	50	90 (68.3 - 98.7)	60.8 (38.5 - 80.3)	66.7 (46 - 83.5)	87.5 (61.6 - 98.4)
Yang <i>et al.</i> , 2017	Circovirus porcino tipo 2	102	100 (88.8 - 100)	100 (94.9 - 100)	100 (88.8 - 100)	100 (94.9 - 100)
Yang <i>et al.</i> , 2017	Herpesvirus porcino 1	103	93.3 (77.9 - 99.2)	100 (95 - 100)	100 (87.6 - 100)	97.3 (90.6 - 99.7)
Abd El Wahed <i>et al.</i> , 2017	Virus del zika	34	92 (74 - 99)	100 (66.3 - 100)	100 (85.2 - 100)	81.8 (48.2 - 97.7)
Xing <i>et al.</i> , 2017	<i>Schistosoma japonicum</i>	200	100 (94.1 - 100)	96.4 (91.8 - 98.8)	98.5 (91.8 - 99.9)	100 (97.3 - 100)
Yang <i>et al.</i> , 2017	Virus de la peste de los pequeños rumiantes	37	90 (68.3 - 98.8)	100 (80.5 - 100)	100 (81.5 - 100)	89.5 (66.9 - 98.7)
Tu <i>et al.</i> , 2017	Virus de la artritis-encefalitis caprina (CAEV)	200	100 (97.7 - 100)	83.7 (69.3 - 93.2)	95.7 (91.4 - 98.3)	100 (90.3 - 100)
Cabada <i>et al.</i> , 2017	<i>Fasciola hepatica</i>	102	87.8 (73.8 - 95.9)	100 (91.6 - 100)	100 (90.3 - 100)	89.4 (76.9 - 96.5)

Wang <i>et al.</i> , 2017	Coxsackievirus A6	234	96.6 (88.1 - 99.6)	97.7 (94.3 - 99.4)	93.3 (83.8 - 98.2)	98.9 (95.9 - 99.9)
Patel <i>et al.</i> , 2016	Virus del chikungunya	58	100 (90.3 - 100)	100 (84.6 - 100)	100 (90.3 - 100)	100 (84.6 - 100)
Clarke <i>et al.</i> , 2017	<i>Streptococcus agalactiae</i>	124	100 (95.8 - 100)	100 (91 - 100)	100 (95.8 - 100)	100 (91 - 100)
Sun <i>et al.</i> , 2016	<i>Schistosoma japonicum</i>	45	92.6 (66.1 - 99.8)	100 (88.8 - 100)	100 (88.8 - 100)	96.9 (83.8 - 99.9)
Wang <i>et al.</i> , 2016	Circovirus porcino tipo 2	48	100 (91.8 - 100)	100 (47.8 - 100)	100 (91.8 - 100)	100 (47.8 - 100)
Yang <i>et al.</i> , 2016	Virus del ébola	375	97.4 (95.5 - 99.3)	97.1 (93.9 - 100)	98.9 (96.8 - 99.8)	96.9 (83.8 - 99.9)
Mondal <i>et al.</i> , 2016	<i>Leishmania donovani</i>	96	100 (92.6 - 100)	100 (92.6 - 100)	100 (92.6 - 100)	100 (92.6 - 100)
Yang <i>et al.</i> , 2016	Orf virus	108	100 (93.8 - 100)	100 (92.9 - 100)	100 (93.8 - 100)	100 (92.9 - 100)
Faye <i>et al.</i> , 2015	Virus del ébola	141	97.1 ¹ (90 - 99.7) 91.2 ² (83.4 - 96.1)	78.8 (67.6 - 87.7)	81.9 (71.9 - 89.5)	96.6 (88.1 - 99.6) 86.2 (74.6 - 93.9)
Castellanos-Gonzalez <i>et al.</i> , 2015	<i>Leishmania infantum</i>	12	100 (54.1 - 100)	100 (54.1 - 100)	100 (54.1 - 100)	100 (54.1 - 100)
Chao <i>et al.</i> , 2015	<i>Orientia tsutsugamushi</i>	22	78.9 (54.4 - 93.9)	100 (75.3 - 100)	100 (78.2 - 100)	76.5 (50.1 - 93.2)
Abd El Wahed <i>et al.</i> , 2015	Virus del dengue	185	78.5 (70.1 - 85.5)	100 (94.4 - 100)	100 (96.2 - 100)	71.1 (60.6 - 80.2)
Teoh <i>et al.</i> , 2015	Virus del dengue	203	77.0 (65.1–85.8)	97.9 (94.0–99.3)	94.0 (83.8–97.9)	90.8 (85.2–94.5)
Crannell <i>et al.</i> , 2015	<i>Giardia lamblia</i>	104	72.6 (59.8 - 83.1)	95.2 (83.8 - 99.4)	95.7 (85.5 - 99.5)	70.2 (56.6 - 81.6)
Jaroenram <i>et al.</i> , 2014	Densovirus de <i>Penaeus</i>	117	100 (89.1 - 100)	94.1 (86.8 - 98.1)	86.5 (71.2 - 95.5)	100 (95.5 - 100)

stylirostris

Boyle <i>et al.</i> , 2014	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	71 ³	91.4 (85 - 97.9)	100 (90 - 100)	100 (89.1 - 100)	89.7 (75.8 - 97.1)
		90 ⁴	87.5 (81.7 - 97.9)	95.4 (92.3 - 98.1)	95.5 (84.5 - 99.4)	87 (73.7 - 90.1)
Ahmed <i>et al.</i> , 2014	<i>Leptospira</i> spp.	63	94.7 (71.9 - 99.7)	97.7 (86.5 - 99.9)	94.7 (71.9 - 99.7)	97.7 (86.5 - 99.9)
Murinda <i>et al.</i> , 2014	<i>Escherichia coli</i> productora de Shiga-toxina	136	93 ⁵ (80.9 - 98.5)	97.8 (92.4 - 99.7)	95.2 (83.8 - 99.4)	92.6 (85.8 - 97.1)
			83.7 ⁶ (69.3 - 93.2)	97.8 (92.4 - 99.7)	94.7 (82.2 - 99.3)	96.8 (91 - 99.3)
Escadafal <i>et al.</i> , 2014	Virus de la fiebre amarilla	34 ⁷	80 (56.3 - 94.1)	100 (76.7 - 100)	100 (79.4 - 100)	77.8 (52.4 - 93.6)
		27 ⁸	71.4 (41.9 - 91.6)	100 (75.3 - 100)	100 (69.2 - 100)	82.3 (56.6 - 96.2)
Crannell <i>et al.</i> , 2014	<i>Cryptosporidium parvum</i>	21	80 (44.4 - 97.5)	100 (71.5 - 100)	100 (63.1 - 100)	84.6 (54.6 - 98.1)
Daher <i>et al.</i> , 2014	<i>Streptococcus agalactiae</i>	50	96 (79.6 - 99.9)	100 (86.3 - 100)	100 (85.8 - 100)	96.2 (80.4 - 99.9)
Krõlov <i>et al.</i> , 2014	<i>Chlamydia trachomatis</i>	70	83.3 (51 - 97)	100 (92 - 100)	100 (69.1 - 100)	96.7 (88.5 - 99.6)
Abd El Wahed <i>et al.</i> , 2013	Virus de la fiebre aftosa del ganado	45	65 (48.3 - 79.4)	60 (14.7 - 94.7)	92.9 (76.5 - 99.1)	82.3 (56.5 - 96.2)

IC 95%: Intervalo de confianza al 95%

VPP: Valor predictivo positivo

VPN: Valor predictivo negativo

¹ Comparado con “RealStar Filovirus RT-PCR” kit, ² Comparado con “EBOV one-step real-time RT-PCR”

³ Se amplificó la secuencia de inserción IS1081, ⁴ Se amplificó la secuencia de inserción IS6110

⁵ Como detección de STEC, ⁶ Como detección de genotipo

⁷ Como RPA en tiempo real, ⁸ Como RPA en oligocromatografía con tiras de flujo lateral

IV. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La ETEC causa diarrea en todos los grupos de edad. Es una importante causa de diarrea en niños menores de 5 años (Lanata *et al.*, 2013), es común en diarrea en adolescentes y adultos (Lamberti *et al.*, 2014) y es la principal causa de la diarrea del viajero (Jiang y DuPont, 2017). El desarrollo de vacunas contra ETEC es difícil debido a la heterogeneidad de las cepas: no todas expresan las toxinas LT o ST y la frecuencia de los CF es variada. Incluso, hay variabilidad de resultados al probar vacunas en distintas poblaciones (Qadri *et al.*, 2005).

Por otro lado, existe una alta incidencia de resistencia antibiótica, especialmente contra ampicilina, co-trimoxazol y tetraciclina, en cepas de ETEC aisladas de niños en Perú. Incluso, se ha encontrado que entre 30 y 40% de estas cepas presentaron resistencia a más de un antibiótico. Probablemente, esto se deba al uso empírico de antibióticos en niños, lo cual no es correcto, ya que la diarrea a esta edad puede deberse a distintos patógenos, no solo bacterias. Actualmente, un tratamiento antibiótico adecuado para ETEC en niños no puede ser recomendado debido a la falta de ensayos clínicos diseñados para este fin, que a su vez requiere de un método de detección rápido y práctico, el cual no está disponible (Medina *et al.*, 2015).

Asimismo, un diagnóstico rápido de ETEC sería útil en los estudios de diarrea en militares en países en vías de desarrollo o de brotes diarreicos en situaciones de desastres naturales (Ahmed y Qadri, 2008). Debido a esto, el desarrollo de técnicas de diagnóstico de aplicación sencilla en campo es necesario. La RPA tiene

características que logran que su uso en zonas rurales sea factible (James y Macdonald, 2015).

Este proyecto propone desarrollar una técnica de diagnóstico de ETEC basada en RPA, la cual se espera pueda ser aplicada en hospitales o centros de salud y futuros estudios clínicos. Además, se espera que el desarrollo de técnicas de diagnóstico usando RPA y las tiras en flujo lateral o en tiempo real pueda ser extendido a las otras *E. coli* diarrogénicas, otros enteropatógenos o para detectar genes de resistencia a antibióticos presentes en dichas bacterias.

V. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

5.1 Hipótesis

Los genes que codifican para las toxinas termolábil (LT) y termoestable (ST) de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) pueden ser detectados mediante la amplificación con recombinasa y polimerasa (RPA), con una sensibilidad y especificidad mayor a 90%.

5.2 Objetivo general

Desarrollar un método molecular para el diagnóstico de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) en muestras de heces mediante la detección simultánea de los genes codificantes de las toxinas LT y ST por la amplificación con recombinasa y polimerasa (RPA).

5.3 Objetivos específicos

- a) Diseñar y seleccionar cebadores (“*primers*”) para amplificar los genes codificantes de las toxinas LT y ST (ST-Ia y ST-Ib) adecuados para la RPA.
- b) Determinar las condiciones óptimas y el límite de detección del método para el diagnóstico de ETEC en heces basado en RPA.
- c) Determinar la sensibilidad y especificidad diagnóstica del método para el diagnóstico de ETEC en heces basado en RPA usando PCR en tiempo real como estándar de oro.

VI. METODOLOGÍA

6.1 Diseño del estudio

Este trabajo es un estudio experimental y transversal para los objetivos de estandarizar y optimizar el método para el diagnóstico de ETEC en heces basado en RPA, y para determinar la sensibilidad y especificidad diagnóstica de dicho método, respectivamente.

En resumen, se diseñaron y seleccionaron *primers* para los genes que codifican para las toxinas LT, ST-Ia y ST-Ib adecuados para su detección simultánea por RPA. Se revelaron los productos de amplificación por electroforesis en gel de agarosa. Se utilizaron los ADN extraídos de la cepa ETEC H10407 y de muestras de heces infectadas artificialmente con esa cepa como controles positivos. Se determinaron las condiciones de reacción óptimas (agitación, temperatura y tiempo). Se evaluó la especificidad (ausencia de reacción cruzada con otros patógenos) y la sensibilidad (límite de detección) analíticas. Finalmente, se determinó la sensibilidad y la especificidad diagnóstica de la técnica de RPA en muestras de heces previamente recolectadas usando la PCR en tiempo real como estándar de oro.

6.2 Población, muestra y tamaño muestral

Las muestras de heces que fueron utilizadas provienen de un estudio previo y se encuentran en el banco de muestras del Laboratorio de Infectología Pediátrica (Laboratorios de Investigación y Desarrollo [LID], UPCH) almacenadas a -20°C.

Un total de 3649 muestras de heces se recolectaron en un estudio clínico randomizado doble ciego cuyo objetivo era determinar el efecto de la lactoferrina bovina en la prevención de diarrea. Se recolectaron 915 muestras de pacientes con diarrea y 2734 muestras “controles” (muestras colectadas en ausencia de diarrea una semana antes y después de la fecha de toma de la muestra, recolectadas cada 1-2 meses). Estas muestras fueron obtenidas de 555 niños entre 12 y 24 meses desde enero de 2008 a marzo de 2011 en Independencia, Lima (Ochoa *et al.*, 2013).

En este estudio, los criterios de inclusión fueron aquellos niños cuyas madres aceptaron la participación de sus hijos en el ensayo clínico, con el criterio de tener entre 12 y 18 meses y haber sido destetados. En tanto, los criterios de exclusión del trabajo original fueron la presencia de diarrea severa, persistente o crónica, malnutrición severa, infecciones severas que requirieron una hospitalización en el mes anterior, una enfermedad crónica seria, y una historia personal o familiar de alergia a leche de vaca, eczema, rinitis alérgica o asma (Ochoa *et al.*, 2013).

Todas las muestras recolectadas fueron analizadas para buscar la presencia de DEC mediante PCR en tiempo real (Barletta *et al.*, 2009). En este análisis, 63 (6.9%) y 114 (4.2%) de las muestras provenientes de pacientes con diarrea y muestras controles, respectivamente, fueron positivas para ETEC (presencia de LT, ST-Ia y/o ST-Ib). En total, 177 (4.9%) muestras de lo recolectado resultaron con presencia de ETEC.

Para el cálculo del tamaño de muestra, se consideró la sensibilidad y especificidad esperadas de 90%, en base a diversos estudios que comparan el RPA con la PCR en

tiempo real (Escadafal *et al.*, 2014). Con un 95% de nivel de confianza, 80% de potencia de la prueba y un error de estimación de 5%, se calculó la cantidad de muestras a analizar (Hajian-Tilaki, 2014):

$$n = \frac{[Z_{\alpha}\sqrt{P_0(1-P_0)} + Z_{\beta}\sqrt{P_1(1-P_1)}]^2}{(P_1 - P_0)^2} = \frac{[1.65\sqrt{0.9(0.1)} + 0.842\sqrt{0.95(0.05)}]^2}{(0.05)^2} = 182.3$$

Es decir, se necesitarían 183 muestras positivas para ETEC y 183 muestras con ausencia de la bacteria. No obstante, debido a los costos y la cantidad y calidad de las muestras almacenadas, se optó por analizar 150 muestras positivas y 150 muestras negativas para ETEC. Con este nuevo tamaño de muestra, el poder de la prueba es 70.73%, conservando los demás parámetros.

6.3 Operacionalización de Variables

Las variables utilizadas están descritas en la Tabla 5. Para la optimización, la detección por RPA fue la variable dependiente; mientras que las variables independientes fueron los *primers*, el tipo de ADN, el paso de agitación, el tiempo y temperatura de reacción, el límite de detección y la presencia de reacción cruzada. En tanto, para caracterizar los sistemas de qPCR, se usaron la temperatura de fusión o de *melting* (T_m , del inglés “*melting temperature*”), el límite de detección y cuantificación, la eficiencia de amplificación y la linealidad. Finalmente, para el análisis de muestras se consideró la detección del gen codificante de la toxina LT, de la toxina ST o de ETEC (presencia de alguno de los genes), sea por RPA o por el estándar de oro.

Tabla 5. Definición y características de las variables usadas en este estudio.

Variable	Definición	Tipo de Variable	Escala de medición
Detección por RPA	Amplificación del gen analizado por RPA. Se determina como la presencia de la banda correspondiente al peso molecular para el gen en gel de agarosa.	Dependiente Cualitativa Dicotómica	Nominal
Cebador o Primer	Secuencia de nucleótido que es complementario a un gen específico.	Independiente Cualitativa Politómica	Nominal
Tipo de ADN	Fuente de ADN. Puede ser a partir de cultivo bacteriano o a partir de heces infectadas	Independiente Cualitativa Dicotómica	Nominal
Purificación del producto de amplificación	Proceso por el cual se elimina sustancias inhibitoras o productos inespecíficos. Se realiza mediante un kit.	Independiente Cualitativa Dicotómica	Nominal
Paso de agitación	Proceso por el cual se genera una mayor interacción entre los componentes de la reacción. Se realiza de forma manual.	Independiente Cualitativa Dicotómica	Nominal
Tiempo de reacción	Tiempo total de incubación. Se midió en un cronómetro.	Independiente Cuantitativa Continua	Razón

Temperatura de reacción	Temperatura en la cual se lleva a cabo la amplificación. Se fijó en una incubadora.	Independiente Cuantitativa Continua	De Intervalo
Límite de detección	Concentración mínima (en UFC/rxn) que puede ser amplificada. Se determina como aquella concentración hasta donde se puede presenciar la banda correspondiente al gen.	Independiente Cuantitativa Continua	Razón
Presencia de reacción cruzada	Detección por RPA usando ADN proveniente de una fuente que no contiene ETEC.	Independiente Cualitativa Dicotómica	Nominal
Temperatura de <i>melting</i> o de fusión	Temperatura en la cual la mitad de la secuencia de ADN está como hebra simple y la otra mitad como hebra doble. Se determina mediante PCR en tiempo real, en una gráfica de la primera derivada negativa de la fluorescencia versus la temperatura.	Independiente Cuantitativa Continua	De Intervalo
Límite de cuantificación	Concentración (en UFC/rxn) hasta la cual se puede obtener una relación lineal entre el ciclo umbral (Cq) y el logaritmo natural de la cantidad de bacterias. Se determina mediante PCR en tiempo real.	Cuantitativa Continua	Razón

Eficiencia de amplificación	Representa la proporción de ADN sintetizado en cada ciclo de PCR. Se toma como referencia el valor de 100%, el cual indica que se duplicó la cantidad de ADN en cada ciclo. Se determina mediante la fórmula $E = (10^{-1/m} - 1) \times 100\%$, donde E es la eficiencia y m es la pendiente de la recta generada entre el ciclo umbral y el logaritmo natural de la cantidad de bacterias.	Cuantitativa Continua	Razón
Linealidad	Representa que porcentaje de la variación de los datos se explica por el modelo de regresión lineal. Se determina mediante el coeficiente de determinación (R^2) de la recta generada entre el ciclo umbral y el logaritmo natural de la cantidad de bacterias.	Cuantitativa Continua	De Intervalo
Detección del gen para LT por RPA	Presencia del gen para LT en la muestra por RPA. Se determina como la presencia de la banda correspondiente al gen para LT en gel de agarosa	Cualitativa Dicotómica	Nominal
Detección del gen para ST por RPA	Presencia del gen para ST en la muestra por RPA. Se determina como la presencia de la banda correspondiente al gen para ST-Ia o ST-Ib en gel de agarosa	Cualitativa Dicotómica	Nominal
Diagnóstico de ETEC por RPA	Presencia de ADN proveniente de ETEC en la muestra. Se determina por la detección de algún gen (LT, ST-Ia o ST-Ib) por RPA	Cualitativa Dicotómica	Nominal

Detección del gen para LT por PCR en tiempo real	Presencia de gen para LT en la muestra por PCR en tiempo real. Se determina como una temperatura de <i>melting</i> (Tm) esperada para el gen para LT y una derivada negativa mayor a 500 unidades	Cualitativa Dicotómica	Nominal
Detección del gen para ST por PCR en tiempo real	Presencia de gen para ST en la muestra por PCR en tiempo real. Se determina como una temperatura de <i>melting</i> (Tm) esperada para el gen de la toxina ST y una derivada negativa mayor a 500 unidades	Cualitativa Dicotómica	Nominal
Diagnóstico de ETEC por PCR en tiempo real	Presencia de ADN proveniente de ETEC en la muestra. Se determina por la detección del gen LT o ST en la muestra por PCR en tiempo real	Cualitativa Dicotómica	Nominal

6.4 Procedimientos y Técnicas

6.4.1 Crecimiento bacteriano

La cepa ETEC H10407 (ATCC 35401; LT+ ST-Ia+ ST-Ib+) fue descongelada y sembrada en Agar MacConkey a 37°C por una noche. Entre 5 y 10 colonias fueron colocadas en 75ml de caldo Luria Bertani (LB) y fueron cultivadas a 37°C y agitación moderada por una noche. Al día siguiente, el cultivo fue diluido en caldo LB fresco hasta una densidad óptica (OD) a 600nm entre 0.1 y 0.2. Se repartió en alícuotas de 25ml y se dejó crecer a 37°C y 250 rpm por 8 horas. En cada hora, se midió la OD 600nm de una de las alícuotas. Este experimento se repitió 3 veces para obtener una curva de crecimiento y determinar el tiempo de la fase logarítmica de crecimiento. Asimismo, se calculó el tiempo de duplicación según Mandsberg *et al.* (2009).

6.4.2 Extracción de ADN bacteriano y de muestras de heces infectadas

Para obtener ADN bacteriano, la cepa ETEC H10407 fue cultivada según lo descrito en la sección anterior por el tiempo determinado para llegar a la fase logarítmica de crecimiento. Luego, el cultivo bacteriano fue centrifugado a 4000 rpm por 10 min y se descartó el medio de cultivo. Después, se agregó 10ml de *buffer* fosfato salino (PBS) al *pellet* celular, se homogenizó y centrifugó a 4000 rpm por 10 min. El sobrenadante fue descartado y el *pellet* fue resuspendido en 5ml de *buffer* PBS. Después, se extrajo el ADN a partir de 200 µl de la suspensión bacteriana usando el “*High Pure PCR Template Preparation Kit*” (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim,

Alemania). Luego, se midió la concentración y la pureza (ratio A260/280) del ADN extraído usando un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Rockford, EEUU).

Para determinar la concentración de bacterias, se realizaron diluciones a la suspensión bacteriana de ETEC H10407 en un factor de 1/10 usando *buffer* PBS. Luego, se sembró por duplicado 100µl de cada dilución en agar MacConkey y se cultivó a 37°C por una noche. Al día siguiente, se contó la cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC) en cada placa y se determinó la concentración de la suspensión bacteriana original en UFC/µl.

Para infectar las heces con ETEC H10407, se pesaron aproximadamente 200mg de heces (confirmadas sin la presencia de alguna DEC por PCR en tiempo real) y se mezclaron con una alícuota de la suspensión bacteriana de ETEC equivalente a la cantidad de UFC deseada.

Para extraer el ADN de las muestras de heces, se usó el “*High Pure PCR Template Preparation Kit*” (Roche Diagnostics GmbH) y se siguieron los pasos recomendados por el fabricante con algunas modificaciones. En resumen, las modificaciones incluyeron un paso de centrifugación a 13500 rpm por 5 min antes de colocar el sobrenadante obtenido en la columna de separación y utilizar 100 ul del *buffer* de elución. Posteriormente a la extracción, se midió la concentración y la pureza (ratio A260/280) del ADN extraído usando un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

6.4.3 Diseño de *primers*

Para diseñar los *primers*, las secuencias de los genes codificantes para las toxinas LT, ST-Ia y ST-Ib fueron descargadas de la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Se alinearon por separado cada gen y simultáneamente las secuencias de los genes para las toxinas ST-Ia y ST-Ib usando Clustal Omega (Sievers *et al.*, 2011) para determinar las regiones conservadas.

Tomando en cuenta el alineamiento, se escogieron *primers* de longitud entre 30 y 35 nt, con un %GC entre 30 y 70, con pirimidinas en el extremo 5' (primeros 3 -5 nt) y de GC en el extremo 3' (últimos 3 nt) y sin repeticiones continuas de nucleótidos (TwistDx Ltd). Asimismo, se evaluó la formación de estructuras secundarias y dímeros de *primers* usando OligoAnalyzer (<https://www.idtdna.com/calc/analyser>), y la especificidad de los *primers* mediante BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). En caso de ser necesario, se diseñaron *primers* con nucleótidos degenerados para cubrir la mayor cantidad de secuencias.

Aunque existen recomendaciones de TwistDx para el diseño de *primers*, también se ha reportado que *primers* de menor tamaño y diseñados para PCR pueden funcionar adecuadamente para la RPA (TwistDx Ltd.; Daher *et al.*, 2016). Por este motivo, se probó seleccionar inicialmente los *primers* reportados para amplificar los genes codificantes de las toxinas LT, ST-Ia y ST-Ib por Guion *et al.* (2008). Estos *primers* fueron LT-F (5'-TCTCTATGTGCATACGGAGC-3'), LT-R (5'-CCATACTGATTGCCGCAAT-3'), STIa-F (5'-

TTTCCCCTCTTTTAGTCAGTCAA-3'), STIb-F (5'-
TGCTAAACCAGTAGAGTCTTCAAAA-3') y ST-R (5'-
GCAGGATTACAACACAATTCACAGCAG - 3').

6.4.4 Selección de *primers* para RPA

Para probar la eficacia de los *primers*, se utilizó el *TwistAmp Basic* kit (TwistDx Ltd., Cambrigde, Inglaterra) con algunas modificaciones para tener un volumen final de 25 μ l. En cada reacción, se usó 14.75 μ l del *buffer* de rehidratación (TwistDx Ltd., Cambrigde, Inglaterra), los *primers* a 480nM de concentración final, acetato de magnesio a 14mM de concentración final y 2 μ l del ADN molde. Como ya se mencionó, los *primers* probados fueron los reportados por Guion *et al.* (2008). Cada reacción contó con un control positivo (ADN extraído de ETEC H10407, equivalente a 10^6 UFC/rxn) y blanco de reacción [agua de grado molecular (Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU)]. Las reacciones fueron incubadas a 42°C por 4 min y luego, la mezcla se agitó moderadamente y se volvió a incubar a 37°C hasta completar los 30 min. El producto de amplificación fue revelado por una electroforesis en gel de agarosa al 2% a 70V por 70 min con una tinción en bromuro de etidio. Se determinó que los *primers* fueron adecuados si se observaron productos de amplificación en los tamaños esperados (322 pb para LT, 159 pb para ST-Ia y 138 pb para ST-Ib). No se pudo realizar la secuenciación de los productos de amplificación.

Luego, se estandarizó el ensayo usando ADN extraído de heces infectadas con ETEC H10407, equivalente a 10^6 UFC/rxn. Los tres genes se amplificaron individual y

simultáneamente (combinando los *primers* de los diferentes genes en la reacción) usando el *TwistAmp Basic* kit (TwistDx Ltd.) bajo las condiciones descritas. Para verificar si el ADN extraído de heces contenía el gen para la toxina LT, se realizó una PCR convencional en el termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, California, EEUU). El volumen final de la reacción fue 17 µl y consistió en 0.03U/µl de GoTaq® DNA Polymerase en 1X Green GoTaq® Reaction *Buffer* (Promega, Wisconsin, EEUU), 240µM de cada deoxinucleótido trifosfato (dNTP) y MgCl₂ 1.7mM. Se usaron los *primers* reportados por Guion *et al* (2008) y sus concentraciones finales fueron 0.6 µM. El protocolo de amplificación fue el siguiente: una desnaturalización inicial de 94°C por 5 min, 30 de ciclos de desnaturalización (94°C por 20s), hibridización (60°C por 30s) y extensión (72°C por 30s), y una extensión final de 73°C por 5 min. Los productos de amplificación fueron revelados bajo las condiciones descritas para la RPA.

Debido a los resultados obtenidos, se evaluó algunos *primers* diseñados en este estudio para el gen de LT usando el *TwistAmp Basic* kit (TwistDx Ltd., Cambridge, Inglaterra) con algunas modificaciones para tener un volumen final de 25 µl, según lo descrito anteriormente. Los *primers* usados fueron LT-F4 (5'–CCATATGAACAGGAGGTTTCTGCGTTAGGTGG–3'), LT-F5 (5'–CTCACTTAGCAGGACAGTCTATATTATCAGG–3'), LT-R2 (5'–GAATTCTGTTATATATGTCAACCTCTGACT–3') y LT-R5 (5'–TCCTGAGATATATTGTGCTCAGATTCTGG–3'). Para la reacción de RPA, se usaron las cuatro combinaciones de *primers forward* y *reverse*. Cada reacción contó

con un control positivo (ADN extraído de ETEC H10407), ADN extraído de heces infectadas con ETEC H10407 y blanco de reacción. Los productos de amplificación fueron revelados según lo descrito anteriormente. A la par, una porción del producto amplificado fue incubado a 65°C por 10 min antes de realizar la electroforesis (Londoño *et al.* 2016). Se determinó que los *primers* fueron adecuados si se observaron productos de amplificación en los tamaños esperados.

Para corroborar la ausencia de inhibidores en el ADN molde, estos fueron usados en una PCR convencional realizada en el termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems). El volumen final de la reacción fue 17 µl y consistía en 0.03U/µl de GoTaq® DNA Polymerase en 1X Green GoTaq® Reaction Buffer (Promega), 240µM de cada dNTP y MgCl₂ 1.7mM. Las concentraciones finales de los primers fue 0.6 µM. El protocolo de amplificación fue el siguiente: una desnaturalización inicial de 94°C por 5 min, 30 de ciclos de desnaturalización (94°C por 20s), hibridización (60°C por 30s) y extensión (72°C por 30s), y una extensión final de 73°C por 5 min. Los productos de amplificación fueron revelados según lo descrito anteriormente.

Una vez escogido el par de *primers* para amplificar el gen que codifica la toxina LT, se procedió a verificar el ensayo para la amplificación simultánea de los genes para LT, ST-Ia y ST-Ib, usando el TwistAmp Basic kit (TwistDx Ltd.), según lo descrito anteriormente. Las concentraciones finales de los *primers* para LT, ST-Ia y ST-Ib fueron 400, 360 y 400 nM, respectivamente. Se realizó la combinación de los tres *primers* y solo LT y ST-Ia. Cada reacción contó con los controles ya mencionados.

Finalmente, los productos de amplificación fueron revelados según lo descrito anteriormente.

6.4.5 Optimización del ensayo

Los parámetros que se optimizaron fueron el uso del paso de agitación a los 4 min del inicio de la incubación, el tiempo de reacción (5 – 30 min) y la temperatura de reacción (30 - 50°C). Para la optimización del paso de agitación, se utilizaron los controles anteriormente mencionados. En tanto, las reacciones de RPA fueron realizadas usando el *TwistAmp Basic* kit (TwistDx), con un volumen final de reacción de 25ul, de manera similar a lo descrito en la sección anterior. Se evaluó la combinación de los tres genes y solo LT y ST-Ia. El producto de amplificación fue revelado según lo descrito en la sección anterior.

6.4.6 Especificidad analítica

Para verificar la especificidad del ensayo de RPA, se extrajo ADN de diferentes enteropatógenos y de ADN de heces confirmadas sin la presencia de alguna DEC por PCR en tiempo real, las cuales fueron evaluadas con el ensayo de RPA usando el *TwistAmp Basic* (TwistDx), según lo descrito anteriormente. Por los resultados, se decidió no continuar evaluando a la toxina ST-Ib y se evaluó simultáneamente la presencia de los genes para LT y ST-Ia. El producto de amplificación fue revelado según lo descrito anteriormente. La especificidad de la prueba se comprobó al observarse un patrón similar a lo observado en el blanco de reacción. Las cepas usadas para este proceso fueron DAEC RMA102, STEC EDL 933, EPEC 2348/69,

EIEC 213, EAEC 042, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Shigella flexneri* ATCC 12022 y una cepa clínica de *Vibrio cholerae*. Todas las cepas están criopreservadas en el banco de cepas del Laboratorio de Infectología Peadiátrica.

6.4.7 PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR) para ETEC

Para comparar el límite de detección con los ensayos de RPA, se desarrolló algunos sistemas de PCR cuantitativo en tiempo real. Las PCR fueron realizadas en el termociclador CFX-96TM Real-Time System (BioRad, California, EEUU) y fueron monitoreadas por el software CFX Manager 2.0 (BioRad, California, EEUU). El volumen final de la reacción fue 20 μ l y contenía 0.5U de la ADN polimerasa Phusion en *buffer high-fidelity Phusion* (Finnzymes OY, Espoo, Finlandia), 200 μ M de cada dNTP y MgCl₂ 4mM. Se diluyó el SYBR Green I (Cambrex Bio Science, Rockland, EEUU) según lo recomendado y se agregó a la concentración final de 1X. Se probaron los *primers* reportados por Guion *et al.* (2008) para los genes codificantes de las toxinas LT y ST, así como los *primers* seleccionados en este trabajo para la amplificación del gen de la toxina LT con RPA. Las concentraciones finales de los *primers* para los genes codificantes la toxinas LT y ST fueron de 0.36 y 0.26 μ M, respectivamente. Los genes fueron evaluados por separado. El protocolo de amplificación fue el siguiente: una desnaturalización inicial a 98°C por 30s, 40 ciclos de desnaturalización (98°C por 20s), hibridización (60°C por 20s) y extensión (72°C por 20s), y una extensión final a 73°C por 3min. Luego de esto, se realizó una curva de *melting* en el rango de 73° a 95°C a una velocidad de 0.2°C/s y una lectura cada

0.2°C. Los picos de *melting* fueron calculados automáticamente con el software CFX Manager 2.0 (BioRad).

En cada ensayo, se realizó por duplicado curvas estándar usando ADN extraído de cultivo bacteriano o de heces infectadas que representaron el rango de 10^6 a 1 UFC de ETEC H10407/rxn. Para el análisis de cuantificación, se graficó los ciclos umbrales (Cq) frente al logaritmo natural de la cantidad de UFC correspondiente. La pendiente de la recta (m) fue calculada por regresión lineal en el software CFX Manager 2.0 (BioRad). Por otro lado, la eficiencia de amplificación (E) fue determinada usando la fórmula $E = (10^{-1/m} - 1) \times 100\%$. Para determinar el rango dinámico en que la relación de las variables sea lineal (coeficiente de determinación (R^2) cercano a 1), se eliminaron los datos de las concentraciones de ADN pertinentes. El límite de cuantificación fue definido como la concentración más baja dentro del rango dinámico lineal. Se realizaron 4 ensayos de qPCR, en días distintos y con diferentes preparaciones (réplicas biológicas) de ADN bacteriano y de heces.

6.4.8 Sensibilidad analítica (Límite de detección)

Para determinar el límite de detección del ensayo de RPA para la amplificación simultánea de genes para LT y ST-Ia, se utilizó el *TwistAmp Basic* kit (TwistDx), con un volumen final de reacción de 25ul, de manera similar a lo descrito en la sección anterior y con las condiciones óptimas antes escogidas. Se utilizaron dos fuentes de ADN molde: bacteria (ETEC H10407) y heces infectadas por ETEC H10407. Se realizaron diluciones a partir del ADN extraído de cultivo bacteriano o de heces

infectadas en un factor de 1/10 de tal forma que se obtuvo concentraciones que representaron el rango de 10^6 a 1 UFC de ETEC H10407/rxn. Los productos de amplificación fueron revelados según lo descrito anteriormente.

6.4.9 Análisis de muestras de heces

En total, se analizaron 316 muestras de heces previamente recolectadas y almacenadas a -20°C . Se seleccionaron al azar 166 y 150 muestras que resultaron con presencia y ausencia de ETEC, respectivamente, según lo reportado por Ochoa *et al.* (2013). En ese estudio, para determinar la presencia de ETEC (y de los otros patotipos de DEC), se realizó el PCR en tiempo real reportado por Guion *et al.* (2008) en un conjunto (“*pool*”) de 5 colonias aisladas a partir de la siembra de cada muestra de heces en agar MacConkey. Para extraer el ADN de las muestras de heces, se usó el “*High Pure PCR Template Preparation Kit*” (Roche Diagnostics GmbH) y se siguieron los pasos recomendados por el fabricante con algunas modificaciones antes mencionadas (Sección 6.4.2). La concentración promedio del ADN de las muestras fue $9\text{ ng}/\mu\text{l}$ (Rango intercuartílico [RIQ]: $7.1 - 14\text{ ng}/\mu\text{l}$, rango: $2.5 - 107.8\text{ ng}/\mu\text{l}$), mientras que el ratio de absorbancia 260/280 fue de 1.48 (RIQ: $1.36 - 1.70$, rango: $1.10 - 2.14$) y el ratio 260/230 fue de 0.44 (RIQ: $0.37 - 0.54$, rango: $0.20 - 2.10$).

Para comprobar la calidad del ADN extraído, se realizó una PCR convencional para amplificar el gen de la beta globina humana. Esta fue realizada en un termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems). El volumen final de la reacción fue $20\ \mu\text{l}$ y consistía en $0.03\text{U}/\mu\text{l}$ de GoTaq® DNA Polymerase en 1X Green

GoTaq® Reaction *Buffer* (Promega), 240µM de cada dNTP y MgCl₂ 1.7mM. Los *primers* fueron HBBL-F (5'-GGCAGACTTCTCCTCAGGAGTC-3') y HBBL-R (5'-CTTAGACCTCACCTGTGGAGC-3') y sus concentraciones finales fueron 0.5 µM (Boggild *et al.*, 2007). El protocolo de amplificación fue el siguiente: una desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, 35 ciclos de desnaturalización (94°C por 20s), hibridización (50°C por 30s) y extensión (72°C por 30s), y una extensión final de 72°C por 5 min. Los productos de amplificación fueron revelados según lo descrito anteriormente. Para comprobar que la presencia de inhibidores no fuera un problema en la PCR, se tomaron las muestras que no pudieron amplificar el producto esperado, se diluyeron en factores de 1/5 a 1/100 y se volvió a realizar la PCR descrita. En ningún caso, se obtuvo un producto de amplificación. Por este motivo, se descartaron para los análisis futuros aquellas muestras que no pudieron amplificar el producto esperado del gen de la beta globina humana.

Debido al tiempo de almacenamiento, existe la posibilidad de pérdida de plásmidos que contienen los genes a analizar (Durand D y Ochoa TJ, comunicación personal). Por esto, se realizó una “nueva” PCR en tiempo real para detectar los genes que codifican para LT y ST. La PCR fue realizada en el termociclador CFX-96™ Real-Time System (BioRad) y fue monitoreada por el software CFX Manager 2.0 (BioRad). El volumen final de la reacción fue 20 µl y constía en 0.4U de la polimerasa Phusion en *buffer* high-fidelity Phusion (Finnzymes OY, Espoo, Finlandia), 200µM de cada dNTP y MgCl₂ 4mM. Se diluyó el SYBR Green I (Cambrex Bio Science, Rockland, EEUU) según lo recomendado y se agregó a la

concentración final de 1X. Se usaron los *primers* reportados por Guion *et al.* (2008) para los genes codificantes de las toxinas LT y ST, a una concentración final de 0.5 μ M. Las toxinas fueron evaluadas simultáneamente. El protocolo de amplificación fue el siguiente: una desnaturalización inicial a 98°C por 30s, 40 ciclos de desnaturalización (98°C por 20s), hibridización (60°C por 20s) y extensión (72°C por 20s), y una extensión final a 73°C por 3min. Luego de esto, se realizó una curva de *melting* en el rango de 73° a 95°C a una velocidad de 0.2°C/s y una lectura cada 0.2°C. Los picos de *melting* fueron calculados automáticamente con el software CFX Manager 2.0 (BioRad). En este estudio, el estándar de oro usado para comparar el ensayo de RPA fue esta PCR en tiempo real para detectar simultáneamente los genes codificantes de las toxinas LT y ST; y no se utilizaron para ese fin, la PCR en tiempo real descrito por Guion *et al.* (2008) y usada por Ochoa *et al.* (2013), ni las qPCR descritas en la sección 6.4.7.

Después, las muestras fueron evaluadas con el ensayo de RPA usando el TwistAmp Basic (TwistDx), según lo descrito anteriormente. Se evaluó simultáneamente la presencia de los genes para LT y ST-Ia. Cada reacción contó con los controles ya mencionados (Sección 6.4.4). Los productos de amplificación fueron según lo descrito anteriormente. La presencia de ETEC en las muestras fue determinada con la amplificación de al menos uno de los genes en estudio.

6.5 Consideraciones éticas

Las muestras fueron codificadas para su uso, es decir, se prescindió de la identidad del niño en todo momento y los resultados fueron incorporados al banco de datos correspondientes para las muestras codificadas. El proyecto en cual se recolectaron las muestras (“Estudio randomizado, controlado de lactoferrina bovina para la prevención de diarrea en niños”; Ochoa *et al.*, 2013) y este trabajo fueron aprobados por el Comité Institucional de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (SIDISI 51407 y 100261, respectivamente).

6.6 Plan de análisis

Para determinar la normalidad de los datos de las variables cuantitativas, se usó la prueba de Shapiro-Wilk. Para resumir la distribución de las variables, se utilizó la media aritmética y su desviación estándar, o la mediana, su rango intercuartílico (RIQ) y el rango de valores; de acuerdo a la normalidad y la escala de medición de las variables. En caso de comparar dichas variables, se utilizó la prueba de t-Student no pareada o la prueba de Mann-Whitney, de acuerdo a la normalidad y la escala de medición de las variables. Se determinó la significancia estadística con un $p < 0.05$ mediante el paquete estadístico Stata 12 (StataCorp LP, EEUU).

Por otro lado, para las muestras de heces, los resultados de la “nueva” PCR en tiempo real, así como los del ensayo de RPA (positivo o negativo para LT o ST) fueron añadidos en la base de datos correspondiente.

En el estándar de oro (la “nueva” PCR en tiempo real), las muestras fueron clasificadas como positivas para un gen determinado si el ciclo umbral (Cq) fue menor a 25, presentó una temperatura de *melting* (Tm) según lo esperado para el gen y la primera derivada de la fluorescencia a dicha Tm fue mayor a 500 unidades. En tanto, se clasificaron como negativas aquellas muestras que no tuvieron una Tm esperada para LT y ST.

En los ensayos de RPA, la presencia o ausencia de la banda correspondiente a los genes en estudio en el gel de agarosa fueron interpretadas como un resultado positivo o negativo, respectivamente. Además, se tomó en cuenta el perfil obtenido para el control negativo y el blanco de reacción para clasificar una muestra como negativa.

Posterior al análisis de muestras, se determinó la cantidad y porcentaje, y su respectivo intervalo de confianza al 95% (IC 95%), de muestras positivas de ETEC solo con la toxina LT, solo con ST y con ambas, tanto por la nueva PCR en tiempo real como la RPA. Para comparar dichos porcentajes entre las pruebas de diagnóstico, se utilizó la prueba de chi cuadrado.

Además, se calculó la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo (PPV) y negativo (NPV), y sus respectivos IC 95%, para la detección de ETEC (solo LT, solo ST-Ia o LT/ST-Ia), del gen codificante para la toxina LT (solo LT o LT/ST-Ia) y del gen codificante para la toxina ST-Ia (solo ST-Ia o LT/ST-Ia) usando como estándar de oro la “nueva” PCR en tiempo real. Para contrastar las hipótesis que la sensibilidad y la especificidad son mayores a 90%, 85% u 82.5%, se utilizó la prueba

Z de una cola. La significancia estadística fue determinada por un $p < 0.05$ para todas las pruebas estadísticas. Todos estos cálculos y pruebas fueron realizados en el paquete estadístico Stata 12 (StataCorp LP).

Finalmente, se determinó el porcentaje de concordancia y el índice kappa entre las pruebas de diagnóstico usando el paquete estadístico Stata 12 (StataCorp LP). Los escenarios considerados fueron para la detección de ETEC (presencia o ausencia) y para la detección del genotipo (solo LT, solo ST-Ia, LT/ST-Ia o ninguno).

VII. RESULTADOS

7.1 Análisis de secuencias nucleotídicas

Al realizar la búsqueda en GenBank (Junio, 2017), se encontraron 34 accesos para la toxina LT que correspondieron a las subunidades A y B. Al buscar por subunidad, se encontraron 34 secuencias completas para la subunidad A y 36 para la subunidad B. En tanto, hubo 35 accesos correspondientes a secuencias completas para los genes de las toxinas ST: 21 para ST-Ia y 14 para ST-Ib.

Al alinear las secuencias completas del operón de la toxina LT, 4.53% (52/1148) fueron posiciones no conservadas y el número máximo de posiciones no conservadas seguidas fue 2. Al realizar lo mismo para cada subunidad, se encontró que el 4.37% (34/777) y 4.8% (18/375) de las posiciones fueron no conservadas para la subunidad A y B, respectivamente. Asimismo, el número máximo de posiciones no conservadas seguidas fue 2 en cada subunidad.

Por el contrario, al alinear las 35 secuencias de la toxina ST, 40.64% (89/219) fueron posiciones no conservadas y el número máximo de posiciones no conservadas seguidas fue de 6; mientras que el de posiciones conservadas seguidas, 13. Además, se encontró repeticiones de adeninas en varias porciones de las secuencias.

Al realizar el alineamiento con las secuencias para la toxina ST-Ia y ST-Ib por separado, el porcentaje de posiciones no conservadas fue de 8.22% (18/219) y 5.48% (12/219), respectivamente. En ambos casos, el número máximo de posiciones no conservadas seguidas fue de 2.

7.2 Diseño de *primers*

En total, se generaron 32 *primers*: 5 *primers forward* y 6 *reverse* para LT, 4 *primers forward* y 4 *reverse* para ST-Ia y ST-Ib, por separado; y 1 primer *forward* y 4 *reverse*, todos estos con secuencias de nucleótidos degenerados, para la detección de los genes codificantes de las toxinas ST-Ia y ST-Ib simultáneamente (Tabla 6). El rango de la longitud de los *primers* fue de 29 a 34 nt, mientras que el rango del porcentaje de GC fue de 30% a 50%. La energía libre de Gibbs (ΔG) predicha para la formación de estructuras secundarias (“*hairpins*”) fue menor a -3.5 kcal/mol; mientras que la ΔG predicha para la formación de homodímeros fue menor a -9.8 kcal/mol.

Por otro lado, los tamaños esperados del producto de amplificación para el gen codificante de la toxina LT estuvieron entre 73 y 936 pares de bases (pb); para el gen codificante de la toxina ST-Ia, entre 132 y 187 pb; para el gen codificante de la toxina ST-Ib, entre 88 y 203pb; y para la detección simultánea de los genes codificantes de ST-Ia y ST-Ib, entre 166 y 175 pb.

Tabla 6. Primers diseñados para amplificar los genes codificantes para las toxinas LT, STIa y STIb.

Toxina	Orient.	Nombre del primer	Secuencia (5' -->3')	Tamaño (nt)	%GC	ΔG - Hairpin	ΔG - Homo	Tamaño producto (pb)
LT	<i>Forward</i>	LT-F1	TTCCACTTACTATATATATGTTATAGCGACAGC	33	33.3	-0.53	-8.78	135-902
		LT-F2	AATTCATCAAGAACAATTACAGGTGATACT	30	30	-0.37	-5.36	73-577
		LT-F3	TTAATGTTAATGATGTATTAGGCGTATACAGCC	33	33.3	-1.31	-6.21	91-858
		LT-F4	CCATATGAACAGGAGGTTTCTGCGTTAGGTGG	32	50	-0.68	-7.82	121-820
		LT-F5	CTCACTTAGCAGGACAGTCTATATTATCAGG	31	41.9	0.41	-3.91	169-936
	<i>Reverse</i>	LT-R1	TATATCTGAGAATATGGTATTCCACCTAACG	31	35.5	-1.59	-5.95	91-169
		LT-R2	GAATTCTGTTATATATGTCAACCTCTGACT	30	33.3	-2.31	-8.51	145-542
		LT-R3	GTAGTTGTTATATAGGTTCCCTAGCATTAGACAT	33	33.3	-0.25	-5.83	577-936
		LT-R4	CTGCTAATCTGTAACCATCCTCTGCCGGAGC	31	54.8	-0.93	-9.75	175-291
		LT-R5	TCCTGAGATATATTGTGCTCAGATTCTGG	29	41.4	-3.12	-6.73	73-432
		LT-R6	GGTCTCTATATTCCCTGTTACGATGTAATCG	31	41.9	-2.71	-6.66	121-237
		ST-Ia	<i>Forward</i>	STIa-F1	TTCTTTCTGTATTATCTTTTTCACCTTTCG	29	34.5	2.42
STIa-F2	CTGTATTATCTTTTTCACCTTTCGCTCAGGATG			33	39.4	-0.49	-4.67	145-177
STIa-F3	GTATTATCTTTTTCACCTTTCGCTCAGGA			29	37.9	-0.97	-4.67	143-175
STIa-F4	TTCACCTTTCGCTCAGGATGCTAAACCAG			29	48.3	-0.97	-4.67	132-164
<i>Reverse</i>	STIa-R1		TACAAGCAGGATTACAACACAATTCACAGC	30	40	1.19	-5.36	161-180
	STIa-R2		CGGTACAAGCAGGATTACAACACAATTCAC	30	43.3	0.53	-5.36	164-183
	STIa-R3		CAGTAATTGCTACTATTCATGCTTTCAGG	29	37.9	-1.54	-5.38	132-151
	STIa-R4		CAAGCAGGATTACAACACAATTCACAGCAG	30	43.3	0.58	-5.36	159-178
ST-Ib	<i>Forward</i>	STIb-F1	TTAACTAATCTCAAATATCCGTGAAACAAC	30	30	0.88	-4.85	148-263
		STIb-F2	TGAAACAACATGACGGGAGGTAACATGAAAAAGC	34	41.2	-2.35	-5.83	127-242
		STIb-F3	TTGGCAATTTTTATTTCTGTATTATCTTTCC	31	25.8	0.67	-5.36	88-203

		STIb-F4	TATTATCTTTCCCCTCTTTTAGTCAGTCAAC	31	35.5	0.53	-1.94	154-184
<i>Reverse</i>		STIb-R1	TAATAACATCCAGCACAGGCAGGATTACAAC	31	41.9	-2.27	-6.12	184-263
		STIb-R2	CAAAGTTCACAGCAGTAAAATGTGTTGTTTC	30	36.7	-1.61	-5.25	154-233
		STIb-R3	CCAGCACAGGCAGGATTACAACAAAGTTCAC	31	48.4	-1.21	-3.29	175-254
		STIb-R4	CTAATGTAATTTTCTCTTTTGAAGAGTCAAGTG	33	30.3	-2.33	-6.72	88-148
	ST (ST-Ia y ST-Ib)*	<i>Forward</i>	STdeg-F1	TCTGTATTRTCTTTYCMYCTTTTRSTCAG	30	36.7	0.94	-4.83
<i>Reverse</i>		STdeg-R1	YACARGCAGGATTACAACAMARTTCACAGC	30	43.3	1.23	-5.12	175
		STdeg-R2	CARGCAGGATTACAACAMARTTCACAGCAG	30	45	1.1	-5.12	173
		STdeg-R3	GCAGGATTACAACAMARTTCACAGCAGTAA	30	40	-1.12	-5.12	170
		STdeg-R4	GATTACAACAMARTTCACAGCAGTAAWWKS	30	35	-1.12	-7.47	166

*Nucleótidos degenerados: R (G o A), Y (T o C), M (A o C), S (G o C), W (A o T).

7.3 Crecimiento de la cepa *Escherichia coli* enterotoxigénica H10407

La curva de crecimiento de la cepa ETEC H10407 se presenta en la Fig. 3. En tres cultivos independientes, la desviación estándar de los OD 600nm obtenidos a cada hora fue baja (0.001 a 0.028). Por otro lado, la ecuación de la recta formada al realizar una gráfica semilogarítmica de las OD 600nm versus el tiempo fue $y = 0.4171x - 0.7618$; por lo que el tiempo de duplicación de la bacteria fue 25 min.

A las 2 horas de crecimiento, se encontró una OD 600nm de 1.1 y se eligió estos dos datos como los característicos en la fase del crecimiento logarítmico de la cepa estudiada.

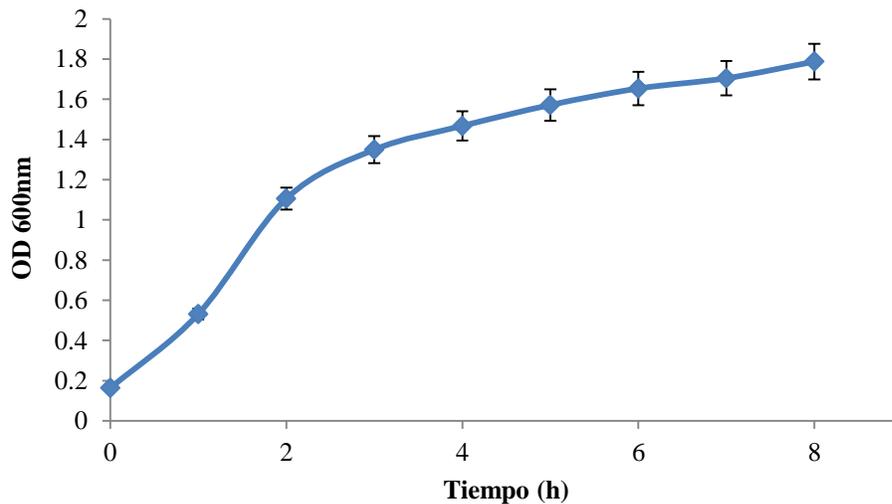


Figura 3. Curva de crecimiento de *E. coli* enterotoxigénica H10407. Los datos representan el promedio de 3 ensayos independientes y las barras de error representan la desviación estándar.

7.4 Concentración de bacterias y extracción de ADN bacteriano

En promedio, la concentración en la suspensión bacteriana a las 2 horas de crecimiento fue de 2.63×10^6 UFC/ μ l. Por otro lado, la concentración del ADN bacteriano en ese punto fue 155.04 ± 16.85 ng/ μ l, mientras que el ratio de absorbancia 260/280 fue de 1.77 ± 0.053 y el ratio 260/230 fue de 1.88 ± 0.094 .

7.5 Selección de *primers* para RPA

La Fig. 4 muestra los productos de amplificación del RPA usando los *primers* descritos por Guion *et al.* (2008). Los tres genes mostraron una banda intensa en el tamaño esperado: LT, 322 pb; ST-Ia, 159 pb; ST-Ib, 138 pb. En el caso de los blancos de reacción, se observaron numerosas bandas inespecíficas y de diferente intensidad. Para LT, tanto la banda principal como la inespecíficas se presentaron como un barrido (bandas “*smear-like*”). De interés, es una banda inespecífica que coincide con el tamaño esperado para ST-Ib (Fig. 4).

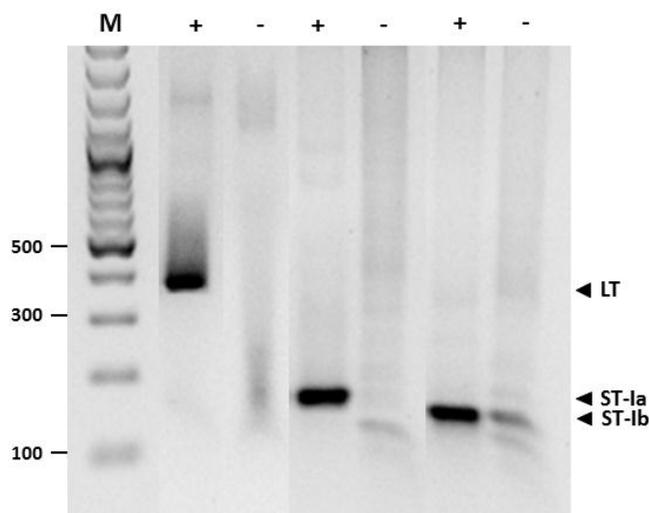


Figura 4. Detección individual de los genes de ETEC con RPA. M: marcador de pares de bases, +: ADN bacteriano, -: blanco de reacción. Las flechas indican las posiciones aproximadas de los genes señalados.

Como siguiente paso, se realizó la amplificación simultánea de los genes codificantes para las toxinas de ETEC mediante RPA y cuyo resultado se muestra en la Fig. 5. En todos los casos, se observaron los productos de amplificación en los tamaños esperados, como en la Fig. 4. Asimismo, la banda correspondiente a LT presentó una banda “*smear-like*”, que también se notó en la amplificación simultánea de los genes para ST-Ia y ST-Ib como un producto inespecífico. Una vez más, en los casos que se amplificó el gen para ST-Ib, una banda inespecífica en el mismo tamaño que lo esperado para el gen de esta toxina se presentó en los blancos de reacción.

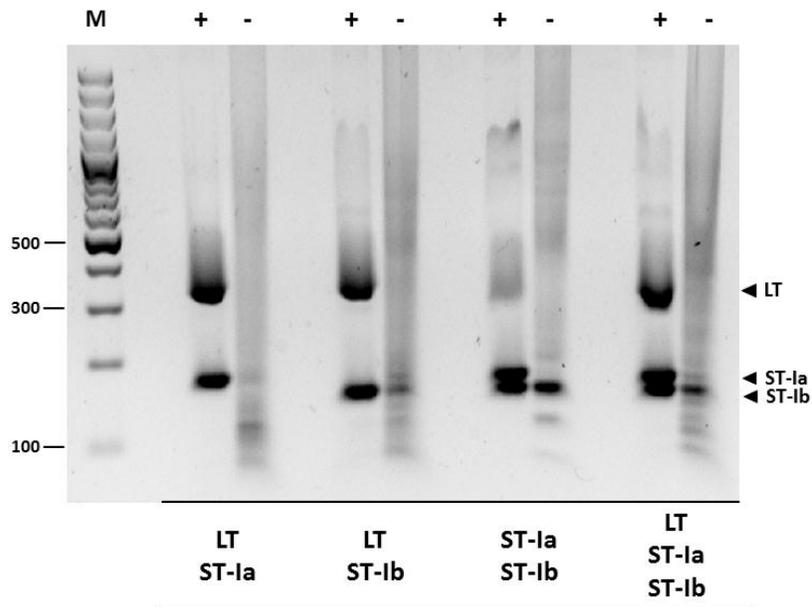


Figura 5. Detección simultánea de los genes de ETEC con RPA. M: marcador de pares de bases, +: ADN bacteriano, -: blanco de reacción. Las flechas indican las posiciones aproximadas de los genes señalados.

Si bien la intensidad de esa banda inespecífica disminuye al variar la concentración final de los *primers* para ST-Ib, esta no desaparece del todo, excepto cuando dicho *primer* no está presente. Además, se notó que su intensidad varía al usar diferentes lotes de reactivos de RPA (datos no mostrados).

Usando el ADN extraído de las muestras de heces infectadas como molde, se realizó una RPA para la detección individual y simultánea de los 3 genes de ETEC, lo cual se muestra en la Fig. 6. Los genes para las toxinas ST-Ia y ST-Ib fueron amplificados sin ningún problema, tanto individual como simultáneamente. Por otro lado, cuando se usaron los *primers* para LT, se presentaron bandas inespecíficas de diversos

tamaños, simulando una escalera (bandas “*ladder-like*”), de manera similar a lo obtenido en el blanco de reacción (Fig. 6).

Cabe notar que el perfil obtenido para el blanco de reacción en la Fig. 6 difiere a lo obtenido en la Fig. 5. Esta heterogeneidad de resultados para el blanco se observó en diferentes ensayos a lo largo de este trabajo. La banda inespecífica en el tamaño correspondiente para ST-Ib estuvo presente (Fig. 6), pero en una menor intensidad a lo obtenido en la Fig. 5.

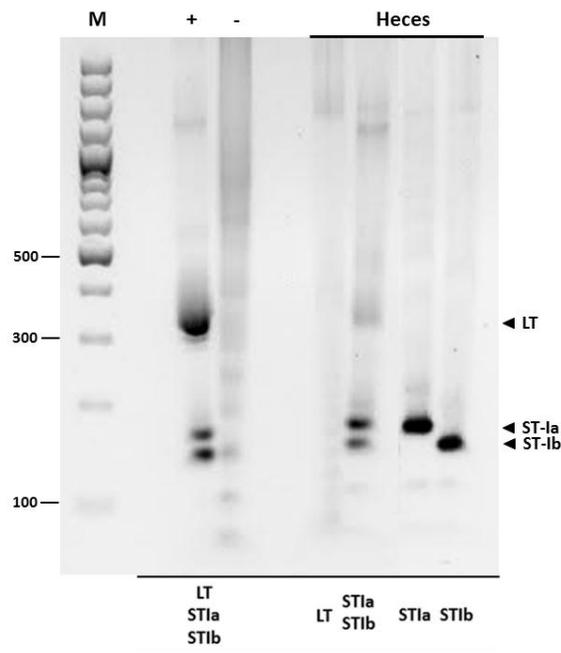


Figura 6. Detección individual y simultánea con RPA de los genes de ETEC en heces infectadas. M: marcador de pares de bases, +: ADN bacteriano, -: blanco de reacción, Heces: ADN de heces infectadas. Las flechas indican las posiciones aproximadas de los genes señalados.

Para comprobar que el ADN de heces infectadas contenía el gen para LT, se realizaron simultáneamente una PCR y una RPA para amplificar dicho gen. Los resultados de este ensayo se observan en la Fig. 7. Una vez más, no hubo amplificación con RPA del gen LT al usar ADN de heces infectadas, pero sí con ADN bacteriano. Se observaron bandas “*smear-like*” en el blanco de reacción. Por otro lado, se observó un producto amplificado para el gen de LT tanto con ADN bacteriano y ADN de heces infectadas al usar PCR, lo cual indica que el gen estaba presente en la muestra. No se observaron bandas inespecíficas en el blanco de reacción con PCR.

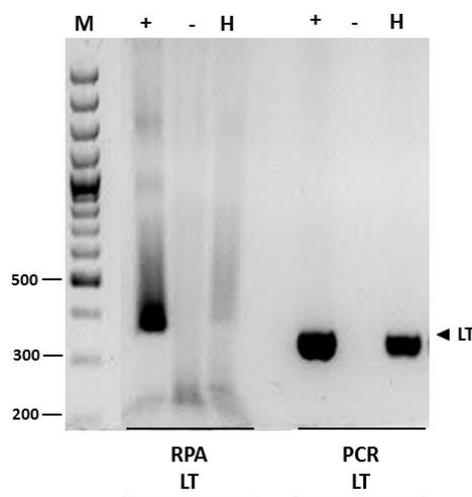


Figura 7. Amplificación del gen para LT en heces con RPA y PCR. M: marcador de pares de bases, +: ADN bacteriano, -: blanco de reacción, H: ADN de heces infectadas. Las flechas indican las posiciones aproximadas del gen señalado.

A pesar de que se probaron distintas concentraciones finales (500 a 800 nM) de los *primers* para LT para incrementar la probabilidad de amplificación por RPA, no se

presentó el producto de amplificación correspondiente para LT en ninguna concentración (datos no mostrados).

Por estos resultados, se decidió evaluar cuatro de los *primers* (F4, F5, R2 y R5) anteriormente diseñados para la detección de la toxina LT (Tabla 6). Los tamaños de productos de amplificación predichos por el programa “*In silico PCR amplification*” (Bikandi *et al.*, 2004) para las combinaciones F4-R2, F4-R5, F5-R2 y F5-R5 fueron 388, 316, 504 y 432 pb, respectivamente. La Fig. 8 muestra los productos de amplificación de los ensayos de RPA y PCR usando estos *primers*.

Al no realizar ningún tratamiento posterior a la amplificación con RPA, solo en la combinación F4-R5 se pudo observar una banda definida. En los demás casos, se notaron bandas “*smear-like*” y algunas bandas inespecíficas (Fig. 8A). No obstante, al incubar los productos de amplificación a 65°C por 10 min antes de la corrida electroforética, la presencia de bandas “*smear-like*” disminuye notablemente y es posible diferenciar bandas definidas en todas las combinaciones (Fig. 8B). Para los pares F4-R2, F4-R5, F5-R2 y F5-R5, los tamaños observados en las bandas definidas con mayor intensidad fueron aproximadamente 400, 300, 600 y 500 pb, respectivamente. Solo las combinaciones con el primer LT-F4 tuvieron un tamaño cercano a lo predicho *in silico*.

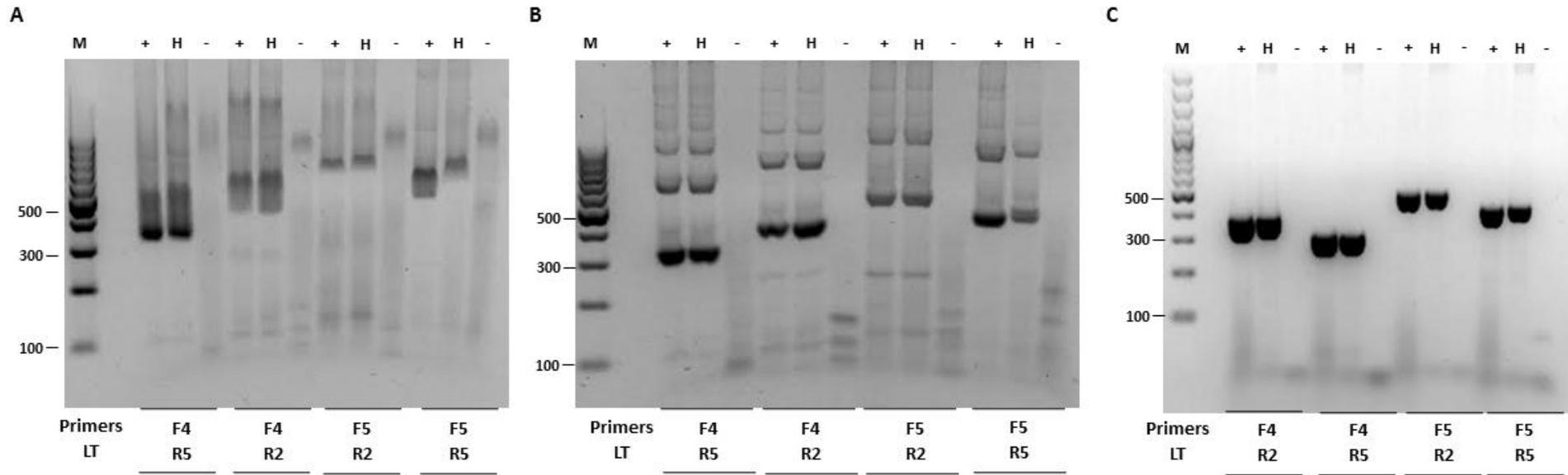


Figura 8. Elección de los *primers* para el gen de la toxina LT. Cuatro *primers* diseñados en este trabajo (LT-F4, LT-F5, LT-R2 y LT-F5) fueron usados en la detección del gen para la toxina LT usando RPA (A), RPA con una incubación posterior a 65°C por 10 min (B) o PCR (C). M: marcador de pares de bases, +: ADN bacteriano, -: blanco de reacción, H: ADN de heces infectadas.

Asimismo, se pudo notar que hubo bandas “*ladder-like*” en todos los controles positivos de los pares de *primers*. Incluso, los tamaños de esas bandas fueron aproximadamente un múltiplo del tamaño de la banda principal antes descrito. Además, si bien todas las combinaciones presentaron bandas inespecíficas en sus blancos de reacción, solo el par F4-R5 tuvo bandas de 100 pb a menos.

Por otro lado, al usar PCR, se obtuvo un producto de amplificación en las 4 combinaciones, sin importar la fuente del ADN molde (Fig. 8C). Los tamaños de los productos de amplificación de los pares F4-R2, F4-R5, F5-R2 y F5-R5 fueron aproximadamente 350, 300, 500 y 400, respectivamente. En este caso, todos los tamaños fueron cercanos a lo predicho *in silico*.

Debido a que el par de *primers* F4-R5 fue el único que pudo amplificar mediante PCR y RPA, sin y con la incubación posterior a 65° C, una banda definida con un tamaño similar a lo predicho *in silico*, y a que su blanco de reacción no presentó bandas inespecíficas de más de 100 pb; se decidió optar por esa combinación para la detección del gen para LT usando RPA. Por otro lado, si bien la incubación posterior a 65°C mejora la calidad del resultado en el gel, esta le quita lo isotérmico a todo el proceso, por lo que se decidió no emplearlo en el análisis de muestras.

Como siguiente paso, se realizó la amplificación simultánea de los genes para las toxinas de ETEC mediante RPA usando los *primers* antes escogidos para LT y los *primers* descritos por Guion *et al.* (2008) para ST. Los resultados de este ensayo se muestran en la Fig. 9.

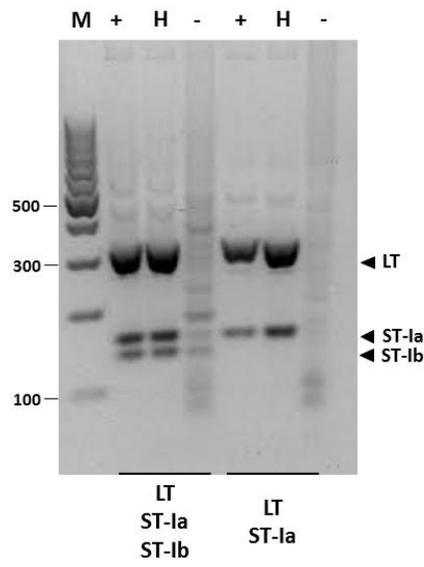


Figura 9. Detección simultánea de LT y ST (ST-Ia y/o ST-Ib) con RPA. Los *primers* usados en cada ensayo se muestran en la parte inferior. M: marcador de pares de bases, +: ADN bacteriano, -: blanco de reacción, H: ADN de heces infectadas. Las flechas indican las posiciones aproximadas de los genes señalados.

Tanto al usar ADN bacteriano como ADN de heces infectadas, se observaron los tres productos de amplificación que corresponden a los tamaños esperados a los genes en estudio, como se obtuvo anteriormente.

Por otro lado, cuando está presente el primer para el gen de ST-Ib, el blanco de reacción presenta bandas “*ladder-like*”, similar a lo observado en la Fig. 6. La banda inespecífica ubicada por el tamaño esperado a ST-Ib estuvo presente en baja intensidad. En cambio, cuando no está dicho primer, la intensidad de las bandas inespecíficas del blanco de reacción disminuye y no se observa la banda de tamaño similar a ST-Ib (Fig. 9).

Debido a dicha banda inespecífica, se decidió no detectar ese gen en el análisis de muestras y se escogieron los *primers* ya mencionados para la detección de LT y ST-Ia en heces usando RPA.

7.6 Optimización del ensayo de RPA

El primer parámetro a optimizar fue el paso de agitación luego de los 4 min iniciada la reacción de RPA (Fig. 10).

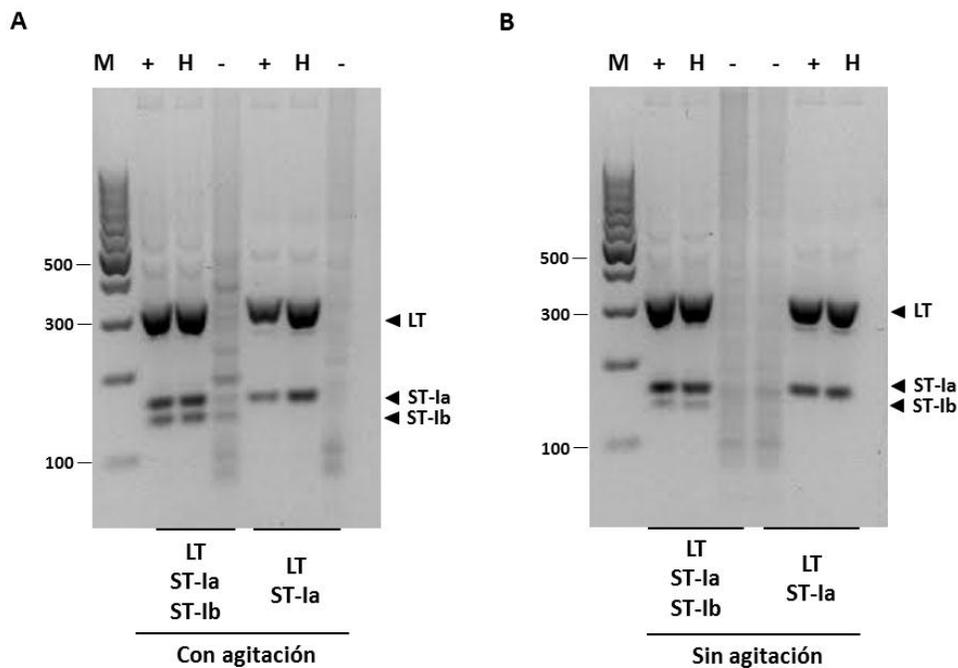


Figura 10. Efecto del paso de agitación en la RPA. Se realizó RPA con (A) o sin (B) el paso de agitación a los 4 min de la reacción. Los *primers* usados en cada ensayo se muestran en la parte inferior. M: marcador de pares de bases, +: ADN bacteriano, -: blanco de reacción, H: ADN de heces infectadas. Las flechas indican las posiciones aproximadas de los genes señalados.

No hubo grandes diferencias en los productos formados al realizar o no la agitación durante la reacción de RPA (Fig. 10). Los tamaños y la intensidad de las bandas de los 3 productos esperados fueron similares en ambos casos. Incluso, la cantidad de productos inespecíficos en el blanco de reacción, que tuvieron un perfil de bandas “*ladder-like*”, fue menor al eliminar el paso de agitación, y tuvieron menos intensidad.

El siguiente parámetro evaluado fue el tiempo de reacción, para lo cual, se detuvo la reacción a los 5, 15, 25 y 30 min (Fig. 11).

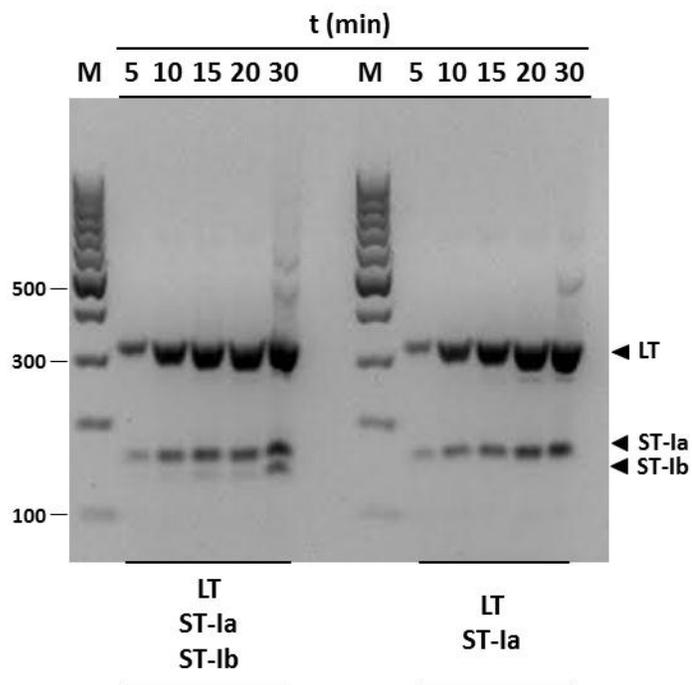


Figura 11. Efecto del tiempo de reacción en la RPA. Se detuvo la reacción en el tiempo indicado en la parte superior. Los *primers* usados en cada ensayo se muestran en la parte inferior. M: marcador de pares de bases, t: tiempo de reacción. Las flechas indican las posiciones aproximadas de los genes señalados.

Al usar ADN bacteriano, se pudo detectar las bandas correspondientes a los genes para LT y ST-Ia a los 5 min de reacción, aunque su intensidad fue baja. Para el gen de ST-Ib, se pudo notar una banda de intensidad baja desde los 15 min. Las intensidades fueron aumentando conforme se incrementó el tiempo de reacción. No obstante, la banda correspondiente para ST-Ib recién tuvo una intensidad similar a los otros genes a los 30 min. No hubo diferencias en los resultados para los genes de LT y ST-Ia por la presencia o ausencia de los *primers* para ST-Ib (Fig. 11). Por otro lado, se obtuvieron los mismos resultados al usar ADN de heces infectadas (datos no mostrados). Para evitar disminuir la sensibilidad de la prueba, se decidió dejar el tiempo de reacción en 30 min.

Posteriormente, se evaluó la temperatura de reacción (30, 37, 42, 45 y 50 °C) y los resultados se muestran en la Fig. 12. Al usar ADN bacteriano, se notó la amplificación de los genes para LT y ST-Ia a 30 °C, pero con una baja intensidad de bandas. En las temperaturas de 37, 42 y 45°C, se pudo observar la amplificación de los tres genes, pero la intensidad de sus bandas, en especial para ST-Ib, fue mayor a 42°C. A 50°C, solo se pudo amplificar el gen para LT. No hubo diferencias en los resultados para los genes de LT y ST-Ia por la presencia o ausencia de los *primers* para ST-Ib (Fig. 12). Por otro lado, se obtuvieron los mismos resultados al usar ADN de heces infectadas (datos no mostrados). Por lo descrito, se decidió mantener la reacción de RPA a 42°C.

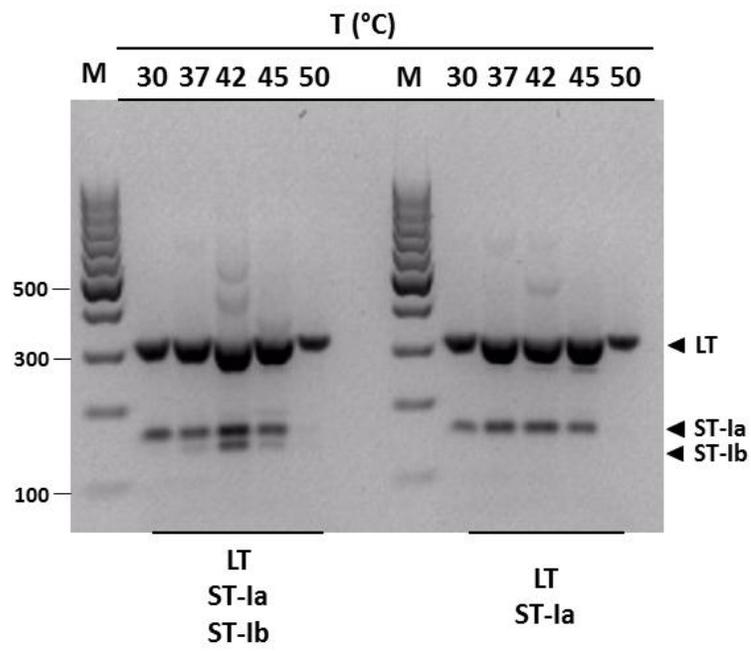


Figura 12. Efecto de la temperatura de reacción en la RPA. Las temperaturas usadas están indicadas en la parte superior. Los *primers* usados en cada ensayo se muestran en la parte inferior. M: marcador de pares de bases, T: temperatura de reacción. Las flechas indican las posiciones aproximadas de los genes señalados.

7.7 Especificidad analítica

Para verificar la ausencia de reacciones cruzadas con otros enteropatógenos, se evaluó el ensayo de RPA para detectar ETEC (LT o ST-Ia) en heces con ADN provenientes de diversos patógenos. Los resultados se muestran en la Fig. 13. Los productos de amplificación correspondientes para LT y ST-Ia pudieron observarse solo con ADN de ETEC o de heces infectadas con esta bacteria. En todos los demás casos, se notó la presencia de bandas “*ladder-like*” inespecíficas, similar a lo obtenido en el blanco de reacción. Este perfil se notó también con el ADN de heces no

infectadas y fue considerado para determinar un resultado negativo de ETEC para las muestras de heces.

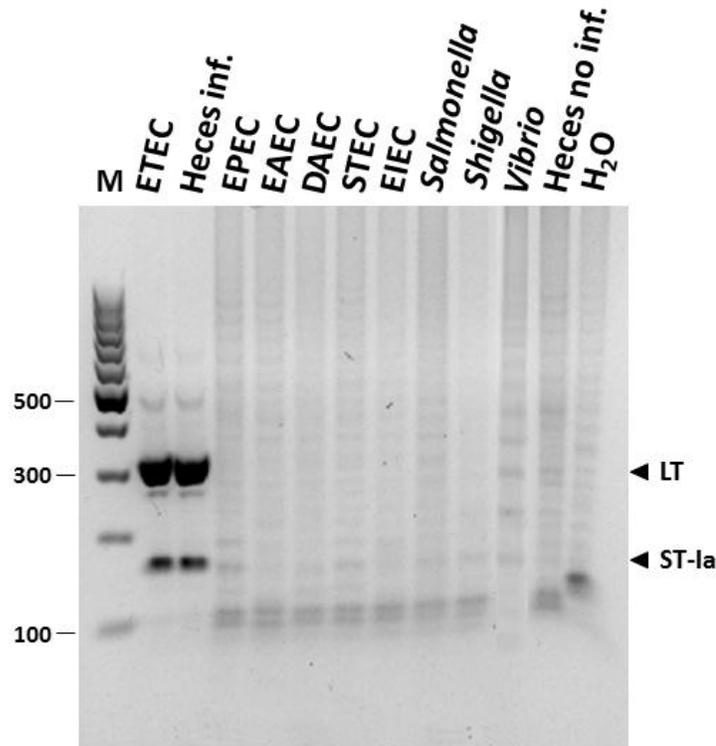


Figura 13. Especificidad analítica del ensayo de RPA. Los ADN usados en cada ensayo se muestran en la parte superior. M: marcador de pares de bases, EPEC: *E. coli* enteropatógena, EAEC: *E. coli* enteroagregativa, EIEC: *E. coli* enteroinvasiva, DAEC: *E. coli* de adherencia difusa y STEC: *E. coli* productora de Shiga-toxina. Las flechas indican las posiciones aproximadas de los genes señalados.

7.8 PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR) para ETEC

En un primer momento, se utilizó los *primers* elegidos en este trabajo para la detección de LT usando RPA (LT-F4 y LT-R5). Al usar ADN bacteriano, el rango lineal de la curva estándar fue con las concentraciones de 10^6 a 10^3 UFC/rxn, con una

eficiencia de 102.5% y un coeficiente de determinación de 0.993 (Fig. 14A). Por otro lado, se observaron dos picos de *melting*: uno con una T_m entre 85.2 y 85.4°C, que corresponde al producto principal, mientras que el segundo pico varió entre 80.0 y 80.4 °C. (Fig. 14B). Este último pico de *melting* comenzó a aparecer desde el punto de 10^2 UFC/rxn y en las concentraciones menores. Asimismo, se notó que la altura del pico de *melting* del producto principal disminuyó conforme la concentración de ADN fue menor.

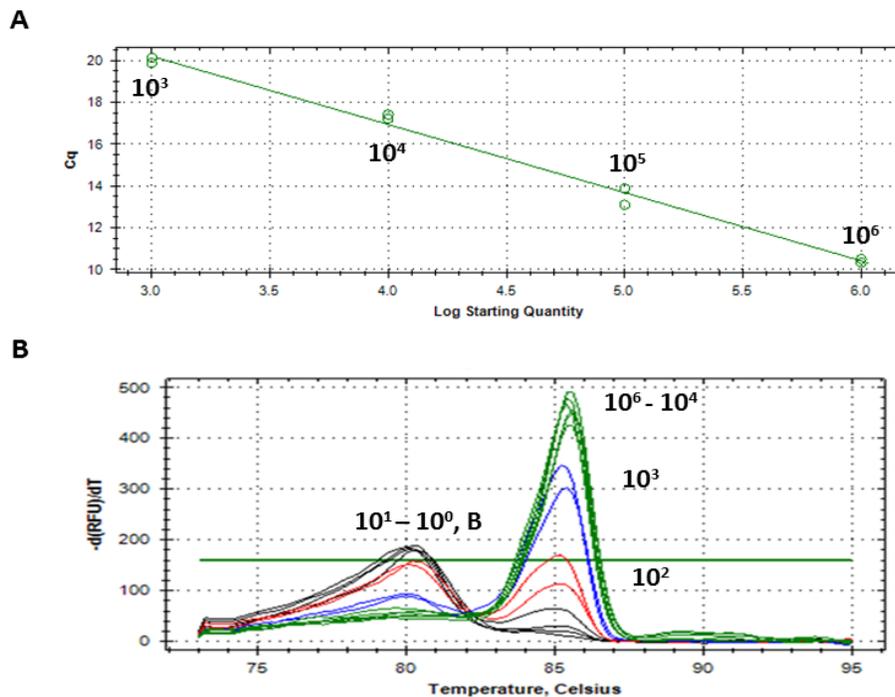


Figura 14. PCR cuantiativo en tiempo real (qPCR) para LT usando los *primers* LT-F4 y LT-R5 y ADN bacteriano. (A) Análisis de cuantificación (Ct vs. Logaritmo de la cantidad de UFC). La ecuación de la recta fue $Y = 37.045 - 3.095X$. (B) Curva de *melting* de los productos de amplificación por qPCR. Los diferentes colores representan distintos rangos de concentración. Verde: $10^6 - 10^4$ UFC/rxn,

Azul: 10^3 UFC/rxn, Rojo: 10^2 UFC/rxn, Negro: $10^1 - 10^0$ UFC/rxn y blanco de reacción.

Al usar ADN de heces infectadas, se observaron también dos picos de *melting* a las temperaturas de 85.0 a 85.8 °C (producto principal) y de 80.2 a 80.6 °C (producto inespecífico). No se pudo construir ninguna recta con la eficiencia y el coeficiente de determinación adecuados para la cuantificación. Esto también se vio reflejado en las cinéticas de reacción, las cuales no podían distinguirse entre concentraciones (datos no mostrados). Al realizar una electroforesis en gel de agarosa, se pudo detectar el producto de amplificación principal (aprox. 300 pb) hasta la concentración de 10^2 UFC/rxn. Asimismo, se notó un producto inespecífico de un tamaño aproximado de 100 pb en todas las concentraciones e incluso en el blanco de reacción (datos no mostrados). Este producto inespecífico no pudo ser eliminado al cambiar la temperatura de alineamiento (63.8, 62.1, 60.2 y 57.7 °C) del qPCR (datos no mostrados).

Debido a estos resultados, el qPCR se realizó con los *primers* para LT y ST reportados por Guion *et al.* (2008). Como ejemplo, la Fig. 15 muestra la curva estándar en el rango dinámico lineal y el análisis de la temperatura de *melting* para la amplificación del gen codificante de la toxina LT usando ADN de heces infectadas. En tanto, la Tabla 7 muestra los resultados de todos ensayos en 4 fechas distintas y el promedio de los mismos.

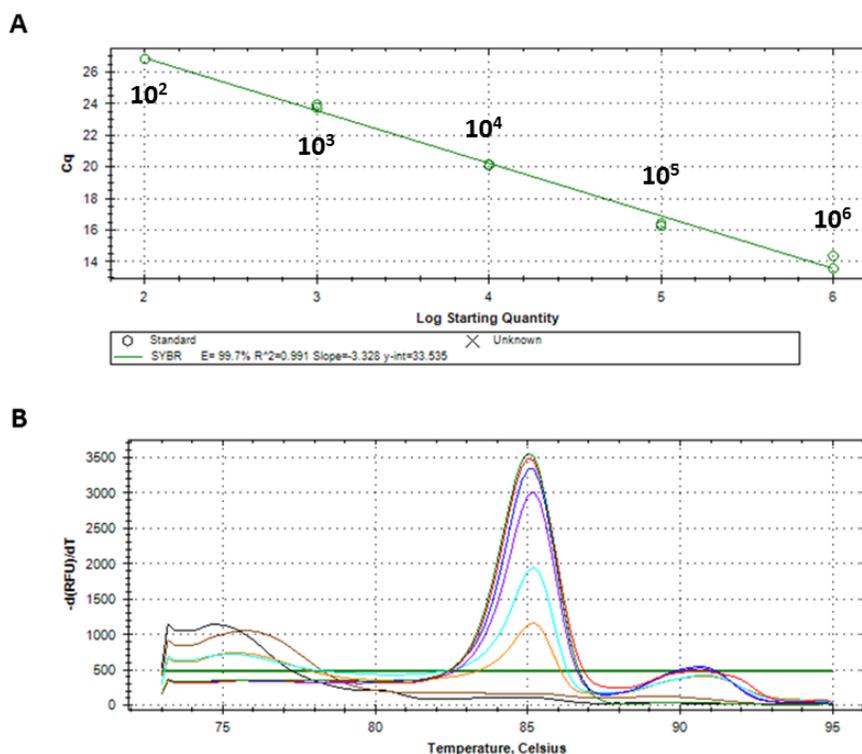


Figura 15. PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR) para LT usando los *primers* LT-F y LT-R y ADN de heces infectadas. (A) Análisis de cuantificación (Ct vs. Logaritmo de la cantidad de UFC). La ecuación de la recta fue $Y = 33.535 - 3.328X$. (B) Curva de *melting* de los productos de amplificación por qPCR. Los diferentes colores representan distintos rangos de concentración. Verde: 10^6 UFC/rxn, Rojo: 10^5 UFC/rxn, Azul: 10^4 UFC/rxn, Morado: 10^3 UFC/rxn, Celeste: 102 UFC/rxn, Naranja 10 UFC/rxn, Marrón: 1 UFC/rxn, Negro: blanco de reacción.

En el ensayo mostrado en la Fig. 15, el rango dinámico lineal abarcó las concentraciones desde 10^2 a 10^6 UFC/rxn, por lo que el límite de cuantificación fue 100 UFC/rxn. La eficiencia de reacción fue 99.7% y el coeficiente de determinación fue 0.991 (Fig. 15A). Asimismo, se observó un pico de *melting* con una T_m entre 85.0 y 85.2°C.

Tabla 7. Parámetros de PCR cuantitativo en tiempo real para ETEC¹. Cuatro qPCR fueron realizados para la cuantificación de (A) LT y (B) ST (ST-Ia y ST-Ib) usando los *primers* de Guion *et al.* (2008).

(A)

Parámetro	Ensayo 1		Ensayo 2		Ensayo 3		Ensayo 4		Promedio	
	ADN Bacteria	ADN Heces Infectadas	ADN Bacteria	ADN Heces Infectadas						
T_m (°C)	85.24 ± 0.08	85.14 ± 0.19	85.22 ± 0.06	85.09 ± 0.15	84.85 ± 0.13	84.70 ± 0.11	84.62 ± 0.06	84.80 ± 0.09	84.97 ± 0.28	84.93 ± 0.23
Límite de detección (UFC/rxn)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Límite de cuantificación (UFC/rxn)	10	10 ²	10	10 ²						
Eficiencia (%)	97.1	89.2	106.3	99.7	106.2	89.5	105.8	94.1	103.9 ± 4.51	93.1 ± 4.92
R²	0.996	0.996	0.995	0.991	0.995	0.996	0.993	0.997	0.995 ± 0.001	0.995 ± 0.003

(B)

Parámetro	Ensayo 1		Ensayo 2		Ensayo 3		Ensayo 4		Promedio	
	ADN Bacteria	ADN Heces Infectadas								
T_m (°C)	80.73 ± 0.42	80.80 ± 0.47	80.60 ± 0.13	80.56 ± 0.36	80.54 ± 0.40	80.53 ± 0.47	80.80 ± 0.47	80.84 ± 0.52	80.65 ± 0.36	80.68 ± 0.44
Límite de detección (UFC/rxn)	10 ²	10 ²								
Límite de cuantificación (UFC/rxn)	10 ²	10 ²								
Eficiencia (%)	74.3	74	77.9	71.6	82	84.3	78.3	83.9	78.1 ± 3.15	78.5 ± 6.60
R²	0.997	0.991	0.995	0.993	0.995	0.991	0.994	0.993	0.995 ± 0.001	0.992 ± 0.001

¹ Cuando es necesario, los datos son presentados como Media ± Desviación estándar

T_m: Temperatura de *melting*.

UFC/rxn: Unidad formadora de colonias/reacción de PCR.

R²: Coeficiente de determinación.

Para el gen codificante de la toxina LT, la temperatura de *melting* (T_m) fue 84.97 ± 0.28 y 84.93 ± 0.23 °C para ADN bacteriano y de heces infectadas, respectivamente. No hubo diferencia significativa entre ambas T_m ($p = 0.506$). Además, el límite de detección fue 10 UFC/rxn en ambos tipos de ADN molde. El límite de cuantificación fue 10 UFC/rxn al usar ADN bacteriano y 100 UFC/rxn para ADN de heces infectadas. La eficiencia de la curva estándar usando ADN bacteriano (103.9 ± 4.51 %) fue mayor ($p = 0.01$) que al usar ADN de heces infectadas (93.1 ± 4.92 %). La linealidad (R^2) fue cercana a 1 en todos los casos.

Por otro lado, para la toxina ST, se obtuvo una T_m para ADN bacteriano y de heces infectadas de 80.65 ± 0.36 y 80.68 ± 0.44 °C. No hubo diferencia significativa entre ambas T_m ($p = 0.650$). Tanto el límite de detección como el de cuantificación fue 100 UFC/rxn en ambos tipos de ADN molde. La eficiencia de la reacción fue 78.1 ± 3.15 % para el ADN bacteriano y 78.5 ± 6.60 % para el ADN de heces infectadas. No hubo diferencia significativa entre las dos eficiencias ($p = 0.932$). La linealidad (R^2) fue cercana a 1 en todos los casos.

7.9 Sensibilidad analítica (Límite de detección)

Para determinar el límite de detección para la detección simultánea de los genes LT y ST-Ia, se utilizaron diluciones de ADN bacteriano y ADN de heces infectadas que representaron 10^6 a 10^0 UFC/rxn como ADN molde en el ensayo de RPA previamente estandarizado. Cada ensayo se hizo a la par (mismo día y mismo lote de

ADN) de los ensayos de qPCR descritos en la Tabla 7. La Fig. 16 muestra el resultado de la RPA en uno de dichos días.

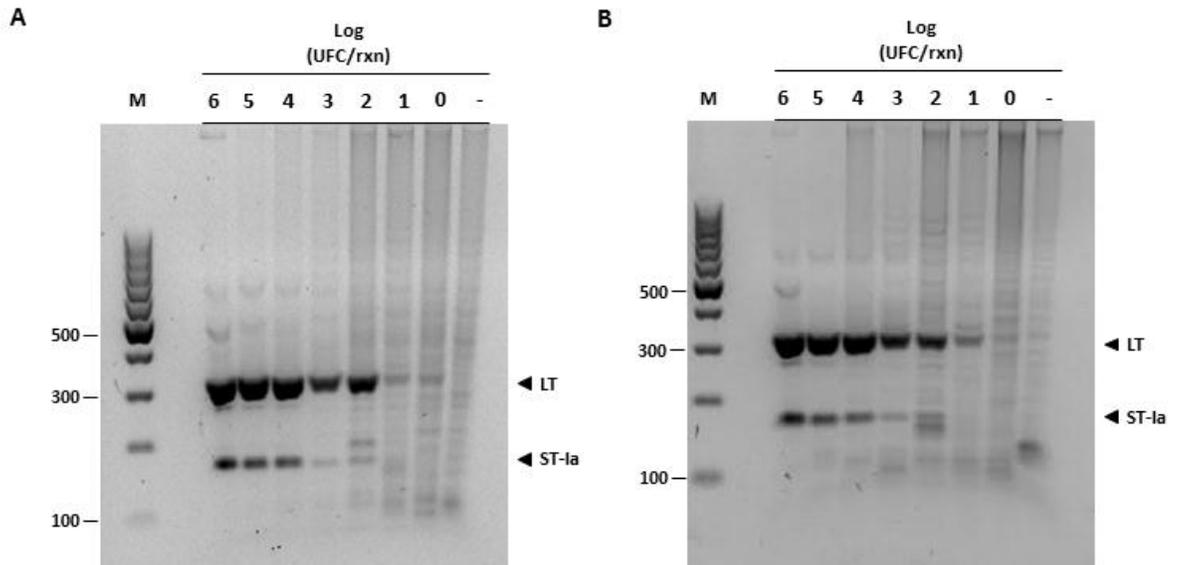


Figura 16. Límite de detección del ensayo de RPA. Se realizó RPA usando 1 a 10⁶ UFC/rxn de ADN bacteriano de ETEC H10407 (A) o ADN de heces infectadas (B). Las concentraciones usadas (en Log(UFC/rxn)) se encuentran en la parte superior. M: marcador de pares de bases, -: blanco de reacción. Las flechas indican las posiciones aproximadas de los genes señalados.

Para el caso del gen de la toxina LT, el límite de detección fue 10 UFC/rxn al usar cualquier fuente de ADN. La intensidad de las bandas fue alta hasta la concentración de 10² UFC/rxn en ambos casos. Por otro lado, para el gen de la toxina ST-Ia, el límite de detección fue 10² UFC/rxn para ADN bacteriano y de heces infectadas, y se pudo notar bandas de alta intensidad que representaron dicho gen hasta la concentración de 10⁶ UFC/rxn. En cualquier caso, para la concentración de 1 UFC/rxn y el blanco de reacción, se obtuvo un perfil de bandas “*ladder-like*”. La

cantidad de bandas inespecíficas fue mayor al usar ADN de heces infectadas respecto al ADN bacteriano. Estos resultados no variaron entre cada día de ensayo.

7.10 Análisis de muestras

Se extrajo el ADN total a las 316 muestras de heces previamente recolectadas y seleccionadas: 166 y 150 muestras que resultaron con presencia (“+”) y ausencia (“-”) de ETEC, respectivamente, de acuerdo a lo obtenido por Ochoa *et al.* (2013).

El primer análisis que se hizo a las muestras fue la amplificación del gen codificante de la beta globina humana por PCR como un control de la extracción. En total, 18 muestras no amplificaron dicho gen: 8 de las muestras “+” y 10 de las muestras “-” según Ochoa *et al.* (2013). A las 298 muestras restantes se le realizó el PCR en tiempo real para la detección simultánea de LT y ST (Fig. 17).

Para los genes codificantes de las toxinas LT y ST, las T_m obtenidas fueron 84.30 ± 0.34 °C y 80.11 ± 0.46 °C, respectivamente. Además de esto, fue común observar en los PCR de las muestras otros picos con T_m, como 83, 87 y 90 °C. Al realizar una electroforesis en gel de agarosa, también se observó la presencia de bandas de tamaños distintos a los esperados para LT y ST. Asimismo, se pudo notar que algunos picos con T_m de 83 y 87 °C les correspondían una banda de tamaño aproximado a 300 pb, similar a lo esperado para LT (datos no mostrados).

De las 158 muestras “+” según Ochoa *et al.* (2013), 9 (5.7 %) resultaron negativas y 149 (94.3 %) positivas. De estas últimas, 88 (59.1 %) amplificaron para LT y ST, 37 (24.8 %) solo ST y 24 (16.1 %) solo LT (Fig. 17). En tanto, para las 140 muestras “-”

según Ochoa *et al.* (2013), 112 (80.0 %) fueron positivas y solo 28 (20.0 %) fueron negativas. De las primeras, 62 (55.4 %) amplificaron solo ST, 39 (34.8 %) LT/ST y 11 (9.8 %) solo LT.

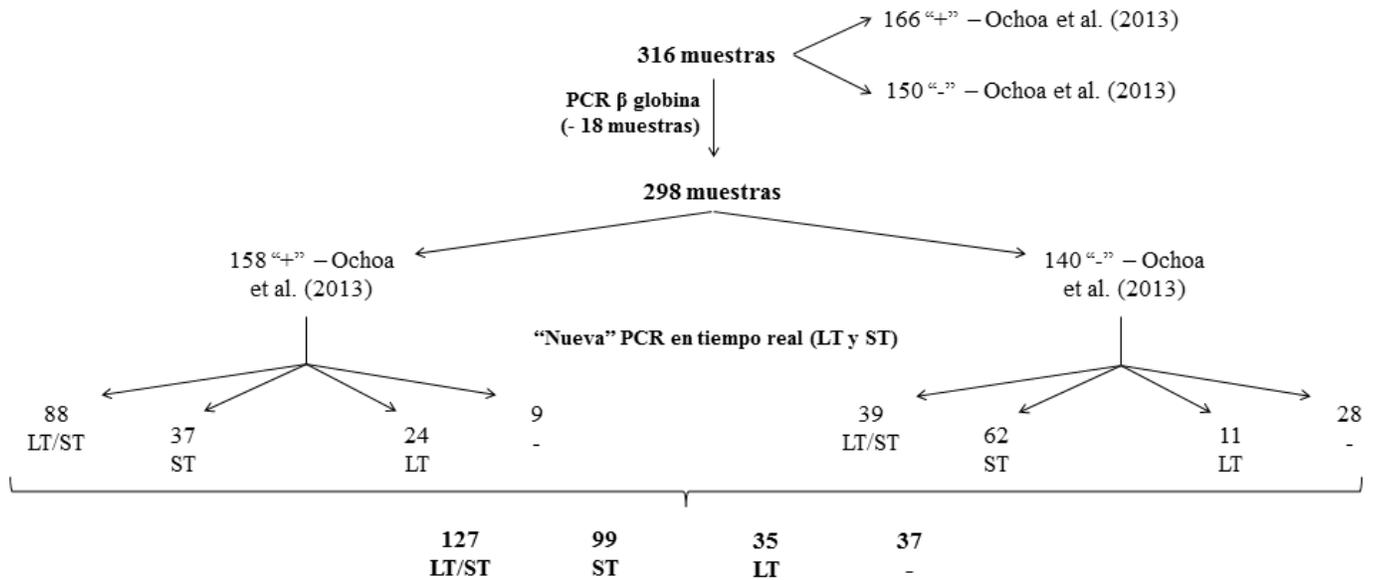


Figura 17. Análisis de muestras con el estándar de oro. Las 316 muestras previamente recolectadas por Ochoa *et al.* (2013) fueron analizadas con una PCR para el gen de beta (β) globina humana y luego por una PCR en tiempo real para la detección simultánea de LT y ST (ST-Ia y ST-Ib), que sirvió como estándar de oro.

Debido a que se este análisis fue reciente y se llevó a cabo en condiciones diferentes a lo realizado por Ochoa *et al.* (2013), se consideró lo obtenido en la “nueva” PCR en tiempo real como los resultados finales del estándar de oro. De esta manera, de las 298 muestras analizadas por PCR en tiempo real, 261 (87.6%) tuvieron presencia de ETEC (127 (42.6%) LT/ST, 99 (33.2%) solo ST, 35 (11.8%) solo LT) y 37 (12.4%) fueron muestras negativas para ETEC.

Luego de esto, las muestras fueron evaluadas por el ensayo de RPA previamente desarrollado. La Fig. 18 muestra el análisis con RPA de 9 muestras de heces escogidas al azar. Las intensidades de bandas de los productos para LT y ST-Ia variaron entre las muestras positivas. El blanco de reacción y el control negativo mostraron el perfil de bandas “*ladder-like*” antes mencionado. Se consideraron muestras negativas a aquellas con dicho perfil de bandas (Fig. 18).

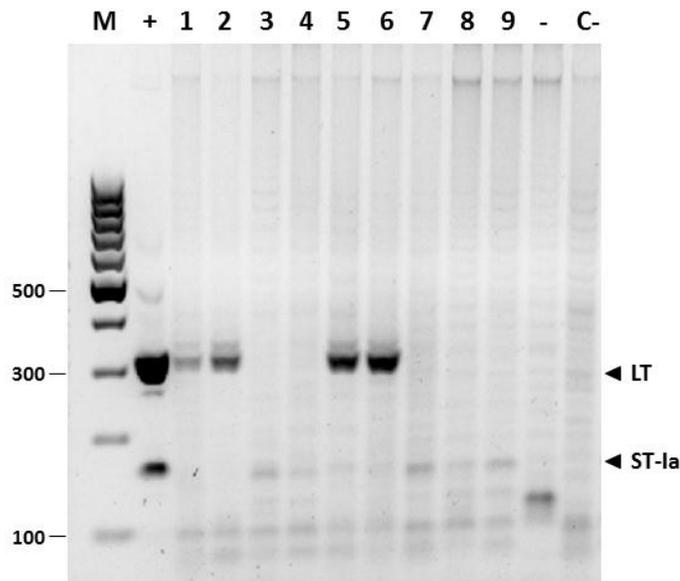


Figura 18. Análisis de muestras con RPA. Las muestras de heces (1 al 9) fueron analizadas con el ensayo de RPA según las condiciones previamente determinadas. M: marcador de pares de bases, -: blanco de reacción, C-: control negativo. Las flechas indican las posiciones aproximadas de los genes señalados.

Del total de muestras analizadas por RPA, 242 (81.2 %) muestras tuvieron presencia de ETEC (114 (38.3 %) LT/ST-Ia, 100 (33.6 %) solo ST-Ia, 28 (9.4 %) solo LT) y 56 (18.8 %) fueron muestras negativas para ETEC (Tabla 8). Hubo una diferencia

significativa en la cantidad de muestras que dieron positivo para ETEC por PCR en tiempo real y RPA ($p = 0.042$).

Tabla 8. Comparación de resultados totales para el diagnóstico de ETEC en las muestras de heces por PCR en tiempo real y RPA.

Resultado	PCR en tiempo real¹ (n = 298)	RPA¹ (n = 298)	Valor de p (PCR vs. RPA)
ETEC	261 (87.6 %, 83.3 – 91.1)	242 (81.2 %, 76.3 – 85.5)	0.042
LT/ST-Ia	127 (42.6 %, 36.9 – 48.4)	114 (38.3 %, 32.7 – 44.0)	0.317
Solo ST-Ia	99 (33.2 %, 27.9 – 38.9)	100 (33.6 %, 28.2 – 39.2)	0.662
Solo LT	35 (11.7 %, 8.3 – 16.0)	28 (9.4 %, 6.3 – 13.3)	0.424
Ninguno	37 (12.4 %, 8.9 – 16.7)	56 (18.8 %, 14.5 – 23.7)	0.042

¹ Cantidad (Porcentaje, Intervalo de confianza al 95%).

La Tabla 9 describe el desempeño diagnóstico del ensayo de RPA en las muestras de heces usando la “nueva” PCR en tiempo real como estándar de oro. Para detectar ETEC, la sensibilidad (IC 95%) del ensayo de RPA fue 91.95 % (87.96 - 94.95), la especificidad fue 94.59 % (81.8 – 99.3), el valor predictivo positivo (VPP) fue 99.17 % (96.9 – 99.8) y el valor predictivo negativo (VPN) fue 62.50 % (52.34 – 71.67). Tanto para la detección de LT y ST, los valores de sensibilidad y especificidad disminuyen o no son significativamente distintos (Tabla 9).

Tabla 9. Desempeño diagnóstico del ensayo de RPA vs. PCR en tiempo real en muestras de heces (n = 298).

Detección	RPA	PCR en tiempo real		Sensibilidad (%; IC 95%)	Especificidad (%; IC 95%)	VPP (%; IC 95%)	VPN (%; IC 95%)
		Positivo	Negativo				
ETEC	Positivo	239	2	91.57 (87.52 - 94.64)	94.59 (81.81 - 99.34)	99.17 (96.88 - 99.78)	61.40 (51.43 - 70.51)
	Negativo	22	35				
LT	Positivo	136	6	83.95 (77.37 - 89.24)	95.59 (91.18 - 98.03)	95.77 (91.18 - 98.03)	83.33 (77.82 - 87.69)
	Negativo	26	130				
ST-Ia	Positivo	201	13	88.94 (84.10 - 92.71)	81.94 (71.11 - 90.02)	93.93 (91.18 - 98.03)	70.24 (61.62 - 77.62)
	Negativo	25	59				

IC 95%: Intervalo de confianza al 95%

VPP: Valor predictivo positivo

VPN: Valor predictivo negativo.

Para la detección de ETEC, ni la sensibilidad ($p = 0.146$) ni la especificidad ($p = 0.176$) del ensayo de RPA fueron estadísticamente mayores a 90 %. Esto es, que con otro conjunto de muestras, no siempre los valores de sensibilidad y especificidad serán mayor a 90%. No obstante, la sensibilidad sí fue estadísticamente mayor a 85 % ($p = 0.0008$) y la especificidad fue estadísticamente mayor a 82.5 % ($p = 0.0264$).

Finalmente, el ensayo de RPA presentó una concordancia con la PCR en tiempo real de 92.3 y 78.2 % para la detección de ETEC y el genotipo (LT/ST-Ia, solo LT, solo ST-Ia o ninguno), respectivamente. El índice kappa tanto para la detección de ETEC ($\kappa: 0.71$, IC 95%: 0.60 – 0.82, $p < 0.001$) y para la del genotipo ($\kappa: 0.68$, IC 95%: 0.61 – 0.76, $p < 0.001$) indicó una coincidencia “sustancial” (Viera y Garret, 2005) entre las pruebas de diagnóstico.

VIII. DISCUSIÓN

Debido a su importancia, una técnica rápida y práctica de diagnóstico de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) y con valores altos de sensibilidad y especificidad es necesaria (Medina *et al.*, 2005). En este trabajo, se pudo observar, mediante bandas en el tamaño esperado del producto de amplificación, que los genes codificantes para las toxinas LT y ST-Ia de ETEC pueden ser amplificados usando RPA (Fig. 18). Sin embargo, no se pudo realizar la secuenciación a dichos productos para verificar que la amplificación sea correcta. A nuestro conocimiento, este es el primer reporte de un método de detección de ETEC en heces usando RPA. Esto prueba una vez más la versatilidad de la RPA para poder amplificar genes provenientes de diversos organismos (James y Macdonald, 2015; Daher *et al.*, 2016).

Si bien hay múltiples reportes sobre ensayos de RPA para la detección de patógenos, solo algunos han logrado la detección de más de un gen a la vez. Crannell *et al.* (2016) lograron un RPA en tiras de flujo lateral para la detección simultánea de *G. lamblia*, *C. parvum* y *E. histolytica* en muestras de heces. En otro caso, Daher *et al.* (2014) reportaron un RPA en tiempo real para la detección de *Streptococcus* grupo B en muestras vaginales, amplificando simultáneamente un gen de *Bacillus atrophaeus* como control interno. Además, Kersting *et al.* (2014) reportan un cuádruplex de RPA en fase sólida y en gel de agarosa para *Neisseria gonorrhoeae*, *S. enterica*, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) y su control interno. En nuestro caso, el ensayo de RPA solo se detecta ETEC, usando como estrategia la amplificación simultánea de los genes codificantes de las toxinas LT y ST-Ia.

8.1 Desempeño diagnóstico del ensayo de RPA

La sensibilidad (91.95%) y especificidad (94.59%) del ensayo de RPA para la detección de ETEC (Tabla 9) están dentro de los rangos reportados en la literatura para otras pruebas con RPA: 65 a 100 % para sensibilidad y 60 a 100 % para especificidad (Tabla 4), y similares a lo obtenido por Murinda *et al.* (2014) en su RPA en tiempo real para STEC (Se: 93%, 80.9 - 98.5; Sp: 97.8%, 92.4 - 99.7). Si bien la mayoría de ensayos (52.6%, 20/38) tiene una sensibilidad y especificidad mayor a 90%, como lo obtenido en este trabajo, muchas de ellas analizan menos de 100 muestras, por lo que el intervalo de confianza obtenido hace que no sean significativamente mayores a 90% (Tabla 4). Debido a los resultados obtenidos con el estándar de oro (la “nueva” PCR en tiempo real), no se consiguieron las 150 muestras negativas para ETEC que se esperaban, lo cual puede explicar por qué ambos valores no fueron estadísticamente mayores a 90%. Otro factor que puede influenciar en la sensibilidad y especificidad es el estándar de oro (Crannell *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2016). En este trabajo, se utilizó una PCR en tiempo real cualitativa para la detección simultánea de LT y ST, en la cual de los productos esperados para los genes codificantes de ambas toxinas, se notó la presencia de productos inespecíficos. Un mejor estándar de oro hubiera sido un sistema de PCR cuantitativo en tiempo real para los genes de las toxinas LT, ST-Ia y ST-Ib por separado; sin embargo, no fue posible analizar todas las muestras bajo estos tres sistemas.

Al analizar por gen, la sensibilidad y especificidad del ensayo disminuyeron o no variaron significativamente (Tabla 9). Esto también fue visto para STEC: los valores

de sensibilidad cuando se consideró la detección de los genes codificantes de las toxinas Stx1 y Stx2 fueron 93.5 y 90%, respectivamente; mientras que la especificidad fue 99.1 y 100%, respectivamente (Murinda *et al.*, 2014).

Los resultados diferentes en una muestra al ser analizada por la RPA y la PCR en tiempo real pueden tener varias explicaciones. En primer lugar, un falso positivo (resultado positivo para RPA y negativo para PCR en tiempo real) puede deberse a que la segunda fue inhibida por los componentes de la muestra de heces (Cabada *et al.*, 2016). Se sabe que la RPA es más tolerante a inhibidores que la PCR (Kersting *et al.*, 2014) y los ADN de las muestras de heces analizados presentaban una gran cantidad de contaminantes. Otra posible causa podría ser las variantes de LT y ST. Se ha reportado variaciones en las temperaturas de *melting* (T_m) respecto a lo esperado por cambios de 1 a 3 nucleótidos en la secuencia amplificada. Para LT, en 7 muestras, la T_m cambió de 62 a 60°C; mientras que en una muestra con ST-Ia, la T_m disminuyó de 57 a 49°C y para ST-Ib, la T_m disminuyó de 64 a 59 y 62°C en 6 y 1 muestra, respectivamente. Además, se encontró una correlación entre la cantidad de cambios de nucleótidos y la disminución de la T_m (Reischl *et al.*, 2004). En nuestro caso, se consideró negativas a las muestras que no presentaron T_m según lo esperado, por lo que pudo clasificarse como negativas a muestras que tuvieron algún cambio en el T_m esperado debido a las mutaciones en la secuencia de los genes. Asimismo, estos cambios podrían explicar la presencia de algunos productos con T_m diferente, pero con tamaño de producto similar a lo esperado para LT. En la RPA, no existiría problema con esto, ya que puede tolerar hasta 11% de cambios de nucleótidos en la

secuencia amplificada (Daher *et al.*, 2015) y por tanto, puede amplificar muestras con polimorfismos en la secuencia de los genes. Una última causa de la presencia de falsos positivos es la contaminación cruzada por aerosoles durante la preparación de las reacciones de RPA (Crannell *et al.*, 2014; Chao *et al.*, 2015). Esto a pesar que se tomaron las precauciones debidas, como la apertura y cierre cuidadosos de los tubos, separar los lugares de “pre-” y “post-” RPA, cambios continuos de tips y guantes, esterilización por UV, entre otros (Wu *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2017). Los aerosoles son producidos por constantes pasos de pipeteo, por lo que se busca utilizar sistemas cerrados (Crannell *et al.*, 2014; Abd El Wahed *et al.*, 2015a). Otra forma de prevenir la contaminación cruzada es el reemplazo de dTTP por dUTP, como fue demostrado en PCR y LAMP (Yang *et al.*, 2017).

Por otro lado, los falsos negativos (resultado negativo para RPA y positivo para PCR en tiempo real) también tienen varias causas. En primer lugar, debido a que no se amplificó el gen para ST-Ib en la RPA, algunas muestras positivas a ST por PCR y negativo RPA podrían existir porque estas tienen solo ST-Ib. En colecciones a nivel mundial, la cantidad de cepas con ST-Ib es mayor que con ST-Ia (Pattabiraman *et al.*, 2016). Además, que al incluir ST-Ia en el análisis de diagnóstico, la cantidad estimada de ST-ETEC solo aumenta en 15% (Liu, Platts-Millis *et al.*, 2016). En nuestro estudio, la cantidad de falsos negativos por RPA para ST fue baja (29.8%, 29/84), a pesar que solo se analiza el gen que codifica la toxina ST-Ia con esta técnica. De esto se puede deducir que en las cepas de Perú, una gran cantidad de cepas comparten ST-Ia y ST-Ib, por lo que al no considerar al segundo, la detección

de ST-ETEC no cambia significativamente. Si bien en algunos países, las cepas con ST-Ia son más abundantes (Konishi *et al.*, 2011), no existen reportes previos de estas frecuencias en Perú. Otra explicación puede ser un bajo número de copias del gen en la muestra. Se ha demostrado que la RPA tiene una menor sensibilidad cuando se analizan muestras con un bajo número de copias de genes (alto Cq) (Daher *et al.*, 2014; Faye *et al.*, 2015). Otra explicación puede ser la presencia de una alta concentración de ADN “background” (diferente al del patógeno), la cual puede inhibir la RPA, sobre todo cuando la concentración del ADN blanco es baja (Rohrman y Richards-Kortum, 2015). Aunque esto también puede inhibir la PCR en tiempo real, algunos estudios han reportado falsos positivos debido a esta causa (Raja *et al.*, 2017). Considerando que todos los *primers* usados en la RPA pueden unirse al genoma humano y que la reacción enzimática de la recombinación estabiliza más la unión por complementariedad que la PCR (Daher *et al.*, 2016), es probable que en una alta proporción de ADN humano/ADN de ETEC, los *primers* prefieran unirse al primero y no amplificar el producto del segundo. Finalmente, se sabe que diferencias en las secuencias amplificadas pueden explicar las discrepancias en resultados (Abd El Wahed *et al.*, 2013). En este caso, las secuencias amplificadas para LT en la RPA y la PCR en tiempo real son diferentes: la primera considera la subunidad A de la toxina; mientras que la segunda, la subunidad B.

La sensibilidad y especificidad obtenidas en este ensayo de RPA es comparable a lo conseguido en otras técnicas de diagnóstico de ETEC. Pattabiraman *et al.* (2016) compararon su sistema de PCR en tiempo real basado en sondas con una PCR

convencional. Al usar cepas bacterianas, obtuvieron una sensibilidad de 100, 100 y 98%, respectivamente para LT, ST-Ia y ST-Ib, y una especificidad de 95, 98 y 99%. Mientras que al usar muestras de heces, la sensibilidad y especificidad para LT fue 97 y 99%, para ST-Ia fue 100 y 94% y para ST-Ib fue de 97% en ambas medidas. Por su parte, al usar los sistemas de PCR cuantitativo en tiempo real reportados por Youmans *et al.* (2014), la sensibilidad fue 89% (IC 95%: 76 – 100%) y la especificidad fue 100% (IC 95%: 95 – 100%). Asimismo, Sjöling *et al.* (2007) compararon un método genotípico (PCR convencional) con un método fenotípico (ELISA). Para ST, la sensibilidad fue 98% (IC 95%: 86 – 100) y la especificidad fue 99% (IC 95%: 92 – 100%); mientras que para LT, la sensibilidad y especificidad fue 100% (IC 95%: 84 – 100%) y 98% (IC 95%: 92 – 100%), respectivamente.

Por otro lado, si bien los índices kappa obtenidos al detectar ETEC (0.71) o el genotipo (0.68) indican una concordancia “sustancial” con el estándar de oro, en la mayoría de reportes de RPA donde calculan dicho índice, se obtiene una concordancia “casi perfecta” (κ : 0.81 – 0.947) o perfecta (κ : 1, Castellanos-Gonzales *et al.*, 2015). Solo Teoh *et al.* (2015), que obtuvo un índice κ de 0.79 obtuvo una concordancia “sustancial” entre su ensayo de RPA para el virus del dengue y el PCR en tiempo real que usó como estándar de oro, de manera similar a lo aquí reportado.

8.2 Análisis de las muestras de heces

Al analizar las muestras de heces, se notó que el 5.7% de estas no pudieron amplificar el gen de la beta globina. De la misma manera, el mismo porcentaje de las muestras

“+” según Ochoa *et al.* (2013) resultaron negativas con la “nueva” PCR en tiempo real. Esto puede ser explicado por el tiempo de almacenamiento de 7 a 9 años (Marston *et al.*, 2005). Asimismo, un resultado destacable fue que el 80% de las muestras “-” según Ochoa *et al.* (2013) resultaron positivas con la “nueva” PCR en tiempo real. Esto puede explicarse por las diferencias en las metodologías de diagnóstico. En el trabajo de Ochoa *et al.* (2013), se tomaron 5 colonias presuntivas de ser *E. coli* a partir de un coprocultivo en agar MacConkey, se extrajo ADN por choque térmico y se realizó la PCR en tiempo real descrita por Guion *et al.* (2008). En nuestro trabajo, se extrajo con kit todo el ADN de la muestra de heces y se realizó la PCR en tiempo real para la detección simultánea de LT y ST. Existe una mayor probabilidad de que al analizar más ADN de la muestra, se detecte la ETEC (y otras bacterias) que si solo se analiza una subpoblación de colonias.

Esto se ve reflejado en la literatura. En primer lugar, el porcentaje de muestras positivas a ETEC se incrementó de 19 a 31.9% al aumentar el número de colonias analizadas de 5 a 10, por lo que se recomienda usar al menos esta última cantidad de colonias (Galbadage *et al.*, 2011). Asimismo, al comparar el cultivo con una PCR posterior con un sistema de PCR cuantitativo en tiempo real, la sensibilidad de este último para las *E. coli* diarrogénicas fue 42.9%; es decir, se obtuvo más resultados positivos con el sistema de qPCR (Liu *et al.*, 2014). Por otro lado, en el reporte original del estudio GEMS (“*Global Enteric Multicenter Study*”) se utilizó como método de diagnóstico el análisis de 3 colonias y una PCR convencional (Panchalingam *et al.*, 2012; Kotloff *et al.*, 2013). No obstante, al reanalizar con ADN

extraído de toda la muestra y un sistema de qPCR para cada bacteria, la incidencia de diarrea atribuible a varios patógenos aumentó respecto al reporte original. De esta manera, la incidencia aumentó 1.5 veces para ST-ETEC (Liu *et al.*, 2016). En nuestro trabajo, la presencia de ST, solo o con LT, fue mayor entre las muestras originalmente “negativas” (Fig. 17). Por estos motivos, es recomendable realizar el diagnóstico al ADN de toda la muestra con un sistema de PCR cuantitativo en tiempo real, el cual también nos permitirá discriminar patógenos en los que existe asociación entre su cantidad (carga bacteriana) y la presencia de diarrea (Liu *et al.*, 2016), sobre todo en países en vías de desarrollo, donde las condiciones de sanidad hacen que la presencia de enteropatógenos sea frecuente, incluso sin causar enfermedad (Robins-Browne y Levine, 2012).

8.3 Optimización y especificidad analítica del ensayo de RPA

Para optimizar el ensayo de RPA, se evaluaron diversos parámetros que pueden afectar a la técnica. Entre estos, el paso de agitación es uno con más cambios en los trabajos reportados de RPA. En el estudio original, se daba este paso luego de los 4 min de iniciada la incubación (Piepenburg *et al.*, 2006). Estudios recientes evaluaron la agitación durante todo el tiempo de la reacción (Kersting *et al.*, 2014b; Rosser *et al.*, 2015), o incluso eliminaron este paso (Crannell *et al.*, 2016; Saldarriaga *et al.*, 2016). La RPA se ayuda del agente “*crowding*” para una interacción homogénea y adecuada de los componentes de la amplificación. Debido a las bajas temperaturas de la RPA, respecto a otras técnicas de amplificación, el efecto de homogenización puede verse disminuido por la viscosidad del polímero; por lo que la agitación es

recomendada para seguir con la reacción, en especial si la carga bacteriana inicial en la muestra es baja. No obstante, se ha demostrado que con bajos volúmenes de reacción (5 μ l) se puede evitar este paso, presuntamente por la mayor facilidad de interacción entre los componentes a ese volumen (Lillis *et al.*, 2016).

En este trabajo, se mostró que eliminar el paso de agitación no cambió la eficiencia del ensayo de RPA (Fig. 10). Si bien nuestro volumen de reacción (25 μ l) es mayor a los 5 μ l donde se puede eliminar la agitación, ese volumen es menor a lo que comúnmente se utiliza (50 μ l) y en donde el paso de agitación sí es crítico (Lillis *et al.*, 2016); por lo que lo obtenido puede deberse también a la mayor interacción de los componentes. Vinelli (2011) también reportó que no hubo diferencias entre eliminar el paso de agitación y mantener este paso a los 4 min del inicio de la reacción en la detección de 100 UFC de *Neisseria gonorrhoeae* usando RPA en tiempo real, a pesar de que su volumen de reacción fue 50 μ l. La eliminación del paso de agitación es favorable para la aplicación en campo, puesto que se evita la variabilidad entre operadores y simplifica el ensayo (Vinelli, 2011; Lillis *et al.*, 2016).

Respecto al tiempo de reacción, se ha reportado que se puede detectar el producto de amplificación desde los 5 min (Tabla 3), aunque este tiempo depende del método de detección y el tamaño del producto, siendo menos de 10 minutos al usar RPA con medición de fluorescencia a tiempo real (Daher *et al.*, 2016). Aunque se pueda detectar en determinado tiempo, no siempre es el tiempo óptimo debido a la señal débil de la forma de detección (intensidad de banda en gel de agarosa o tira de flujo lateral, medición de fluorescencia), por lo que muchas veces se indican el tiempo

mínimo y óptimo de reacción (Tabla 3). En nuestro caso, el tiempo mínimo 5 min, respectivamente, para LT y ST-Ia (Fig. 11); similar a lo obtenido anteriormente (Tabla 3). No hay forma de predecir este tiempo mínimo; sin embargo, debe estar relacionado a la procesividad de la polimerasa (número de nucleótidos incorporados en un ciclo de amplificación) (Bloom y Goodman, 2001), así como a la velocidad de la actividad de intercambio de hebra de la recombinasa (Daher *et al.*, 2015).

Por otro lado, se ha reportado que la temperatura óptima de la RPA está entre 37 y 42°C, aunque esta puede funcionar entre 25 y 45 °C (Piepenburg *et al.*, 2006). En diversos estudios, el rango de temperatura en el que la RPA funciona es de 30 – 45 °C, aunque esto varía entre patógenos y *primers* usados (Tabla 2). Asimismo, un reporte describe la amplificación a 25°C al usar una hora de tiempo de incubación (TwistDx, 2016). Este rango puede deberse a la actividad de la polimerasa Bsu: se sabe que la actividad de esta enzima se reduce a la mitad a los 25°C (BioLab, 2014). Asimismo, la recombinasa RecA de *Escherichia coli* presenta actividad enzimática de 30 a 50°C, siendo 40°C la temperatura óptima (Wetmur *et al.*, 1994). En este trabajo pudo mostrar que la RPA trabaja entre 30 y 50°C, aunque la eficacia depende del gen amplificado (Fig. 12). A nuestro conocimiento, es la primera vez que se reporta la amplificación con RPA a 50°C.

Se ha demostrado que la RPA es versátil en cuanto a la fuente de temperatura. En primer lugar, se puede realizar reacciones químicas exotérmicas para elevar la temperatura ambiente y hacer la incubación. Esto se ha logrado con acetato de sodio trihidratado (SAT), que ha permitido amplificar ADN de VIH con RPA desde

temperaturas ambientales de 10°C (Lillis *et al.*, 2014). Por otro lado, se ha logrado utilizar RPA para amplificar desde 100 copias de VIH usando el calor corporal de la axila (aprox. 35 °C) durante la reacción. Sin embargo, esta forma de llevar a cabo la reacción tuvo una menor sensibilidad en comparación con una incubación en un bloque térmico (Crannell *et al.*, 2014b). Asimismo, la incubación de un ensayo de RPA para detectar la soya transgénica “GTS 40-3-2” se realizó en el puño (aprox. 35°C) bajo varias temperaturas ambiente (12 – 23 °C), e incluso se pudo detectar visualmente bajo UV al añadirle SYBR Green (Wang *et al.*, 2017). Todas estas modificaciones pueden tenerse en cuenta a futuro en el ensayo de RPA para ETEC con el objetivo de simplificar el proceso.

Como era de esperarse, no hubo reacción cruzada con ninguno de los enteropatógenos probados, que incluyen los otros patotipos de DEC y de *Vibrio cholerae* (Fig. 14). La especificidad analítica reportada de los ensayos de RPA siempre ha sido la adecuada (no hubo reacción cruzada con los patógenos evaluados) y está en función al diseño de *primers* que cada estudio realizó (Daher *et al.*, 2016). Se pudo observar bandas “*ladder-like*” inespecíficas en todos los controles negativos usados, similar a lo observado y explicado para el blanco de reacción, similar a lo observado por Cabada *et al.*, 2017 y Ahmed *et al.*, 2015. El ensayo con *Vibrio cholerae* es de interés, puesto que la toxina colérica es homóloga a la toxina LT de ETEC y tienen un 80% de identidad de aminoácidos (Joffré *et al.*, 2015). La toxina colérica está codificada en el genoma integrado del profago CTXΦ (Das *et al.*, 2011), mientras que la toxina LT se encuentra en diversos plásmidos (Jobling, 2016). Este hecho, sumado a que haya

homología en la estructura proteica de ambas y no en las secuencias de nucleótidos, hace suponer que han surgido mediante evolución convergente, lo cual puede deberse a las características del plegamiento de las toxinas tipo AB₅, sobre todo de la subunidad B (Sixma *et al.*, 1993).

8.4 Los sistemas de PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR) y el límite de detección para el ensayo de RPA para ETEC

En este trabajo, se desarrollaron dos sistemas de PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR) para las toxinas LT y ST de ETEC con la finalidad de comparar los límites de detección con el ensayo de RPA. Aunque se intentó realizar la qPCR con los *primers* para LT usados en la RPA, no fue posible estandarizarlo; por lo que se decidió usar los *primers* para LT reportados por Guion *et al.* (2008). De manera similar a otros trabajos, aquí se comparó la RPA con un sistema de PCR que usó *primers* distintos.

Para el gen de la toxina LT, la qPCR tuvo una eficiencia de amplificación está dentro del rango aceptado (90 – 110 %) (Pattabiraman *et al.*, 2016) y es comparable a lo obtenido en los sistemas de qPCR previamente reportados para este gen (Tabla 1), a pesar que para productos mayores a 150 pb, se espera una menor eficiencia (Applied Biosystems, 2010). De especial interés es el sistema reportado por Youmans *et al.* (2014), porque al igual que en este trabajo, utiliza SYBR Green como forma de detección y compara ADN bacteriano y ADN de heces infectadas. En aquel estudio, el límite de detección y cuantificación para LT fue 10 y 100 copias del gen/rxn, respectivamente, sin importar la fuente de ADN. Considerando que en promedio hay

2 copias del gen para la toxina LT en una cepa de ETEC (Lothigius *et al.*, 2008), los límites de detección y cuantificación obtenidos por Youmans *et al.*, 2014 son similares a lo que se consiguió en este trabajo (10 y 100 UFC/rxn, respectivamente, Tabla 7).

De otro lado, el sistema de qPCR para la toxina ST no fue óptimo, puesto que las eficiencias de amplificación alcanzadas no están dentro del rango aceptable y son menores a lo reportado en la literatura (Tabla 1). Diversas causas pueden explicar este resultado. Realizar una cuantificación múltiple con SYBR Green, como en los qPCR desarrollados en este trabajo, no es adecuado dada la alta afinidad de este colorante por cualquier ADN de doble hebra; por lo que lo recomendado es usar sondas para diferenciar cada gen (Qiagen, 2010). En este trabajo, el sistema de qPCR puede amplificar ST-Ia y ST-Ib simultáneamente y para la cuantificación no hubo separación de productos, puesto que los T_m no son diferenciables (Guion *et al.*, 2008). Esta detección única de una amplificación doble puede haber afectado la cinética de reacción y por tanto, la eficiencia (Applied Biosystems, 2010). Otro motivo puede ser que la extracción de ADN de heces infectadas no haya sido 100% eficiente y por tanto, las diluciones no estén representando las UFC calculadas. En este trabajo, no se pudo determinar la eficiencia de extracción, lo cual se puede lograr haciendo una cuantificación relativa, por ejemplo, con el ARN ribosomal 16S (Youmans *et al.*, 2014). Por otro lado, se sabe que la presencia de dímeros de *primers* puede afectar la eficiencia de reacción, en especial cuando se usa SYBR Green (Qiagen 2010, Sigma 2010). Existen heterodímeros formados entre los *primers* STIa-

F, STIb-F y ST-R con ΔG menores a -5 kcal/mol y que involucran el extremo 3', los cuales podrían haber afectado la eficiencia de reacción. Finalmente, entre otros factores que pueden afectar la eficiencia se encuentran errores en el pipeteo (Curry *et al.*, 2002), los reactivos del *master mix* (Applied Biosystems, 2010), el termociclador, el laboratorio, los materiales, el operador, pequeños cambios en el protocolo, entre otros (Svec *et al.*, 2015).

Comparado con el trabajo de Youmans *et al.* (2014), que obtuvo 10 y 100 copias de gen/rxn para ADN bacteriano y ADN de heces infectadas, respectivamente, como límite de detección para ST-Ia y ST-Ib, y 100 copias de gen/rxn como límite de cuantificación en todos los casos, lo conseguido en este trabajo es menos sensible (Tabla 7).

Una vez desarrollados los sistemas de qPCR, se comparó con el ensayo de RPA, y los límites de detección para LT (10 UFC/rxn) y ST-Ia (100 UFC/rxn) no variaron y son comparables entre las técnicas (Fig. 16). Los límites de detección obtenidos en este trabajo están dentro del rango de lo reportado en la literatura para otros ensayos de RPA. Por ejemplo, este resultado es comparable a lo encontrado para STEC (5 a 7 UFC/ml para el gen de la toxina Stx1) (Murinda *et al.*, 2014). Aunque se indica que la RPA puede amplificar desde 1 copia de un gen (Piepenburg *et al.*, 2006), cálculos estadísticos indican que el límite de detección no puede ser menor a 3 copias de un gen (Bustin *et al.*, 2009).

Finalmente, los distintos límites de detección entre varios genes bajo un sistema de amplificación simultánea de RPA también han sido reportados. Por ejemplo, se logró desarrollar una RPA en tiras de flujo lateral para la detección simultánea de *G. lamblia*, *C. parvum* y *E. histolytica* en muestras de heces. Al usar ADN genómico para una detección individual de cada parásito, empleando la tira de detección múltiple, los límites de detección fueron 39, 2 y 0.5 parásitos/rxn para *G. lamblia*, *C. parvum* y *E. histolytica*, respectivamente. Al realizar la detección simultánea con ADN genómico, los límites de detección cambiaron a 400 parásitos/rxn para *G. lamblia* y 2 parásitos/rxn para los otros parásitos. Finalmente, al detectar simultáneamente los parásitos a partir de ADN de heces infectadas, los límites fueron 444, 9 y 6 parásitos/rxn para *G. lamblia*, *C. parvum* y *E. histolytica*, respectivamente (Crannell *et al.*, 2016).

Entre los factores que explican la variabilidad de los límites de detección están el tipo de organismo, los *primers* y/o sondas usados, el tipo de muestra a analizar, el método de detección del producto de amplificación, entre otros (James y Macdonalds, 2015; Daher *et al.*, 2016). Estos cambios de la sensibilidad analítica entre la detección individual y simultánea puede deberse a la interacción no deseada entre *primers* y sondas de distintos genes, lo que disminuiría la eficiencia de amplificación (Crannell *et al.*, 2016). En este trabajo, la amplificación de los genes de ST-Ia y ST-Ib podría ser interferida por los *primers* del gen LT. Un análisis de predicción de heterodímeros reveló que la ΔG predicha para la formación de dichas estructuras varió entre -8.67 y -6.3 kcal/mol; con lo cual, la interacción entre *primers* de distintos genes es posible.

Las combinaciones con menor ΔG fueron con los *primers* LT-R5 y ST-R (-8.67 kcal/mol) y LT-F4 y STIb-F (-8.3 kcal/mol). Estas interacciones podrían evitarse si se prueba distintas concentraciones de cada par de *primers* para lograr una sensibilidad adecuada para cada gen (Crannell *et al.*, 2016).

Por otro lado, la cantidad de posiciones no conservadas en el producto de amplificación puede afectar la velocidad del intercambio de hebras catalizada por la recombinasa, y por tanto, la eficiencia del RPA (Babu *et al.*, 2017). Las posiciones no conservadas en los extremos 3' y un bajo o muy alto porcentaje de GC afectan más dicha eficiencia (Daher *et al.*, 2015). Esto sucede para los productos de ST-Ia y ST-Ib, e incluso los porcentajes de GC son bajos (31.4 y 31.9%, respectivamente), lo cual podría explicar por qué el límite de detección de estos genes es mayor que con el producto de LT (Fig. 17).

8.5 Dificultades en el diseño y selección de *primers* adecuados para RPA

El diseño de *primers* era un problema constante en los ensayos para RPA, debido a que es difícil de lograr los requerimientos que TwistDx indicaba para este fin. No obstante, TwistDx indicó que la amplificación puede llevarse a cabo usando *primers* de PCR (TwistDx). Incluso, ya se había reportado ensayos de RPA usando *primers* de menor tamaño a lo recomendado (aproximadamente, en 9% de los casos), o con diferencias a lo inicialmente recomendado (Daher *et al.*, 2016). Por este motivo, se optó por probar inicialmente los *primers* reportados por Guion *et al.* (2008) para los genes de las toxinas LT, ST-Ia y ST-Ib.

Fue importante realizar el análisis de secuencias nucleotídicas de los genes codificantes de las toxinas para verificar la conservación de las posiciones de nucleótidos. Como ya se había reportado, los genes de las toxinas ST-Ia y ST-Ib no presentaron una alta conservación, a diferencia del gen de la toxina LT (Reischl *et al.*, 2004; Youmans *et al.*, 2014). Este problema ha ocasionado que en la mayoría de ensayos de amplificación molecular para los genes de estas toxinas, se utilice un par de *primers* para cada toxina. Esto también pasa para las Shigas-toxinas de STEC, donde por la baja identidad de secuencias (55 – 60 %) entre la Stx1 y Stx2, se tuvo que diseñar *primers* de RPA para cada toxina por separado (Murinda *et al.*, 2014). Por esto, es clave la estrategia usada por Guion *et al.* (2008) para los genes de las toxinas ST. Ellos usan un *primer reverse* capaz de detectar a todas las secuencias para ST, mientras que diferencian las toxinas ST-Ia y ST-Ib con un *primer forward* para cada uno. El *primer reverse* se une completamente a todas las secuencias del ST-Ia, y tiene 4 posiciones no conservadas para las de ST-Ib, pero como estas no se encuentran en el extremo 3', no afecta el rendimiento de la PCR (Guion *et al.*, 2008). Excepto por la banda inespecífica en el blanco de reacción, no hubo problemas con los *primers* de PCR para ST-Ia y ST-Ib durante los ensayos de RPA. Boyle *et al.* (2013) han reportado que la RPA puede tolerar hasta 9 (8%) posiciones no conservadas en el producto amplificado. Otros autores también indican que pudieron amplificar RPA a pesar de tener posiciones no conservadas (Patel *et al.*, 2016; Moore *et al.*, 2017). Mientras tanto, Daher *et al.* (2015) encontraron falsos positivos cuando amplifican productos con 7 (11%) posiciones no conservadas. Estos últimos concluyen que la presencia de esta clase de posiciones en el extremo 3' o de más de 3

que abarcan todo el primer afecta la eficiencia de la reacción de RPA. Si bien eso pasa con el primer STIa-F (Tabla 7), no hubo problema en la amplificación; por lo que se puede deducir que la eficiencia de la RPA es multifactorial (Daher *et al.* 2015).

No obstante, este no fue el caso del primer para LT reportado por Guion *et al.* (2008), debido a que fue capaz de amplificar el gen con ADN bacteriano, pero no con ADN de heces infectadas (Fig. 7 y 8). Los *primers* LT-F y LT-R son complementarios con el gen humano de la familia del citocromo P450 con un porcentaje de cobertura de 75% y con una secuencia en la posición 6q16.1-21 con un porcentaje de cobertura de 100%, respectivamente. Una posible explicación a la falta de amplificación en ADN de heces es que esos *primers*, luego de formar el complejo nucleoproteico con las recombinasas, se hayan unido con preferencia al ADN humano en lugar del ADN de ETEC, debido a la mayor cantidad del primero. La reacción enzimática de la recombinación hace que la unión de los *primers* con su respectivo gen humano sea más estable que la unión por complementariedad que hay en la PCR (Daher *et al.*, 2016), lo cual podría ser la causa de la formación del producto de interés (amplificación del gen para LT) al usar PCR.

Por otro lado, se notó la presencia de bandas inespecíficas (Fig. 4-9). La aparición de este tipo de bandas fue reportada en estudios anteriores, tanto en controles positivos, controles negativos y blancos de reacción. Los tamaños de estos productos inespecíficos varían entre trabajos, pero generalmente son menores a 200pb. Tanto el perfil de bandas “*ladder-like*” y “*smear-like*”, así como productos de tamaño múltiplo al producto principal (Fig. 9), están previamente reportadas (Jaroenram *et al* 2014;

Castellanos-Gonzales *et al* 2015; Ahmed *et al* 2015; entre muchos otros). La presencia de estos resultados varía en cada ensayo, incluso en cada lote de reactivos (Saldarriaga *et al.*, 2016), como pasó en este trabajo. Aunque la presencia de esta clase de bandas es esperada, debido a que la baja temperatura usada (hasta 45°C) favorece la formación de dímeros de *primers* e incluso la polimerización del producto de amplificación principal (Piepenburg *et al* 2006), no se ha discutido en detalle el porqué de este fenómeno. En el presente estudio, la banda inespecífica de tamaño similar a lo esperado para el gen de ST-Ib está supeditada a la presencia del primer STIb-F. Una posible explicación puede ser la formación de un artefacto entre los primer STIb-F y ST-R. Un análisis de predicción de heterodímeros reveló que para las combinaciones de estos dos *primers*, la ΔG predicha para la formación de las estructuras más probables fue -6.69 kcal/mol. En tanto, para STIa-F y STIb-F, la ΔG predicha de las estructuras más probable fue -6.45 kcal/mol. En ambos casos, una estructura involucraba el extremo 3'. Debido a esto, es probable que un heterodímero haya podido ser molde para la amplificación con RPA y formar un producto de tamaño similar al producto de ST-Ib (138 pb), el cual está dentro del rango de tamaños de los productos inespecíficos. Para corroborar esto y descartar la contaminación del blanco de reacción por amplicones, se debe realizar la secuenciación a dicho producto inespecífico.

8.6 Ventajas en el uso de RPA

A pesar que el ensayo de RPA para ETEC aquí descrito no puede ser aplicado en campo como tal, debido a la infraestructura necesaria para la electroforesis en gel de

agarosa, es posible que modificando la forma de detección del producto amplificado, esta técnica pueda ser llevada a zonas alejadas. Numerosos estudios describen las ventajas que tiene la RPA sobre la PCR, e incluso sobre otras técnicas de amplificación isotérmica como la LAMP. Entre estas se encuentran que ya no se necesita del termociclador, que el tiempo de reacción es corto (10 min del RPA vs. 30 – 60 minutos del LAMP), que necesita menos cantidad de *primers* y su diseño es más fácil respecto a la LAMP, que la estandarización de sistemas de detección múltiple es más simple respecto a la LAMP, que no hace falta seguir la cadena de frío debido a que los reactivos están liofilizados, que existen aparatos de fácil aplicación en el punto de atención al paciente, que se gasta menos energía (porque funciona a menor temperatura que la PCR y la LAMP), la presencia de proteínas de unión a cadena simple (SSB) que ayuda en la amplificación de ARN con estructura secundaria compleja, que no es necesaria una purificación total del ADN de la muestra y otras ventajas (Abs El Wahed *et al.*, 2015; Moore *et al.*, 2017; Kapoor *et al.*, 2017). Actualmente, el costo de los reactivos de la RPA (\$4.3 por reacción) es mayor al de la PCR en tiempo real (\$3.0 por reacción) (Santiago-Felipe *et al.*, 2015; Daher *et al.*, 2016). No obstante, el costo del termociclador (\$ 5700) supera considerablemente los equipos que podrían ser usados en la RPA, como el “*Twirla™ Portable Mixing Incubator*” (\$ 339) o el “*ESEQuant Tube Scanner*” (\$ 2000) (Escadafal *et al.*, 2014; Santiago-Felipe *et al.*, 2015). Sin embargo, disminuir el volumen de reacción total, como se hizo en este trabajo, contribuye a reducir los costos (Yang *et al.*, 2017).

8.7 Limitaciones del estudio

Este trabajo tiene varias limitaciones. En primer lugar, no se secuenciaron los productos amplificados por RPA para LT, ST-Ia y ST-Ib, ni el producto inespecífico en el blanco de reacción de tamaño similar a lo esperado para ST-Ib (Fig. 4). Esto es necesario para comprobar la correcta amplificación de los genes y para descartar contaminación del blanco. En segundo lugar, no se probaron todos los *primers* diseñados para RPA en este trabajo (Tabla 6) y los *primers* elegidos tienen algunas deficiencias, como la posibilidad de complementarse al genoma humano. La elección de los *primers* adecuados para la RPA requiere siempre de una comprobación experimental porque no es posible predecir la eficiencia de la amplificación a partir de la secuencia de nucleótidos (Abd El Wahed *et al.*, 2015). Incluso dentro de esta comprobación, el “ensayo y error” es lo recomendable, principalmente en amplificaciones múltiples, lo cual puede dificultar y dilatar la estandarización, como sucedió en este trabajo. En tercer lugar, los productos inespecíficos fueron frecuentes en todo el trabajo, ya sea con los blancos de reacción y los controles positivos y negativos (Fig. 4-9). Esto obligó a que no se considerara al gen de la toxina ST-Ib en el análisis de muestras. Una forma de evitar esto es cambiar el método de detección, ya sea por oligocromatografía con las tiras de flujo lateral o con la medición de fluorescencia a tiempo real (James y Macdonald, 2015; Daher *et al.*, 2016). No obstante, el cambio del método de detección está fuera del objetivo de este trabajo.

Además, existe un sesgo relacionado a la subjetividad en la observación de la banda, sobre todo cuando esta es tenue. Una forma de solucionar esto es aumentar el

volumen añadido de ADN de la muestra con el fin de aumentar la sensibilidad (Nair *et al.*, 2015). También se podría cambiar el método de detección, ya que por oligocromatografía o por la medición de fluorescencia existen métodos para determinar objetivamente si una muestra es positiva o negativa (Rohrman y Richards-Kortum, 2012; Daher *et al.*, 2016). Asimismo, no hubo un control interno en la RPA ni en la PCR en tiempo real, lo cual es recomendable (Clarke *et al.*, 2016). Para evitar errores por este motivo, se puede agregar controles externos y negativos (Castellanos-Gonzales *et al.*, 2015), como pasó en este trabajo con la PCR del gen de la beta globina y los controles negativos sin ADN y con ADN de heces sin infectar.

Otra limitación es inherente al estándar de oro escogido en este trabajo. Este puede modificarse para mejorar los resultados de sensibilidad y especificidad. El uso de sistemas de PCR cuantitativo en tiempo real en paralelo para cada gen analizado es lo más recomendable en estos casos. Además, estos sistemas podrían ayudar a clasificar con más facilidad a las muestras positivas y negativas, mediante el uso de ciclo umbrales “cut-off” (Elfving *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2016).

Por otro lado, los métodos de extracción de ADN usados no son los adecuados para una posterior implementación del ensayo en campo. Es recomendable probar el uso de métodos más simples y de menor costo, tales como el empleo de surfactantes aniónicos para oocistos de *Cryptosporidium* sp. (Wu *et al.*, 2016), el uso de beads magnéticos para evitar el uso de centrifugas y la generación de aerosoles (Abd El Wahed *et al.*, 2015b; Sun *et al.*, 2016), la extracción simple con NaOH a partir de semillas machacadas (Wang *et al.*, 2017), el uso de papel filtro impregnado con

sangre con lavados, calentamiento a 95°C y elución (Saldarriaga *et al.*, 2016). Incluso, se demostró que se puede usar muestras directas o casi crudas, como orina total o una suspensión de heces al 20% con PBS (Krölov *et al.*, 2014; Moore *et al.*, 2017). Sin embargo, optimizar la extracción de ADN no fue prioridad de este trabajo, aunque se puede realizar posteriormente.

Finalmente, este ensayo no es cuantitativo. Una forma de realizar una prueba cuantitativa con RPA es usando la detección en tiempo real. Se ha demostrado que la relación entre el tiempo de umbral y la cantidad de copias del gen se ajusta mejor a un modelo exponencial, respecto al modelo lineal o polinomial de segundo grado (Crannell *et al.*, 2014c). Para llevarlo a cabo, se necesitaría equipos de medición de fluorescencia portables. Asimismo, al igual que con los sistemas de qPCR, se requiere más cuidado y precisión en el uso de los lotes de los reactivos, en los procedimientos y el almacenamiento para lograr consistencia entre los resultados (Crannell *et al.*, 2015). Además, se necesitaría contar con estándares de número de copias de cada gen para poder estimar el número de copias en las muestras. Los genes codificantes de LT y ST están en plásmidos y el número de copias varía entre cada uno (Lothigius *et al.*, 2008). Esta variabilidad en el número de copias en cepas/muestras clínicas debe ser un parámetro importante a tomar en cuenta.

A pesar de las limitaciones explicadas, algunas de estas pudieron ser superadas y se pudo desarrollar por primera vez un método de diagnóstico molecular para ETEC utilizando RPA, la cual es una técnica práctica y con potencial en el uso al punto de atención del paciente.

IX. CONCLUSIONES

En este trabajo, se pudo observar que los genes codificantes para las toxinas LT y ST-Ia de ETEC pueden ser amplificados mediante RPA. Sin embargo, la secuenciación de los productos es necesaria para validarlos. Además, se logró desarrollar un método de diagnóstico molecular de ETEC en muestras de heces amplificando simultáneamente los genes codificantes de LT y ST-Ia mediante RPA. La sensibilidad (91.95%, IC 95%: 87.96 – 94.95%) y la especificidad (94.59%, IC 95%: 81.81 – 99.34%) de este ensayo de RPA para la detección de ETEC fueron óptimas a nivel de laboratorio. Finalmente, las condiciones obtenidas en la optimización y los límites de detección están dentro de lo esperado para la técnica.

X. RECOMENDACIONES

En primer lugar, se debe secuenciar los productos amplificados por RPA para LT, ST-Ia y ST-Ib y el producto inespecífico en el blanco de reacción de tamaño similar a lo esperado para ST-Ib. Esto es necesario para comprobar la correcta amplificación de los genes y para descartar contaminación del blanco. En segundo lugar, se debe probar con más *primers* y procurar que estos no generen productos inespecíficos en la RPA y que puedan ser usados en una PCR en tiempo real. Además, se pueden mejorar los sistemas de PCR cuantitativos en tiempo real para usarlos como estándar de oro. Asimismo, es recomendable incluir un control interno en la RPA y el estándar de oro, para comprobar que una posible ausencia de amplificación del gen sea por la falta del mismo y no por la inhibición de la reacción de amplificación. Por otro lado, se puede analizar mayor cantidad de muestras negativas a ETEC para así obtener un rango más corto del intervalo de confianza a 95% de la especificidad. Finalmente, a futuro se puede optar por cambiar el método de detección (oligocromatografía o en tiempo real), analizar métodos de extracción de ADN menos costosos, lograr la detección simultánea de las *E. coli* diarrogénicas más comunes (EAEC, EPEC y ETEC) mediante RPA e implementar la prueba en zonas alejadas.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abd El Wahed A, El-Deeb A, El-Tholoth M, Abd El Kader H, Ahmed A, Hassan S, *et al.* A portable *reverse* transcription recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of foot-and-mouth disease virus. PLoS One. 2013 Aug 20;8(8):e71642.
2. Abd El Wahed A, Patel P, Faye O, Thaloengsok S, Heidenreich D, Matangkasombut P, *et al.* Recombinase Polymerase Amplification Assay for Rapid Diagnostics of Dengue Infection. PLoS One. 2015 Jun 15;10(6):e0129682.
3. Abd El Wahed A, Sanabani SS, Faye O, Pessôa R, Patriota JV, Giorgi RR, *et al.* Rapid Molecular Detection of Zika Virus in Acute-Phase Urine Samples Using the Recombinase Polymerase Amplification Assay. PLoS Curr. 2017 Jan 25;9. pii: ecurrents.outbreaks.a7f1db2c7d66c3fc0ea0a774305d319e
4. Abd El Wahed A, Weidmann M, Hufert FT. Diagnostics-in-a-Suitcase: Development of a portable and rapid assay for the detection of the emerging avian influenza A (H7N9) virus. J Clin Virol. 2015 Aug;69:16-21.
5. Acosta GJ, Vigo NI, Durand D, Riveros M, Arango S, Zambruni M, *et al.* Diarrheagenic *Escherichia coli*: Prevalence and Pathotype Distribution in Children from Peruvian Rural Communities. Am J Trop Med Hyg. 2016 Sep 7;95(3):574-9.
6. Ahmed A, van der Linden H, Hartskeerl RA. Development of a recombinase polymerase amplification assay for the detection of pathogenic *Leptospira*. Int J Environ Res Public Health. 2014 May 8;11(5):4953-64.

7. Ahmed SA, van de Sande WW, Desnos-Ollivier M, Fahal AH, Mhmoud NA, de Hoog GS. Application of Isothermal Amplification Techniques for Identification of *Madurella mycetomatis*, the Prevalent Agent of Human Mycetoma. J Clin Microbiol. 2015 Oct;53(10):3280-5.
8. Ahmed T, Qadri F. Enterotoxigenic *Escherichia coli*'s Endemicity in Developing Countries and Its Emergence During Diarrheal Epidemics and Natural Disasters. In: Lu Y, *et al.*, editors. Emerging Infections in Asia. New York: Springer US; 2008. p. 163-177.
9. Antikainen J, Kantele A, Pakkanen SH, Lääveri T, Riutta J, Vaara M, *et al.* A quantitative polymerase chain reaction assay for rapid detection of 9 pathogens directly from stools of travelers with diarrhea. Clin Gastroenterol Hepatol. 2013 Oct;11(10):1300-1307.e3.
10. Applied Biosystems. Factors Influencing Multiplex Real-Time PCR [Internet]. Estados Unidos: Applied Biosystems; 2010 [citado 2017 Jul 17].
Disponibile en:
http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_076529.pdf
11. Babu B, Washburn BK, Miller SH, Poduch K, Sarigul T, Knox GW, *et al.* A rapid assay for detection of Rose rosette virus using *reverse* transcription-recombinase polymerase amplification using multiple gene targets. J Virol Methods. 2017 Feb;240:78-84.

12. Barletta F, Ochoa TJ, Ecker L, Gil AI, Lanata CF, Cleary TG. Validation of five-colony pool analysis using multiplex real-time PCR for detection of diarrheagenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*. 2009 Jun;47(6):1915-7.
13. Bélanger SD, Boissinot M, Ménard C, Picard FJ, Bergeron MG. Rapid Detection of Shiga Toxin-Producing Bacteria in Feces by Multiplex PCR with Molecular Beacons on the Smart Cycler. *J Clin Microbiol*. 2002;40(4):1436-40.
14. BioLabs. Bsu DNA Polymerase [Internet]. Estados Unidos: BioLabs; 2014 [citado 2017 Jul 16]. Disponible en: <https://www.neb.com/~~/media/Catalog/All-Products/4518FD384B1442F9A28B3774732CB4A0/Datacards%20or%20Manuals/M0330Datasheet-Lot0011209.pdf>
15. Black RE, Brown KH, Becker S. Effects of diarrhea associated with specific enteropathogens on the growth of children in rural Bangladesh. *Pediatrics*. 1984;33:1004-1009.
16. Bloom LB, Goodman MF. Polymerase Processivity: Measurement and Mechanisms. In: *Encyclopedia of Life Science*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester: 2001.
17. Boggild AK, Miranda-Verastegui C, Espinosa D, Arevalo J, Adai V, Tulliano G, *et al*. Evaluation of a microculture method for isolation of *Leishmania* parasites from cutaneous lesions of patients in Peru. *J Clin Microbiol*. 2007 Nov;45(11):3680-4.
18. Boyle DS, Lehman DA, Lillis L, Peterson D, Singhal M, Armes N, *et al*. Rapid detection of HIV-1 proviral DNA for early infant diagnosis using recombinase polymerase amplification. *MBio*. 2013 Apr 2;4(2). pii: e00135-13.

19. Boyle DS, McNerney R, Teng Low H, Leader BT, Pérez-Osorio AC, Meyer JC, *et al.* Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* by recombinase polymerase amplification. PLoS One. 2014 Aug 13;9(8):e103091.
20. Brill BM, Wasilaukas BL, Richardson SH. Adaptation of the staphylococcal coagglutination technique for detection of heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. J Clin Microbiol. 1979 Jan;9(1):49-55.
21. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin Chem. 2009 Apr;55(4):611-22.
22. Cabada MM, Malaga JL, Castellanos-Gonzalez A, Bagwell KA, Naeger PA, Rogers HK, *et al.* Recombinase Polymerase Amplification Compared to Real-Time Polymerase Chain Reaction Test for the Detection of *Fasciola hepatica* in Human Stool. Am J Trop Med Hyg. 2017 Feb 8;96(2):341-346.
23. Castellanos-Gonzalez A, Saldarriaga OA, Tartaglino L, Gacek R, Temple E, Sparks H, *et al.* A Novel Molecular Test to Diagnose Canine Visceral Leishmaniasis at the Point of Care. Am J Trop Med Hyg. 2015 Aug 3. pii: 15-0145.
24. Chandu D, Paul S, Parker M, Dudin Y, King-Sitzes J, Perez T, *et al.* Development of a Rapid Point-of-Use DNA Test for the Screening of Genuity® Roundup Ready 2 Yield® Soybean in Seed Samples. Biomed Res Int. 2016;2016:3145921.
25. Chao CC, Belinskaya T, Zhang Z, Ching WM. Development of Recombinase Polymerase Amplification Assays for Detection of *Orientia tsutsugamushi* or *Rickettsia typhi*. PLoS Negl Trop Dis. 2015 Jul 10;9(7):e0003884.

26. Charles M, Delva GG, Boutin J, Severe K, Peck M, Mabou MM, *et al.* Importance of cholera and other etiologies of acute diarrhea in post-earthquake Port-au-Prince, Haiti. *Am J Trop Med Hyg.* 2014 Mar;90(3):511-7.
27. Clarke C, O'Connor L, Carré-Skinner H, Piepenburg O, Smith TJ. Development and performance evaluation of a recombinase polymerase amplification assay for the rapid detection of group B streptococcus. *BMC Microbiol.* 2016 Sep 22;16(1):221.
28. Clements A, Young JC, Constantinou N, Frankel G. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Microbes.* 2012 Mar-Apr;3(2):71-87.
29. Crannell Z, Castellanos-Gonzalez A, Nair G, Mejia R, White AC, Richards-Kortum R. Multiplexed Recombinase Polymerase Amplification Assay To Detect Intestinal Protozoa. *Anal Chem.* 2016 Feb 2;88(3):1610-6.
30. Crannell ZA, Cabada MM, Castellanos-Gonzalez A, Irani A, White AC, Richards-Kortum R. Recombinase polymerase amplification-based assay to diagnose *Giardia* in stool samples. *Am J Trop Med Hyg.* 2015 Mar;92(3):583-7.
31. Crannell ZA, Castellanos-Gonzalez A, Irani A, Rohrman B, White AC, Richards-Kortum R. Nucleic acid test to diagnose cryptosporidiosis: lab assessment in animal and patient specimens. *Anal Chem.* 2014a Mar 4;86(5):2565-71.
32. Crannell ZA, Rohrman B, Richards-Kortum R. Development of a quantitative recombinase polymerase amplification assay with an internal positive control. *J Vis Exp.* 2015 Mar 30;(97).

33. Crannell ZA, Rohrman B, Richards-Kortum R. Equipment-free incubation of recombinase polymerase amplification reactions using body heat. PLoS One. 2014 Nov 5;9(11):e112146.
34. Crannell ZA, Rohrman B, Richards-Kortum R. Quantification of HIV-1 DNA using real-time recombinase polymerase amplification. Anal Chem. 2014c Jun 17;86(12):5615-9.
35. Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. Nat Rev Microbiol. 2010 Jan;8(1):26-38.
36. Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 2013 Oct;26(4):822-80.
37. Curry JD, McHale C, Smith MT. Factors Influencing Real-Time RT-PCR Results: Application of Real-Time RT-PCR for the Detection of Leukemia Translocations. Mol Biol Today (2002) 3: 79-84.
38. Daher RK, Stewart G, Boissinot M, Bergeron MG. Isothermal recombinase polymerase amplification assay applied to the detection of group B streptococci in vaginal/anal samples. Clin Chem. 2014 Apr;60(4):660-6.
39. Daher RK, Stewart G, Boissinot M, Bergeron MG. Recombinase Polymerase Amplification for Diagnostic Applications. Clin Chem. 2016 Jul;62(7):947-58.
40. Daher RK, Stewart G, Boissinot M, Boudreau DK, Bergeron MG. Influence of sequence *mismatches* on the specificity of recombinase polymerase amplification technology. Mol Cell Probes. 2015 Apr;29(2):116-21.

41. Das B, Bischerour J, Barre FX. Molecular mechanism of acquisition of the cholera toxin genes. *Indian J Med Res.* 2011 Feb;133:195-200.
42. Donta ST, Moon HW, Whipp SC. Detection of heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin with the use of adrenal cells in tissue culture. *Science.* 1974 Jan 25;183(4122):334-6.
43. Dubreuil JD, Isaacson RE, Schifferli DM. Animal Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *EcoSal Plus.* 2016 Oct;7(1)
44. Elfving K, Andersson M, Msellem MI, Welinder-Olsson C, Petzold M, Björkman A, *et al.* Real-time PCR threshold cycle cutoffs help to identify agents causing acute childhood diarrhea in Zanzibar. *J Clin Microbiol.* 2014 Mar;52(3):916-23.
45. Escadafal C, Faye O, Sall AA, Faye O, Weidmann M, Strohmeier O, *et al* Rapid molecular assays for the detection of yellow fever virus in low-resource settings. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014 Mar 6;8(3):e2730.
46. Evans DG, Evans DJ Jr, Pierce NF. Differences in the response of rabbit small intestine to heat-labile and heat-stable enterotoxins of *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 1973 Jun;7(6):873-80.
47. Faye O, Faye O, Soropogui B, Patel P, El Wahed AA, *et al.* Development and deployment of a rapid recombinase polymerase amplification Ebola virus detection assay in Guinea in 2015. *Euro Surveill.* 2015;20(44).
48. Ferdous F, Ahmed S, Farzana FD, Das J, Malek MA, Das SK, *et al.* Aetiologies of diarrhoea in adults from urban and rural treatment facilities in Bangladesh. *Epidemiol Infect.* 2015 May;143(7):1377-87.

49. Fischer Walker CL, Sack D, Black RE. Etiology of diarrhea in older children, adolescents and adults: a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010 Aug 3;4(8):e768.
50. Fleckenstein JM, Hardwidge PR, Munson GP, Rasko DA, Sommerfelt H, Steinsland H. Molecular mechanisms of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. *Microbes Infect*. 2010 Feb;12(2):89-98.
51. Fleckenstein JM, Munson GM, Rasko DA. Enterotoxigenic *Escherichia coli*: Orchestrated host engagement. *Gut Microbes*. 2013 Sep-Oct;4(5):392-6.
52. Galbadage T, Jiang ZD, DuPont HL. Improvement in detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in patients with travelers' diarrhea by increasing the number of *E. coli* colonies tested. *Am J Trop Med Hyg*. 2009 Jan;80(1):20-3.
53. Giannella RA. Suckling mouse model for detection of heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin: characteristics of the model. *Infect Immun*. 1976 Jul;14(1):95-9.
54. Gonzales-Siles L, Karlsson R, Kenny D, Karlsson A, Sjöling Å. Proteomic analysis of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in neutral and alkaline conditions. *BMC Microbiol*. 2017 Jan 7;17(1):11.
55. Guerrant RL, Brunton LL, Schnaitman TC, Rebhun LI, Gilman AG. Cyclic adenosine monophosphate and alteration of Chinese hamster ovary cell morphology: a rapid, sensitive in vitro assay for the enterotoxins of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 1974 Aug;10(2):320-7.
56. Guerrant RL, DeBoer MD, Moore SR, Scharf RJ, Lima AA. The impoverished gut--a triple burden of diarrhoea, stunting and chronic disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013 Apr;10(4):220-9.

57. Guion CE, Ochoa TJ, Walker CM, Barletta F, Cleary TG. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* by use of *melting-curve* analysis and real-time multiplex PCR. J Clin Microbiol. 2008 May;46(5):1752-7.
58. Hajian-Tilaki K. Sample size estimation in diagnostic test studies of biomedical informatics. J Biomed Inform. 2014 Apr;48:193-204.
59. Honda T, Taga S, Takeda Y, Miwatani T. Modified Elek test for detection of heat-labile enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli*. J Clin Microbiol. 1981 Jan;13(1):1-5.
60. Isidean SD, Riddle MS, Savarino SJ, Porter CK. A systematic review of ETEC epidemiology focusing on colonization factor and toxin expression. Vaccine. 2011 Aug 26;29(37):6167-78.
61. James A, Macdonald J. Recombinase polymerase amplification: Emergence as a critical molecular technology for rapid, low-resource diagnostics. Expert Rev Mol Diagn. 2015;15(11):1475-89.
62. Jaroenram W, Owens L. Recombinase polymerase amplification combined with a lateral flow dipstick for discriminating between infectious *Penaeus stylirostris* densovirus and virus-related sequences in shrimp genome. J Virol Methods. 2014 Nov;208:144-51.
63. Jennings MC, Tilley DH, Ballard SB, Villanueva M, Costa FM, Lopez M, *et al.* Case-Case Analysis Using 7 Years of Travelers' Diarrhea Surveillance Data: Preventive and Travel Medicine Applications in Cusco, Peru. J Trop Med Hyg. 2017 May;96(5):1097-1106.

64. Jiang K, Zhu Y, Liu W, Feng Y, He L, Guan W, *et al.* Development of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the detection of F5 fimbriae gene in enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Curr Microbiol.* 2012 Nov;65(5):633-8.
65. Jiang ZD, DuPont HL. Etiology of travellers' diarrhea. *J Travel Med.* 2017 Apr 1;24(suppl_1):S13-S16
66. Jobling MG. The chromosomal nature of LT-II enterotoxins solved: a lambdoid prophage encodes both LT-II and one of two novel pertussis-toxin-like toxin family members in type II enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Pathog Dis.* 2016 Apr;74(3). pii: ftw001.
67. Joffré E, Sjöling Å. The LT1 and LT2 variants of the enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) heat-labile toxin (LT) are associated with major ETEC lineages. *Gut Microbes.* 2016;7(1):75-81.
68. Joffré E, von Mentzer A, Abd El Ghany M, Oezguen N, Savidge T, Dougan G, *et al.* Allele variants of enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-labile toxin are globally transmitted and associated with colonization factors. *J Bacteriol.* 2015 Jan;197(2):392-403.
69. Joffré E, von Mentzer A, Svennerholm AM, Sjöling Å. Identification of new heat-stable (STa) enterotoxin allele variants produced by human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Int J Med Microbiol.* 2016 Nov;306(7):586-594.
70. Kabayiza JC, Andersson ME, Nilsson S, Bergström T, Muhirwa G, Lindh M. Real-time PCR identification of agents causing diarrhea in Rwandan children less than 5 years of age. *Pediatr Infect Dis J.* 2014 Oct;33(10):1037-42.

71. Kalsi S, Valiadi M, Tsaloglou MN, Parry-Jones L, Jacobs A, Watson R, *et al.* Rapid and sensitive detection of antibiotic resistance on a programmable digital microfluidic platform. *Lab Chip*. 2015 Jul 21;15(14):3065-75.
72. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*. 2004 Feb;2(2):123-40.
73. Kapoor R, Srivastava N, Kumar S, Saritha RK, Sharma SK, Jain RK, *et al.* Development of a recombinase polymerase amplification assay for the diagnosis of banana bunchy top virus in different banana cultivars. *Arch Virol*. 2017 May 12.
74. Kappagantu M, Villamor DEV, Bullock JM, Eastwell KC. A rapid isothermal assay for the detection of Hop stunt viroid in hop plants (*Humulus lupulus*), and its application in disease surveys. *J Virol Methods*. 2017 Jul;245:81-85.
75. Kersting S, Rausch V, Bier FF, von Nickisch-Rosenegk M. Multiplex isothermal solid-phase recombinase polymerase amplification for the specific and fast DNA-based detection of three bacterial pathogens. *Mikrochim Acta*. 2014;181(13-14):1715-1723.
76. Kersting S, Rausch V, Bier FF, von Nickisch-Rosenegk M. Rapid detection of *Plasmodium falciparum* with isothermal recombinase polymerase amplification and lateral flow analysis. *Malar J*. 2014 Mar 15;13:99.
77. Khare R, Espy MJ, Cebelinski E, Boxrud D, Sloan LM, Cunningham SA, *et al.* Comparative evaluation of two commercial multiplex panels for detection of gastrointestinal pathogens by use of clinical stool specimens. *J Clin Microbiol*. 2014 Oct;52(10):3667-73.

78. Konishi N, Obata H, Monma C, Nakama A, Kai A, Tsuji T. Bacteriological and epidemiological characteristics of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated in Tokyo, Japan, between 1966 and 2009. *J Clin Microbiol*. 2011 Sep;49(9):3348-51.
79. Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder WC, Nasrin D, Farag TH, Panchalingam S, *et al*. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet*. 2013 Jul 20;382(9888):209-22.
80. Kovacs SD, Mullholland K, Bosch J, Campbell H, Forouzanfar MH, Khalil I, *et al*. Deconstructing the differences: a comparison of GBD 2010 and CHERG's approach to estimating the mortality burden of diarrhea, pneumonia, and their etiologies. *BMC Infect Dis*. 2015 Jan 16;15:16.
81. Krölov K, Frolova J, Tudoran O, Suhorutsenko J, Lehto T, Sibul H, *et al*. Sensitive and rapid detection of *Chlamydia trachomatis* by recombinase polymerase amplification directly from urine samples. *J Mol Diagn*. 2014 Jan;16(1):127-35.
82. Lamberti LM, Bourgeois AL, Fischer Walker CL, Black RE, Sack D. Estimating diarrheal illness and deaths attributable to *Shigellae* and enterotoxigenic *Escherichia coli* among older children, adolescents, and adults in South Asia and Africa. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(2):e2705.
83. Lanata CF, Fischer-Walker CL, Olascoaga AC, Torres CX, Aryee MJ, Black RE, *et al*. Global causes of diarrheal disease mortality in children <5 years of age: a systematic review. *PLoS One*. 2013 Sep 4;8(9):e72788.

84. Lau HY, Wang Y, Wee EJ, Botella JR, Trau M. Field Demonstration of a Multiplexed Point-of-Care Diagnostic Platform for Plant Pathogens. *Anal Chem.* 2016 Aug 16;88(16):8074-81.
85. Lee G, Paredes Olortegui M, Peñataro Yori P, Black RE, Caulfield L, *et al.* Effects of *Shigella*-, *Campylobacter*- and ETEC-associated diarrhea on childhood growth. *Pediatr Infect Dis J.* 2014 Oct;33(10):1004-9.
86. Li J, Macdonald J. Advances in isothermal amplification: novel strategies inspired by biological processes. *Biosens Bioelectron.* 2015 Feb 15;64:196-211.
87. Li Y, Luo Q, Shi X, Lin Y, Qiu Y, Lv D, *et al.* Phenotypic and Genotypic Characterization of Clinical Enterotoxigenic *Escherichia coli* Isolates from Shenzhen, China. *Foodborne Pathog Dis.* 2017 Jun;14(6):333-340
88. Lillis L, Lehman D, Singhal MC, Cantera J, Singleton J, Labarre P, *er al.* Non-instrumented incubation of a recombinase polymerase amplification assay for the rapid and sensitive detection of proviral HIV-1 DNA. *PLoS One.* 2014 Sep 29;9(9):e108189.
89. Lillis L, Siverson J, Lee A, Cantera J, Parker M, Piepenburg O, *et al.* Factors influencing Recombinase polymerase amplification (RPA) assay outcomes at point of care. *Mol Cell Probes.* 2016;30(2):74-8.
90. Lindsay BR, Chakraborty S, Harro C, Li S, Nataro JP, Sommerfelt H, *et al.* Quantitative PCR and culture evaluation for enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) associated diarrhea in volunteers. *FEMS Microbiol Lett.* 2014 Mar;352(1):25-31.

91. Liu J, Gratz J, Amour C, Kibiki G, Becker S, Janaki L, *et al.* A laboratory-developed TaqMan Array Card for simultaneous detection of 19 enteropathogens. *J Clin Microbiol.* 2013 Feb;51(2):472-80.
92. Liu J, Kabir F, Manneh J, Lertsethtakarn P, Begum S, Gratz J, *et al.* Development and assessment of molecular diagnostic tests for 15 enteropathogens causing childhood diarrhoea: a multicentre study. *Lancet Infect Dis.* 2014 Aug;14(8):716-24
93. Liu J, Platts-Mills JA, Juma J, Kabir F, Nkeze J, Okoi C, *et al.* Use of quantitative molecular diagnostic methods to identify causes of diarrhoea in children: a reanalysis of the GEMS case-control study. *Lancet.* 2016 Sep 24;388(10051):1291-301.
94. Liu J, Silapong S, Jeanwattanalert P, Lertsehtakarn P, Bodhidatta L, Swierczewski B, *et al.* Multiplex real time PCR panels to identify fourteen colonization factors of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *PLoS One.* 2017 May 5;12(5):e0176882.
95. Liu L, Oza S, Hogan D, Perin J, Rudan I, Lawn JE, *et al.* Global, regional, and national causes of child mortality in 2000-13, with projections to inform post-2015 priorities: an updated systematic analysis. *Lancet.* 2015 Jan 31; 385(9966):430-40.
96. Londoño MA, Harmon CL, Polston JE. Evaluation of recombinase polymerase amplification for detection of begomoviruses by plant diagnostic clinics. *Virology.* 2016 Mar 22;13:48.

97. Lothigius A, Janzon A, Begum Y, Sjöling A, Qadri F, Svennerholm AM, *et al.* Enterotoxigenic *Escherichia coli* is detectable in water samples from an endemic area by real-time PCR. *J Appl Microbiol.* 2008 Apr;104(4):1128-36.
98. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, *et al.* Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet.* 2012 Dec 15;380(9859):2095-128.
99. Ma B, Fang J, Wang Y, He H, Dai M, Lin W, *et al.* Isothermal Method of a Recombinase Polymerase Amplification Assay for the Detection of Most Common High-Risk Human Papillomavirus Type 16 and Type 18 DNA. *Clin Lab.* 2017 Jan 1;63(1):27-38.
100. MacDonald E, Møller KE, Wester AL, Dahle UR, Hermansen NO, Jennum PA, *et al.* An outbreak of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) infection in Norway, 2012: a reminder to consider uncommon pathogens in outbreaks involving imported products. *Epidemiol Infect.* 2015 Feb;143(3):486-93
101. Madhavan TP, Sakellaris H. Colonization factors of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Adv Appl Microbiol.* 2015;90:155-97.
102. Magro L, Jacquelin B, Escadafal C, Garneret P, Kwasiborski A, Manuguerra JC, *et al.* Paper-based RNA detection and multiplexed analysis for Ebola virus diagnostics. *Sci Rep.* 2017 May 2;7(1):1347.
103. Mandsberg LF, Ciofu O, Kirkby N, Christiansen LE, Poulsen HE, Høiby N. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains with increased mutation

frequency due to inactivation of the DNA oxidative repair system. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(6):2483-91.

104. Marston CK, Hoffmaster AR, Wilson KE, Bragg SL, Plikaytis B, Brachman P, *et al.* Effects of long-term storage on plasmid stability in *Bacillus anthracis*. *Appl Environ Microbiol.* 2005 Dec;71(12):7778-80.

105. Mayboroda O, Gonzalez Benito A, Sabaté del Rio J, Svobodova M, Julich S, Tomaso H, *et al.* Isothermal solid-phase amplification system for detection of *Yersinia pestis*. *Anal Bioanal Chem.* 2016 Jan;408(3):671-6.

106. Medina AM, Rivera FP, Pons MJ, Riveros M, Gomes C, Bernal M, *et al.* Comparative analysis of antimicrobial resistance in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolates from two paediatric cohort studies in Lima, Peru. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2015 Aug;109(8):493-502.

107. Mondal D, Ghosh P, Khan MA, Hossain F, Böhlken-Fascher S, Matlashewski G, *et al.* Mobile suitcase laboratory for rapid detection of *Leishmania donovani* using recombinase polymerase amplification assay. *Parasit Vectors.* 2016 May 13;9(1):281.

108. Monteville MR, Riddle MS, Baht U, Putnam SD, Frenck RW, Brooks K, *et al.* Incidence, etiology, and impact of diarrhea among deployed US military personnel in support of Operation Iraqi Freedom and Operation Enduring Freedom. *Am J Trop Med Hyg.* 2006 Oct;75(4):762-7.

109. Moore MD, Jaykus LA. Development of a Recombinase Polymerase Amplification Assay for Detection of Epidemic Human Noroviruses. *Sci Rep.* 2017 Jan 9;7:40244.

110. Moseley SL, Echeverria P, Seriwatana J, Tirapat C, Chaicumpa W, Sakuldaipeara T, *et al.* Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* by colony hybridization using three enterotoxin gene probes. *J Infect Dis.* 1982 Jun;145(6):863-9.
111. Mudrak B, Kuehn MJ. Heat-labile enterotoxin: beyond G(m1) binding. *Toxins (Basel).* 2010 Jun;2(6):1445-70.
112. Murinda SE, Ibekwe AM, Zulkaffly S, Cruz A, Park S, Razak N, *et al.* Real-time isothermal detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* using recombinase polymerase amplification. *Foodborne Pathog Dis.* 2014 Jul;11(7):529-36.
113. Nagy B, Fekete PZ. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. *Int J Med Microbiol.* 2005 Oct;295(6-7):443-54.
114. Nair G, Rebolledo M, White AC Jr, Crannell Z, Richards-Kortum RR, Pinilla AE, *et al.* Detection of *Entamoeba histolytica* by Recombinase Polymerase Amplification. *Am J Trop Med Hyg.* 2015 Jun 29. pii: 15-0276.
115. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 1998 Jan;11(1):142-201.
116. Nawar HF, King-Lyons ND, Hu JC, Pasek RC, Connell TD. LT-IIc, a new member of the type II heat-labile enterotoxin family encoded by an *Escherichia coli* strain obtained from a nonmammalian host. *Infect Immun.* 2010 Nov;78(11):4705-13.
117. NCBI. BLAST®: Frequently Asked questions [Internet]. Estados Unidos: NCBI; 2014 [citado 2017 Sep 05]. Disponible en:

https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastDocs&DOC_TYPE=FAQ

118. Nicklasson M, Klena J, Rodas C, Bourgeois AL, Torres O, Svennerholm AM, *et al.* Enterotoxigenic *Escherichia coli* multilocus sequence types in Guatemala and Mexico. *Emerg Infect Dis.* 2010 Jan;16(1):143-6.

119. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000 Jun 15;28(12):E63.

120. Ochoa TJ, Chea-Woo E, Baiocchi N, Pecho I, Campos M, Prada A, *et al.* Randomized double-blind controlled trial of bovine lactoferrin for prevention of diarrhea in children. *J Pediatr.* 2013 Feb;162(2):349-56.

121. Ochoa TJ, Mercado EH, Durand D, Rivera FP, Mosquito S, Contreras C, *et al.* Frecuencia y patotipos de *Escherichia coli* diarrogénica en niños peruanos con y sin diarrea. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2011 Mar;28(1):13-20.

122. Olive DM. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* after polymerase chain reaction amplification with a thermostable DNA polymerase. *J Clin Microbiol.* 1989 Feb;27(2):261-5.

123. Organización Mundial de la Salud. Diarrhoeal disease. 2013. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/>

124. O'Ryan M, Vidal R, del Canto F, Carlos Salazar J, Montero D. Vaccines for viral and bacterial pathogens causing acute gastroenteritis: Part II: Vaccines for *Shigella*, *Salmonella*, enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) and *Campylobacter jejuni*. *Hum Vaccin Immunother.* 2015;11(3):601-19.

125. Panchalingam S, Antonio M, Hossain A, Mandomando I, Ochieng B, *et al.* Diagnostic microbiologic methods in the GEMS-1 case/control study. *Clin Infect Dis.* 2012 Dec;55 Suppl 4:S294-302. doi: 10.1093/cid/cis754. Erratum in: *Clin Infect Dis.* 2013 Jun;56(12):1851. Berkeley, Lynette Y [added].
126. Patel CB, Vajpayee P, Singh G, Upadhyay RS, Shanker R. Contamination of potable water by enterotoxigenic *Escherichia coli*: qPCR based culture-free detection and quantification. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2011 Nov;74(8):2292-8.
127. Patel P, Abd El Wahed A, Faye O, Prüger P, Kaiser M, Thaloengsok S, *et al.* A Field-Deployable *Reverse* Transcription Recombinase Polymerase Amplification Assay for Rapid Detection of the Chikungunya Virus. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016 Sep 29;10(9):e0004953.
128. Pattabiraman V, Parsons MB, Bopp CA. Real-Time TaqMan PCR Assay for the Detection of Heat-Labile and Heat-Stable Enterotoxin Genes in a Geographically Diverse Collection of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Strains and Stool Specimens. *Foodborne Pathog Dis.* 2016 Apr;13(4):212-20.
129. Piepenburg O, Williams CH, Stemple DL, Armes NA. DNA detection using recombination proteins. *PLoS Biol.* 2006 Jul;4(7):e204.
130. Pires SM, Fischer-Walker CL, Lanata CF, Devleesschauwer B, Hall AJ, Kirk MD, *et al.* Aetiology-Specific Estimates of the Global and Regional Incidence and Mortality of Diarrhoeal Diseases Commonly Transmitted through Food. *PLoS One.* 2015 Dec 3;10(12):e0142927.

131. Prescott MA, Reed AN, Jin L, Pastey MK. Rapid Detection of Cyprinid Herpesvirus 3 in Latently Infected Koi by Recombinase Polymerase Amplification. *J Aquat Anim Health*. 2016 Sep;28(3):173-80.
132. Qadri F, Svennerholm AM, Faruque AS, Sack RB. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. *Clin Microbiol Rev*. 2005 Jul;18(3):465-83.
133. Qiagen. Critical Factors for Successful Real-Time PCR [Internet]. Estados Unidos: Qiagen; 2010 [citado 2017 Jul 17]. Disponible en: <http://www.genequantification.de/qiagen-qpcr-sample-assay-tech-guide-2010.pdf>
134. Raja B, Goux HJ, Marapadaga A, Rajagopalan S, Kourentzi K, Willson RC. Development of a Panel of Recombinase Polymerase Amplification Assays for Detection of Common Bacterial Urinary Tract Infection Pathogens. *J Appl Microbiol*. 2017 May 16.
135. Ram S, Vajpayee P, Shanker R. Rapid culture-independent quantitative detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in surface waters by real-time PCR with molecular beacon. *Environ Sci Technol*. 2008 Jun 15;42(12):4577-82.
136. Read LT, Hahn RW, Thompson CC, Bauer DL, Norton EB, Clements JD. Simultaneous exposure to *Escherichia coli* heat-labile and heat-stable enterotoxins increases fluid secretion and alters cyclic nucleotide and cytokine production by intestinal epithelial cells. *Infect Immun*. 2014 Dec;82(12):5308-16.
137. Reischl U, Youssef MT, Wolf H, Hyytia-Trees E, Strockbine NA. Real-time fluorescence PCR assays for detection and characterization of heat-labile I and heat-

stable I enterotoxin genes from enterotoxigenic *Escherichia coli*. J Clin Microbiol. 2004 Sep;42(9):4092-100.

138. Riveros M, Ochoa TJ. Enteropatógenos de importancia en salud pública. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2015 Mar;32(1):157-64.

139. Robins-Browne RM, Levine MM. Laboratory diagnostic challenges in case/control studies of diarrhea in developing countries. Clin Infect Dis. 2012 Dec;55 Suppl 4:S312-6.

140. Rohrman B, Richards-Kortum R. Inhibition of recombinase polymerase amplification by background DNA: a lateral flow-based method for enriching target DNA. Anal Chem. 2015 Feb 3;87(3):1963-7.

141. Rohrman BA, Richards-Kortum RR. A paper and plastic device for performing recombinase polymerase amplification of HIV DNA. Lab Chip. 2012 Sep 7;12(17):3082-8.

142. Rosser A, Rollinson D, Forrest M, Webster BL. Isothermal Recombinase Polymerase amplification (RPA) of *Schistosoma haematobium* DNA and oligochromatographic lateral flow detection. Parasit Vectors. 2015 Sep 4;8:446

143. Roussel C, Sivignon A, de Wiele TV, Blanquet-Diot S. Foodborne enterotoxigenic *Escherichia coli*: from gut pathogenesis to new preventive strategies involving probiotics. Future Microbiol. 2017 Jan;12:73-93.

144. Sahl JW, Sistrunk JR, Fraser CM, Hine E, Baby N, Begum Y, *et al.* Examination of the Enterotoxigenic *Escherichia coli* Population Structure during Human Infection. MBio. 2015 Jun 9;6(3):e00501.

145. Saldarriaga OA, Castellanos-Gonzalez A, Porrozzi R, Baldeviano GC, Lescano AG, de Los Santos MB, *et al.* An Innovative Field-Applicable Molecular Test to Diagnose Cutaneous *Leishmania Viannia* spp. Infections. PLoS Negl Trop Dis. 2016 Apr 26;10(4):e0004638.
146. Santiago-Felipe S, Tortajada-Genaro LA, Morais S, Puchades R, Maquieira Á. Isothermal DNA amplification strategies for duplex microorganism detection. Food Chem. 2015 May 1;174:509-15.
147. Senarath KD, Usgodaarachchi RB, Navaratne V, Nagahawatte A, Wijayarathna CD, Alvitigala J, *et al.* Non Specific Amplification with the LAMP Technique in the Diagnosis of Tuberculosis in Sri Lankan Settings. J Tuberc Res. 2014;2:168-172.
148. Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, *et al.* Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. Mol Syst Biol. 2011 Oct 11;7:539.
149. Sigma. Optimizing qPCR [Internet]. Estados Unidos: Sigma; 2010 [citado 2017 Jul 17]. Disponible en: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/SAJ/Brochure/1/j_qpcr_techguide06.pdf
150. Singh G, Vajpayee P, Ram S, Shanker R. Environmental reservoirs for enterotoxigenic *Escherichia coli* in south Asian Gangetic riverine system. Environ Sci Technol. 2010 Aug 15;44(16):6475-80.
151. Sixma TK, Stein PE, Hol WG, Read RJ. Comparison of the B-pentamers of heat-labile enterotoxin and verotoxin-1: two structures with remarkable similarity and dissimilarity. Biochemistry. 1993 Jan 12;32(1):191-8.

152. Sjöling A, Wiklund G, Savarino SJ, Cohen DI, Svennerholm AM. Comparative analyses of phenotypic and genotypic methods for detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* toxins and colonization factors. *J Clin Microbiol.* 2007 Oct;45(10):3295-301.
153. Steffen R, Hill DR, DuPont HL. Traveler's diarrhea: a clinical review. *JAMA.* 2015 Jan 6;313(1):71-80.
154. Sun K, Xing W, Yu X, Fu W, Wang Y, Zou M, *et al.* Recombinase polymerase amplification combined with a lateral flow dipstick for rapid and visual detection of *Schistosoma japonicum*. *Parasit Vectors.* 2016 Aug 31;9:476.
155. Svec D, Tichopad A, Novosadova V, Pfaffl MW, Kubista M. How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomol Detect Quantif.* 2015 Mar 11;3:9-16.
156. Svennerholm AM, Wiklund G. Rapid GM1-enzyme-linked immunosorbent assay with visual reading for identification of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *J Clin Microbiol.* 1983 Apr;17(4):596-600.
157. Svennerholm AM, Wikström M, Lindblad M, Holmgren J. Monoclonal antibodies against *Escherichia coli* heat-stable toxin (STa) and their use in a diagnostic ST ganglioside GM1-enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol.* 1986 Oct;24(4):585-90.
158. Syed HC, Dubreuil JD. *Escherichia coli* STb toxin induces apoptosis in intestinal epithelial cell lines. *Microb Pathog.* 2012 Sep;53(3-4):147-53.

159. Teoh BT, Sam SS, Tan KK, Danlami MB, Shu MH, Johari J, *et al.* Early detection of dengue virus by use of *reverse* transcription-recombinase polymerase amplification. *J Clin Microbiol.* 2015 Mar;53(3):830-7.
160. Tsen HY, Jian LZ. Development and use of a multiplex PCR system for the rapid screening of heat labile toxin I, heat stable toxin II and shiga-like toxin I and II genes of *Escherichia coli* in water. *J Appl Microbiol.* 1998 Apr;84(4):585-92.
161. Tu PA, Shiu JS, Lee SH, Pang VF, Wang DC, Wang PH. Development of a recombinase polymerase amplification lateral flow dipstick (RPA-LFD) for the field diagnosis of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) infection. *J Virol Methods.* 2017 May;243:98-104.
162. TwistDx, Ltd. Appendix to the TwistAmpTM reaction kit manuals [Internet]. Inglaterra: TwistDx, Ltd; 2014. [citado 2017 Jul 10]. Disponible en: <http://www.twistdx.co.uk/images/uploads/docs/Appendix.pdf>
163. TwistDx, Ltd. Evaluation of isothermal Recombinase Polymerase Amplification incubation temperature tolerance [Internet]. Inglaterra: TwistDx, Ltd; 2016. [citado 2017 Jul 17]. Disponible en: <https://www.twistdx.co.uk/docs/default-source/Application-notes/app-note-002-v1-0.pdf?sfvrsn=6>
164. TwistDx, Ltd. Frequently asked questions [Internet]. Inglaterra: TwistDx, Ltd; 2014. [citado 2017 Jul 17]. Disponible en: <https://www.twistdx.co.uk/en/support/faqs>
165. TwistDx, Ltd. PCR *Primers* Work Using Standard RPA Reagents [Internet]. Inglaterra: TwistDx, Ltd; 2014. [citado 2017 Jul 10]. Disponible en: http://www.twistdx.co.uk/our_technology/pcr_primers_work_using_standard_rpa_reagents/

166. Vila J. New molecular diagnostic tools in traveller's diarrhea. *J Travel Med.* 2017 Apr 1;24(suppl_1):S23-S28.
167. Vilchez S, Becker-Dreps S, Amaya E, Perez C, Paniagua M, Reyes D, *et al.* *J Med Microbiol.* Characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from Nicaraguan children in hospital, primary care & community settings. 2014 May;63(Pt 5):729-34
168. Vinelli A. Development of Bionanotechnological Strategies for Signal Enhancement in Nucleic Acids Biosensors [Tesis de Doctorado]. Università di Bologna; 2011.
169. Wambua L, Schneider B, Okwaro A, Wanga JO, Imali O, Wambua PN, *et al.* Development of field-applicable tests for rapid and sensitive detection of *Candidatus Phytoplasma oryzae*. *Mol Cell Probes.* 2017 Jun 21. pii: S0890-8508(17)30064-6.
170. Wang J, Liu L, Li R, Wang J, Fu Q, Yuan W. Rapid and sensitive detection of canine parvovirus type 2 by recombinase polymerase amplification. *Arch Virol.* 2016 Apr;161(4):1015-8.
171. Wang J, Wang J, Liu L, Li R, Yuan W. Rapid detection of Porcine circovirus 2 by recombinase polymerase amplification. *J Vet Diagn Invest.* 2016 Sep;28(5):574-8.
172. Wang JC, Liu LB, Han QA, Wang JF, Yuan WZ. An exo probe-based recombinase polymerase amplification assay for the rapid detection of porcine parvovirus. *J Virol Methods.* 2017 Jul 6;248:145-147.

173. Wang K, Wu Y, Yin D, Tang S, Hu G, He Y. Development and evaluation of a rapid recombinase polymerase amplification assay for detection of coxsackievirus A6. *Arch Virol*. 2017 Jan;162(1):287-290.
174. Wang R, Zhang F, Wang L, Qian W, Qian C, Wu J, *et al*. Instant, Visual, and Instrument-Free Method for On-Site Screening of GTS 40-3-2 Soybean Based on Body-Heat Triggered Recombinase Polymerase Amplification. *Anal Chem*. 2017 Apr 18;89(8):4413-4418.
175. Wang X, Gao X, Hardwidge PR. Heat-labile enterotoxin-induced activation of NF- κ B and MAPK pathways in intestinal epithelial cells impacts enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) adherence. *Cell Microbiol*. 2012 Aug;14(8):1231-41.
176. Weiglmeier PR, Rösch P, Berkner H. Cure and curse: *E. coli* heat-stable enterotoxin and its receptor guanylyl cyclase C. *Toxins (Basel)*. 2010 Sep;2(9):2213-29.
177. Wetmur JG, Wong DM, Ortiz B, Tong J, Reichert F, Gelfand DH. Cloning, sequencing, and expression of RecA proteins from three distantly related thermophilic eubacteria. *J Biol Chem*. 1994 Oct 14;269(41):25928-35.
178. Wu YD, Zhou DH, Zhang LX, Zheng WB, Ma JG, Wang M, *et al*. Recombinase polymerase amplification (RPA) combined with lateral flow (LF) strip for equipment-free detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts in dairy cattle feces. *Parasitol Res*. 2016 Sep;115(9):3551-5.
179. Xing W, Yu X, Feng J, Sun K, Fu W, Wang Y, *et al*. Field evaluation of a recombinase polymerase amplification assay for the diagnosis of *Schistosoma*

japonicum infection in Hunan province of China. BMC Infect Dis. 2017 Feb 21;17(1):164.

180. Yang M, Ke Y, Wang X, Ren H, Liu W, Lu H, *et al.* Development and Evaluation of a Rapid and Sensitive EBOV-RPA Test for Rapid Diagnosis of Ebola Virus Disease. Sci Rep. 2016 Jun 1;6:26943.

181. Yang W, Song X, Wang J, Li Z, Ji M, Li Y. Detection methods for milk pathogenic bacteria by loop-mediated isothermal amplification. Biosci Trends. 2014 Dec;8(6):316-21.

182. Yang Y, Qin X, Song Y, Zhang W, Hu G, Dou Y, *et al.* Development of real-time and lateral flow strip *reverse* transcription recombinase polymerase Amplification assays for rapid detection of peste des petits ruminants virus. Virol J. 2017 Feb 7;14(1):24.

183. Yang Y, Qin X, Sun Y, Cong G, Li Y, Zhang Z. Development of Isothermal Recombinase Polymerase Amplification Assay for Rapid Detection of Porcine Circovirus Type 2. Biomed Res Int. 2017;2017:8403642.

184. Yang Y, Qin X, Wang G, Jin J, Shang Y, Zhang Z. Development of an isothermal amplification-based assay for rapid visual detection of an Orf virus. Virol J. 2016 Mar 19;13:46.

185. Yang Y, Qin X, Zhang W, Li Z, Zhang S, Li Y, Zhang Z. Development of an isothermal recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of pseudorabies virus. Mol Cell Probes. 2017 Jun;33:32-35.

186. Yano A, Ishimaru R, Hujikata R. Rapid and sensitive detection of heat-labile I and heat-stable I enterotoxin genes of enterotoxigenic *Escherichia coli* by Loop-Mediated Isothermal Amplification. *J Microbiol Methods*. 2007 Feb;68(2):414-20.
187. Yin F, Liu J, Liu A, Li Y, Luo J, Guan G, *et al*. Rapid diagnosis of *Theileria annulata* by recombinase polymerase amplification combined with a lateral flow strip (LF-RPA) in epidemic regions. *Vet Parasitol*. 2017 Apr 15;237:125-129.
188. Youmans BP, Ajami NJ, Jiang ZD, Petrosino JF, DuPont HL, Highlander SK. Development and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction assays for detection and quantification of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) heat labile and heat stable toxin genes in travelers' diarrhea samples. *Am J Trop Med Hyg*. 2014 Jan;90(1):124-32.
189. Zhao Y, Chen F, Li Q, Wang L, Fan C. Isothermal Amplification of Nucleic Acids. *Chem Rev*. 2015 Nov 25;115(22):12491-545.