

AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA DE ÁCIDOS NUCLEICOS “EL FUTURO DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR”

✓ EVERARDO GONZÁLEZ-GONZÁLEZ¹,
MARGARITA DE LA LUZ MARTÍNEZ-FIERRO²,
IDALIA GARZA-VELOZ², GERARDO DE JESÚS
TRUJILLO-RODRÍGUEZ¹, IVÁN DELGADO-
ENCISO³, ELDA A. FLORES-CONTRERAS⁴, IRAM
PABLO RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ¹



¹Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Laboratorio de Fisiología Molecular y Estructural. Ave. Pedro de Alba s/n cruz con Ave. Manuel L. Barragán. San Nicolás de los Garza, Nuevo León, 66455 México.

²Laboratorio de Medicina Molecular, Unidad Académica de Medicina Humana y Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Zacatecas, Zacatecas 98160, México

³Facultad de Medicina, Universidad de Colima, Colima, México.

⁴Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Francisco I. Madero y Dr. E. Aguirre Pequeño s/n, Mitras Centro, Monterrey 64460, México



Palabras claves: Diagnóstico molecular, qPCR, ADN, ARN, NASBA, LAMP, RPA

Keywords: Molecular diagnosis, qPCR, DNA, RNA, NASBA, LAMP, RPA

RESUMEN

El diagnóstico molecular es una herramienta clave con aplicaciones en salud humana, veterinaria y seguridad alimentaria, entre otras áreas. En salud humana, la pandemia de COVID-19 impulsó el uso masivo de pruebas de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (también conocidas como qPCR cuando es de carácter cuantitativo), que permitieron tamizajes a gran escala y millones de diagnósticos a nivel global, consolidando a la qPCR como la técnica molecular más utilizada en la historia. Sin embargo, el acceso a estas pruebas no fue equitativo en todos los países, ya que la qPCR requiere infraestructura especializada y equipos de un costo elevado. Frente a esta limitación, la amplificación isotérmica de ácidos nucleicos ha surgido como una alternativa revolucionaria en diagnóstico molecular, permitiendo la detección rápida y precisa de patógenos y biomarcadores sin necesidad de equipo sofisticado. En este artículo, se abordan tres métodos que están marcando el futuro de la detección molecular: NASBA (Amplificación Basada en Secuencias de Ácidos Nucleicos), LAMP (Amplificación Isotérmica Mediada por Bucle) y RPA (Amplificación por Recombinasa y Polimerasa). Cada técnica ofrece ventajas en sensibilidad, especificidad y facilidad de uso, haciéndolas especialmente adecuadas para entornos de bajos recursos y diagnósticos en el punto de atención. Estas tecnologías no solo pueden revolucionar el diagnóstico, sino también permitir una respuesta rápida y efectiva ante nuevas crisis sanitarias.

ABSTRACT

Molecular diagnostics is a key tool with applications in human health, veterinary science, and food safety, among other areas. In human health, the COVID-19 pandemic spurred the widespread use of real time polymerase chain reaction (also known as qPCR when it when used in quantitative analysis) tests, enabling large-scale screenings and millions of diagnoses worldwide, establishing qPCR as the most widely used molecular technique in history. However, access to these tests was not equitable across countries, as qPCR requires specialized infrastructure and costly equipment. To address this limitation, nucleic acid isothermal amplification has emerged as a revolutionary alternative in molecular diagnostics, enabling rapid and accurate detection of pathogens and biomarkers without the need for sophisticated equipment. This article discusses three methods shaping the future of molecular detection: NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification), LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification), and RPA (Recombinase Polymerase Amplification). Each technique offers advantages in sensitivity, specificity, and ease of use, making them particularly suitable for low-resource settings and point-of-care diagnostics. These technologies not only have the potential to revolutionize diagnostics but also to enable a rapid and effective response to future health crises.

INTRODUCCIÓN

La pandemia de COVID-19, provocada por el virus SARS-CoV-2, generó la necesidad de desarrollar y establecer rápidamente tecnología en diversas áreas, principalmente en la salud humana, educación y telecomunicaciones (Clipper, 2020). Particularmente en el caso de la salud humana, se desarrollaron, evaluaron y aplicaron vacunas con tecnología de ARN mensajero, las cuales no se habían utilizado masivamente en humanos. También hubo un gran esfuerzo en la detección del SARS-CoV-2, aplicando pruebas de qPCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real) de forma masiva en todo el mundo, siendo el método recomendado por la organización mundial de la salud (OMS) para diagnosticar y controlar la enfermedad. La qPCR para detectar el SARS-CoV-2 es la prueba que se ha utilizado más en la historia, estimando hasta la fecha más de 900 millones solamente en Estados Unidos de América y en México alrededor de 15 millones ("Total COVID-19 tests", <https://ourworldindata.org>) .

Es por eso que después de la pandemia de la COVID-19, la mayoría de la población había tenido contacto y sabía que era una qPCR: Una técnica sensible que permitía saber si estabas o no infectado por el SARS-CoV-2.

La PCR es una técnica desarrollada en la década de los 80 por el investigador Kary Mullis, la cual permite amplificar (multiplicar) de forma específica ácidos nucleicos y así poder detectar la presencia de ese fragmento de interés (Mullis et al., 1986). Sin embargo, la qPCR es una variante desarrollada en la década de los 90. La qPCR requiere de forma básica una ADN polimerasa termoestable (llamada *Taq*), un par de cebadores (fragmentos pequeños de ADN), sondas

marcadas con un fluorocromo (o también el uso de un intercalador como el SYBR), buffer de reacción y variaciones de temperatura para lograr esta amplificación de ácidos nucleicos, para llegar a las diferentes temperaturas es necesario de un equipo llamado termociclador, el cual tiene la capacidad de controlar el tiempo y la temperatura.

El termociclador es una de las principales limitaciones del diagnóstico por qPCR, debido a su alto costo, lo cual impide que todos los países tengan la capacidad de equipar sus laboratorios clínicos con esta tecnología. Esto se traduce en una disparidad significativa en el acceso a la tecnología de diagnóstico molecular, siendo un factor importante en las diferencias en la cantidad de pruebas de qPCR para SARS-CoV-2 realizadas en México y E.U.A.

La falta de acceso a estos equipos, reactivos (polimerasas) y personal especializado en ciertos países ha sido un obstáculo para una detección oportuna y masiva, subrayando la necesidad de desarrollar alternativas más accesibles para el diagnóstico molecular. Sin embargo, existe una amplia variedad de kits comerciales basados en qPCR para la detección de diversos patógenos. La Tabla 1 presenta algunos ejemplos de patógenos detectables mediante esta técnica, junto con el nombre del kit correspondiente y su fabricante.

Teniendo en cuenta la necesidad de simplificar la qPCR, se han desarrollado tecnologías alternativas bajo el mismo principio de la amplificación de ácidos nucleicos, pero sin necesidad de variar la temperatura evitando el uso del termociclador. Este tipo de pruebas se han denominado Técnicas de Amplificación Isotérmica y su principal atractivo es que con una temperatura

Tabla 1. Kits comerciales basados en qPCR para la detección de patógenos

Patógeno	Kit Comercial	Fabricante
Salmonella spp.	Condagene® Salmonella	Condalab (condalab.com)
Listeria monocytogenes	Condagene® Listeria monocytogenes	Condalab
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Condagene® E. coli O157:H7	Condalab
Campylobacter spp.	Condagene® Campylobacter	Condalab
Staphylococcus aureus	Condagene® Staphylococcus aureus	Condalab
Norovirus GI/GII	Vitassay qPCR Norovirus	Vitassay (vitassay.com)
Rotavirus A	Vitassay qPCR Rotavirus A	Vitassay
Adenovirus	Vitassay qPCR Adenovirus	Vitassay
SARS-CoV-2	Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Kit	Bio-Rad (bio-rad.com)
Influenza A/B y RSV	COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit	NZYTech (nzytech.com)
Virus del Ébola	RealStar® Filovirus Screen RT-PCR Kit 1.0	Altona Diagnostics (altona-diagnostics.com)

constante se pueden amplificar los ácidos nucleicos. Existen diferentes técnicas de amplificación isotérmicas, entre las más populares están NASBA (Amplificación Basada en Secuencias de Ácidos Nucleicos), LAMP (Amplificación Isotérmica Mediada por Bucle) y RPA (Amplificación por Recombinasa y Polimerasa). En la Figura 1 se muestra un resumen de las técnicas mencionadas con sus respectivas principales características

NASBA

La técnica de NASBA es la pionera en tecnología de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos. En 1991 el investigador J. Compton publicó en la revista Nature la tecnología de NASBA. El fundamento técnico de NASBA se basa en el proceso de replicación retroviral, en un principio se enfocaba a la detección de moléculas de ARN (en la actualidad se ha adaptado a ADN). Para lograr una amplificación de ácidos nucleicos por medio de NASBA es necesario utilizar 3 enzimas: transcriptasa inversa (AMV), T7 RNA polimerasa y RNasa H, además de un par de cebadores específicos a la secuencia a detectar. Por último, para llevar a cabo la reacción de NASBA se requiere de una incubación a una temperatura constante de 41°C durante 2 horas (Compton, 1991).

Como se mencionó previamente NASBA es una tecnología que tiene más de 30 años y se han publicado diversas pruebas para la detección de patógenos, por ejemplo: la detección de VPH (Virus del Papiloma Humano) (Smits et al., 1995), la detección de norovirus (Mao et al., 2024), o la detección de SARS-CoV-2 (Kia et al., 2023).

LAMP

La tecnología isotérmica de LAMP fue desarrollada por Notomi y colaboradores en el año 2000 y actualmente es la más utilizada en el mundo en el área de diagnóstico isotérmico (Becherer et al., 2020). Se han publicado una basta variedad de pruebas para la detección de patógenos entre ellos el SARS-CoV-2 (González-González et al., 2021), EBOV (virus del Ébola) (Kurosaki et al., 2016) y VIH (virus de la Inmunodeficiencia Humana) (Curtis et al., 2018). Además, se encuentran disponibles en el mercado una gama de pruebas basadas en esta tecnología (Becherer et al., 2020). El fundamento general de LAMP se basa en emplear una polimerasa (*Bst*) que funciona a una temperatura de 60°C, en conjunto con 4 cebadores específicos para una región de ADN (a diferencia del qPCR que solo usa 2) y de esta forma se puede sintetizar fragmentos de ADN en incubaciones de 30 a 60 minutos (Notomi et al., 2000).






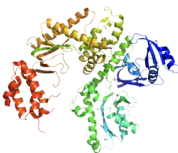
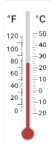

Técnicas Isotérmicas				
	qPCR	NASBA	LAMP	RPA
Termociclador 				
No. de Enzimas 	1	3	1	4
Temperatura 	95°C 60°C 72°C	41 °C	60 °C	37 °C
Tiempo 	60-120 min (Depende de la polimerasa)	120 min	30-60 min	60 min

Figura 1. Comparativa de técnicas moleculares utilizadas en el diagnóstico. Características principales de las técnicas qPCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real), NASBA (Amplificación Basada en Secuencias de Ácidos Nucleicos), LAMP (Amplificación Isotérmica Mediada por Bucle) y RPA (amplificación por recombinasa y polimerasa), destacando la necesidad de utilizar el equipo necesario en la qPCR como el termociclador, cantidad de enzimas requeridas para procesar la reacción de amplificación de ácidos nucleicos, la temperatura que se requiere para que las enzimas funcionen y su respectiva duración de la reacción.

Recientemente LAMP ha tenido un crecimiento en su uso debido a que se han desarrollado algunas presentaciones comerciales de la polimerasa *Bst*, las cuales están contenidas en soluciones colorimétricas, permitiendo observar la presencia de la secuencia a detectar (es decir, el ADN del patógeno) mediante un cambio de color en la solución, teniendo una forma sencilla de detección. Esto simplifica significativamente el diagnóstico molecular, ya que solo se necesita contar con un recipiente (baño agua) que mantenga la temperatura a 60°C durante 30 min y observar si la mezcla de reacción vira de rojo a amarillo, de esta forma podemos determinar la presencia o ausencia del ADN que se está buscando. Este tipo de técnicas habilitan la capacidad de hacer diagnóstico molecular de alta sensibilidad de forma oportuna sin necesidad de infraestructura costosa como lo son los laboratorios moleculares y de los equipos como los termocicladores.

RPA

La amplificación por recombinasa polimerasa o también llamada RPA, es de las técnicas isotérmicas más modernas, siendo desarrollada en 2006 por Olaf Piepenburg y colaboradores. Esta tecnología isotérmica utiliza al igual que la qPCR un par de cebadores específicos y complementarios a una región de ADN, pero la diferencia es que utiliza un conjunto de proteínas (una recombinasa, una proteína de unión a ADN, una proteína accesoria y una ADN polimerasa). La tecnología de RPA respecto a la temperatura de trabajo es la más atractiva debido a que se puede incubar a temperatura ambiente constante, porque el sistema es eficiente en un rango entre 20°C a 42°C (Piepenburg et al., 2006).

Normalmente las pruebas de RPA tienen una duración de 60 minutos para lograr la amplificación de los fragmentos de ADN y se han publicado una amplia variedad de pruebas basada en RPA para la detección de patógenos entre los que destacan SARS-CoV-2 (Zingg et al., 2023), ZIKV (Zika) (Wand et al., 2018) y *Mycoplasma bovis* (Li et al., 2021).

En cuanto a la revelación de los resultados de RPA, se han desarrollado diversas alternativas para la detección de muestras positivas a patógenos. Estas van desde metodologías tradicionales, como la electroforesis en gel de agarosa, hasta enfoques más recientes, como el uso de colorantes o intercaladores fluorescentes, que permiten la detección visual del patógeno sin necesidad de equipos especializados. La implementación de estas técnicas facilita el diagnóstico en prácticamente



Figura 2. Representación de un laboratorio de diagnóstico molecular en tiempos de pandemia (Imagen generada con inteligencia artificial).

cualquier lugar, sin requerir infraestructura costosa (Tan et al., 2022).

PERSPECTIVAS

La reciente pandemia de COVID-19 ha evidenciado la necesidad urgente de herramientas de diagnóstico accesibles y eficaces. Aunque la tecnología qPCR ha sido fundamental, su complejidad y costo limitan su disponibilidad en muchas regiones (Figura 2. Representación de un laboratorio en una pandemia). Las tecnologías de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos ofrecen una alternativa prometedora, con aplicaciones que van más allá de la detección de enfermedades infecciosas, abarcando también la identificación de enfermedades crónicas, cáncer, entre otras. Gracias a su bajo costo, simplicidad y portabilidad, estas tecnologías pueden ser implementadas en entornos con recursos limitados, como comunidades rurales o países en desarrollo. No obstante, su adopción enfrenta desafíos, entre ellos, asegurar la precisión y consistencia de los resultados en contextos diversos, así como fomentar su aceptación en los sistemas de salud locales. Si se superan estos retos, estas tecnologías podrían no solo revolucionar la respuesta a futuras crisis sanitarias, sino que abren el camino hacia un futuro de atención médica más equitativa y resiliente.

Literatura citada



- Becherer, L., Borst, N., Bakheit, M., Frischmann, S., Zengerle, R., Von Stetten, F., 2020. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) – review and classification of methods for sequence-specific detection. *Analytical Methods* 12, 717–746. <https://doi.org/10.1039/C9AY02246E>
- Clipper, B., 2020. The Influence of the COVID-19 Pandemic on Technology: Adoption in Health Care. *Nurse Lead* 18, 500. <https://doi.org/10.1016/j.MNL.2020.06.008>
- Compton, J., 1991. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature* 350, 91–92. <https://doi.org/10.1038/350091A0>
- Curtis, K.A., Morrison, D., Rudolph, D.L., Shankar, A., Bloomfield, L.S.P., Switzer, W.M., Owen, S.M., 2018. A multiplexed RT-LAMP assay for detection of group M HIV-1 in plasma or whole blood. *J Virol Methods* 255, 91–97. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.02.012>
- González-González, E., Lara-Mayorga, I.M., Rodríguez-Sánchez, I.P., Zhang, Y.S., Martínez-Chapa, S.O., Santiago, G.T., Alvarez, M.M., 2021. Colorimetric loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for cost-effective and quantitative detection of SARS-CoV-2: the change in color in LAMP-based assays quantitatively correlates with viral copy number. *Analytical Methods* 13, 169–178. <https://doi.org/10.1039/D0AY01658F>
- Kia, V., Tafti, A., Paryan, M., Mohammadi-Yeganeh, S., 2023. Evaluation of real-time NASBA assay for the detection of SARS-CoV-2 compared with real-time PCR. *Ir J Med Sci* 192, 723–729. <https://doi.org/10.1007/S11845-022-03046-2>
- Kurosaki, Y., Magassouba, N., Oloniniyi, O.K., Cherif, M.S., Sakabe, S., Takada, A., Hirayama, K., Yasuda, J., 2016. Development and Evaluation of Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) Assay Coupled with a Portable Device for Rapid Diagnosis of Ebola Virus Disease in Guinea. *PLoS Negl Trop Dis* 10, e0004472. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0004472>
- Li, R., Wang, Jinfeng, Sun, X., Liu, L., Wang, Jianchang, Yuan, W., 2021. Direct and Rapid Detection of *Mycoplasma bovis* in Bovine Milk Samples by Recombinase Polymerase Amplification Assays. *Front Cell Infect Microbiol* 11. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2021.639083>
- Mao, Z., Lei, H., Chen, R., Ren, S., Liu, B., Gao, Z., 2024. CRISPR/Cas13a analysis based on NASBA amplification for norovirus detection. *Talanta* 280. <https://doi.org/10.1016/j.TALANTA.2024.126725>
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H., 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1, 263–273. <https://doi.org/10.1101/SQB.1986.051.01.032>
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., Hase, T., 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 28. <https://doi.org/10.1093/NAR/28.12.E63>
- Piepenburg, O., Williams, C.H., Stemple, D.L., Armes, N.A., 2006. DNA Detection Using Recombination Proteins. *PLoS Biol* 4, e204. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.0040204>
- Smits, H.L., Van Gemen, B., Schukink, R., Van Der Velden, J., Tjong-a-hung, S.P., Jebbink, Maarten F., Ter Schegget, J., 1995. Application of the NASBA nucleic acid amplification method for the detection of human papillomavirus type 16 E6-E7 transcripts. *J Virol Methods* 54, 75–81. [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(95\)00032-P](https://doi.org/10.1016/0166-0934(95)00032-P)
- Tan, M., Liao, C., Liang, L., Yi, X., Zhou, Z., Wei, G., 2022. Recent advances in recombinase polymerase amplification: Principle, advantages, disadvantages and applications. *Front Cell Infect Microbiol* 12, 1019071. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2022.1019071/BIBTEX>
- Total COVID-19 tests, URL <https://ourworldindata.org/grapher/full-list-total-tests-for-covid-19?tab=table&facet=none&country=ECU~IND~IDN~ITA~SEN~NZL~MEX#explore-the-data> (accessed 10.24.24).
- Wand, N.I.V., Bonney, L.C., Watson, R.J., Graham, V., Hewson, R., 2018. Point-of-care diagnostic assay for the detection of Zika virus using the recombinase polymerase amplification method. *J Gen Virol* 99, 1012. <https://doi.org/10.1099/JGV.0.001083>
- Zingg, J.-M., Yang, Y.-P., Seely, S., Joshi, P., Roshid, M.H.O., Iribarren Latasa, F., O'Connor, G., Alfaro, J., Riquelme, E., Bernales, S., Dikici, E., Deo, S., Daunert, S., 2023. Rapid isothermal point-of-care test for screening of SARS-CoV-2 (COVID-19). *Aspects of Molecular Medicine* 1, 100002. <https://doi.org/10.1016/J.AMOLM.2023.100002>