

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD MEDICINA
ESCUELA DE CIENCIAS DE LA SALUD
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO



TRABAJO DE GRADO:

**ANÁLISIS DE LAS VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA
MEDIADA POR LOOP (LAMP) EN EL DIAGNÓSTICO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DE
DIFERENTES ENFERMEDADES TRANSMISIBLES, EN EL MES DE JULIO DE 2023**

PRESENTADO POR:

KEMELIN GRACIELA CARDOZA QUIJADA

PARA OPTAR AL GRADO DE:

LICENCIADO/A EN LABORATORIO CLÍNICO

ASESOR:

Msp. MIRIAM CECILIA RECINOS DE BARRERA

CIUDAD UNIVERSITARIA "DR. FABIO CASILLO FIGUEROA", EL SALVADOR, OCTUBRE, 2023

AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MSC. ROGER ARMANDO ARIAS

VICERRECTOR ACADÉMICO

PHD. RAÚL ERNESTO AZCÚNAGA LÓPEZ

VICERRECTOR ADMINISTRATIVO:

ING. JUAN ROSA QUINTANILLA

SECRETARIO/A GENERAL

ING. FRANCISCO ANTONIO ALARCÓN

AUTORIDADES DE LA FACULTAD DE MEDICINA

DECANA

MSC. JOSEFINA SIBRIÁN DE RODRIGUEZ

VICEDECANO

DR. SAUL DIAZ PEÑA

SECRETARIA

MSC. AURA MARINA MIRANDA DE ARCE

DIRECTOR DE ESCUELA

MSC. JOSÉ EDUARDO ZEPEDA AVELINO

DIRECTORA DE CARRERA

Msp. MIRIAM CECILIA RECINOS DE BARRERA

CONTENIDO

AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR.....	iv
AUTORIDADES DE LA FACULTAD DE MEDICINA.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	iv
RESUMEN.....	iv
INTRODUCCIÓN.....	iv
DESARROLLO.....	1
CONCLUSIONES.....	11
FUENTES DE INFORMACIÓN.....	12

AGRADECIMIENTOS

A Dios,

Por haberme bendecido durante toda la carrera con sabiduría y fuerza para lograr cumplir mi sueño de graduarme.

A mis padres,

Por haber sido mi apoyo incondicional, y enseñarme que con mucho esfuerzo nada es imposible, que los caminos más difíciles son los que conducen al éxito.

A mis hermanos,

Por siempre apoyarme y darme palabras de ánimo y aliento cada que pensaba en desistir y por ser mi ejemplo de superación.

A mi novio,

Que fue un apoyo incondicional durante el último año y el servicio social, y por ser la persona que siempre me animaba a ser buen profesional.

A mis docentes,

Por haber sido mis guías, y modelo a seguir, por haber transmitidos sus conocimientos y consejos que mejoraron mi calidad de profesional, que sin su ayuda realmente hubiese sido más difícil lograr finalizar la licenciatura.

Kemelin Graciela Cardoza Quijada

RESUMEN

Los países en vías de desarrollo suelen ser más frecuentes las enfermedades de tipo infeccioso debido a la cultura y a la carencia de medidas de higiene, por lo cual es indispensable contar con métodos de más efectivos y rápidos aplicables en laboratorios de 1er, 2do y 3er nivel. Hoy en día la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una de las más usadas en el país para el diagnóstico de virus y bacterias que no se pueden diagnosticar con métodos convencionales porque su sensibilidad o especificidad es muy baja, por lo que la convierte en una de las mejores herramientas, pero uno de las dificultades de la PCR y cualquiera de sus variantes, es que su uso es exclusivo en el Laboratorio de referencia y laboratorios de 3er nivel, debido a diversos requerimientos como: instalaciones adecuadas, equipos costosos y muy sofisticados, profesionales altamente capacitados, entre otros, además de que el tiempo de ejecución de la prueba suele demorarse de 24 a 48 horas aproximadamente. La Amplificación Isotérmica mediada por loop (LAMP) es una técnica relativamente nueva que promete mejorar el diagnóstico de biología molecular ya que al ser isotérmica, es decir que no requiere ciclos específicos de temperatura, no es necesario un termociclador, si no que con un simple baño maría se produce la amplificación de los ácidos nucleicos, que pueden ser evidenciados por diferentes como la turbidez que es visible a la simple vista o a través de ciertos colorantes. En resumen la LAMP promete ser un método de diagnóstico rápido, simple y aplicable en laboratorios menos especializados por sus pocos requerimientos para su ejecución.

Palabras Clave:

PCR, Isotérmica, ADN, Biología molecular, Bucle

ABSTRACT

In developing countries, infectious diseases tend to be more frequent due to culture and the lack of hygiene measures, which is why it is essential to have more effective and faster methods applicable in 1st, 2nd and 3rd level laboratories. . Nowadays, the Polymerase Chain Reaction (PCR) is one of the most used in the country for the diagnosis of viruses and bacteria that cannot be diagnosed with conventional methods because their sensitivity or specificity is very low, so the It becomes one of the best tools, but one of the difficulties of PCR and any of its variants is that its use is exclusive in the Reference Laboratory and 3rd level laboratories, due to various requirements such as: adequate facilities, expensive equipment. and very sophisticated, highly trained professionals, among others, in addition to the fact that the test execution time usually takes approximately 24 to 48 hours. Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) is a relatively new technique that promises to improve molecular biology diagnosis since being isothermal, that is, it does not require specific temperature cycles, a thermocycler is not necessary, but rather a A simple water bath produces amplification of nucleic acids, which can be evidenced by different types such as turbidity that is visible to the naked eye or through certain dyes. In summary, LAMP promises to be a rapid, simple and applicable diagnostic method in less specialized laboratories due to its few requirements for its execution.

Keywords:

PCR, Isothermal, DNA, Molecular biology, L

INTRODUCCIÓN

La biología molecular consiste en el estudio de la estructura, la función y la composición de los componentes moleculares de la vida. Se trata de una disciplina estrechamente relacionada con los campos de la bioquímica, la genética y la biología celular que se centra en las interacciones entre los distintos sistemas de una célula, la interrelación del ADN, el ARN y la síntesis de proteínas, y en cómo se regulan entre sí. Aunque existen muchos tipos de moléculas en cada ser vivo, los estudios de la biología molecular generalmente se centran en los genes y las proteínas. La razón es que estas últimas desempeñan una enorme diversidad de funciones en las células vivas y los genes contienen la información necesaria para fabricar más proteínas. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) fue creada hace más de 35 años, por el científico estadounidense Kary Mullis, cuyo trabajo lo condujo a la obtención del Premio Nobel de Química en 1993, momento que condujo a un cambio de rumbo de la biología molecular. Sus aplicaciones son diversas e impactan diferentes áreas de las ciencias biológicas. La biología molecular ha tomado un papel esencial en el diagnóstico de enfermedades infecciosas, esto se debe a que se detectan microorganismos que no pueden ser diagnosticados con técnicas convencionales de laboratorio. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la técnica más importante de la biología molecular debido a que permite obtener in vitro millones de copias de un fragmento de ADN a partir de una sola molécula, es por ello que se han desarrollado diferentes tipos PCR a lo largo de estos últimos años. La PCR cuenta con diversas ventajas como su sensibilidad, especificidad y rapidez.

En el año 2000, T. Notomi y colaboradores, publicaron un estudio sobre una nueva prueba molecular llamada LAMP, que consiste en la amplificación de ácidos nucleicos en condiciones isotérmicas (proceso mediante el cual la temperatura se mantiene constante). La técnica de Amplificación Isotérmica mediada por bucle o LAMP, al igual que la PCR, tiene la capacidad de amplificar fragmentos específicos de ADN, lo que permite la detección altamente sensible de patógenos. La reacción LAMP es isotérmica, se realiza a una misma temperatura, lo que constituye una importante ventaja sobre la PCR, reduciendo su costo al no ser necesario el uso de equipos sofisticados, entre otras de las ventajas de esta técnica nueva, es que permite amplificar el ADN del microorganismo patógeno al punto de permitir su visualización directa, a través de su reacción en donde se liberan pirofosfatos que causan turbidez. La LAMP ha llamado mucho la atención como un nuevo método de amplificación de ADN potencialmente rápido, preciso y rentable

para la detección de microorganismos, esta se ha utilizado con éxito para detectar enfermedades virales como: Virus del Nilo Occidental, Coronavirus, Norovirus, Virus de la influenza aviar, Virus la fiebre aftosa, Virus la peste porcina clásica, Virus de la enfermedad de Newcastle, Virus de la anemia del pollo, también ha sido utilizada para el diagnóstico de enfermedades bacterianas causadas por *Mycobacterium tuberculosis*, *Burkholderia pseudomallei*, *Shigella spp.*, *Escherichia coli*, *Brucella spp.*, entre otros. Adicionalmente se ha desarrollado esta técnica para parásitos patógenos como *Babesia gibsoni*, *Plasmodium spp.*, *Leishmania spp.* La importancia de analizar las ventajas y desventajas de la LAMP en contraste de la PCR radica en comparar cuál de estas se acopla mejor a los recursos y necesidades de diagnóstico en un laboratorio de biología molecular. En los países subdesarrollados, la población está predispuesta a contraer enfermedades infecciosas ocasionadas por microorganismos, en dichos países es muy difícil contar con los recursos necesarios para el buen diagnóstico clínico, además las técnicas utilizadas actualmente de biología molecular, como los diferentes tipos de PCR, si bien son muy sensibles y específicas tienen un costo elevado, sumado a que los resultados no se emiten de forma tan rápida y a que solo se realizan exclusivamente en laboratorios especializados con personal altamente capacitado, lo cual es un gran inconveniente en países en vías de desarrollo, es por eso que la PCR LAMP es una herramienta útil para el diagnóstico de patógenos. En la pandemia de Covid-19 en el Instituto Pasteur de Montevideo junto con la Facultad de Ciencias y Facultad de Química de la Universidad de la República desarrollaron esta técnica para el diagnóstico de Coronavirus, lo cual fue de gran ayuda debido a que los resultados estaban listos en 25 minutos en comparación de las 24 a 48 horas de una PCR, los estudios dictan a que también se podrá utilizar para la detección del virus del Zika y Chikungunya.

La LAMP a pesar de contar con varias ventajas mencionadas anteriormente en comparación de los diferentes tipos de PCR, no podría llegar a sustituirla debido a que la LAMP no es útil para la clonación o muchas otras aplicaciones de biología molecular en la que la PCR se hace indispensable. Debido a que LAMP usa 4 (o 6) cebadores dirigidos a 6 (u 8) regiones dentro de un segmento bastante pequeño del genoma, y debido a que el diseño de cebadores está sujeto a numerosas restricciones, es difícil diseñar conjuntos de cebadores para LAMP "a simple vista". Paquetes de software comerciales de código abierto son generalmente usados para realizar el diseño de los cebadores LAMP, aunque las limitaciones del diseño del cebador en comparación con la PCR significan que hay menos libertad con LAMP para elegir el sitio diana.

PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se considera una de las técnicas más sensibles y específicas de las pruebas moleculares. Fue desarrollada en 1986 por el Dr. Kary Mullis, en los laboratorios de CETUR Corporation, en Estados Unidos, lo que le hizo valedor del premio Nobel en 1993. La idea se fundamentó en la necesidad de obtener un gran número de copias de fragmentos específicos de ADN de manera rápida y económica, los cuales no podían obtenerse por otros métodos hasta ese momento. Esta técnica se basa en una replicación exponencial *in vitro* de una molécula de ADN genómico (ADNg) o ADN complementario (ADNc), mediante ciclos repetitivos, que constan de tres temperaturas. En cada uno de los ciclos las moléculas se duplican hasta que los reactivos se agotan. La longitud del producto amplificado la delimitan los iniciadores, también llamados primers u oligonucleótidos, de cuyo diseño adecuado depende el éxito de la PCR. Los iniciadores deben ser específicos, no formar estructuras secundarias entre ellos ni hibridaciones inespecíficas entre ellos u otra parte de la cadena.

Características de la amplificación *in vitro* y requerimientos necesarios para la PCR

La amplificación *in vitro* de la PCR se apega a las mismas reglas de la replicación; esto es, se basa en una secuencia que le sirve de molde y, por complementariedad, sintetiza la cadena antiparalela. También, la síntesis de la cadena sigue la dirección 5-3, ya que requiere de un nucleótido con el extremo 3 libre que proporcione el grupo OH para la adición del siguiente nucleótido, con lo que se forma el enlace fosfodiéster. Para que se lleve a cabo la PCR se requiere una cadena de ADNg o ADNc que sirva de molde, una enzima ADN polimerasa, cofactores necesarios para la actividad correcta de la ADN polimerasa, desoxinucleótidos (dNTP) para la síntesis del producto de PCR y oligonucleótidos o primers.

1. ADN polimerasa

En la actualidad, la Taq ADN polimerasa es la enzima más empleada para la PCR; tiene como función polimerizar una nueva cadena de ADN tomando como molde otra ya existente. Debido a que en cada ciclo de la PCR se lleva la mezcla de reacción a temperaturas de 95°C, se requiere de una ADN polimerasa capaz de soportar dichas temperaturas. Anteriormente, esta necesidad se suplía con la adición *de E. coli* en cada ciclo de la ADN polimerasa, que se inactivaba con la temperatura de 95°C, por lo que debía suplementarse de nuevo después de cada paso de desnaturalización (95°C). Sin embargo, el descubrimiento de bacterias habitantes de los géiser, que viven a temperaturas alrededor del punto de

ebullición del agua, permitió el aislamiento de la Taq polimerasa de la bacteria *Thermophilus aquaticus*. Con ello, la técnica pudo hacerse más eficiente, pues dicha enzima soporta los 95°C, y la cantidad inicial de enzima añadida a la reacción es suficiente como para suplementar los 25 a 40 ciclos de amplificación. La concentración de Taq polimerasa que se recomienda es de 1 a 2.5 U/reacción de PCR, y su tasa de error en la incorporación de bases es de 4×10^{-4} . Esta enzima es capaz de polimerizar un promedio de 1000 nt/minuto.

2. ADN molde

Para la PCR teóricamente se requiere de una sola molécula, cuya secuencia sirva de molde para la amplificación, ya sea de ADN o de ADNg. El ADN se puede obtener de cualquier muestra biológica, y la mayoría de las técnicas de extracción de ácidos nucleicos proveen de moléculas de calidad adecuada para realizar la PCR. Si se quiere amplificar ARN, antes de la PCR se requiere realizar una reacción previa: la retrotranscripción, que permite convertir el ARN en ADNc, menos lábil que una cadena de ARN (cabe recordar que la inestabilidad molecular del ARN es elevada por la presencia del grupo OH en el carbono 2 de la ribosa). El ADNc puede manejarse, entonces, con mayor facilidad. Las técnicas actuales empleadas en la PCR permiten realizar la amplificación a partir de 300 ng de ADN genómico, o bien desde 25 a 100 ng en el caso de ADNc o ADN proveniente de genes clonados en vectores. Es importante aclarar que en el caso de la amplificación de ADNc obtenido por retrotranscripción a partir de ARN, durante los primeros ciclos de la PCR se realiza la síntesis de la cadena complementaria del ADNc, lo que permitirá la amplificación de la secuencia como ADN de doble cadena (ADNds) en los ciclos posteriores de la PCR.

3. Desoxinucleótidos

Para que la polimerasa lleve a cabo su función necesita que existan desoxinucleótidos (dNTP: dATP, dCTP, dGTP, dTTP) en la mezcla de reacción para poder sintetizar la nueva hebra del ADN. Los desoxinucleótidos libres, cuando no forman cadenas de ácidos nucleicos, se encuentran en su forma trifosfatada, estructura molecular necesaria para su estabilidad y para proporcionar el grupo fosfato con el que se formará el enlace fosfodiéster en la unión nucleótido nucleótido. Los desoxinucleótidos trifosfatados deben adicionarse en una concentración óptima de entre 50 y 200 μ M, cantidad suficiente para sintetizar de 6.5 a 25 μ g de ADN. Cantidades mayores de 200 μ M pueden producir incorporaciones erróneas, mientras que concentraciones menores de 50 μ M se consideran insuficientes para una síntesis adecuada.

4. Amortiguador

La solución amortiguadora proporciona el pH y concentraciones de sales adecuadas para la correcta función de la ADN polimerasa. Este buffer maneja un pH de 8.4 y está compuesto por Tris-HCl y KCl.

5. Cloruro de magnesio

El magnesio actúa como cofactor de la ADN polimerasa y se suplementa a una concentración de entre 1.0 y 2.5 mM. Esta concentración debe optimizarse de manera experimental para cada PCR, ya que un exceso de magnesio produce una amplificación inespecífica de productos de PCR, mientras que una baja concentración disminuye la producción del amplificado.

6. Iniciadores

El diseño adecuado de los iniciadores es la clave del éxito de una PCR. Estos oligonucleótidos, con secuencia específica, se utilizan para reconocer por complementariedad secuencias blanco en el ADN molde. En la PCR convencional, se usa un par de iniciadores para delimitar los extremos del producto que se desea amplificar. Su función radica en proporcionar un extremo 3' libre al que se han de añadir los nucleótidos consecutivos mediante enlace fosfodiéster, ya que la ADN polimerasa requiere iniciar la síntesis partiendo de un 3'OH preexistente. A partir de ellos, la ADN polimerasa inicia la polimerización en dirección 5'-3'. Los iniciadores reciben el nombre de sentido y antisentido, según la secuencia a la que dan origen. El iniciador sentido es complementario y antiparalelo a la cadena 3'-5' del ADN molde, por lo que la polimerasa, al adicionar nucleótidos en él, origina una cadena sentido (5'-3'). En cambio, el PRIMER antisentido es complementario y antiparalelo a la cadena 5'-3', por lo que su polimerización originará la cadena 3'-5'. En la PCR la concentración óptima de los iniciadores es de 0.3 a 1 μM /reacción, ya que un exceso favorecería la formación de dímeros entre dos primers parcialmente complementarios, o bien de estructuras secundarias por complementariedad parcial de un primer con el mismo.

Esquema de la PCR

1. Inicio de la desnaturalización.

2. Ciclos de amplificación.

-Temperatura de desnaturalización.

-Temperatura de alineamiento.

-Temperatura de extensión.

3. Amplificación final.
4. Almacenamiento temporal.

Estos pasos se llevan a cabo mediante el cambio automático de temperaturas en un equipo diseñado para este fin denominado termociclador: es el equipo en el cual se realiza la PCR. Es capaz de cambiar la temperatura de la muestra en cuestión de segundos, lo que por lo general se logra mediante calentamiento/enfriamiento por resistencia eléctrica de una placa metálica, que distribuye la temperatura de manera homogénea durante tiempos programados en el rango de segundos a minutos. Normalmente los rangos de temperatura que abarca el equipo van de 4 a 96°C. Dado que las PCR que se incuban son soluciones acuosas, los equipos cuentan con una placa metálica a manera de tapa, la cual se mantiene a 103°C para evitar la condensación del agua en las tapas de los tubos donde ocurre la reacción. De esta manera, se evita que la concentración de los solutos se modifique, lo que alteraría las condiciones óptimas para la ADN polimerasa y la termodinámica de hibridación de los primers. Para el enfriamiento se generan flujos de aire frío, lo que permite descensos de temperatura relativamente rápidos.

Inicio de la desnaturalización

Es necesaria una temperatura de 95°C para la desnaturalización de la doble cadena de ADN, en el caso del ADN genómico, o el rompimiento de estructuras secundarias, en el ADNc. Esta temperatura se mantiene por cinco minutos al inicio de la PCR.

Ciclos de amplificación

Un ciclo típico de PCR convencional consta de las tres temperaturas siguientes:

- 95°C: desnaturalización por unos 30 segundos.
- 55 a 60°C: alineación por 30 a 40 segundos.
- 72°C extensión, según la longitud del producto que se va a amplificar, considerando la adición de 1000 nucleótidos en 60 segundos.

Este ciclaje de temperatura se repite continuamente por 30 a 35 ocasiones. Cada temperatura cumple con una función específica.

- **Desnaturalización**

Se realiza a 95°C y tiene como objetivo desnaturalizar la doble cadena de ADN y/o destruir las estructuras secundarias del ADN, lo que permite el acceso de los primers a la cadena molde en sus secuencias complementarias. Esta temperatura se mantiene por 30 segundos.

- **Alineación**

En esta fase, la temperatura se encuentra en un rango entre 55 y 60°C, en el cual la mayoría de los iniciadores hibridan; esto es, se genera la energía cinética necesaria para que los iniciadores busquen en las cadenas de ADN su secuencia complementaria y formen los puentes de hidrógeno con la cadena molde, dejando el extremo 3OH disponible y listo para la adición de los nucleótidos consecutivos por la ADN polimerasa.

- **Extensión**

Se produce a la temperatura óptima para el funcionamiento de la ADN polimerasa empleada, por lo que dependerá ésta para la PCR. En el caso de la Taq polimerasa, la más utilizada es de 72°C.

- **Amplificación final**

Una vez terminados los ciclos designados para la PCR, la temperatura de extensión (72°C) se mantiene por cinco minutos, lo que permite que la polimerasa termine la extensión de los productos a los cuales se encuentra unida.

- **Almacenamiento temporal**

Durante la programación de los ciclos de la PCR se programa también un ciclo final de 4°C por varias horas, lo que permite conservar los productos de PCR hasta que se retiren los tubos de reacción del equipo.

Amplificación Isotérmica mediada por bucle (LAMP por sus siglas en inglés)

El método LAMP está basado en el principio de síntesis de ADN por desplazamiento de cadena, el cual es llevado a cabo por una polimerasa con alta actividad de desplazamiento de cadena y un sistema de dos cebadores internos y dos cebadores externos para reconocer un total de seis secuencias distintas en el ADN blanco¹⁶. Desde su publicación en el año 2000, varios métodos LAMP se han desarrollado para la identificación de virus, bacterias, protozoos y hongos.

En los pasos iniciales de la reacción de LAMP, se utilizan los cuatro cebadores, pero cuando se completa un ciclo de la reacción solo los cebadores internos son usados para la síntesis de ADN. Los cebadores internos se denominan Forward Inner Primer (FIP) y Backward Inner Primer (BIP), respectivamente, y cada uno contiene dos secuencias distintas que corresponden a las secuencias sentido y antisentido del ADN blanco, uno para cebar en la primera etapa y el otro para auto-cebarse en etapas posteriores. Las secuencias (23-24 nucleótidos típicamente) dentro de ambos extremos de la región blanco para la amplificación en un ADN son denominadas F2c y B2, respectivamente. Dos secuencias internas (23-24 nucleótidos típicamente) a 40 nucleótidos de los extremos de F2c y B2 son designadas F1c y B1 y dos secuencias (17-21 nucleótidos) externas a los extremos de F2c y B2 son denominadas F3c y B3. Las secuencias de FIP y BIP son diseñadas así: FIP contiene F1c, un espaciador de TTTT y la secuencia F2 complementaria a F2c. BIP contiene la secuencia B1c complementaria a B1, un espaciador de TTTT y a B2. Los dos cebadores externos consisten en B3 y la secuencia F3 complementaria a F3c.

Una muestra de ADN que contiene la secuencia blanco y los cuatro cebadores se desnaturaliza con calor y rápidamente se enfría en hielo. La reacción de LAMP se inicia después por la adición de un fragmento considerable de ADN polimerasa Bst (*Bacillus stearothermophilus*) y es llevada a 65°C durante una hora.

El cebador interno FIP se une a F2c en el ADN blanco e inicia la síntesis de la hebra complementaria. El cebador externo F3, que es unas pocas bases más cortas y está en menor concentración que FIP, lentamente se une a F3c en el ADN blanco e inicia la síntesis de ADN por desplazamiento de la hebra. Al liberar una cadena complementaria unida a FIP, puede formar una estructura enrollada (en

bucle, crespo o asa; del inglés, loop) en un extremo. Esta hebra sencilla de ADN sirve como molde para la síntesis de ADN iniciada por BIP y la subsiguiente síntesis de ADN por desplazamiento de la hebra a partir del cebador B3 originando la producción de un ADN en forma de doble asa (dumb-bell), que es rápidamente convertida a una forma de bucle en tallo (stem loop) por la síntesis de ADN del autocebador. A continuación, esta forma sirve de inicio para los ciclos de LAMP, la segunda etapa de la reacción de LAMP.

Para iniciar los ciclos de LAMP, FIP se une a la estructura en herradura de ADN y se inicia la síntesis por desplazamiento de la hebra, lo que genera una separación intermedia en la estructura en herradura de ADN con una copia invertida adicional de la secuencia blanco en la base y un asa o bucle formada en el extremo opuesto a través de la secuencia BIP. Posteriormente, la síntesis de ADN por desplazamiento de la hebra produce una estructura complementaria a la herradura de ADN original y un ADN en herradura reparado con una base elongada dos veces (hasta el doble de copias de la secuencia blanco) y un bucle en el extremo opuesto. Ambos productos sirven luego como molde para un cebador BIP en los ciclos siguientes de la reacción por desplazamiento de la hebra, de los cuales, una parte es denominada elongación y reciclaje. Así, la secuencia original de LAMP es amplificada tres veces cada medio ciclo. Los productos finales son una mezcla de ADN en herradura con diferentes longitudes en su tallo y con estructuras similares a una coliflor con múltiples bucles formados por la unión entre repeticiones invertidas alternativas de la secuencia blanco en la misma cadena.

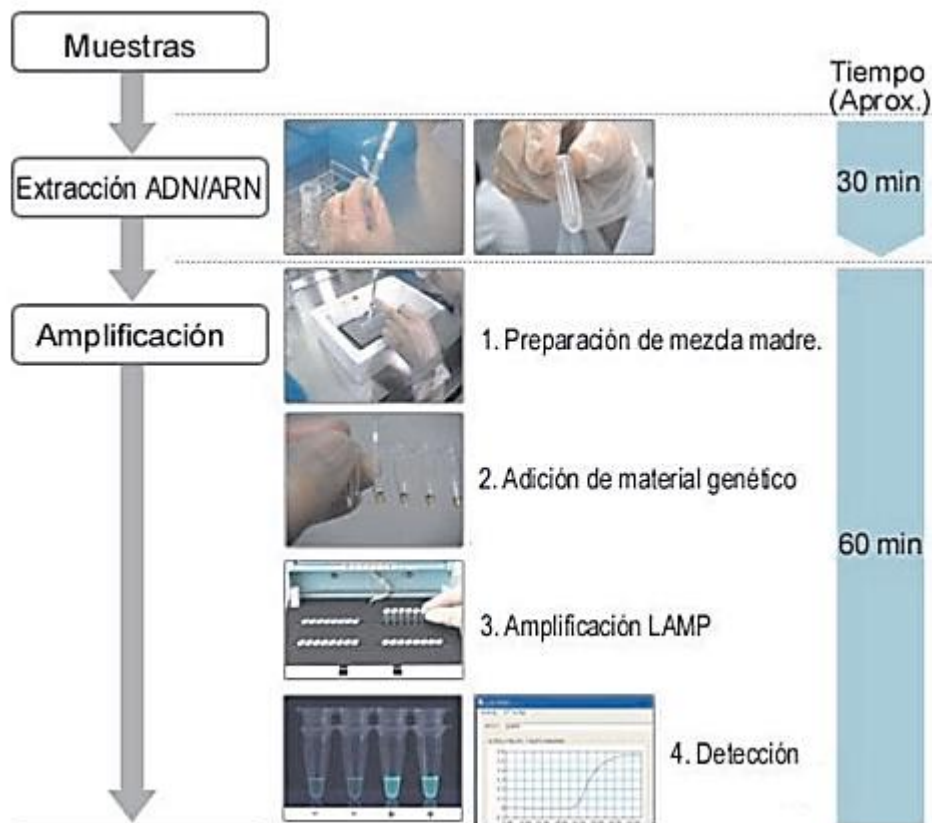
El uso de cuatro cebadores (reconocimiento de seis secuencias diferentes) en las etapas iniciales de LAMP y dos cebadores (reconocimiento de las cuatro secuencias) durante los siguientes pasos garantiza alta especificidad para la amplificación. Por lo tanto, se espera que la selectividad del blanco sea superior a las obtenidas por PCR y SDA (del inglés, Strand displacement amplification).

1. Procedimientos estándares de LAMP

Los procedimientos estándares de LAMP son básicamente tres:

1. Extracción del ADN o del ARN, según el agente infeccioso presente en la muestra (sangre, secreción, cultivo, etc.)
2. Amplificación del ácido nucleico
3. Detección del ácido nucleico presente por inspección visual directa (con fluorescencia) o con turbidímetro en tiempo real.

LAMP genera estructuras de alto peso molecular que contienen hasta 10⁹ copias del blanco. Procedimientos estándares de LAMP.



VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LAMP

VENTAJAS	DESVENTAJAS
<p>Alta capacidad diagnóstica: en varios estudios realizados el método LAMP ha sido altamente sensible, específico y extremadamente rápido en el diagnóstico molecular de infecciones. La técnica es altamente específica para la secuencia de interés, lo cual es atribuible al reconocimiento de la secuencia blanco en seis sitios independientes con cuatro cebadores</p>	<p>La baja concentración de ADN molde disminuye la eficacia del reconocimiento de los cebadores, lo cual puede causar retraso en el tiempo del umbral de detección.</p>
<p>Amplificación isotérmica: una característica de LAMP es su capacidad de amplificar ácidos nucleicos bajo condiciones isotérmicas a temperaturas entre 60 y 65°C. La eficacia de la amplificación del método LAMP es extremadamente alta debido en parte a su naturaleza isotérmica, pues no se pierde tiempo para realizar el cambio térmico y la reacción se puede conducir en la temperatura óptima para el funcionamiento de la enzima⁴⁸. Esta característica exige solo un bloque de calentamiento o baño maría.</p>	<p>Aunque LAMP es un método eficaz en la amplificación de ADN viral, la observación de la turbidez es menos sensible que la visualización de los productos en gel de agarosa y teñidos con bromuro de etidio. Sin embargo, en comparación con la electroforesis en gel de agarosa, la prueba de turbidez permite una reducción en el tiempo de operación y</p>
<p>Rapidez, bajo costo y facilidad de aplicación: LAMP no requiere de la extracción de ADN que desperdicia tiempo y aumenta los costos, tampoco utiliza equipos sofisticados como el termociclador. Las reacciones de amplificación de LAMP se realizan entre 35 y 60 minutos. La amplificación máxima ocurre en menos de una hora. No requiere desnaturalización. Además, el molde de ADN se prepara por tratamiento directo con calor constante de las muestras de sangre.</p>	<p>El método LAMP genera mucho ADN y, por lo general, los tubos positivos no deben abrirse después de la prueba para evitar la contaminación del laboratorio.</p>
<p>Inspección visual y cuantificación: uno de los hechos atractivos de la prueba LAMP es su capacidad para</p>	

<p>generar una gran cantidad de precipitado blanco de pirofosfato de magnesio en una reacción positiva.</p>	
<p>Menor inhibición: los inhibidores en sangre pueden afectar seriamente la amplificación del ADN en los análisis por PCR. No se sabe, sin embargo, por qué estos inhibidores de PCR tienen poco impacto en las reacciones de LAMP; se sospecha que la ADN polimerasa Bst usada en las reacciones de LAMP es más resistente⁶³. Se ha informado que LAMP tolera mejor que la PCR los componentes de los medios de cultivo y las sustancias biológicas.</p>	
<p>A diferencia de la técnica de PCR, que a menudo requiere una preparación previa de la muestra, el RT-LAMP puede llevarse a cabo en una amplia variedad de muestras, incluyendo muestras clínicas, ambientales y de alimentos, sin la necesidad de una preparación previa compleja.</p>	

CONCLUSIONES

Con respecto al informe se concluye que:

1. El costo de cualquier tipo de PCR y sus variantes es muy elevado, por lo que no es un tipo de prueba que se pueda realizar en cualquier nivel de laboratorio en el país.
2. Si bien es cierto que la PCR es muy sensible y específica, la Amplificación Isotérmica mediada por Loop cuenta con muchas ventajas por su sencillez y rapidez al realizarse, además de que su costo es más bajo al no requerirse equipos tan complejos como en la PCR.
3. En unidades de salud, la LAMP podría ser de gran ayuda para el diagnóstico de enfermedades infecciosas, con baja sensibilidad en sus métodos de diagnósticos convencionales, ya que al no ser compleja y al no requerirse equipos sofisticados ni personal altamente capacitado se vuelve una de las mejores opciones.
4. Una de las desventajas de la LAMP es que a diferencia de la PCR, es que en el caso de las muestras positivas, no es posible realizar la secuenciación del agente patógeno.
5. Además con las muestras positivas es de tener mucho cuidado, no deben destaparse ya que se contaminaría el laboratorio por la gran magnitud de ADN que se amplificó.

FUENTES DE INFORMACION

1. B, M. I.-F. (2014). *lamp para detección de plasmodium . Amplificación isotérmica de ácidos nucleicos tipo LAMP para la detección de Plasmodium: nueva técnica diagnóstica*, 160-166.
2. Contreras, J. (14 de Marzo de 2023). *Amunet Laboratorio*. Obtenido de Amunet Laboratorio: <https://www.amunet.com.mx/rt-lamp-es-equiparable-al-pcr/#:~:text=A%20diferencia%20de%20la%20t%C3%A9cnica,de%20una%20preparaci%C3%B3n%20previa%20compleja>.
3. Diz Mellado, O. M. (2020). *TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR EN EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS*. Npuno.
4. Garrido, P. (2016). *TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR BUCLE O LAMP. VENTAJAS EN EL DIAGNÓSTICO SANITARIO*. 11-13.
5. Gutiérrez, Ó. F. (13 de Julio de 2020). *PCR: historia de una Revolución biomédica*. Obtenido de SAVALnet: https://www.savalnet.cl/mundo-medico/reportajes/pcr-historia-de-una-revolucion_biomedica.html
6. Johnson, E. W. (23 de Mayo de 2023). *3stres3.com*. Obtenido de 3stres3.com: https://www.3tres3.com/latam/articulos/metodo-lamp-%C2%BFuna-alternativa-a-la-pcr-sencilla-rapida-y-economica_15342/
7. Kelly J. Domesle, S. R. (20 de Mayo de 2020). *Jove Journal* . Obtenido de Jove Journal : <https://www.jove.com/es/t/61239/loop-mediated-isothermal-amplification-for-screening-salmonella?language=Spanish>
8. Leidy Hurtado, D. D. (31 de Octubre de 2022). *National Library of Medicine*. Obtenido de National Library of Medicine: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9683688/>
9. Maestre, M. I.-F. (21 de Marzo de 2008). *Amplificación isotérmica de ácidos nucleicos tipo LAMP para la detección de Plasmodium: nueva técnica diagnóstica*. Obtenido de Amplificación isotérmica de ácidos nucleicos tipo LAMP para la detección de Plasmodium: nueva técnica diagnóstica: [chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgclefindmkaj/https://biblat.unam.mx/hevila/MedicasUIS/2008/vol21/no3/4.pdf](https://biblat.unam.mx/hevila/MedicasUIS/2008/vol21/no3/4.pdf)
10. UMSA, E. d. (30 de Julio de 2014). *SciELO - Scientific Electronic Library Online*. Obtenido de SciELO - Scientific Electronic Library Online: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2310-02652014000100014