



Amplificación isotérmica mediada por LOOP (LAMP) de ácidos nucleicos en el diagnóstico clínico

SÁNCHEZ, EDWIN¹

NINA, MARITZA¹

AGUIRRE, PAMELA¹

ARCE, MAYRA¹

TORO, NEYDA¹

VILELA, RODRIGO¹

FECHA DE RECEPCIÓN: 16 DE ABRIL DE 2014

FECHA DE ACEPTACIÓN 30 DE JULIO DE 2014

Resumen

A medida que va desarrollando la tecnología, los microorganismos también van aumentando su capacidad de virulencia haciéndose más resistentes a los antibióticos de última generación; pruebas de rutina como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) son herramientas que nos ayudan en el diagnóstico clínico, pero una de las principales desventajas es su alto costo debido al equipamiento que usa y su larga duración en que esta puede entregar resultados. Para ello es recomendable usar métodos rápidos, sensibles y específicos que nos ayuden en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. Un novedoso método que actualmente se usa en países desarrollados es la Amplificación Isotérmica Mediada por Loop (LAMP) de Ácidos Nucleicos. LAMP brinda resultados en

Abstract

As technology develops, the microorganisms are also increasing their ability to become more virulent antibiotic resistant generation; routine tests Polymerase Chain Reaction (PCR) are tools that help us in the clinical diagnosis but a major disadvantage is its high cost due to equipment using the length and where it can deliver results. It is therefore advisable to use rapid, sensitive and specific methods to help us in the diagnosis of infectious diseases. A novel method currently used in developed countries is Mediated Isothermal Amplification Loop (LAMP) Nucleic Acids. LAMP provides results in less time with high sensitivity and specificity, thus necessitating a water bath operating at a single temperature of 60°C to 65°C, 4 and 6 primers at least maximum all highly specialized, DNA polymerase is

¹ Estudiantes de 4to año de la Carrera de Bioquímica FCFB - UMSA

menor tiempo con alta sensibilidad y especificidad, necesitando así de un baño maria que funciona a una sola temperatura entre 60°C a 65°C, 4 cebadores como mínimo y 6 como máximo todos ellos altamente especializados, la DNA polimerasa es la Bst polimerasa la cual tiene actividad desplazante de cadena que proviene de *Bacillus stearothermophilus*; en caso de amplificar RNA se hace uso de una transcriptasa reversa; los resultados pueden ser vistos a simple vista debido a la turbidez que forma después de la reacción, también se pueden usar reactivos como la calceína (método visual por fluorescencia), CYBR green, que dan cierta coloración cuando la reacción se torna positiva. Los países que están en vías de desarrollo son los que más sufren de infecciones por microorganismos, una de las causas se da por la pobreza y mala alimentación siendo así LAMP una buena opción para incorporar como pruebas de rutina en el laboratorio debido a su bajo costo y a su simplicidad en cuanto a equipos.

the Bst polymerase activity which is displacing string comes from *Bacillus stearothermophilus*; in case of amplifying RNA using a reverse transcriptase is made; the results can be seen with the naked eye due to haze that forms after the reaction, can also be used as reagents calcein (fluorescence visual method), CYBR green, giving a coloration when the reaction becomes positive . Countries that are developing are the worst sufferers of microorganism infections, one of the reasons given by poverty and poor diet and LAMP still a good option to incorporate as routine tests in the laboratory due to it's low cost and simplicity in terms of equipment

PALABRAS CLAVE

amplificación, isotérmica, LAMP, cebador, loop, enfermedades infecciosas

KEY WORDS

amplification, isothermal, LAMP, primer, loop, infectious diseases

INTRODUCCIÓN

La desventaja de los países en vías de desarrollo, es que las personas están predisuestas a contraer enfermedades infecciosas ocasionadas por microorganismos esto debido a la mala alimentación, la pobreza, el alcoholismo, las drogas. En estos países es muy difícil tener los equipamientos de última generación para el buen diagnóstico clínico.

Las pruebas de rutina como el cultivo y la microscopia siguen siendo métodos tradicionales que se usan en el laboratorio, si bien nos brindan resultados confiables estos lo hacen en un tiempo muy extenso. Además existen patógenos que no se los puede cultivar y si se puede tienen un desarrollo muy lento lo cual hace que se limite el diagnóstico.

La observación directa de los microorganismos (parásitos, bacterias, hongos) por microscopía es con frecuencia empleado como método de diagnóstico rápido y sencillo. La robustez y relación costo - eficiencia de las pruebas

microscópicas hacen que sean aceptables para su uso incluso en laboratorios con recursos limitados en los países en desarrollo. Sin embargo, la poca sensibilidad de la prueba puede llegar a tener consecuencias muy graves; la infección viral también ha sido diagnosticada por cultivo selectivo, seguida por la observación en microscopía electrónica. Un gran inconveniente es el tiempo que tarda y por ende inicio tarde del tratamiento. De acuerdo con ello se requieren métodos de diagnósticos rápidos, sensibles y específicos que ayuden al buen diagnóstico.

Métodos moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), Reacción en Cadena de la Ligasa (LCR), Amplificación Basada en Secuencias de Ácidos Nucleicos (NASBA), y Amplificación por Desplazamiento de Cadena (SDA) se comercializan en forma de kits y es introducido en el diagnóstico de rutina lo cual brinda una mayor garantía de obtener buenos resultados. (Yasuyoshi Mori, Tsugunori Notomi 2009).

En el año 2000, Notomi y colaboradores, publicaron un estudio sobre una nueva prueba molecular llamada LAMP, que consiste en la amplificación de ácidos nucleicos en condiciones isotérmicas. El protocolo de laboratorio para aplicar LAMP acaba de ser examinado y los autores insisten en que, como la señal química de reconocimiento es altamente sensible, el sistema permite la discriminación visual de resultados sin equipos especializados costosos. La empresa Eiken Chemical Company, Ltd. es líder actual en la tecnología de LAMP. (Arroyo, M. I. et al. 2008)

PROPIEDADES DE LAMP

Amplificación Isotérmica Mediada por loop (LAMP) de ácido nucleico amplifica el DNA blanco con alta especificidad, eficacia y rapidez bajo condiciones isotérmicas, que se lleva a cabo a una temperatura constante (entre 60 °C - 65 °C), utiliza una Bst polimerasa con actividad desplazante de cadena. En la tabla N° 1 se muestran las propiedades de LAMP.

Tabla n° 1
Propiedades del método LAMP

Simplicidad	Amplificación isotérmica en un solo paso Detección visual de productos amplificados
Rapidez	Resultados de las pruebas finales entre 15 a 60 minutos
Especificidad	Uso de 4 cebadores que reconocen 6 regiones distintas del DNA blanco Amplificación -Resultados positivos de la prueba
Rentabilidad	No requiere ningún reactivo especial y equipo sofisticado
Productos amplificados	Cantidad extremadamente grande (109-1010 veces dentro de 15 a 60 minutos) Diversos tamaños de las estructuras de repeticiones invertidas de forma alterna de la secuencia diana en el misma cadena
Amplificación de RNA	Amplificación isotérmica de RNA en un solo paso con sólo añadir la transcriptasa inversa

(Fuente de la información anterior: Eiken Chemical Co., Ltd. LAMP folleto)

La principal ventaja de LAMP en comparación de la PCR y otros métodos de amplificación de ácidos nucleicos es que no requiere termocicladores, ya que puede llevarse a cabo en dispositivos de calefacción simples tales como baño maria o bloque de calor de laboratorio. (Oriol M. M. Thekisoie and Noboru Inoue 2011). En la tabla N° 2 se muestran las diferencias que tiene LAMP con otros métodos que también son usados en el diagnóstico clínico.

Tabla n° 2:
Comparación entre diversas tecnologías de amplificación de ácido nucleico

Tecnologías isotérmicas de Amplificación de Ácidos Nucleicos

Propiedades de varios métodos isotérmicos de amplificación incluyendo PCR

Técnica	PCR	NASBA	SAMART	SDA	RCA	LAMP	HDA	SPIA
1. Amplificación de ADN	+	+	+	+	+	+	+	+
2. Amplificación de ARN	+	+	+	+	+	+	+	+
3. Temperatura °C	94, 55-60, 72	37-42	41	37	38	60-65	TA, 37, 60-65	45. 50
4. No de enzimas	1	2 a 3	3 a 3	2	1	1	2	3
5. Diseño de cebadores	Sencillo	Sencillo	Complejo	Complejo	Sencillo	Complejo	Sencillo	Sencillo
6. Amplificación multiplex	+	+	-	-	+	-	+	-
7. Detección del producto	Gel, ELISA, RT	Gel, ELISA, RT, ECL	ELOSA, RTL	Gel, RT	Gel, RT	Gel, RT, Turbidómetro	Gel, ELISA, RT	Bioanalizador
8. Tolerancia a compuestos biológicos	-	-	-	-	-	+	+	-
9. Requiere denaturalización del templado	+	+	+	+	-	-	-	+
10. Agente denaturalizante	Calor	Rnasa H	Rnasa H	ER, cebador	Polimerasa ϕ 29	Betaina	Helicasa	Rnasa H

ELISA: Enzyme-linked immunoabsorbent assay
 ELOSA: Enzyme linked oligoabsorbent assay
 ECL: Electrochemiluminescence

Tomado con modificaciones de Gill y Ghaemi, 2008

(Fuente: Tomada con modificaciones de Gill y Ghaemi, 2008)

CEBADORES

Para llevar a cabo la reacción de LAMP se necesitan un número de 4 hasta 6 cebadores; 2 cebadores externos F3 y B3, 2 cebadores internos FIP (F1C, F2) y BIP (B1C, B2) que tienen secuencias tanto sentido y antisentido de tal manera que ayuda en la formación de un bucle, 2 cebadores bucle F(FLP) y B(BLP) diseñados para acelerar el reacción de amplificación mediante la unión adicional a sitios que no son accesibles por los cebadores internos. Reconociendo un total de 8 secuencias distintas del DNA blanco (Figura N°1) todos estos cebadores son los que le dan la especificidad al método.

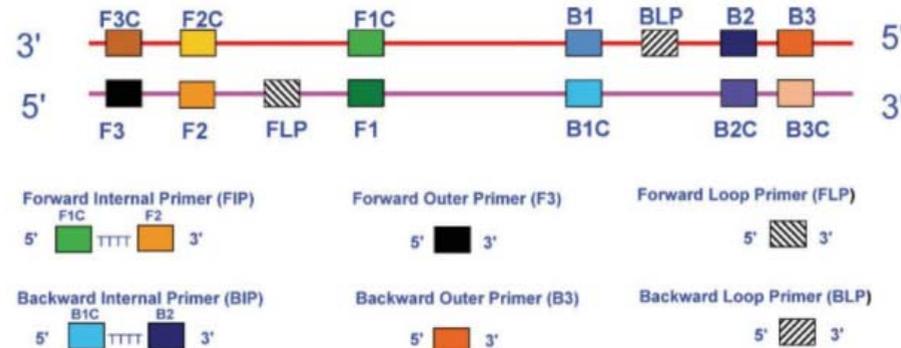
Los cebadores internos se denominan Forward Inner Primer (FIP) y Backward Inner Primer (BIP), respectivamente, y cada uno contiene dos secuencias distintas que corresponden a las secuencias sentido y antisentido del ADN blanco, uno para cebar en la primera etapa y el otro para auto-cebarse en etapas 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. (Arroyo, M. I. et al. 2008)

El contenido de GC de los cebadores debe ser aproximadamente del 50-60% y alrededor de 40-50 % para AT. Los cebadores deben ser diseñados de manera que no se forme fácilmente estructuras secundarias. La secuencia del extremo 3' no debe ser rica en AT o complementarias de otros cebadores. La distancia entre el extremo 5' de F2 y B2 debería ser 120 - 180pb, y la distancia entre F2 y F3 así como de B2 y B3 debe ser 0-20pb. La distancia para las regiones de formación de bucle (5' de F2 a 3' de F1, 5' de B2 a 3' de B1) debe ser 40-60pb. (Parida, M. et al. 2008)

Figura n° 1

Representacion esquematica de los cebadores usados en LAMP,
FLP y BLP son usados en LAMP en tiempo real (mejora de LAMP)



(Fuente: Reviews in Medical Virology Parida, M., 2008)

Figura N° 2

Secuencias de cebadores de *Plasmodium Falciparum* los cebadores
fueron extraidos de (GenBank accessionno. M19173.1)

REGIÓN	PRIMER SEQUENCE (5' to 3')
F1P(F1c+F2)	AGCTGGAATTACCGCGGCTGGGTTCTAGAGAAACAATTGG
B1P(B1+B2c)	TGTTGCAGTAAAAACGTTTCGTAGCCCAAACCAGTTTAAATGAAAC
F3	TGTAATTGGAATGATAGGAATTIA
B3c	GAAAACCTTATTTTGAACAAAGC
LPF	GCACCAGACTTGCCT
LPB	TTGAATATTAAGAA

Fuente: Clinical Chemistry (Leo L.M. Poon et al. 2005)

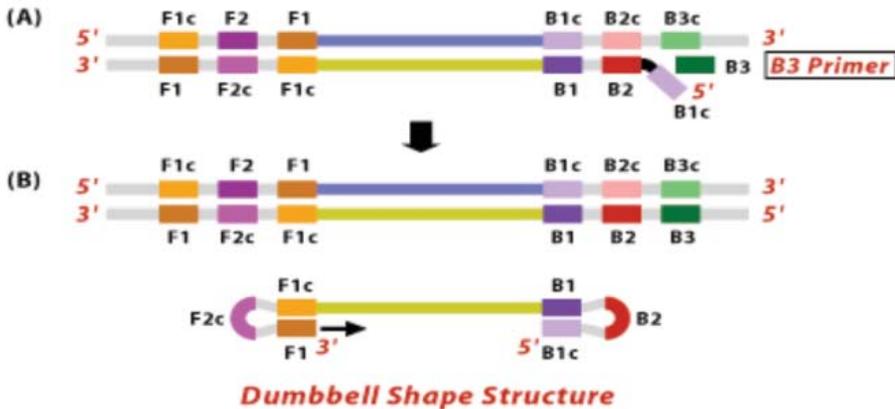
AMPLIFICACIÓN

Se lleva a cabo en dos pasos: no cíclico y cíclicos. Extraído de (Ushikubo H. Principle of LAMP method—a simple and rapid gene amplification method. Uirus 2004; 54(1): 107–112.)

NO CÍCLICO .- Los cebadores inician su acción en dirección 5'→3', el primer cebador en interactuar con el DNA blanco es el FIP el cual se une a su región complementaria F2c y así comienza a sintetizar la hebra complementaria del DNA blanco (figura 3A), el siguiente cebador en interactuar es el F3 uniéndose a la región F3c complementaria del DNA blanco, la Bst polimerasa tiene una cualidad, esta actúa también como helicasa lo que ocasiona que la doble hebra se abra y la F3 pueda seguir con su camino; por el otro extremo tanto BIP como B3 siguen los mismo paso, la hebra complementaria simple cadena hace que por complementariedad sus extremos formen un loop o buble esta hebra es la que servirá como secuencia madre para la posterior síntesis de DNA.

Figura 3A.

Principios de la amplificación de la LAMP. Generación de DNA tallo bucle estructura con forma de mancuerna en ambos extremos a la cual denominamos secuencia madre; está listo para entrar en etapa de amplificación cíclica

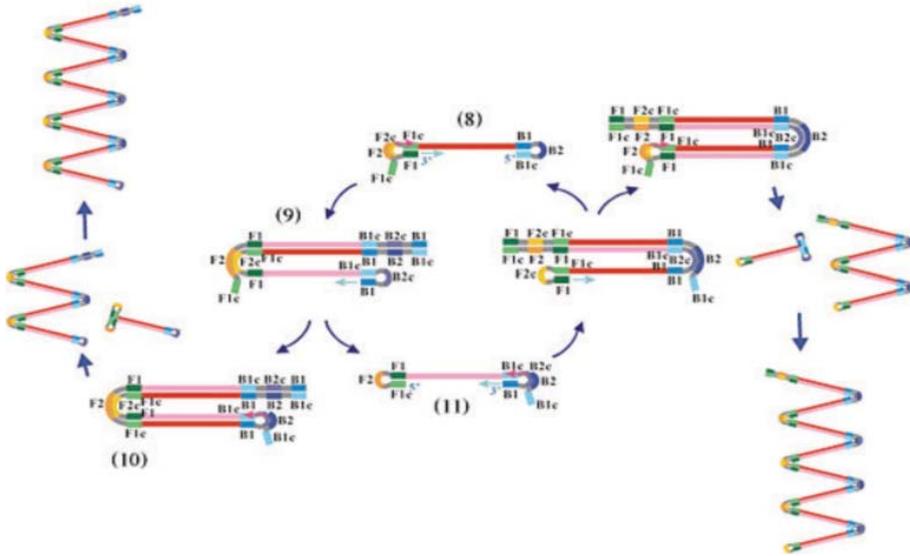


Derechos de autor # 2005, Eiken Chemical Co. Ltd., Japón

CICLIZACIÓN.- (figura 3B) En la secuencia madre, interactúan nuevamente el cebador FIP donde la región F2 se una a su región F2c de la hebra complementaria realizando la hibridación así como también por el otro extremo BIP donde la región B2 se une a su región B2c de la hebra complementaria, en el transcurso de la polimerización las secuencias sintetizadas van adquiriendo una forma de coliflor.

Figura 3B

El producto son las estructuras de diferente tamaño que consisten en repeticiones de la secuencia blanco, dando una estructura similar a una coliflor.

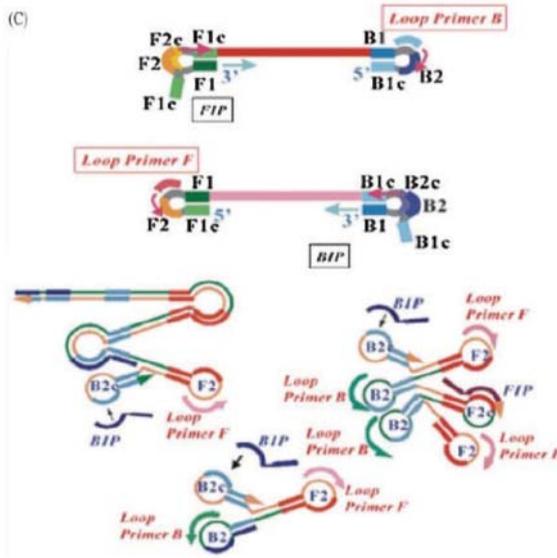


Derechos de autor # 2005, Eiken Chemical Co. Ltd., Japón

Los cebadores bucle tanto FLP como BLP son los que se utilizan en LAMP EN TIEMPO REAL la cual brinda las primeras señales a los 11 minutos de iniciada la reacción (K. Nagamine, T. Hase and T. Notomi 2002) (figura 4)

Figura 3C

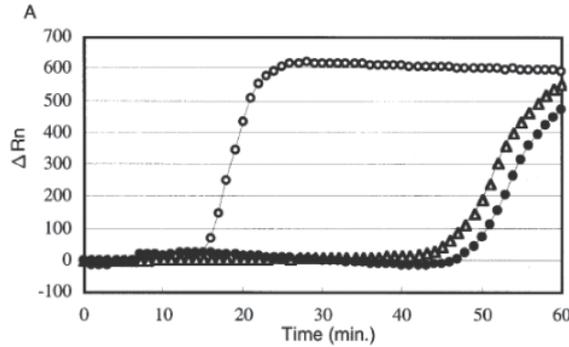
Los cebadores bucle Proporcionan sitios de partida adicionales para la síntesis de DNA y acelerar la amplificación reduciendo el tiempo de reacción a menos de 30 minutos.



Derechos de autor # 2005, Eiken Chemical Co. Ltd., Japón

Figura 4

Grafica absorbancia vs. Tiempo los círculos abiertos iundican que usaron cebadores bucle FLP Y BLP. Los triangulos abiertos y circulos cerrados indican que no usaron los cebadores bucle. Se amplificó DNA de Virus de Hepatitis B



Derechos de autor # 2005, Eiken Chemical Co. Ltd., Japón

Para mejor comprensión del mecanismo de LAMP puede visitarse la página electrónica: [vimeo.com/13391184](https://www.vimeo.com/13391184)

AMPLIFICACIÓN DE RNA

Se lleva a cabo mediante Transcripción Inversa (RT -LAMP) donde además de los reactivos de DNA para la amplificación (cebadores, ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de hebra, sustratos, etc) se añade transcriptasa inversa . La detección se puede llevar a cabo en un solo paso. (Parida, M. et al. 2008)

Bst polimerasa

LAMP utiliza Bst polimerasa con temperaturas óptimas oscilan entre 60 - 65°C y se inactiva a 80°C. Aunque la temperatura de almacenamiento recomendada es - 20°C, la Bst polimerasa es relativamente estable fuera de la cadena de frío durante más de 14 días. La Tabla 3 muestra las características de ADN polimerasa Bst en comparación con la ADN polimerasa Taq que es ampliamente utilizado en la PCR.

Tabla N° 3

Características de la Bst polimerasa y Taq polimerasa

PROPERTY	Bst DNA Polymerase	Taq DNA Polimerase
Origin	Bacillus stearothermofilus	Thermus aquaticus
DNA poly	5' → 3'	5' → 3'
Primer	Required	Required
Strand displacement	Yes	No
DNAdenaturation step	Not required	Required
Reaction temp.	65°C	75°C
Heat inactivation	80°C	None

Fuente Oriel M. M. Thekisoe and Noboru Inoue 2011

Sensibilidad y Especificidad

(Hidekazu Takagi, Makoto Itoh, Mohammad Zahidul Islam, et al. 2009 en su artículo **Sensitive, Specific, and Rapid Detection of Leishmania donovani DNA by Loop-Mediated Isothermal Amplification**) trabajan con parásitos del genero de Leishmania. Para determinar la sensibilidad diluyen una serie de muestras de DNA de *L. donovani* que va de 100pg a 1fg de concentración, el producto de amplificación se detectó en todas las muestras (Figura 5A y B) . Por el contrario, con el PCR convencional, la muestra 1fg era demasiado débil para ser juzgado positivo o negativo (Figura 5C carril 6). La PCR anidada mostró un reacción positiva en 100pg hasta 1fg (Figura 5D). Evaluando la sensibilidad de la LAMP, 20-25 alícuotas con 1fg, 20 (80 %) de 25 alícuotas fueron positivos. Con 100pg, 1 (5 %) de 20 eran positivo. En un experimento similar usando una PCR convencional, 1(7 %) de los 15 resultados de la prueba fue positiva con 1fg de DNA del parásito. La PCR anidada amplificó 11 (55 %) de 20 muestras con 1fg, pero ninguno de los 20 con 100pg . Estos resultados indicaron que nuestra LAMP fue más sensible que la PCR anidada.

Figura N°5

Sensibilidad a. Detección de LAMP por turbidez. b. LAMP c. PCR convencional d. PCR anidado

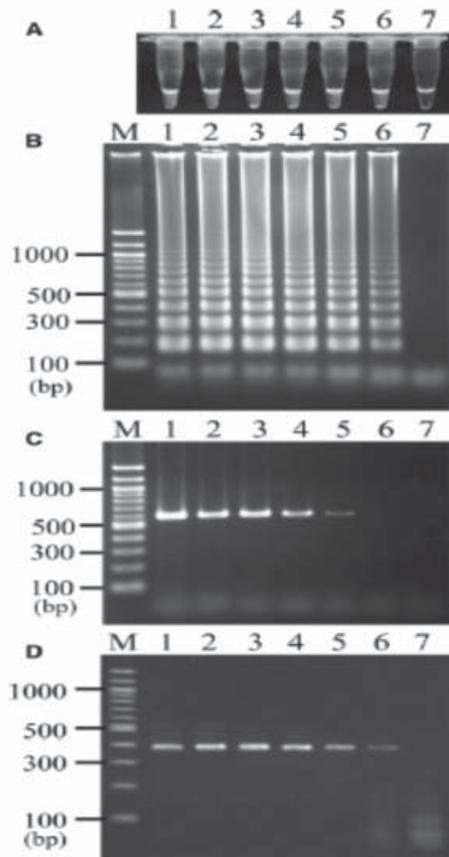
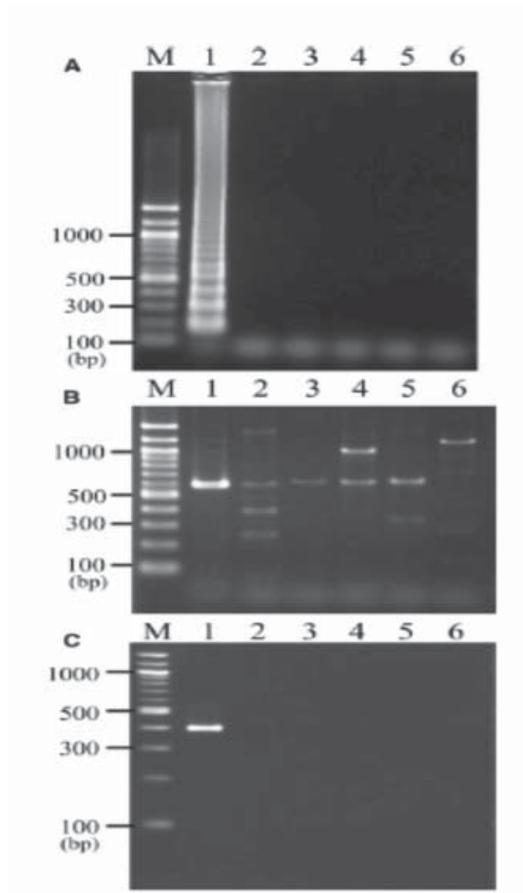


Figura N°6

ESPECIFICIDAD, usaron diferentes especies de Leishmania A. LAMP -POSITIVO SOLO PARA *L. donovani*
B. PCR CONVENCIONAL-POSITIVO PARA TODAS LAS ESPECIES de Leishmania C. PCR ANIDADADO -
POSITIVO SOLO PARA *L. donovani*



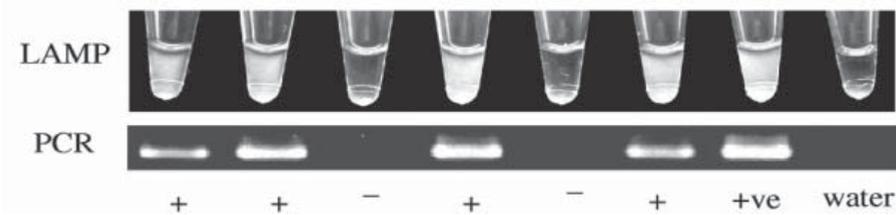
Para evaluar la especificidad de LAMP, fueron examinados las muestras de DNA de las otras cinco especies de *Leishmania* (*L. infantum*, *L. major*, *L. mexicana*, *L. tropica*, y *L. braziliensis*). Cuando se usó 100ng de ADN para cada muestra de *Leishmania*, el producto de amplificación no fue detectado (Figura 6A). El mismo resultado se obtuvo con la PCR anidada (Figura 6C). Varios productos de amplificación fueron detectados con la PCR convencional, pero tenían inesperado tamaños (Figura 6B, carriles 2-6). Estos resultados mostraron que la LAMP era específico para la detección de *L. donovani*.

MÉTODOS DE DETECCIÓN DE LAMP

Turbidez

Figura 7

Detección de LAMP por turbidez, esto se debe a que el pirofosfato el cual se forma como producto secundario de la amplificación reacciona con el magnesio, haciendo que el medio se vuelva turbio. La PCR solo se detecta mediante corrida electroforética.



Fuente Leo L.M. Poon, et al. (2006). pp 303-306

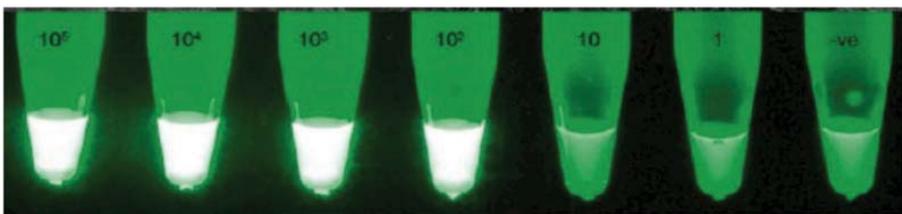
Detección visual por fluorescencia

La calceína en el reactivo de detección fluorescente de LAMP fue combinada inicialmente con iones de magnesio para conseguir el efecto de amortiguación. La amplificación genera el subproducto, iones pirofosfato, los cuales se unirán y quitarán iones manganeso de la calceína para irradiar fluorescencia. La fluorescencia es intensificada mucho más a medida que la calceína se combina con los iones magnesio. En consecuencia, la presencia de fluorescencia puede indicar la presencia del gen blanco y la detección visual puede lograrse.

Detección visual por sustancias que se integran al producto.

Figura 8

Detección visual mediante luz UV, para ello se usa un colorante fluorescente como el bromuro de etidio entre otros.



Fuente:Adams, E. R., et al.(2010). 591-596

Electroforesis

Se hace uso de geles de agarosa para separar los productos de amplificación obtenidos.

VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LAMP FRENTE A OTRAS PRUEBAS

	PCR convencional	PCR en tiempo real	LÁMP
VENTAJAS	Estándar de oro alternativo para el aislamiento en ausencia de agente en vivo	amplificación simultánea y la detección durante exponencial amplificación	amplificación del gen sin requerir termociclador
	confirmación temprana diagnóstico	Monitoreo en tiempo real de la amplificación	La amplificación puede ser logrado con baño de maria / bloque de calentamiento
	formato de diagnóstico molecular ampliamente utilizado	Cuantitativo, por tanto útiles para el seguimiento de la carga viral	En tiempo real, así como cuantitativo
		Se trabaja en tubo cerrado debido a contaminación	Altamente sensible y específico
		Aumento de la sensibilidad debido a la química fluorescente	Simple vista visual monitoreo ya sea a través de la turbidez o cambio de color por intercalante fluorescente colorante (SYBR Green I)
		Alto rendimiento análisis debido al software operación impulsada	
DESVENTAJAS	Cualitativa (Sí o No formato)	detección de caro equipos y consumibles	diseño complicado de cebadores (requisito para seis cebadores)
	Detección de punto final en fase de meseta	Requisito para sonda fluorescente	Dos largos cebadores de Pureza de grado HPLC
	Manejo post-PCR líder para llevar a más de contaminaciones	Restringido a laboratorios que no tengan buen apoyo financiero	Restringido a la disponibilidad de reactivos y equipos en algunos países
	Menos sensible, de ese modo faltan casos límite con bajo número de copias de genes números		
	Consume tiempo (3-4 horas)		
	Requisito para termociclador y gel sistema de documentación		

Fuente: JOHN WILEY & SONS, Ltd. 2008

DISCUSIÓN

LAMP es un método que fue estudiado por Notomi et al. el año 2000. A partir del cual surgieron muchas investigaciones tanto en el diagnóstico clínico en animales (Ikadai, H., Tanaka, H., et al. (2004) Molecular Evidence of Infections with *Babesia gibsoni* Parasites in Japan and Evaluation of the Diagnostic Potential of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Method. American Society for Microbiology 42 (6) 2465–2469) como en humanos, también se realizaron estudios a nivel de enfermedades infecciosas causadas por alimentos (Ohtsuka K., Yanagawa K., et al. Detection of *Salmonella* enterica in naturally contaminated liquid eggs by loop-mediated isothermal amplification, and characterization of *Salmonella* isolates. Appl Environ Microbiol (71) 2005 6730-6735) indican que no se inhibió la reacción con los componentes que tiene el huevo, un caso contrario a este (Wang, D., Huo, G., Wang, F., Li, Y. and Ren, D. Drawback of loop-mediated isothermal amplification 083-086 (2008).) indican que si no se usa el kit para la extracción del DNA de *Salmonella* la LAMP sale menos sensible y contrariamente si se usa el kit sale altamente sensible.

Boehme, C. C., et al. (2007) pp1936–1940 menciona que la prueba es tan fácil de realizar que hasta un técnico sin conocimiento la podría realizar, también indica que los inhibidores presentes en la sangre no afectan en la reacción y así refuerza sus resultados con (Poon et al. 2005) que trabajo con Malaria.

Iwamoto, T., Sonobe, T. and Hayashi, K. (2003) 2616–2622 mencionan que las especies de *Micobacterias* se pueden identificar en 35 min de un cultivo en medio sólido y en 60 minutos a partir de un cultivo en medio líquido o de esputo muestra de análisis tras la extracción de DNA, concluyen que en el caldo de MGIT usado como medio líquido el número de células sería mínimo al del cultivo en medio sólido.

Como ya se había mencionado antes los inhibidores presentes en diferentes tipos de muestra de alguna forma no afectan a la reacción de LAMP, y debido a la temperatura que se usa ocasiona la formación de pirofosfato la cual reacciona con el ion magnesio y como consecuencia un medio turbio, en caso de la PCR esto no sucede debido a que el pirofosfato es hidrolizado a 94°C.

Relacionando con otros métodos LAMP es el método más efectivo, si bien muestra igualdad de resultados en cuanto a la PCR nested y la PCR en tiempo real estos métodos son de alto costo y sería muy difícil acoplarlos a países que se encuentran en vías de desarrollo recordando que estos países son los que más sufren de enfermedades infecciosas; la utilización de tan solo un baño maría para LAMP hace que podamos optimizar el método en nuestro medio, en Gen Bank ya existen diseños de cebadores para diferentes microorganismos y virus lo cual facilita la incorporación a un laboratorio.

REFERENCIAS

- Adams, E. R., Schoone, G. J., Ageed, A. F., Safi, S. E., and Schallig H. D. F. H. (2010). Development of a Reverse Transcriptase Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for the Sensitive Detection of Leishmania Parasites in Clinical Samples [versión electrónica]. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene* 82 (4). 591-596
- Arroyo, M. I., Morales, G. P., Sosa, P. A., Carmona, J., Maestre, A. (2008). Amplificación isotérmica de ácidos nucleicos tipo LAMP para la detección de Plasmodium: nueva técnica diagnóstica [versión electrónica]. *Revista de los estudiantes de la Universidad industrial de Santander* 21 158-175
- Boehme, C. C., Nabeta, P., Henostroza, G., Raqib, R., Rahim, Z., Gerhardt, M., Sangha, E., Hoelscher, M., Notomi, T., Hase, T. and Perkins, M. D. (2007). Operational Feasibility of Using Loop-Mediated Isothermal Amplification for Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in Microscopy Centers of Developing Countries [version electronica]. *American Society for Microbiology* 45 (6), 1936-1940
- Hidekazu, T., Makoto, I., * Mohammad, Z. I., Abdur, R., A. R. M. Saifuddin, E., Yoshihisa, H., Eisei, N., and Eisaku, K. (2009). Sensitive, Specific, and Rapid Detection of Leishmania donovani DNA by Loop-Mediated Isothermal Amplification [versión electrónica]. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene* 81 (4). 578-582
- Iwamoto, T., Sonobe, T. and Hayashi, K. (2003) Loop-Mediated Isothermal Amplification for Direct Detection of Mycobacterium tuberculosis Complex, M. avium, and M. intracellulare in Sputum Samples [versión electrónica]. *American Society for Microbiology* 41 (6), 2616-2622
- Leo L.M. Poon, Bonnie W.Y. Wong, Edmund H.T. Ma, Kwok H. Chan, Larry M.C. Chow, Wimal Abeyewickreme, Noppadon Tangpukdee, Kwok Y. Yuen, Yi Guan, Sornchai Looreesuwan, and J.S. Malik Peiris (2006). Sensitive and Inexpensive Molecular Test for Falciparum Malaria: Detecting Plasmodium falciparum DNA Directly from Heat-Treated Blood by Loop-Mediated Isothermal Amplification [versión electrónica]. *Clinical Chemical* 52 (2) 303-306 DOI: 10.1373/clinchem.2005.057901
- Mori Y., Notomi T., (2005) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases [versión electrónica] *J Infect Chemother* 15, 62-69 DOI 10.1007/s10156-009-0669-9
- Nagamine, K., Hase, T. and Notomi, T. (2002). Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers [version electronica]. *Molecular and Cellular Probes* 16. 223-229
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. and Hase, T. (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA [versión electrónica]. *Nucleic Acids Research* 28 (12)
- Ohtsuka K, Yanagawa K, Takatori K, Hara-Kudo Y. (2005) Detection of Salmonella enterica in naturally contaminated liquid eggs by loop-mediated isothermal amplification, and characterization of Salmonella isolates. [versión electrónica] *Appl Environ Microbiol* 71. 6730-5.
- Oriel M. M. Thekisoe and Noboru I. (2011) Molecular Diagnosis of Protozoan Infections by Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) 1ra edicion
- Parida, M., Sannarangaiah S., Kumar Dash P., P. V. L. Rao and Kouichi M. (2008) Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases [versión electrónica] *Reviews in Medical Virology* DOI: 10.1002/rmv.593
- Wang, D., Huo, G., Wang, F., Li, Y. and Ren, D. (2008). Drawback of loop-mediated isothermal amplification [version electronica]. *African Journal of Food Science* 2 083-086. online <http://www.academicjournals.org/ajfs>
- Zablon Kithinji Njiru, Andrew Stanislaw John Mikosza, Tanya Armstrong, John Charles Enyaru, Joseph Mathu Ndung'u, Andrew Richard Christopher Thompson (2008). Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Method for Rapid Detection of Trypanosoma brucei rhodesiense [versión electrónica]. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 2, Retrieved from www.plosntds.org