

ARTÍCULO DEL MES

(noviembre 2025)

Detección de ARN a temperatura ambiente mediada por anti-tag de CRISPR utilizando CRISPR/Cas13a

**Dr. Felipe Pérez García. Hospital Universitario Príncipe de Asturias.
Universidad de Alcalá. Alcalá de Henares. Madrid**



Referencia original: Moon J, Zhang J, Guan X, Yang R, Guo C, Schalper KT, Avery L, Banach D, LaSala R, Warriar R & Liu C. CRISPR anti-tag-mediated room-temperature RNA detection using CRISPR/Cas13a. *Nature Communications*. 2025 Oct 15;16:9142. doi: 10.1038/s41467-025-64205-4

Resumen: las plataformas de diagnóstico molecular basadas en CRISPR/Cas13a han demostrado tener una excelente sensibilidad, alcanzando niveles de attomolar (10^{-18} moles/L). Sin embargo, generalmente se requiere una preamplificación del ácido nucleico (por ejemplo, mediante amplificación isotérmica) y/o temperaturas de incubación elevadas, lo cual incrementa sus costes y limita su uso en entornos de bajos recursos. El objetivo de Moon *et al.* fue desarrollar un método de detección de ARN sensible, en un solo paso y que funcione a temperatura ambiente sin preamplificación.

La metodología que desarrollan, denominada CARRD (C RISPR Anti-tag Mediated Room-temperature RNA Detection), se basa en el mecanismo de regulación alostérica de Cas13a. Los autores descubrieron que ciertas secuencias (denominadas *anti-tag*) y estructuras secundarias en el ARN diana inhiben la actividad de escisión colateral de Cas13a. Así, diseñaron un mediador sintético (horquilla anti-tag de CRISPR – *CRISPR anti-tag hairpin*) que, en su estado basal, se une a Cas13a y lo mantiene inactivo. Cuando el ARN viral diana (del VIH o del VHC) está presente, activa el complejo Cas13a/crRNA, el cual corta colateralmente la horquilla inhibidora. Este corte destruye la inhibición y libera una secuencia diana que estaba oculta en la horquilla, la cual es reconocida por otros complejos Cas13a, generando así una amplificación de señal de fluorescencia en cascada usando una única enzima.

Moon *et al.* demuestran en este trabajo que CARRD alcanza un límite de detección de 10 attomolar, tanto para el ARN del VHC como del VIH, lo que supondría una mejora muy importante (unas 10.000 veces) respecto a la detección convencional con Cas13a sin preamplificación. Asimismo, la reacción demostró ser más eficaz a temperatura ambiente (25 °C) que a 37 °C. Los autores validaron el método de detección para VIH en 30 muestras clínicas de plasma, y concluyeron que CARRD es un método simple, asequible y sensible con potencial para el desarrollo de herramientas de diagnóstico *point of care* (PoC).



Comentario: este trabajo presenta una innovación metodológica muy interesante, ya que su principal aportación no es el uso de Cas13a en sí mismo, sino la ingeniería bioquímica que convierte un mecanismo de inhibición alostérica, habitualmente considerado un obstáculo, en el motor de una amplificación de señal en cascada. Estrategias previas para lograr sensibilidad attomolar requerían preamplificación (como la plataforma SHERLOCK) o sistemas de enzimas duales (por ejemplo, Cas13-Cas12). El enfoque de Moon *et al.* es superior en cuanto a su simplicidad: en un paso y empleando una sola enzima.

Una de sus principales fortalezas, con un impacto potencial directo en nuestra práctica asistencial, es el hecho de que la reacción funciona óptimamente a 25 °C, lo cual elimina la dependencia de termobloques, termocicladores y otro aparataje, que suele constituir una de las principales barreras a la hora de implementar el diagnóstico molecular PoC.

Sin embargo, esta tecnología aún presenta una importante limitación, que condiciona su aplicabilidad inmediata: aunque la sensibilidad analítica parece excelente, la sensibilidad clínica obtenida en las 30 muestras de plasma de VIH resultó muy pobre. Reportaron una alta especificidad (100 %), pero una sensibilidad de solo el 77,8 % (7 de 9 muestras positivas confirmadas por RT-qPCR). Los propios autores sugieren que la causa puede ser lo que denominan “ruido de fondo” basal (*background noise*), generado por el diseño de la horquilla, que les obligó a establecer un umbral de positividad (*cutoff*) relativamente alto, lo que provoca que las muestras con bajo nivel de señal, secundario a una baja viremia, caigan por debajo del límite de detección. Otras limitaciones de este trabajo serían el bajo tamaño muestral de la cohorte de validación para VIH y la necesidad de seguir teniendo que extraer el ARN antes de aplicar el ensayo CARRD y de contar con un detector de fluorescencia, lo cual limita su aplicabilidad como PoC.

En definitiva, este artículo presenta una prueba de concepto de un prototipo tecnológico, basado en una aproximación muy novedosa y original. Su impacto potencial en el diagnóstico de la infección por VIH y de las hepatitis virales puede ser enorme y podría constituir una gran ayuda para cumplir los objetivos de eliminación de las hepatitis virales de la OMS. Las líneas de investigación futuras deberían centrarse en optimizar el diseño de la horquilla *anti-tag* para reducir el ruido de fondo (mejorando la sensibilidad) y realizar una validación clínica rigurosa y, por otro lado, maximizar su aplicabilidad como PoC, perfeccionándolo para no necesitar extracción de ARN y



adaptando la lectura de los resultados a formatos más simples, como tiras de flujo lateral, en vez de detectores de fluorescencia.