

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



Diseño de una técnica de amplificación isotérmica mediada por horquillas (LAMP) en el gen *AMA-1* para la detección de *Plasmodium vivax*

BARBARA LOURDES YMAÑA GONZALES DEL VALLE

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciada en Biología

Asesora de Tesis: Dra. Lidia Cruz Neyra

Lima, Perú

2019

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



Diseño de una técnica de amplificación isotérmica mediada
por horquillas (LAMP) en el gen *AMA-1* para la detección
de *Plasmodium vivax*

BARBARA LOURDES YMAÑA GONZALES DEL VALLE

MIEMBROS DEL JURADO CALIFICADOR Y ASESOR.

PRESIDENTE:

Dr. HUGO GONZALES FIGUEROA

SECRETARIA:

Lic. FLOR DE MARIA MADRID DE MEJÍA

VOCAL:

Blgo. ALCIDES GUERRA SANTA CRUZ

ASESORA:

Dra. LIDIA CRUZ NEYRA

Dedicatoria

A mis padres.

A la nonna.

Agradecimientos

Al laboratorio de malaria de la UPCH. Gracias por hacerme sentir en familia durante el corto tiempo que estuve ahí. Especialmente a Jhonatan por los recuerdos, anécdotas y enseñanzas felinas los martes en el billar; a Juanjo por siempre ser un oído en mis crisis existenciales y a Scar por su ayuda y amistad.

Al profesor Oscar por su paciencia, dedicación y carácter. Gracias por darme la oportunidad de realizar mi tesis con usted.

A Andrés David Hernández Gil, por enseñarme que la distancia es sólo un número. Gracias por confiar en mí incluso cuando yo no lo hacía.

A los profesores Hugo Gonzales Figueroa, Flor de María Madrid y Lidia Cruz Neira por la asesoría en la redacción de este manuscrito.

A mis amigos del alma: Valeria, Michella, Sergio, Matia, Rosario y Jocelyn. Sin ustedes hubiera acabado la carrera más rápido, pero no cambiaría por nada los momentos vividos. Ustedes no sólo son mis amigos, sino mi familia.

A mis padres:

Gracias papá por haber luchado por sacar a la familia adelante.

Gracias mamá por enseñarme a nunca conformarme y siempre mirar hacia adelante.

Sin ustedes nada de esto hubiera sido posible.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	9
2. Planteamiento del problema.....	10
3. Formulación del problema.....	11
4. Justificación de la investigación.....	11
5. Objetivo general.....	13
6. Objetivos específicos.....	13
7. MARCO TEÓRICO.....	14
7.1. Métodos de diagnóstico.....	14
7.1.1. Microscopía.....	14
7.1.2. Pruebas de Diagnóstico Rápido (PDR).....	15
7.1.3. Diagnóstico molecular de la malaria.....	16
7.1.3.1. Amplificación Isotérmica mediada por Bucle.....	17
8. ANTECEDENTES.....	18
9. HIPÓTESIS.....	24
10. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
10.1. Lugar de Ejecución.....	24
10.2. Tipo y Diseño de investigación.....	25
10.3. Operacionalización de las variables.....	25
10.3.1. Variable Independiente.....	25
10.3.2. Variables Dependientes.....	25
10.4. Obtención del material biológico.....	26

10.5. Procedimiento y análisis de resultados.....	26
10.5.1. Análisis bioinformático.....	26
10.5.1.1. Selección del blanco de amplificación.....	26
10.5.1.2. Diseño de cebadores tipo LAMP.....	27
10.5.1.3. Análisis <i>in – silico</i>	28
10.5.1.3.1. A. de especificidad.....	28
10.5.1.3.2. A. de formación de estructuras secundarias.....	28
10.5.1.4. Alineamiento y ubicación de los cebadores en secuencias del locus <i>ama-1</i> en cepas de <i>P. vivax</i>	29
10.5.2. Optimización del ensayo.....	30
10.5.2.1. Curva de sulfato de magnesio.....	30
10.5.2.2. Curva de cebadores.....	30
10.5.3. Obtención del amplicón.....	31
10.5.4. Clonación del producto de amplificación para la obtención del control estándar.....	31
10.5.4.1. Obtención del producto de amplificación.....	31
10.5.4.2. Ligación de los productos al vector PCR®2.1.....	32
10.5.4.3. Transformación en <i>E. coli</i> OneShot® TOP10.....	32
10.5.4.4. Extracción del plásmido.....	33
10.5.4.5. Preparación de la solución madre de ADN plasmídico y la curva estándar.....	33
10.5.4.6. Secuenciamiento del producto de amplificación.....	34
10.5.5. Análisis de especificidad analítica.....	34

10.5.6. Determinación del límite de detección.....	34
10.5.7. Evaluación de la técnica.....	35
10.6. Aspecto ético.....	35
11. RESULTADOS.....	36
11.1. Análisis bioinformático.....	36
11.2. Evaluación y optimización del ensayo.....	39
11.3. Obtención del amplicón.....	39
11.4. Clonación del producto de amplificación.....	40
11.5. Secuenciamiento del producto de amplificación.....	42
11.6. Análisis de especificidad analítica.....	43
11.7. Determinación del límite de detección.....	43
11.8. Evaluación de la técnica.....	43
12. DISCUSIÓN.....	44
13. CONCLUSIONES.....	48
14. RECOMENDACIONES.....	49
15. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
16. ANEXOS.....	59

Índice de tablas

Tabla 1. *Condiciones de amplificación de la PCR convencional.*

Tabla 2. *Concentración final de los reactivos para la técnica LAMP.*

Tabla 3. *Resultados comparativos de las diferentes técnicas de diagnóstico.*

Índice de figuras

Figura 1. *Diagrama del diseño de estudio del trabajo de investigación*

Figura 2. *Secuencia parcial del locus ama -1 de la cepa Belem de P. vivax.*

Figura 3. *Análisis de cebadores escogidos para la técnica LAMP con la herramienta GeneDoc.*

Figura 4. *Gel de agarosa al 2% con el producto de amplificación a diferentes gradientes de temperatura.*

Figura 5. *Gel de agarosa al 2% donde se observa la presencia del inserto de interés.*

Figura 6. *Resultados de la evaluación de las condiciones de amplificación.*

Figura 7. *Ensayo de especificidad analítica.*

Índice de anexos

Anexo 1. *Combinaciones experimentales de cebadores para el ensayo preliminar.*

Anexo 2. *Procedimiento de Ligación de los productos al vector PCR[®]2.1 mediante el kit T.A Cloning[™] Kit, with pCR[™]2.1 Vector and One Shot[™] TOP10 Chemically Competent E. coli.*

Anexo 3. *Procedimiento de transformación por choque térmico en E. coli OneShot[®] TOP10.*

Anexo 4. *Procedimiento lisis alcalina según “Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Volume 1”*

Anexo 5. *Procedimiento extracción de plásmidos mediante el kit ZymoPURE Plasmid Miniprep.*

Anexo 6. *Procedimiento de purificación del producto de amplificación.*

Anexo 7. *Renovación de la aprobación del comité de ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia con el código de inscripción 100405.*

Anexo 8. *Tabla de las características de los cebadores para el locus ama-1 de Plasmodium vivax.*

Anexo 9. *Tabla de alineamiento de la secuencia consenso obtenida del secuenciamiento del producto de amplificación.*

RESUMEN

El diagnóstico rápido y preciso de la malaria es fundamental en el tratamiento y su control de la enfermedad. Las pruebas diagnósticas basadas en la identificación del parásito mediante microscopía óptica no pueden detectar de manera confiable las infecciones de baja densidad parasitaria y los métodos moleculares si bien son muy sensibles se mantienen demasiado complejos para su implementación en campo. Por ello, la técnica LAMP (de las siglas en inglés: *Loop Mediated Isothermal Amplification*) es una de las técnicas moleculares más utilizadas en el diagnóstico de enfermedades infecciosas gracias a su capacidad isotérmica, alta sensibilidad, preparación de reactivos simple y fácil lectura de resultados.

El presente trabajo de investigación tuvo como finalidad el optimizar un método de detección rápida, específica y sensible de *Plasmodium vivax* mediante la técnica de amplificación isotérmica mediada por horquillas para lo cual se diseñaron cebadores que amplifiquen una secuencia específica del gen *ama -1* de *Plasmodium vivax*. Para ello, se clonó el producto de amplificación para la obtención de ADN plasmídico el cual fue usado como control estándar de amplificación en los ensayos de optimización de las condiciones de amplificación y la determinación del límite de detección de la técnica. La especificidad de la técnica se realizó con muestras de ADN causantes de malaria en humanos - *Plasmodium falciparum*, *P. malariae* y *P. ovale*-. Finalmente, se realizó la evaluación de muestras previamente diagnosticadas por el método de rutina y técnicas moleculares para *P. vivax* en donde se comprobó la efectividad del ensayo. Los resultados obtenidos confirmaron que la técnica LAMP tiene como límite de detección 4 parásitos/ μ L en el cual se obtuvieron resultados fácilmente interpretables en una hora de incubación. Gracias a estas características, esta técnica podría ser implementada en zonas endémicas rurales donde hay diferentes factores que limitan la implementación de equipos sofisticados para un diagnóstico rápido y sensible de la malaria.

Palabras clave: *Plasmodium vivax*, LAMP, *ama -1*, prueba diagnóstica, malaria.

ABSTRACT

The rapid and accurate diagnosis of malaria is essential in the treatment and control of the disease. Diagnostic test based in the identification of the parasite by optical microscopy cannot be reliably in the detection of low parasitic density infections and molecular methods, although they are very sensitive, are too complex for field implementation. Thus, Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) is one of the most used molecular in the diagnosis of infectious diseases thanks to its isothermal amplification technology, high sensitivity, easy reagents preparation, simple reading of results.

This study aims to develop and optimize a rapid, specific and sensitive detection method of *Plasmodium vivax* using the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technique where primers were design towards a specific sequence of the *Plasmodium vivax ama -1* gene. For that purpose, amplification product was cloned to obtain plasmid DNA which was used as standard amplification control, for optimization tests of the amplification conditions and determination of the limit of detection. Analytical specificity with samples of different human malaria species such as *Plasmodium falciparum*, *P. malariae* and, *P. ovale*. Finally, the effectiveness of the assay was checked with previously diagnosed samples by the routine method – microscopy- and molecular techniques. The results obtained showed us that the LAMP technique has a limit of detection of 4 parasites/ μ L with easily interpretable results were obtained in an hour incubation. Thanks to these characteristics, this technique could be implemented in rural endemic areas where there are different factors that limit the implementation of sophisticated equipment for rapid and sensitive diagnosis of malaria.

Keywords: *Plasmodium vivax*, LAMP, *ama -1*, diagnostic test, malaria.

1. INTRODUCCIÓN

La malaria, al ser una de las enfermedades infecciosas de mayor prevalencia a nivel mundial, necesita el desarrollo de métodos diagnósticos que permitan la detección certera y temprana del agente etiológico para una estrategia de control adecuada de la enfermedad.

La técnica de rutina en el diagnóstico de la malaria está basada en el diagnóstico microscópico o parasitológico formas parasitarias previamente teñidas a través de un microscopio. Estas se dividen en los exámenes de gota gruesa y frotis sanguíneo. Dichas técnicas son de procedimiento sencillo y económicas, pero requieren personal experto y un estricto control de calidad para poder garantizar un diagnóstico confiable y sensible. En áreas de difícil acceso donde no se encuentre un centro médico cerca se utilizan los “Test de Diagnóstico Rápido” los cuales detectan antígenos parasitarios de las especies *Plasmodium* mediante la inmunocromatografía de flujo lateral. A pesar poder ser usadas como autodiagnóstico, hay reportes de resultados falsos positivos en infecciones ya tratadas donde aún puede ser detectable el antígeno del parásito; reacciones cruzadas infecciones mixtas y entre las especies de *Plasmodium*. Finalmente, las pruebas moleculares son mayormente utilizadas como confirmatorias de posibles casos positivos de malaria ya que han demostrado mayor sensibilidad y especificidad que los métodos convencionales. Lamentablemente, estas técnicas conllevan un coste elevado y sólo pueden realizarse en laboratorios especializados lo cual restringe la población a diagnosticar.

Por lo tanto, el presente trabajo tuvo como objetivo el diseñar y optimizar cebadores basados en el análisis de un nuevo blanco de amplificación unicopia: el locus que codifica el Antígeno Apical de Membrana o *AMA -1* (de las siglas en inglés: *Apical Membrane Antigen*). para su uso en la detección específica de *P. vivax*, mediante la técnica de amplificación isotérmica tipo LAMP.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La necesidad de contar con una técnica diagnóstica que pueda ser implementada en áreas endémicas de difícil acceso capaz de detectar infecciones de densidad parasitaria muy baja es esencial para el tratamiento y control de la enfermedad a nivel nacional donde la alta prevalencia de infecciones -en su mayoría sub microscópicas- se presentan en comunidades rurales alejadas de centros médicos y/o laboratorios clínicos. Una solución a este problema fue el desarrollo de los sistemas de amplificación isotérmica los cuales permiten amplificar secuencias específicas de ácidos nucleicos a temperatura constante prescindiendo de equipos de biología molecular difíciles de implementar en dichas zonas por su alto costo y necesidad de mantenimiento.

Con este trasfondo, la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) es considerada como el método más promisorio en el diagnóstico de enfermedades infecciosas ya que a diferencia de diferentes técnicas de amplificación isotérmica es de procedimiento simple, incubación rápida y fácil lectura de resultados. En el presente trabajo de investigación se tiene como objetivo la detección del parásito *Plasmodium vivax* a través de la amplificación del gen *ama-1* mediante la técnica LAMP.

3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

PROBLEMA GENERAL:

¿Cuál es el límite de detección y especificidad en la detección de *Plasmodium vivax* mediante la técnica amplificación isotérmica mediada por horquillas del locus *ama -1*?

PROBLEMAS ESPECIFICOS:

- ¿Cuáles son los cebadores apropiados para la amplificación del gen *ama -1* mediante la técnica LAMP en la detección de *Plasmodium vivax*?

- ¿Cuál es el límite de detección analítica de la técnica LAMP *ama -1*?

- ¿Es la técnica LAMP *ama-1* específica en la detección de infecciones por *Plasmodium vivax*?

4. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

En el Perú, uno de los principales desafíos en la erradicación de la malaria es la falta de técnicas de diagnóstico que puedan ser ejecutados en zonas rurales en los cuales la imposibilidad de implementar laboratorios con las características e infraestructura necesarias para el desarrollo de técnicas de diagnóstico molecular (Gubala, V. *et al.* 2012). Debido a esta dificultad, la fase de eliminación del plan “Malaria Cero”, busca asegurar la calidad del diagnóstico en los establecimientos de salud a nivel comunitario - los cuales son escenarios de alta endemicidad- (Ministerio de Salud del Perú. (2016). *Resolución Ministerial: Plan Malaria Cero Periodo 2017 - 2021*. Ministerio de Salud del Perú) con el que busca reemplazar las técnicas clásicas de identificación de agentes patógenos como la

PCR tradicional (de las siglas en inglés: *Polymerase Chain Reaction*) y la qPCR (de las siglas en inglés: *Quantitative Polymerase Chain Reaction*) mediante el desarrollo de pruebas moleculares de uso masivo que permitan diagnosticar las infecciones submicroscópicas para eliminar la transmisión estable de la enfermedad suprimiendo los reservorios de infección y así evitar la reintroducción (Ministerio de Salud del Perú.(2016). *Resolución Ministerial: Plan Malaria Cero Periodo 2017 - 2021.*). Además, la implementación de estas técnicas de diagnóstico en zonas rurales prevendría el agravamiento de la enfermedad al no ser tratada a tiempo, la morbilidad y la incidencia de relapsos por formas latentes los cuales son característicos de esta especie. (White, N. J. 2011).

Una solución a este problema son las “Técnicas de Amplificación Isotérmica de Ácidos Nucleicos” que nos ofrecen resultados rápidos, sensibles, de mínima preparación de reactivos, solo requiere instrucción básica de personal y los resultados son fácilmente interpretables. Algunas técnicas de amplificación isotérmica simplifican el uso de equipos de laboratorio teniendo la oportunidad de reemplazar los termocicladores por bloques de temperatura o un baño maría (Kumar S, *et al.* 2018).

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la especificidad y condiciones de amplificación de la técnica tipo LAMP para la detección sensible y específica de *Plasmodium vivax* mediante la elaboración de cebadores específicos del gen *ama -1*.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Elaborar cebadores tipo LAMP para la amplificación de la secuencia blanco del gen *ama -1* de *Plasmodium vivax*.
- Evaluar las condiciones de amplificación de la técnica LAMP.
- Clonar el producto de amplificación para la obtención del control estándar de amplificación
- Determinar el límite de detección analítica mediante diluciones seriadas del control estándar de amplificación.
- Comprobar la especificidad entre especies con muestras de ADN de *Plasmodium falciparum*, *P. malariae* y *P. ovale*.
- Constatar la técnica estandarizada en un grupo de muestras sanguíneas positivas y negativas de infección por *P. vivax*.

7. MARCO TEÓRICO

7.1. Métodos diagnósticos

El diagnóstico de la malaria debe tener en cuenta tres criterios asociados entre sí: clínicos, epidemiológicos y de laboratorio. El primero se basa en el análisis de los signos clínicos iniciales de la enfermedad como náuseas, cefalea, vómitos, sudoración profusa y mialgias. Al manifestarse la crisis palúdica - también llamados paroxismos palúdicos- se puede observar fiebre elevada, escalofríos y dolor de cabeza cada 3 ó 4 días dependiendo del agente etiológico (Hortelano, M. G. *et al.* 2010). Estos signos no son específicos, es decir, comparten sintomatología con otras enfermedades febriles por lo que se deben de complementar con los criterios epidemiológicos que darán a conocer si el paciente ha estado en exposición con el vector en los últimos 15 días, ha tenido antecedentes de transfusión sanguínea y medicación anti malárica en las últimas cuatro semanas (Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia. 2015. *Manual para el diagnóstico de malaria no complicada en puestos de diagnóstico y Tratamiento*).

Al sospechar un posible caso de malaria, se procederá a los criterios de laboratorio en donde se busca la presencia del parásito mediante microscopía, detección de antígenos a través de las Pruebas de Diagnóstico Rápido y diagnóstico molecular (Zheng, Z. & Cheng, Z. 2017).

7.1.1. Microscopía

La técnica de gota gruesa y el extendido de sangre periférica son los métodos de rutina para el diagnóstico de la malaria. Ambos se basan en la observación y conteo de formas parasitarias coloreadas libres asexuadas y sexuadas a través del microscopio a partir de sangre periférica obtenida de yema del dedo donde el primero al ser más sensible es

usado para el descarte de la enfermedad y el segundo es más específico por lo que es utilizado en la identificación del agente etiológico. La muestra es comúnmente tratada con tinción de Giemsa para poder observar las diferencias morfológicas del eritrocito infectado en diferentes estadios sanguíneos del parásito. La coloración nos permite diferenciar los componentes intracelulares con los extracelulares como el citoplasma de azul, la cromatina o núcleo de rojo y el pigmento malárico o hemozoína de pardo – amarillo (Alger, J. 1999)

En el manejo clínico, la densidad parasitaria está estrechamente relacionada con la severidad de las manifestaciones clínicas siendo producto de diversos factores como la dosis infectante inicial, el número de días de evolución de la fase sanguínea y la inmunidad del paciente (Alger, J. 2001). En el Perú, la determinación de la densidad parasitaria sigue el método recomendado por la OMS denominado el “Conteo por cruces” el cual es un método cualitativo donde el número de cruces representa un rango de parásitos encontrados en 100 campos siendo “+2” el valor mínimo representando aproximadamente 40 a 100 parásitos y un máximo de 4 cruces lo cual equivale a parasitemia muy alta representando más de 200 parásitos en 100 campos. (Ministerio de Salud. 2005. *Norma técnica para la atención curativa de la malaria, esquemas terapéuticos en el tratamiento de la malaria no complicada y malaria grave en el Perú.*).

7.1.2. Pruebas de diagnóstico rápido (PDRs)

También llamadas “tiras reactivas” o “dispositivos de diagnóstico rápido”, tienen como objetivo el capturar el antígeno parasitario presente en sangre periférica utilizando anticuerpos monoclonales que viran de color al haber unión antígeno - anticuerpo (OMS. 2006. *Uso de las pruebas en el diagnóstico rápido de la malaria*). El principio de las PDR es la inmunocromatografía de flujo lateral, es decir, la muestra y el movimiento de la

solución tampón se mezclan mediante capilaridad (Ching, K. 2015). La tira de nitrocelulosa absorbente viene impregnada en el extremo inferior el anticuerpo específico - al antígeno problema - marcado a un colorante mientras que en el extremo superior dos bandas fijas (la línea de muestra y control) con un anticuerpo específico que capturaría al complejo antígeno – anticuerpo (Campuzano –Zuluaga, G. *et al.* 2010); la muestra de sangre, donde se encuentra el antígeno problema, se mezcla con la solución tampón y se coloca en la parte inferior de la tira reactiva formando el complejo antígeno – anticuerpo el cual es transportado a lo largo de la tira hasta las dos bandas fijas produciendo una línea visible en caso de positiva la muestra (Col, M. *et al.* . 2007).

Los modelos se diferencian por el antígeno que detectan, el primero es específico para la especie *P. falciparum* la cual detecta la proteína rica en histidina 2 o HRP-2 (de las siglas en inglés: Histidine Rich Protein); el segundo prototipo y tercer prototipo identifican el género *Plasmodium* gracias a las enzimas lactato deshidrogenasa o pLDH (de las siglas en inglés: Parasite Lactate Dehydrogenase) y aldolasa respectivamente (Campuzano – Zuluaga G. *et al.* 2010).

7.1.3. Diagnóstico molecular de la malaria

Diversos autores coinciden que el diagnóstico precoz, sensible y diferencial de la malaria es fundamental para su eliminación (Zimmerman, P. & Howes, R. 2015; Kobayashi, T. *et al* 2015; The malERA Consultative Group on Diagnosis and Diagnostics. 2011). Es por ello que, a diferencia de los métodos de diagnóstico previamente mencionados, las pruebas moleculares son reconocidas por su alta sensibilidad siendo la PCR (de las siglas en inglés: *Polymerase Chain Reaction*) la más utilizada en el diagnóstico de laboratorio siendo capaz de detectar hasta 0.2 parásitos por microlitro de sangre

(Imwong, M. *et al.* 2014). Estas pruebas moleculares amplifican secuencias específicas de ADN o ARN de los estadios sanguíneos parasitarios. Por lo general, los blancos más utilizados en el diagnóstico molecular son los genes multicopia, es decir, aquellos que tienen un mayor número de repeticiones en el genoma del patógeno en el cual se espera una alta probabilidad de detección al amplificar un mayor número de secuencias por parásito. (Zheng, Z. & Cheng, Z. 2017). El más reconocido para el diagnóstico molecular es la subunidad ribosomal pequeña 18s (18srARN) el cual tiene entre 4-8 copias/parásito (Mercereau-Puijalon, O. *et al.* 2002).

7.1.3.1. Amplificación isotérmica de ácidos nucleicos mediada por bucle

LAMP fue desarrollada en el 2000 por Notomi y colaboradores el cual se basa en la síntesis de ADN por desplazamiento de cadena usando cuatro cebadores (dos internos – FIP y BIP - y dos externos –F3 y B3-) donde los cebadores externos se hibridan con las secuencias externas de la secuencia diana mientras que los 2 cebadores internos permiten la formación del bucle debido a que en su estructura hay dos regiones complementarias a la secuencia diana. (Notomi, T. *et al.* 2000).

La amplificación se lleva a cabo en dos etapas: no cíclico y cíclico en el primero se utilizan los cebadores internos (FIP y BIP) y donde la región F2 del FIP se anilla a su secuencia complementaria del ADN (F2c) y comienza a sintetizar una nueva cadena obteniendo la primera cadena más la región F1c que no es una secuencia complementaria. El cebador externo F3 se alinea a la secuencia complementaria después que la enzima isotérmica desplazo la cadena. Luego, el cebador BIP sigue el mismo proceso que el FIP donde el B2 se alinea su región complementaria, la enzima sintetiza la nueva cadena y el cebador externo B3 inicia la copia de la segunda cadena que contiene las regiones

antisentido en los extremos de ambas cadenas que al alinearse forman la estructura de asas en los extremos. (Lira, R. *et al.* 2018).

Una de las principales características de esta técnica es su alta sensibilidad (puede amplificar la secuencia diana de $10^9 - 10^{10}$ veces) y capacidad isotérmica gracias al ADN polimerasa termoresistente denominada *Bst Polymerase* la cual es capaz de sintetizar una nueva cadena de ADN a la vez que disocia el enlace de hidrogeno de la doble cadena molde (actividad de desplazamiento de cadena). También, la lectura de resultados es por visualización de turbidez, cambio de color por cambio de pH y fluorescencia en una lámpara U.V. (Serra – Casas, E. *et al* 2017).

8. ANTECEDENTES

La malaria es una enfermedad metaxénica transmitida por el mosquito *Anopheles sp* el cual inocula el protozoario del filo apicomplexa, género *Plasmodium* (parásito obligado intracelular). Las cinco especies causantes de la malaria en humanos poseen prevalencia y distribución geográfica variada siendo *P. vivax* preponderante en América central e India; *P. falciparum* en África, Nueva Guinea y Haití; *P. malariae* y *P. knowlesi* en el sudeste asiático y *P. ovale* es endémico de África occidental (Rial, M. *et al.* 2009).

El ciclo de vida de *Plasmodium vivax* incluye dos hospederos: un vertebrado, en este caso el humano y el vector, específicamente la hembra del culícido *Anopheles sp.* (Castro, I. & del Carmen, M. 2009). La transmisión comienza cuando el vector hematófago hembra se alimenta de una persona infectada e ingiere las formas sexuales llamados microgametos (gametocitos masculinos) y macrogametos (gametocitos femeninos) los cuales al fecundarse en el tubo digestivo desarrollan un cigoto móvil llamado ookinete que

se desarrollará en esporozoíto (forma móvil e infectiva) el cual se desplazará a las glándulas salivales del vector para ser inyectado al ser humano en la picadura. En este hospedero se lleva a cabo el ciclo asexual (Spencer, L. M. *et al.* 2016) donde los esporozoítos inyectados viajan por el torrente sanguíneo hasta llegar al hígado infectando las células hepáticas multiplicándose mediante esquizogonia extraeritrocítica para dar lugar a merozoítos. Esta forma infectiva invade exclusivamente a reticulocitos (glóbulos rojos inmaduros) que contienen el antígeno Duffy en su superficie en los cuales se dará a cabo la esquizogonia eritrocítica dando lugar a esquizontes eritrocíticos los cuales romperán al glóbulo rojo infectado los cuales repetirán el ciclo (Jiménez, J. *et al.* 2005) causando las manifestaciones clínicas de la malaria.

El blanco de amplificación propuesto en este trabajo es el Antígeno Apical de Membrana o *ama -1* (de las siglas en inglés: *Apical Membrane Antigen*) el cual es un gen unicopia reconocido por su capacidad inmunogénica al ser ampliamente utilizado en pruebas serológicas, en estudios de transmisión al ser más preciso que las medidas tradicionales (Corran, P. *et al.* 2007) y es un potencial componente en el desarrollo de vacunas (Hodder, A. N. *et al.* 2001). La función de este gen se da en la invasión eritrocitaria – única fase donde el parásito se encuentra completamente expuesto al sistema inmune del hospedero - (Spencer, L. M. *et al.* 2016) estando presente en el estadio de esquizonte tardío tisular siendo almacenado en los micronemas del cuello de las roptrias. Al momento de la invasión, los micronemas secretan la proteína análoga “madura” de 66kDa –y otras proteínas importantes en el proceso de invasión- a la superficie de membrana del merozoíto (Peterson, M. *et al.* 1989) la cual en la fase de empalme – también denominado *Moving Junction Formation* - e invasión interactúa con el complejo de proteínas del cuello de las roptrias o Complejo RON (de las siglas en inglés: *Rhoptry Neck proteins*) (Remarque, E. *et al.* 2008) promoviendo la

formación de una invaginación que luego del ingreso del parásito a la célula se convertirá en la vacuola parasitófora donde se llevará a cabo su desarrollo intracelular (Cowman, A. *et al.* 2012).

Vale la pena mencionar que el *target* escogido está catalogado como un gen polimórfico gracias a la necesidad del parásito de evadir el sistema inmune del hospedero (Neafsey, D. *et al.* 2012) el cual es considerado una fuerza selectiva que fomenta la acumulación y aumento en la frecuencia de mutaciones en la población del parásito. (Souza-Neiras, W. *et al.* 2007). Se han realizado diversos estudios de variabilidad genética y diversidad de *Plasmodium sp* para poder entender la situación epidemiológica de la malaria, proponer una estrategia de control adecuada y profundizar el estudio de polimorfismos en genes que podrían ser usados en el desarrollo de vacunas entre ellos, *ama-1*. Varias investigaciones sostienen que este gen mantiene presión positiva de la selección natural (Rajesh, V. *et al.* 2007; Figtree, M. *et al.* 2000; Moon, S. *et al.* 2010; Gunasekera, A. *et al.* 2007) lo que conlleva a una alta recombinación meiótica que resulta en una alta diversidad genética del gen. Si bien no hay un acuerdo sobre cual dominio es el más conservado, Souza-Neiras, W. *et al.* 2007 manifiesta que este gen a comparación de aquellos asociados con la invasión eritrocitaria o moduladores de la respuesta inmune es altamente conservado con diversidad genética estrechamente relacionada a la región geográfica. Lamentablemente, estudios de diversidad genética de *Plasmodium vivax* en el Perú son muy escasos excepto por Delgado – Ratto, C. *et al.* 2016 El cual encontró alta diversidad génica en la amazonia peruana que podría estar relacionada a la coexistencia de diferentes haplotipos en una misma comunidad como resultado de los diferentes factores que propician la evolución como la deriva genética, la selección natural así como el flujo de genes de una población y reservorios ocultos de parásitos en un área determinada.

A nivel nacional, el principal agente causal de malaria es *Plasmodium vivax* con el 84.31% de prevalencia (Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades – MINSA. (*) Hasta la SE 22 – 2019). Este tipo de malaria se caracteriza por infecciones sub microscópicas en su mayoría asintomáticas lo que dificulta su detección debido que, al no haber sintomatología, las personas infectadas no se acercan a un establecimiento de salud para descartar la enfermedad y en el caso se le realice el examen de rutina, este no sería lo suficientemente sensible. Estas características mantienen la transmisión constante de los parásitos en una determinada área (da Silva-Nunes, M., *et al.* 2012) siendo considerados focos de transmisión donde el 97.65% de los casos se concentra en los departamentos de Loreto y Amazonas abarcando un total de 89 distritos de difícil acceso distribuidos en 7 provincias con al menos un caso de malaria (Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades – MINSA. (*) Hasta la SE 22 - 2019).

La problemática de la malaria a nivel nacional como la alta prevalencia de infecciones submicroscópicas, su impacto en la reemergencia y estabilidad de transmisión de la malaria en la amazonia peruana se demuestran en las investigaciones realizadas por Gabriel Carrasco *et al* (2017) y Rovira – Vallbona *et al* (2017) donde la primera demostró que la prevalencia de infecciones submicroscópicas por *P. vivax* en el 25% de la población y que la técnica molecular en la cual se realizó el diagnóstico es 7 veces más sensible que la microscopía que sólo pudo detectar el 3.6% de infecciones. La parasitemia promedio de las infecciones detectadas por la técnica molecular es de <5 parásitos/uL y en el 52% de infecciones <10 parásitos/uL. El otro estudio diagnosticó malaria mediante ensayos de microscopía y cuantificación parásitos totales mediante técnicas moleculares donde

demonstró que las infecciones por *P. vivax* fueron del doble que *P. falciparum* (7.2% y 3.2% respectivamente) y de las cuales el 73.5% fueron submicroscópicas.

Cook.*et al.* (2015) tuvieron como objetivo comprobar si la técnica LAMP de rutina es efectiva en zonas rurales de Zanzíbar – Costa Oriental de África comparándose con las PDR y PCR como referencia. En Zanzíbar, al igual que la amazonia peruana, presentan casos de infecciones asintomáticas y de baja parasitemia. Por ello, esta investigación realizó un screening en áreas de transmisión permanente (hotspot) antes del periodo de lluvias en un total de 997 personas. Basándonos en la PCR, LAMP y las PDR tuvieron una sensibilidad del 88.3% y 55.6% respectivamente.

Otro estudio realizado por Han, E. *et al.* (2007) diseñaron una técnica tipo LAMP desarrollada capaz de detectar las 4 especies de *Plasmodium* que infectan al humano. Su objetivo fue compararla con la microscopia para comprobar si la técnica LAMP diseñada es un método de diagnóstico efectivo en clínicas y áreas rurales. Esta investigación colectó 110 muestras de sangre de pacientes con malaria no complicada en una clínica en Tailandia las cuales fueron analizadas mediante PCR anidada como técnica de referencia, microscopia y LAMP. El análisis por microscopia detectó el 54.5% de infecciones con parasitemia entre los 365-16,500 parásitos/ μ L a diferencia de LAMP el cual tuvo el 98.3% de sensibilidad pudiendo detectar 59 de 60 infecciones positivas por microscopia y una especificidad del 100%.

La investigación realizada en Tailandia por Pöschl *et al* (2010) comparó las técnicas LAMP, microscopia y PCR anidada para el diagnóstico de 105 muestras de sangre colectadas. LAMP pudo detectar 22 de 23 infecciones positivas por PCR anidada (técnica de referencia) obteniendo un 100% de sensibilidad en infecciones causadas por *P. vivax* a diferencia de la microscopia que solo detecto el 65%.

Hopkins *et al* (2013) compararon el kit Malaria LAMP desarrollado por Eiken Chemical® con las técnicas PCR cuantitativa, microscopia y PCR anidada. Estos métodos de diagnóstico se pusieron a prueba en 272 muestras de pacientes de una clínica rural en Uganda. En esta investigación, la técnica LAMP junto con la PCR anidada obtuvo una sensibilidad del 90% a diferencia de la microscopia con el 51%.

Una investigación se llevó a cabo en la Amazonía peruana en el 2017, se buscó implementar la técnica LAMP en el diagnóstico del género *Plasmodium sp* como herramienta de diagnóstico en zonas rurales. Serra-Casas y colaboradores compararon los límites de detección con la microscopía, el kit comercial LAMP Pan/Pf comercial de Eiken Chemical Company y PCR en tiempo real el cual fue usado como referente. La sensibilidad del LAMP comercial para género fue del 91.8% y especificidad del 91.9% a comparación de la microscopia con un 20.3% de sensibilidad en campo.

El gen utilizado en el presente trabajo para la detección molecular de *Plasmodium vivax* fue seleccionado gracias a los ensayos realizados por Reller *et al* (2013) que emplea el locus *ama-1* en un sistema de PCR multiplex cuantitativo el cual obtuvo 97.3% de sensibilidad y 100% de especificidad clínica

Por último, el proyecto “Círculo de investigación: Hacia la eliminación de la malaria en el Perú” financió la tesis de licenciatura donde se diseñó una técnica de diagnóstico tipo LAMP a cargo de la licenciada Ana Lucía Rosales Rosas (2018) utilizando el locus *pvr47*. Se determinó el límite de detección de 3.89 parásitos/ μ L mediante diluciones seriadas de ADN plasmídico pero al implementarlo en campo sólo pudo detectar el 48.14% de infecciones, es decir, 26 de 54 infecciones confirmadas por la técnica molecular Mangold.

9. HIPÓTESIS

Un adecuado diseño de cebadores y optimización de las condiciones de amplificación de la técnica tipo LAMP permitirá la detección sensible y específica del parásito *Plasmodium vivax* a través de la amplificación del gen *ama-1*.

10. MATERIALES Y MÉTODOS

10.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

El proyecto se realizó en el laboratorio de Malaria del Laboratorio de Investigación y Desarrollo (LID) en la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH), ubicada la Av. Honorio Delgado 430, San Martín de Porres, provincia de Lima y departamento de Lima.

Las asesorías del desarrollo y redacción se llevaron a cabo en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma.

10.2. TIPO Y DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

La investigación es tipo observacional descriptivo. Se desarrolló de acuerdo a las etapas mostradas en la Fig. 1.

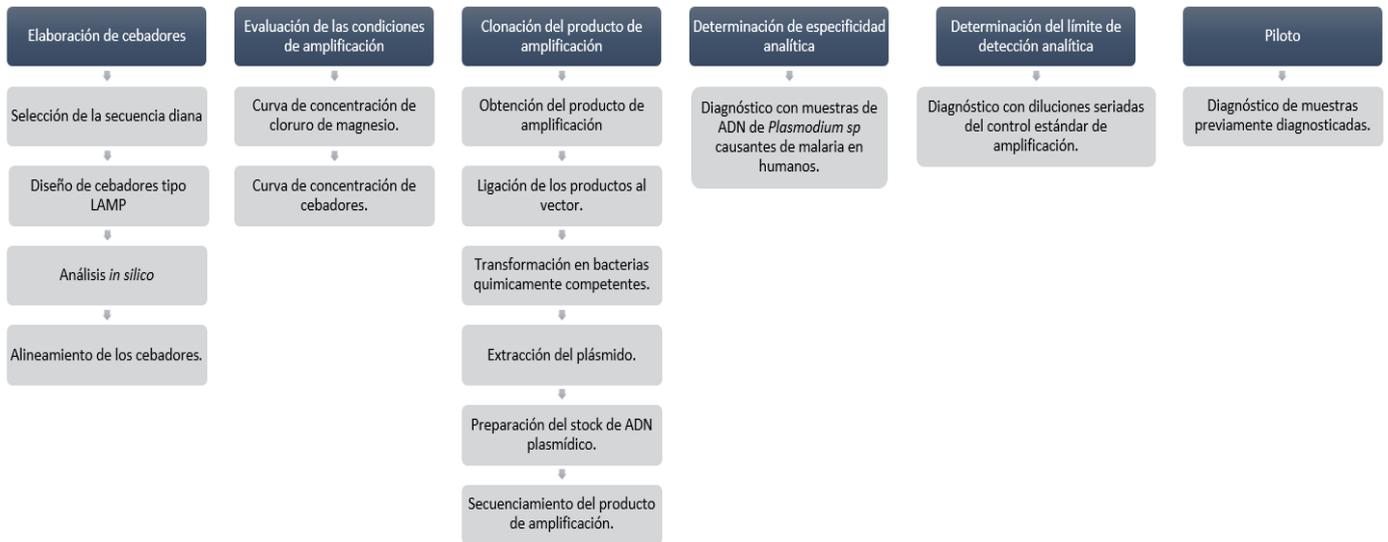


Fig. 1: Diseño de estudio dividido en seis etapas: elaboración de cebadores, evaluación de las condiciones de amplificación, clonación del producto de amplificación, análisis de especificidad analítica, determinación del límite de detección analítica, y evaluación de la técnica.

10.3. VARIABLES

Las variables para la solución de la hipótesis fueron las siguientes:

10.3.1. Variables independientes: Concentración de magnesio, concentración de dNTPs, temperatura de amplificación, concentración de enzima isotérmica y concentración de cebadores.

10.3.2. Variables dependientes: Amplificación de la secuencia diana del gen *ama-1*.

10.4. OBTENCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO

Para los ensayos de obtención del amplicón se utilizó 2 muestras de pool de ADN extraído de pacientes con malaria causada por *P. vivax* que fueron utilizados como controles y 2 muestras de ADN de *P. falciparum* cepa 3D7.

Para el ensayo de especificidad analítica fueron 1 muestra de ADN de *P. malariae*, *P. falciparum* cepa 3D7, *P. vivax* cepa Sal I, *P. ovale* provenientes del Center for Disease Control and Prevention (CDC) los cuales causan malaria en humanos. Dos muestras de *P. falciparum* y dos muestras pool de *P. vivax* fueron utilizados para control positivo fueron provenientes del Laboratorio de Investigación y Desarrollo (LID) en la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH).

Finalmente, las 31 muestras utilizadas en la prueba de evaluación de la técnica, fueron colectadas previo consentimiento informado para el uso de las muestras en el departamento de Loreto – Perú durante el 2018 por el proyecto “Círculo para la implementación de una plataforma de diagnóstico molecular diferencial y TICs para la vigilancia de zika, dengue, chikungunya y malaria” que cuenta con aprobación del Comité de ética de la UPCH código: 100405.

10.4. PROCEDIMIENTOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

10.4.1. Análisis bioinformático

10.4.1.1. Selección del=blanco de amplificación

El gen utilizado para la detección molecular de *Plasmodium vivax* fue *ama-1*. El blanco se seleccionó debido a su amplio uso en sistemas de detección antigénica y al ensayo realizados por Megan Reller y colaboradores que emplea el locus *ama-1* en un sistema de PCR multiplex cuantitativo (Reller, M. *et al.* 2013)

10.4.1.2. *Diseño de cebadores tipo LAMP*

Se descargó la secuencia completa del blanco *ama-1* de *Plasmodium vivax* cepa SAL I (la cual es considerada una secuencia referencial del parásito) de la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). La secuencia problema fue ingresada en el software en línea *PrimerExplorer V5* el cual es específico para el diseño de cebadores tipo LAMP del cual se obtuvo 5 sets con las características necesarias de esta técnica.

Al finalizar el análisis de los cebadores y escoger el set más adecuado para los ensayos, se diseñó un par de cebadores que flanqueen la región de interés del set #3 para que reemplacen a los F3/B3 con el objetivo de ser usados en la obtención del producto de amplificación y su posterior clonación. Para el desarrollo de estos, primero se ubicó la posición de los cebadores F3/B3 en la secuencia, al ubicarlos, desplazé la secuencia a amplificar 500 nucleótidos hacia el extremo 5' del forward y se desplazaron 500 nucleótidos a la posición 3' del reverse lo que permitiría aumentar el rango de búsqueda. Posteriormente, se identificará la posición de anillamiento y gracias a la herramienta bioinformática *Primer 3* se buscaron cebadores externos a estas posiciones. En el caso del forward, debe de estar antes de la posición de anillamiento y en el reverse debe de ser posterior a la posición de anillamiento en un máximo de 20 nucleótidos de distancia. Estos cebadores se denominaron: *EFAMI* para el forward – F3- y *ERAMI* para el reverse -B3-.

Finalmente, de la base de datos del NCBI se descargó la secuencia del locus *ama-1* de la cepa *P. vivax* Belem (NCBI ID: EU395595.1) la cual se utilizó como cepa de referencia para confirmar la presencia y ubicación de los cebadores externos diseñados *in situ* y los escogidos para su síntesis.

10.4.1.3. *Análisis in silico*

En esta etapa se utilizaron herramientas bioinformáticas en línea donde se analizó la composición, estabilidad y especificidad de los cebadores. Los más aptos serán seleccionados para su síntesis.

10.4.1.3.1. *Análisis de especificidad*

Este parámetro fue realizado utilizando la página *Primer Blast* proporcionada por el NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) el cual compara la secuencia problema, en este caso la secuencia *Plasmodium vivax ama-1* (NCBI ID: NC_009914.1) con secuencias de la base de datos del NCBI mediante el logaritmo heurístico. En este paso se comprobará si los cebadores amplifican exclusivamente al target y organismo blanco evitando reacciones cruzadas entre especie de *Plasmodium* u otras especies y/o secuencias diana.

10.4.1.3.2. *Análisis de formación de estructuras secundarias*

Se pudo predecir las propiedades biofísicas de los cebadores específicos para *ama-1* de *P. vivax* como temperatura de melting, delta G y otros con lo cual se inferirá su rendimiento en el ensayo para prevenir potenciales formaciones de estructuras secundarias como hairpin, homodímeros y heterodímeros. Dicha data fue obtenida por la herramienta bioinformática Olygoanalyzer desarrollada por *Integrated DNA Technologies* (IDT).

Los cebadores se seleccionaron bajo las siguientes condiciones:

- Longitud de cebadores entre 18 a 23 nucleótidos.
- El tamaño del producto de amplificación estuvo en un rango máximo de 220pb excepto el de los cebadores externos (EFAM1 y ERAM1) desarrollados *in situ* los cuales al ser diseñados para la clonación se aseguró que se contenía la secuencia de interés siendo el tamaño del producto de amplificación 340pb.
- El rango del porcentaje de GC es entre el 30% y 50% asegurando la estabilidad de los cebadores.
- Los cebadores propuestos amplificaron cepas de *Plasmodium vivax* y a las especies *P. knowlesi*, *P. inui*, *P. cynomolgi* *P. coatneyi* y *P. fieldi* las cuales sólo parasitan a simios.
- La probabilidad de formación de estructuras secundarias se puede inferir con los datos de la energía libre de Gibbs (ΔG) siendo más probable cuando es mayor a -8 kcal/mol por lo que se trabajó con aquellos cebadores que contienen menos de ese valor.
- El promedio de Temperatura de Melting (T_m) es entre los 55-57°C.

10.4.1.4. Alineamiento y ubicación de los cebadores en secuencias del locus *ama-1* en cepas de *P. vivax*

Este gen al poseer una alta diversidad genética por estar en contacto con el sistema inmune fue necesario realizar un alineamiento (MUSCLE) de los cebadores usando el software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) 7.0 con el objetivo de identificar si estos se encuentran en regiones conservadas del genoma y si están presentes en 100 secuencias alineadas del locus *ama-1* de diferentes cepas de *Plasmodium vivax* obtenidas de la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

Los cebadores escogidos para síntesis fueron analizados con el programa GeneDoc el cual es capaz de editar e incluir múltiples cebadores al mismo tiempo con el cual se hizo un análisis de confirmación.

10.5.2. Optimización del ensayo

La estandarización se realizó con la Combinación 1: *F3 Ex. / B3 Ext* y Combinación 2: *F3 Ext. / B3* de cebadores escogidos según los parámetros previamente mencionados. Se realizaron curvas de concentración de sulfato de magnesio y cebadores para definir las concentraciones óptimas en los ensayos ya que son componentes que podrían afectar la amplificación.

10.5.2.1. Curva de sulfato de magnesio

Para la curva de sulfato de magnesio se realizaron ensayos a 7mM, 7.5 mM y 8mM con muestras fueron diluciones seriadas en base 10 de la curva estándar donde primera muestra tendría 0.02ng/ml hasta 2×10^{-8} ng/ml de ADN plasmídico seguido del blanco.

10.5.2.2. Curva de cebadores

En el caso de la curva de cebadores se realizaron 3 diseños de ensayos en diferentes concentraciones de cebadores siendo el primero: F3/B3: 0.2 μ M; FIP/BIP: 2 μ M. F3/B3: 0.2 μ M; FIP/BIP: 4 μ M. F3/B3: 0.4 μ M; FIP/BIP: 4 μ M. Las muestras también fueron diluciones seriadas en base 10 de la curva estándar donde primera muestra tendría 0.02ng/ml hasta 2×10^{-8} ng/ml de ADN plasmídico seguido del blanco.

10.5.3. Obtención del amplicón

Se diseñaron las combinaciones entre los cebadores (Anexo 1) del set #3 y las diseñadas *in silico* (Ver tabla 2) para comprobar si hay amplificación. El mix de reacción utilizado fue ajustado en ensayos previos y se utilizaron como controles mezclas de ADN de *P. vivax*, *P. falciparum* y blancos de reacción.

La selección de los cebadores se basó en los siguientes parámetros:

- De las combinaciones de cebadores, se comparó y escogieron los cebadores donde las reacciones positivas tienen la coloración fucsia más intensa.
- Mayor contraste de la coloración del negativo (amarillo – ámbar) y el positivo (fucsia – magenta) era más evidente que los demás.
- Amplificación específica para *P. vivax*.

10.5.4. Clonación del producto de amplificación para la obtención del control estándar

Esta etapa tiene como objetivo el desarrollo de la solución madre de ADN plasmídico el cual se someterá a diluciones seriadas que serán usados como curva estándar de amplificación en los ensayos posteriores.

10.5.4.1. Obtención del producto de amplificación

Se realizó un PCR convencional con gradiente de temperatura de los cebadores externos para determinar a cuál temperatura se obtendrá el mejor anillamiento del ensayo. Se realizó un PCR convencional con gradiente de temperatura - 58°C, 59.9°C, 62°C y 63°C de los cebadores externos - ya que estos flanquean la secuencia total- diseñados *in situ* para conocer la temperatura ideal de amplificación.

Los productos de amplificación con las bandas más nítidas y de mayor intensidad se purificaron para eliminar cualquier rastro de producto de PCR con el protocolo descrito en el anexo 1. Al finalizar la precipitación se preparó un gel de agarosa al 2% para comprobar si el peso del producto de amplificación concuerda con el producto de los cebadores externos.

10.5.4.2. Ligación de los productos al vector PCR®2.1

Se procedió a introducir la secuencia de interés del producto de amplificación escogido al vector de clonación *PCR®2.1* mediante el kit *T.A Cloning™ Kit, with pCR™2.1 Vector and One Shot™ TOP10 Chemically Competent E. coli* siguiendo el protocolo del fabricante (Anexo 2).

10.5.4.3. Transformación en E. coli OneShot® TOP10

Se introdujo el plásmido de interés en bacterias *E. coli OneShot® TOP10* químicamente competentes mediante choque térmico según el protocolo recomendado por el fabricante (Anexo 3). Al finalizar la transformación se realizó una siembra del cultivo transformado junto un inductor de β -galactosidasa llamado IPTG y medio X - Gal en placas con agar Luria-Bertani (LB) + ampicilina. Al finalizar el tiempo de incubación, se seleccionaron 5 colonias y se sembraron en 5 tubos con caldo LB + 1ml ampicilina dejándose incubar en un *shaker* a 37°C por 20 horas para obtener mayor volumen de baterías con el inserto de interés. Dichos cultivos se sometieron a lisis alcalina para confirmar la presencia del inserto mediante un gel de agarosa al 2% que se corrió a 90V por 30 minutos.

10.5.4.4. Extracción del plásmido

Al comprobar el crecimiento bacteriano, se tomó una alícuota 1ml de cada cultivo y se le realizó lisis alcalina según el protocolo del libro “*Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Volume 1*” (Anexo 4). Al finalizar el procedimiento, se preparó un gel de agarosa al 2% para comprobar en cuales cultivos está presente el inserto de interés.

Para confirmar en qué tubos hubo clonación exitosa, la extracción del plásmido a gran escala se realizó con el kit *ZymoPURE Plasmid Miniprep* (Anexo 5). En la etapa final, se realizaron dos eluciones continuas para obtener un mayor volumen de ADN plasmídico denominándose la primera “Dil. A” y la segunda “Dil. B”.

El excedente de cultivo se criopreservó con glicerol (500µL de glicerol + 700µL de cultivo) y se almacenó a -80°C.

10.5.4.5. Preparación de la solución madre de ADN plasmídico y la curva estándar.

A los dos volúmenes de ADN plasmídico obtenidos (Dil. A y Dil. B” se les realizó una dilución 1/10 y se cuantificó mediante *QUBIT* con el kit *dsDNA Hs Assay by Molecular Probes* obteniendo la concentración aproximada de ADN plasmídico en ng/ml. Con esta información y el peso del plásmido se pudo determinar un aproximado del número de copias del inserto de interés con lo cual se preparó el stock de ADN plasmídico diluyendo los volúmenes iniciales hasta obtener la concentración final de 2.19ng/ml el cual se tomó una alícuota 15 µL en eppendorfs de 0.2ml. Las 20 alícuotas del stock se agruparon en tubo de 50ml para evitar contaminación y se almacenaron a -20°C.

La preparación de la curva estándar se realizó diluyendo el stock mencionado anteriormente con siete diluciones seriadas 1:10 con volumen final de 100µL. Cada curva preparada podía usarse en un plazo máximo de 5 días almacenándose a 4°C.

10.5.4.6. Secuenciamiento del producto de amplificación

Para confirmar si el producto de amplificación contiene el inserto de interés se envió a secuenciar 45 µL a Macrogen Corea para su secuenciamiento.

10.5.5. Análisis de especificidad analítica

Este ensayo sirvió para confirmar si la técnica tiene la capacidad de detectar exclusivamente al organismo problema en una muestra por lo que se utilizaron muestras de ADN de diferentes especies de *Plasmodium* como *P. malariae*, *P. falciparum* cepa 3D7, *P. vivax* cepa Sal I, *P. ovale* provenientes del Center for Disease Control and Prevention (CDC); muestras de *P. falciparum* y pool de *P. vivax* provenientes del laboratorio de malaria.

10.5.6. Determinación del límite de detección

Con los resultados de los ensayos de estandarización, se escogieron los cebadores **EFAM1 / A1VB3** (F3 ext. /B3) según los mismos parámetros de la selección del amplicón previamente mencionados además un mayor límite de detección.

En este ensayo se determinó la sensibilidad analítica, es decir, cuanta concentración de muestra como mínimo puede ser medida por la técnica. Se realizaron 27 repeticiones del ensayo donde se utilizó como diseño de muestra la curva estándar desde 0.2ng/ml hasta 2×10^{-7} ng/ml de ADN plasmídico seguido del blanco.

10.5.7. Evaluación de la técnica

El sistema LAMP estandarizado fue puesto a prueba en 31 muestras de ADN positivas y negativas por *P. vivax* obtenidas de una colecta en el departamento de Iquitos – Perú. Estas muestras fueron previamente diagnosticadas por microscopía en campo, la técnica cuantitativa molecular Mangold y la técnica de detección de *P. vivax* financiado por el proyecto “Círculo para la implementación de una plataforma de diagnóstico molecular diferencial y TICs para la vigilancia de zika, dengue, chikungunya y malaria” denominada “LAMP Pvr47” diseñado por la Licenciada Ana Lucía Rosales Rosas.

10.6. Aspectos éticos

Esta investigación es parte del proyecto “Círculo para la implementación de una plataforma de diagnóstico molecular diferencial y TICs para la vigilancia de zika, dengue, chikungunya y malaria”, el cual cuenta con la aprobación del comité de ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia con el código de inscripción 100405. (Anexo 7)

11. RESULTADOS

11.1. Análisis bioinformático

Se elaboraron un total de 6 pares de cebadores tipo LAMP para el locus *ama-1* de *Plasmodium vivax* de los cuales 5 fueron obtenidos mediante la herramienta bioinformática “Primer 3” y un par fue diseñado manualmente. Al realizarse el análisis *in silico* (Anexo 7) se eligieron para su síntesis el par diseñados manualmente y el set N° 3 obtenido de *Primer 3* a Invitrogen mediante la empresa BELOMED SRL.

Primer par de cebadores (diseñado a través del programa bioinformático “Primer 3”):

5'->3'

F: AGAGAATTCCGCTGTTAGC

R: GAAGCTTTCATTTTTATCTGGC

FIP: GGTCATTCGCATTGGGGAAG-CTGTGGCTACAGGAGATC

BIP: ACAATAGCGAACCTTAAGGCAA-CTGCACAAAGCTATATCGTTTA

Segundo par de cebadores (diseñados manualmente): 5'->3'

F: AAGTGGAAAATGCAAAGTACA

R: ATGTGGCATGTTTTATTCTTT

La ubicación del primer par de cebadores F3 y B3 en la cepa de referencia de *P. vivax* “Belem” (Ver Fig. 2) confirmó que hibridan en la posición 309 – 327 y 526 – 509 respectivamente. Los diseñados manualmente: F3 externo – EFAM1- está en la posición 242 – 262 y el B3 externo – ERAM1- en la posición 581 – 561.

El análisis de las secuencias alineadas del locus *ama-1* (Ver Fig. 3) demostró que los cebadores escogidos se encuentran en una región altamente conservada del dominio 1 comprendiendo del codón 81 al 528, estando presentes en el 97% y 100% de las cepas. También se encontró una mutación a 6 nucleótidos del extremo 3 del cebador F3 externo en las cepas KR09-1-1 (KM230320.1) y KR10-3-1 (KM230354.1).

```
>EU395595.1 Plasmodium vivax strain Belem apical merozoite protein 1
(ama1) gene, partial cds

ATGAATAAAATATACTACATAATCTTTTTAAGCGCCAGTGCCTTGTGCACATTGGGAAGTGCGGGCGAA
ACCAGAAGCCGAGCAGGCTGACCCGTAGCGCCAACAACGTTCTACTGGAAAAGGGGCTACCGTTGAGAG
AAGCACACGAATGAGTAACCCCTGGAAAGCGTTCATGGAAAAATACGACATCGAAAGAACACACAGTTCT
GGGGTTCGAGTGGATTTAGGGGAAGATGCAGAAGTGGAAAAATGCAAAGTACAGAAATCCAGCTGGAAGAT
GTCCTGTTTTTGGAAAGGGTATCGTCATAGAGAATTCGCTGTTAGCTTCTTAAAACCTGTGGCTACAGG
AGATCAGAGGCTGAAGGATGGAGGTTTCGCCTTCCCAATGCGAATGACCATATCTCCCCATGACATTA
GAGAACCTTAAGGCAAGGTATAAAGACAATGTAGAGATGATGAAGTTAAACGATATAGCTTTGTGCAGAA
CCCACGCAGCTAGCTTTGTCATGGCAGGGGATCAAATTCGTCCTACAGACACCCAGCTGTATACGACGA
AAAGGAAAAAACATGCCACATGTTGTATTTATCAGCGCAGGAAAAATATGGGTCCGAGGTACTGCAGCCCA
GATGCACAAAAATAGAGATGCCGTGTTCTGCTTCAAGCCAGATAAAAAATGAAAGCTTTGAAAACCTGGTGT
ATTTGAGCAAAAAATGTGCGTAATGATTGGGATAAAAAATGCCCCGTAAAAATTTAGGAAACGCCAAGTT
CGGATTTATGGGTGGATGGGAACTGCGAAGAAATTCATACGTTAAAGAAGTGGAGGCAAAGGATCTGCGC
GAATGCAACCGAATCGTTTTTGAAGCGAGTGCCTCAGATCAACCAACTCAGTATGAAGAAGAAATGACGG
ATTATCAAAAAATACAACAAGGGTTTAGACAAAAACAACCGAGAGATGATTAAGAGTGCCTTTCTTCCAGT
GGGTGCATTCAACTCGGATAATTTCAAAAAGTAAAGGAAGAGGATTTAACTGGGCAAATTTGATTCTGTA
AAAAAGAAGTGTTACATTTTTAATACCAAACCGACTTGCCTCATTAAATGACAAAAATTTTATTGCAACAA
CGGCGTTATCTCACCCACGAGAAGTAGACCTGGAGTTCGCCCTGCAGCATATATAAAGACGAAATTGAAAG
AGAAATTAAGAAACAATCGAGGAACATGAATCTGTACAGTGTGATGGGGAACGCATTGTCTGCCGAGG
ATATTTATCTCCAACGATAAGGAGAGTATCAAATGTCCCTGCGAACCTGAGCACATTTCCAACAGTACCT
GCAACTTTTTACGTTTGTAACTGTGTAGAGAAAAGGGCGGAAATTAAGGAAAAATAACCAAGTTGTTATAAA
GGAAGAATTTAGGGATTATTACGAAAAATGGGGAGGAAAAATCGAACCAAGCAGATGCTACTAATCATTATC
GGAATAACTGGTGGCGTGTGCGTCGTCGCGCTGGCCTCTATGGCCTACTTCAGGAAGAAGGCTAACAATG
ATAAGTATGACAAGATGGACCAGGCAGAGGGGTACGGGAAGCCCACCACCAGGAAGGACGAGATGCTCGA
CCCCGAGGCCTCCTTCTGGGGCGAGGACAAGCGGGCCTCCCACACCACGCCCGTGTGATGGAGAAGCCA
TACTAC
```

Fig. 2: Secuencia parcial del locus *ama-1* de la cepa Belem de *P. vivax*. Las secuencias de verde representan a los cebadores F3 y B3 externos (EFAM1 y ERAM1) y los de rojo a los cebadores diseñados *in silico* (F3 y B3) respectivamente. El recuadro morado representa la mutación del cebador externo.

En la Fig. 3 se observa de izquierda a derecha: Las columnas coloreadas representan los nucleótidos de hibridación en las secuencias. La primera amarilla representa a la secuencia que hibrida con el cebador F3 externo y la última a B3 diseñado *in silico* confirmando su presencia en el 97% y 100% de cepas. La primera columna roja es el cebador F2 el cual se encontró en un 98% y el B2 (segunda columna roja), cuya secuencia está presente en todas las especies. Las columnas azules representan a los cebadores FIP y BIP (permiten la formación del bucle) en donde los espacios en blanco representan posiciones nucleotídicas muy variables. Con el cebador F1 se encontraron dos regiones de alta variabilidad: en la posición 11 del 3' hay mutación trimórfica donde la timina (90.1%) fue reemplazada por la adenina en un 7% y por la guanina en un 3%; la otra secuencia está ubicada en la posición 7 del 3' donde se reemplazó la adenina (58.4%) por la guanina en un 41.6%. El B1 tuvo tres regiones de variabilidad en las posiciones 178, 182 y 194 siendo las tres mutaciones transicionales.

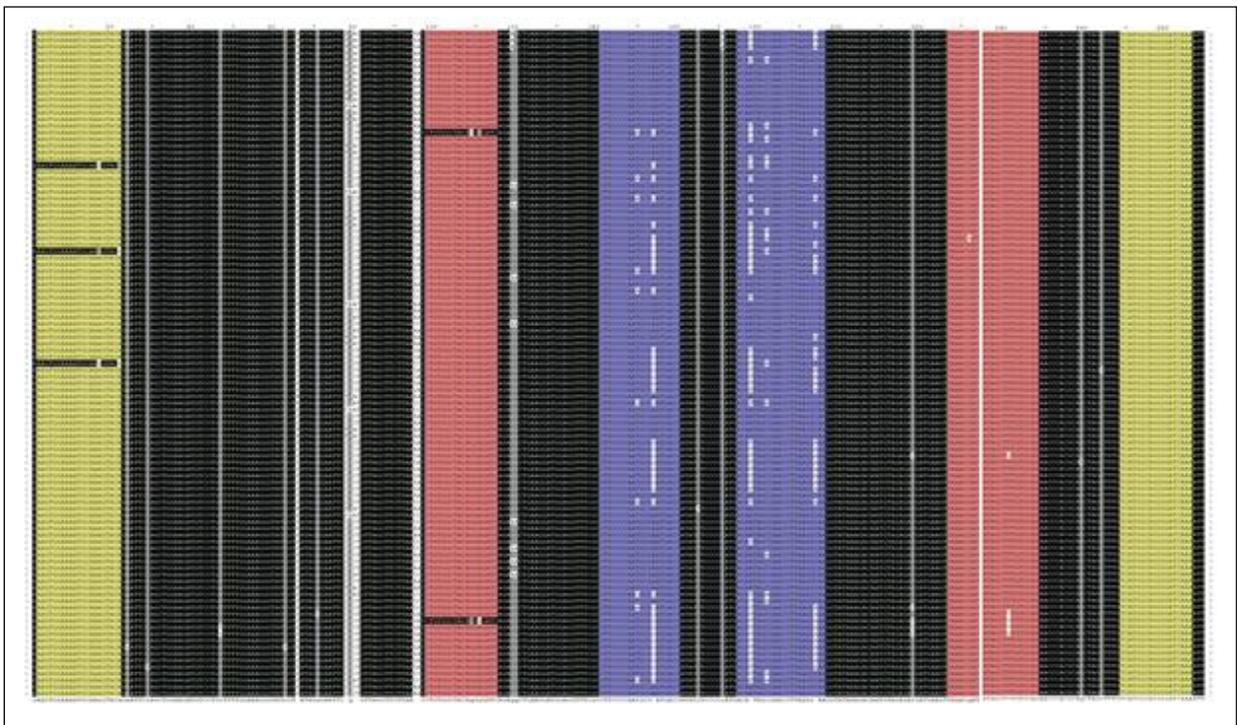


Fig. 3: Análisis de cebadores escogidos para la técnica LAMP con la herramienta GeneDoc.

El análisis de especificidad *in silico* de EFAM1 (F3 ext.) y A1VB3 (B3) – escogidos para la técnica- fue crucial ya que el gen *ama-1* se comparte entre las especies del sub filo *Apicomplexa*. En el primer análisis sin restricción, de los 36189 organismos que presentan las secuencias el 99.9% de ellos amplifican la región *ama – 1* de *P. vivax* mientras que el 0.01% (4 organismos) amplifican al cromosoma 9 *P. vivax*. Cuando se filtra la búsqueda al phylum *Plasmodium sp* (NCBI taxid: 5820) de los 8483 resultados de los cuales 13 presentan las secuencias en organismos no *P. vivax*, es decir, las especies *P. cynomolgi*, *P. fieldi*, *P. simiovale* las cuales sólo están reportados en ocasionar malaria en primates. Se encontraron dos concordancias para la especie *P. ovale* (ID: LT594595.1; LT594516.1) pero tenían una y tres mutaciones en los primeros nucleótidos del extremo 3' respectivamente por lo que el anillamiento en dichas secuencia sería muy poco probable al igual que la concordancia para *P. malariae* (ID: LT594492.1) la cual tiene 2 mutaciones en el primer y segundo nucleótido del extremo 3' (de preferencia los cuatro nucleótidos iniciales de la región 3' deben de ser conservados para aumentar la probabilidad de amplificar en diferentes cepas).

11.2. Evaluación y optimización del ensayo

Los resultados de los ensayos de estandarización mediante la curva de magnesio:

- Ambos diseños de cebadores, mencionados anteriormente, amplificaron hasta 2×10^{-4} ng/ml a 7Mm de magnesio.
- Ambas combinaciones a 7.5Mm amplificaron hasta 2×10^{-5} ng/ml de magnesio.
- Los cebadores externos a 8Mm mostraron inespecificidad a diferencia de la que los diseñados *in silico* que amplificaron hasta 2×10^{-6} ng/ml de magnesio.

La estandarización mediante la curva de cebadores (1° F3/B3: 0.2µM, FIP/BIP: 2µM; 2° F3/B3: 0.2µM, FIP/BIP: 4µM y 3° F3/B3: 0.4µM, FIP/BIP: 4µM):

- Los cebadores externos en la primera condición amplificaron hasta 2×10^{-5} ng/ml en las tres condiciones.
- La segunda combinación de cebadores amplificó hasta 2×10^{-7} ng/ml en la primera condición y las otras dos amplificaron hasta 2×10^{-6} ng/ml

Con estos resultados se escogió la combinación de cebadores **EFAM1 / A1VB3** (F3 ext. / B3). Las mejores condiciones de amplificación para LAMP son demostradas en la tabla N°2 a una temperatura de hibridación constante de 60°C durante 1 hora.

11.3. Obtención del amplicón

Las combinaciones escogidas según los parámetros previamente mencionados fueron el **F3 Ex. / B3 Ext** (Combinación 1) y el **F3 Ext. / B3** (Combinación 2) en donde se pudo observar que solo amplifica a muestras de ADN de pools de *P. vivax* observándose el viraje de color a fucsia intenso (gracias al viraje del pH del rojo neutro) seguidas de las muestras de pool de ADN de *P. falciparum* y blanco de reacción (agua de PCR) en los cuales se mantuvo la coloración basal de reacción: amarillo/ámbar (Ver Fig. 4).



Donde:

1	2	3	4	5
Pool ADN <i>P. vivax</i>	Pool ADN <i>P. vivax</i>	Pool ADN <i>P. falciparum</i>	Pool ADN <i>P.</i> <i>falciparum</i>	Blanco

Fig. 4: La imagen izquierda representa a la combinación 1 y la imagen de la derecha a la combinación 2. Se observa que las muestras con ADN de *P. vivax* (Pocillo 1 y 2) dieron positivo y las últimas 3 muestras (Pools de ADN de *P. falciparum* y blanco de amplificación) no viraron de color por lo que se les consideró negativo.

11.4. Clonación del producto de amplificación para la generación de la curva estándar

En la Fig. 5 se puede observar las bandas de amplificación a temperaturas de 58, 60, 62 y 63°C. Se realizó la clonación del producto de amplificación de 60°C, tal como lo exige el método LAMP. Además, se confirmó que el peso de los productos de amplificación es 340pb.

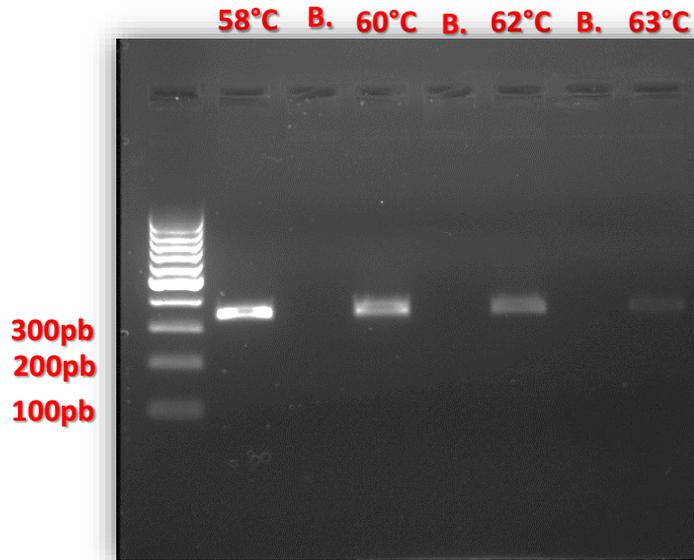


Fig. 5: Gel de agarosa al 2% con el producto de amplificación a diferentes gradientes de temperatura.

Para confirmar si las bacterias contienen el inserto de interés se realizó una siembra a partir de colonias en cinco tubos con medio líquido a los cuales se les realizó la extracción del ADN plasmídico confirmándose mediante un gel de agarosa (Ver Fig. 6).

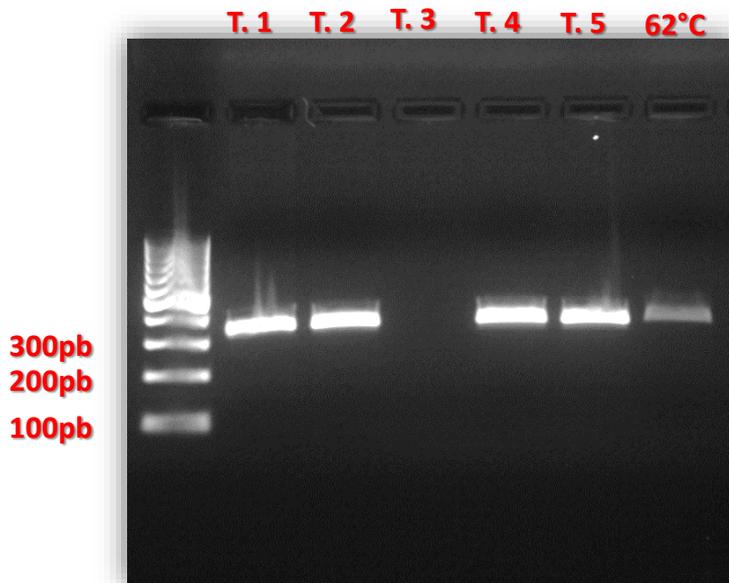


Fig. 6: Gel de agarosa al 2% donde se comprobó la presencia del inserto en los tubos 1,2, 4 y 5. Se descartó el tubo #3.

Se escogió cultivo del tubo 1 para sembrar en placas de agar LB + ampicilina y se incubó a 37°C durante 20h. Dos colonias se resembraron en dos tubos con 10ml de caldo LB + ampicilina y se incubó a 37°C durante 20h. Del cultivo obtenido, se tomó una alícuota de 1ml de cada uno, se realizó lisis alcalina y extracción del plásmido con el kit *ZymoPURE Plasmid Miniprep*. Los dos volúmenes de plásmido eluidos (A y B) se les realizó una dilución 1/10 y se cuantificó mediante *QUBIT*. Al obtener una concentración similar de 13.7ng/ml y 13.9ng/ml se unificaron como Stock 1:5 del cual se tomó una alícuota de 90µL y se diluyeron en 910µL de agua ultra pura al cual se denominó “Dil. X” el cual tiene un promedio de 6.57ng/ml de ADN plasmídico. A partir de “Dil. X”, se realizó una dilución 1:3 obteniendo una concentración de 2.19ng/ml la cual se usará como stock para los análisis de sensibilidad analítica y para la generación del control de amplificación.

11.5. Secuenciamiento del producto de amplificación

El análisis se realizó mediante la herramienta bioinformática *Blast Nucleotide* en el cual se comparó la secuencia consenso obtenida por el secuenciamiento con la base de datos NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) y entre las especies de *Plasmodium*. En ambas búsquedas la secuencia consenso tuvo un rango de identidad entre el 99.05% - 100-00% con el gen *ama-1* de la especie *Plasmodium vivax* de diferentes cepas (Ver anexo 8).

Secuencia consenso: 5'->3'

AAAGTACAGAATTCCAGCTGGAAGATGTCCTGTTTTTGGAAAGGGTATCGTCATA
GAGAATTCCGATGTTAGCTTCTTAACCCCTGTGGCTACAGGAGATCAGAGGCTGA
AGGATGGAGGTTTCGCCTTCCCAAGGCGGATGACCATATCTCCCCCATGACATT
AGAGAACCTTAAGGCAAGGTATAAAGACAATGTAGAGATGATGAAGTTAAACGA
TATAGCTTTGTGCAGAACCCACGCAGCTAGCTTTGTCATGGCAGGGGATCAAAAT
TCGTCCTACAGACACCCAGCTGTATACGACGAAAAGAATAAA

11.6. Análisis de especificidad analítica

La especificidad analítica del ensayo fue del 100% amplificando solo las muestras de *P. vivax*.

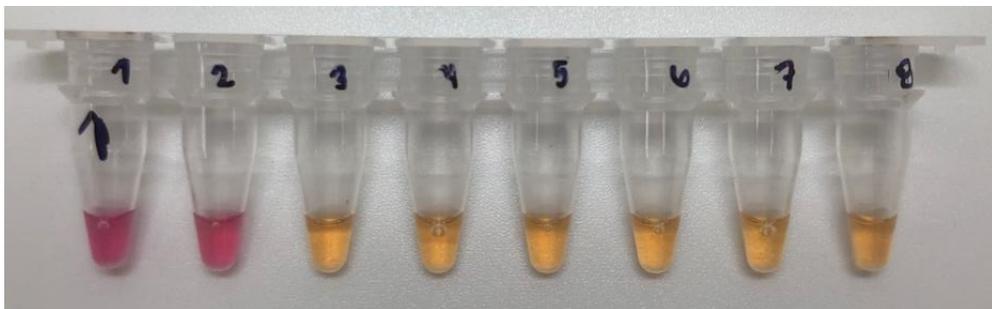


Fig. 7: Ensayo de especificidad analítica.

Donde:

1	2	3	4	5	6	7	8
<i>P. vivax</i> Pool 100ul	<i>P. vivax</i> SAL I*	<i>P. f</i> 3D7*	<i>P. f.</i> 3D7*	<i>P. ovale</i> *	<i>P. malariae</i> *	<i>P. falciparum</i>	Blanco

*Muestras otorgadas por el CDC.

11.7. Determinación del límite de detección

A partir de las diluciones seriadas con el plásmido de interés, el 81.48% de veces amplificó hasta 2×10^{-5} ng/mL moléculas de ADN plasmídico (equivalente a 4 parásitos/ μ L).

11.8. Evaluación de la técnica

De las 31 muestras evaluadas, 21 fueron positivas por *P. vivax* y 2 por *P. falciparum* mediante la técnica de referencia de diagnóstico molecular PCR cuantitativa Mangold la cual nos otorgó la parasitemia logarítmica referencial de las muestras. Al comparar las dos técnicas LAMP diseñadas en el laboratorio y basándonos en Mangold, se comprobó que el target de amplificación propuesto en este trabajo de investigación pudo detectar el 85.7% de muestras positivas (n: 18).

11. DISCUSIÓN

La detección del parásito *Plasmodium vivax* a través de la amplificación del gen *ama-1* mediante la técnica LAMP ha sido analizado en el presente trabajo.

El análisis de las secuencias alineadas del locus *ama-1* demostró que los cebadores escogidos se encuentran en una región altamente conservada del dominio 1. Resultados similares a los encontrados por Gunasekera. *et al.* (2007) y Souza-Neiras. *et al.* (2007) quienes sostienen que el dominio I de *Plasmodium vivax* posee una menor tasa de variabilidad a comparación de los otros dominios por lo que los cebadores se diseñaron entre los codones altamente conservados 81 - 525 del dominio I.

Cebadores previamente reportados basados en genes mitocondriales tales como citocromo oxidasa 3 sub unidad III (Tao. *et al.* 2011) y genes multicopia (Rosales. 2018; Lucchi. *et al.* 2016; Polley. *et al.* 2010) como el *Pvr47*, sub unidad ribosomal pequeña 18s, unidad ribosomal 28s, entre otros. Dichas familias de genes son reconocidas por su mayor sensibilidad analítica y son comúnmente seleccionados como blancos de amplificación en diagnóstico molecular de la malaria siendo capaz de detectar entre 1 a 5 parásitos/ μ l. A pesar de ser un gen unicopia, *ama-1* tiene el límite de detección dentro de los rangos previamente mencionados y especificidad analítica del 100% lo cual permite su uso en la detección de infecciones causadas por *Plasmodium vivax* a nivel molecular.

El uso de betaína como agente adyuvante y cebadores “loop primers” es común en la detección de *Plasmodium vivax* en ensayos tipo LAMP. Investigaciones como las de Kudyba. *et al.* (2019), Ocker. *et al.* (2016), Imai. *et al.* (2017) utilizan este reactivo para aumentar la eficiencia y disminuir inespecificidades pero Chen. *et al.* (2011) demuestra que su uso es innecesario al no observar diferencia significativa en la eficiencia de los ensayos. A pesar de su uso contradictorio, se consideró inútil el uso de este reactivo en LAMP *ama-1* ya el diseño de los cebadores fue lo suficiente sólido como para no formar estructuras secundarias que disminuyan la eficiencia de la técnica. También, Zhou *et al.* (2014) reporta su falta de utilidad en escenarios donde los blancos de amplificación contienen un bajo porcentaje de uniones G-C siendo el caso del blanco de amplificación el cual no reporta regiones ricas en G-C (Cheng. *et al.* (2015). En el caso de los “Loop Primers”, Polley. *et al.* (2010), Han. *et al.* (2007), Singh. *et al.* (2017) los implementaron en sus técnicas con el objetivo de reducir el tiempo de incubación debido a la baja densidad parasitaria característica de las infecciones por *Plasmodium vivax* logrando obtener resultados confiables a los 100 minutos de incubación total. En el presente estudio, no fue necesario el uso de dichos cebadores ya que se determinó que 60 minutos de incubación total era el tiempo de corte para la lectura de resultados libre de inespecificidades e ideal para su aplicabilidad en campo

La concentración final del cofactor MgSO₄ en LAMP *ama-1* fue de 8mM (incluyendo la concentración del buffer), en ensayos preliminares se demostró que 9mM la presencia de inespecificidades era muy alta y a 6mM se inhibía la amplificación a diferencia de Rosales. (2018) y Ranjbar R., & Afshar, D. (2015) quien optimizaron su técnica a 6 mM de MgSO₄ (incluyendo la concentración del buffer). En la optimización de concentración de dNTPs, LAMP *ama-1* está por encima de la media (1.75 mM) si se compara con ensayos de Zhou. *et al.* (2014); Goodarzi. *et al.* (2017) y Rosales. (2018) quienes utilizan 1.4mM en

sus técnicas. Esta diferencia podría explicarse en qué el producto de amplificación de LAMP *ama-1* es de mayor longitud que lo sugerido.

Una de las principales características de LAMP es la capacidad de optar por reactivos que actúen como indicadores de amplificación de la secuencia diana mediante la presencia de turbidez, fluorescencia o viraje de color. El objetivo de LAMP *ama-1* es su implementación en áreas rurales de escasos recursos por lo cual se descartó la necesidad de equipos que controlen el proceso de amplificación. Por ello, se utilizó la colorimetría a través del rojo neutro el cual es un indicador de p H ampliamente utilizado en el área de biomedicina. Rosales. (2018) al estandarizar su técnica recomendó disminuir la concentración del buffer de amplificación isotérmica a 0.5X donde obtuvo mayor contraste entre resultados positivos y negativos. En LAMP *ama-1*, no se observó diferencia significativa en ambas concentraciones de buffer (1X y 0.5X) por lo que decidió mantener la concentración a 0.5X con el fin de economizar el uso del reactivo.

En el Perú todavía se sigue privilegiando para la detección de infecciones por *Plasmodium vivax*. el método microscópico (Serra-Casas. *et al.* 2017) que es de baja sensibilidad Berzosa. *et al.* (2018); Zimmerman & Howes (2015) sustentan que el límite de detección de la microscopia de campo oscila entre 100-150 parásitos/ μ L coincidiendo con los resultados de las pruebas iniciales, donde el límite de detección encontrado fue 130 parásitos/ μ L para infecciones positivas. Es decir, según Han. *et al.* (2007); Pöschl. *et al.* (2010); Hopkins. *et al.* (2013) y Serra-Casas. *et al.* (2017) la microscopia de campo sólo puede detectar entre el 20%- 50% de infecciones totales confirmando que no es la técnica adecuada para el diagnóstico de malaria en zonas rurales confirmándose en el piloto de la presente investigación donde LAMP *ama-1* detectó el 85.7% de las infecciones totales

siendo de similar sensibilidad al estudio de Cook.*et al.* (2015) el cual detectó 88.3% de infecciones a diferencia de la microscopia la cual solo pudo detectar el 20% de infecciones totales.

Es importante destacar que la técnica Mangold, LAMP $ama-1$ es lo suficientemente sensible para detectar infecciones en el nivel de complejidad molecular. De las 3 muestras no detectables por LAMP $ama-1$, una de ellas se encontraba por debajo del límite de detección (1.71 parásitos/ μ L). Las restantes se encontraban en el rango de detección de la técnica (entre 14 – 106 parásitos/ μ L) atribuyéndose la causa al poco volumen de la muestra al momento del ensayo lo que representaría poca cantidad/ausencia de ADN o el método de extracción de ADN en las muestras podría presentar contaminantes inhibitorios. En la muestra falso positivo de LAMP $ama-$, LAMP $Pvr47$ de Rosales. (2018) también obtuvo el mismo resultado lo cual podría ser explicado por contaminación de ADN foráneo ya que la prueba de referencia dio positivo para *Plasmodium falciparum*.

En este contexto, LAMP $ama-1$ podría ser utilizada como prueba diagnóstica en infecciones sub microscópicas por *P.vivax* teniendo como límite de detección analítica 2.19×10^{-5} ng/mL moléculas de ADN plasmídico equivalente a 4 parásitos/ μ L

13. CONCLUSIONES

- Secuencias conservadas del gen *ama-1* de *Plasmodium vivax* podrían ser utilizadas como blancos de amplificación de pruebas moleculares para el diagnóstico de malaria causada por *P. vivax*.
- LAMP *ama-1* podría ser utilizada como prueba diagnóstica en infecciones submicroscópicas por *P.vivax* teniendo como límite de detección analítica 2.19×10^{-5} ng/mL moléculas de ADN plasmídico equivalente a 4 parásitos/ μ L.
- El producto de amplificación de LAMP *ama-1* es de mayor longitud que lo sugerido, a pesar de ello no hubo efectos negativos que disminuyen la eficacia y especificidad de la técnica.
- La especificidad analítica de los cebadores diseñados fue del 100% con respecto a las otras especies de *Plasmodium* causantes de malaria en humanos (*P. falciparum*, *P. ovale* y *P. malariae*).

14. RECOMENDACIONES

Una de las principales dificultades en el desarrollo de la presente técnica fue la alta incidencia de contaminación por ADN plasmídico lo cual podría confundirse en resultados falsos positivos. Para prevenir este escenario se recomienda mantener un lugar exclusivo para el uso de ADN plasmídico; manejar con sumo cuidado dichas muestras y al finalizar los ensayos se debe de limpiar con lejía al 10% y alcohol al 70% el área de trabajo y los materiales utilizados.

Ensayos complementarios a esta investigación podrían comprender en una evaluación con un mayor número de muestras de pacientes para poder determinar la sensibilidad diagnóstica de la técnica y el comportamiento de la variabilidad del gen *ama-1*. Además, sería interesante probar la técnica con muestras de ADN de las diferentes especies de protistas apicomplejos patógenos en humanos.

15. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alger, J. (1999). Diagnóstico microscópico de la malaria: gota gruesa y extendido fino. *Rev. Med Hond*, 67, 216-218.
- Alger, J. (2001). Densidad Parasitaria en Malaria: Métodos de determinación y su interpretación. *Revista Médica Hondureña*, 69, 118-120.
- Berzosa, P., de Lucio, A., Romay-Barja, M., Herrador, Z., González, V., García, L., ... Benito, A. (2018). Comparison of three diagnostic methods (microscopy, RDT, and PCR) for the detection of malaria parasites in representative samples from Equatorial Guinea. *Malaria journal*, 17(1), 333. doi:10.1186/s12936-018-2481-4
- Campuzano-Zuluaga G, Blair-Trujillo S. (2010) Malaria: consideraciones sobre su diagnóstico. *Medicina & Laboratorio*; 16: 311-354.
- Carrasco-Escobar, G., Gamboa, D., Castro, M. C., Bangdiwala, S. I., Rodriguez, H., Contreras-Mancilla, J. & Rosas-Aguirre, A. (2017). Micro-epidemiology and spatial heterogeneity of *P. vivax* parasitaemia in riverine communities of the Peruvian Amazon: A multilevel analysis. *Scientific reports*, 7(1).
- Castro, Ivone. & G, del Carmen Rodríguez, María. (2009). Análisis proteómico de *Plasmodium*, el agente causal de la malaria. *Salud Pública de México*, 51(Supl. 3), s395-s402.
- Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades – MINSA. (*) Hasta la SE 22 – 2019.
- Chen, S., Wang, F., Beaulieu, J. C., Stein, R. E., & Ge, B. (2011). Rapid detection of viable salmonellae in produce by coupling propidium monoazide with loop-mediated isothermal amplification. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(12).

- Cheng, Q., Cunningham, J., & Gatton, M. L. (2015). Systematic review of sub-microscopic *P. vivax* infections: prevalence and determining factors. *PLoS neglected tropical diseases*, 9(1).
- Ching, K. H. (2015). Lateral flow immunoassay in *ELISA*. Humana Press, New York, NY.
- Col, M. M. L., & Capt, R. M. S. (2007). Immunochromatographic methods in malaria diagnosis. *Medical Journal Armed Forces India*, 63(2), 127-129.
- Cook, J., Aydin-Schmidt, B., González, I. J., Bell, D., Edlund, E., Nassor, M. H., & Björkman, A. (2015). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for point-of-care detection of asymptomatic low-density malaria parasite carriers in Zanzibar. *Malaria journal*
- Corran, P., Coleman, P., Riley, E., & Drakeley, C. (2007). Serology: a robust indicator of malaria transmission intensity? *Trends in parasitology*, 23(12), 575-582.
- Cowman, A. F., Berry, D., & Baum, J. (2012). The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell. *J Cell Biol*, 198(6), 961-971.
- Da Silva-Nunes, M., Moreno, M., Conn, J. E., Gamboa, D., Abeles, S., Vinetz, J. M., & Ferreira, M. U. (2012). Amazonian malaria: asymptomatic human reservoirs, diagnostic challenges, environmentally driven changes in mosquito vector populations, and the mandate for sustainable control strategies. *Acta Tropical*, 121(3), 281-291.
- Delgado-Ratto, C., Gamboa, D., Soto-Calle, V. E., Van den Eede, P., Torres, E., Sánchez-Martínez, L., ... & Erhart, A. (2016). Population genetics of *Plasmodium vivax* in the Peruvian Amazon. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(1), e0004376.
- Figtree, M., Pasay, C. J., Slade, R., Cheng, Q., Cloonan, N., Walker, J., & Saul, A. (2000). *Plasmodium vivax* synonymous substitution frequencies, evolution and population

- structure deduced from diversity in AMA 1 and MSP 1 genes. *Molecular and biochemical parasitology*, 108(1), 53-66.
- Goodarzi, M., Shahhosseiny, M. H., Bayat, M., Hashemi, S. J., & Ghahri, M. (2017). Comparison between molecular methods (PCR vs LAMP) to detect *Candida albicans* in bronchoalveolar lavage samples of suspected tuberculosis patients. *Microbiology Research*, 8(2).
- Gubala, V., Harris, L. F., Ricco, A. J., Tan, M. X., & Williams, D. E. (2012). Point of care diagnostics: Status and future. *Analytical Chemistry*, 84(2), 487–515.
- Gunasekera, A. M., Wickramarachchi, T., Neafsey, D. E., Ganguli, I., Perera, L., Premaratne, P. H., & Wirth, D. F. (2007). Genetic diversity and selection at the *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1 (PvAMA-1) locus in a Sri Lankan population. *Molecular biology and evolution*, 24(4), 939-947.
- Han, E. T., Watanabe, R., Sattabongkot, J., Khuntirat, B., Sirichaisinthop, J., Iriko, H., & Tsuboi, T. (2007). Detection of four *Plasmodium* species by genus-and species-specific loop-mediated isothermal amplification for clinical diagnosis. *Journal of clinical microbiology*, 45(8), 2521-2528.
- Harvey, K. L., Yap, A., Gilson, P. R., Cowman, A. F., & Crabb, B. S. (2014). Insights and controversies into the role of the key apicomplexan invasion ligand, Apical Membrane Antigen 1. *International journal for parasitology*, 44(12), 853-857.
- Hodder, A. N., Crewther, P. E., & Anders, R. F. (2001). Specificity of the protective antibody response to apical membrane antigen 1. *Infection and immunity*, 69(5), 3286-3294.

- Hopkins, H.; González, I. Polley, S; Angutoko, P.; Ategeka, J; Asiimwe, C; Agaba, B.; Kyabayinze, D; Colin J.; Sutherland, M.; Perkins, D. (2013) Highly Sensitive Detection of Malaria Parasitemia in a Malaria-Endemic Setting: Performance of a New Loop-Mediated Isothermal Amplification Kit in a Remote Clinic in Uganda, *The Journal of Infectious Diseases*, Volume 208, Issue 4, 15 August 2013, Pages 645–652,
- Hortelano, M. G. L., Ascaso, M. T. G., Peña, M. J. M., & Arrieta, J. V. (2010) Patología infecciosa importada I: Malaria.
- Imai, K., Tarumoto, N., Misawa, K., Runtuwene, L. R., Sakai, J., Hayashida, K., ... Maeda, T. (2017). A novel diagnostic method for malaria using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and MinION™ nanopore sequencer. *BMC infectious diseases*, 17(1), 621. doi:10.1186/s12879-017-2718-9
- Imwong, M., Hanchana, S., Malleret, B., Rénia, L., Day, N. P., Dondorp, A., Nosten, F., Snounou, G., White, N. J. (2014). High-throughput ultrasensitive molecular techniques for quantifying low-density malaria parasitemias. *Journal of clinical microbiology*, 52(9), 3303-9.
- Jiménez, J. N., Muskus, C. E., & Vélez, I. D. (2005). Diversidad genética de Plasmodium falciparum y sus implicaciones en la epidemiología de la malaria. *Biomédica*, 25(4), 588-602.
- Kobayashi, T., Gamboa, D., Ndiaye, D., Cui, L., Sutton, P. L., & Vinetz, J. M. (2015). Malaria diagnosis across the International Centers of Excellence for Malaria Research: platforms, performance, and standardization. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 93(3_Suppl), 99-109.
- Kudyba, H. M., Louzada, J., Ljolje, D., Kudyba, K. A., Muralidharan, V., Oliveira-Ferreira, J., & Lucchi, N. W. (2019). Field evaluation of malaria malachite green loop-

- mediated isothermal amplification in health posts in Roraima state, Brazil. *Malaria journal*, 18(1), 98. doi:10.1186/s12936-019-2722-1
- Kumar S, Kumar A, Venkatesan G (2018) Isothermal Nucleic Acid Amplification System: An Update on Methods and Applications. *J Genet Genom* 2: 112.
- Lira Carmona, R., De la Cruz Pérez, J., Maldonado Rodríguez, A., & Rojas Montes, O. (2018). Sistemas de amplificación isotérmica para la detección molecular de los virus zika, dengue y chikungunya.
- Lorenz, T.C. (2012). Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *J. Vis. Exp.* (63), e3998, doi: 10.3791/3998
- Lucchi, N. W., Ljolje, D., Silva-Flannery, L., & Udhayakumar, V. (2016). Use of Malachite Green-Loop Mediated Isothermal Amplification for Detection of Plasmodium spp. Parasites. *PloS one*, 11(3), e0151437. doi:10.1371/journal.pone.0151437
- Mercereau -Puijalon, O., Barale, J. C., & Bischoff, E. (2002). Three multigene families in Plasmodium parasites: facts and questions. *International journal for parasitology*, 32(11), 1323-1344.
- Ministerio de Salud del Perú. (2016). *Resolución Ministerial: Plan Malaria Cero Periodo 2017 - 2021*. Ministerio de Salud del Perú.
- Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia. (2015) *Manual para el diagnóstico de malaria no complicada en puestos de diagnóstico y Tratamiento*.
- Moon, S. U., Na, B. K., Kang, J. M., Kim, J. Y., Cho, S. H., Park, Y. K., ... & Kim, T. S. (2010). Genetic polymorphism and effect of natural selection at domain I of apical membrane antigen-1 (AMA-1) in *Plasmodium vivax* isolates from Myanmar. *Acta tropica*, 114(2), 71-75.

- Neafsey, D. E., Galinsky, K., Jiang, R. H., Young, L., Sykes, S. M., Saif, S., ... & Chapman, S. B. (2012). The malaria parasite *Plasmodium vivax* exhibits greater genetic diversity than *Plasmodium falciparum*. *Nature genetics*, 44(9), 1046.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic acids research*, 28(12), e63-e63.
- Ocker, R., Prompunjai, Y., Chutipongvivate, S., & Karanis, P. (2016). Malaria diagnosis by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) in Thailand. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 58, 27. doi:10.1590/S1678-9946201658027
- Patel, J. C., Oberstaller, J., Xayavong, M., Narayanan, J., DeBarry, J. D., Srinivasamoorthy, G., Lucchi, N. W. (2013). Real-time loop-mediated isothermal amplification (RealAmp) for the species-specific identification of *Plasmodium vivax*. *PloS one*, 8(1), e54986. doi: 10.1371/journal.pone.0054986
- Peterson, M. G., Marshall, V. M., Smythe, J. A., Crewther, P. E., Lew, A., Silva, A., ... & Kemp, D. J. (1989). Integral membrane protein located in the apical complex of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and cellular biology*, 9(7), 3151-3154.
- Polley, S. D., Mori, Y., Watson, J., Perkins, M. D., González, I. J., Notomi, T., & Sutherland, C. J. (2010). Mitochondrial DNA targets increase sensitivity of malaria detection using loop-mediated isothermal amplification. *Journal of clinical microbiology*, 48(8), 2866-2871.
- Pöschl, B., Waneesorn, J., Thekisoe, O., Chutipongvivate, S., & Panagiotis, K. (2010). Comparative diagnosis of malaria infections by microscopy, nested PCR, and LAMP in northern Thailand. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 83(1), 56-60.

- Rajesh, V., Elamaran, M., Vidya, S., Gowrishankar, M., Kochar, D., & Das, A. (2007). Plasmodium vivax: genetic diversity of the apical membrane antigen-1 (AMA-1) in isolates from India. *Experimental parasitology*, 116(3), 252-256.
- Ranjbar, R., & Afshar, D. (2015). Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Yersinia enterocolitica* via targeting a conserved locus. *Iranian journal of microbiology*, 7(4), 185–190.
- Reller, M. E., Chen, W. H., Dalton, J., Lichay, M. A., & Dumler, J. S. (2013). Multiplex 5' nuclease quantitative real-time PCR for clinical diagnosis of malaria and species-level identification and epidemiologic evaluation of malaria-causing parasites, including *Plasmodium knowlesi*. *Journal of clinical microbiology*, 51(9), 2931-2938.
- Remarque, E. J., Faber, B. W., Kocken, C. H., & Thomas, A. W. (2008). Apical membrane antigen 1: a malaria vaccine candidate in review. *Trends in parasitology*, 24(2), 74-84.
- Rial, M., Checa, M., Genovés, J., & Carreras, R. (2009). Malaria y embarazo: fisiopatología y manejo. *Ginecología y Obstetricia Clínica*, 10(3), 157-164.
- Rodríguez-López, M. H. (2008). Avances en el desarrollo de vacunas contra la malaria. *Revista Biomédica*, 19(1), 61-79.
- Rosales, Ana Lucia. (2018). Diseño de una técnica de amplificación isotérmica mediada por horquillas (LAMP) *in-house* para la detección de *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax*. (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional de Piura.
- Rovira-Vallbona, E., Contreras-Mancilla, J. J., Ramirez, R., Guzmán-Guzmán, M., Carrasco-Escobar, G., Llanos-Cuentas, A.,... & Rosanas-Urgell, A. (2017). Predominance of asymptomatic and sub-microscopic infections characterizes the *Plasmodium* gametocyte reservoir in the Peruvian Amazon. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(7), e0005674.

- Serra-Casas, E., Manrique, P., Ding, X. C., Carrasco-Escobar, G., Alava, F., Gave, A., & González, I. J. (2017). Loop-mediated isothermal DNA amplification for asymptomatic malaria detection in challenging field settings: Technical performance and pilot implementation in the Peruvian Amazon. *PloS one*, *12*(10), e0185742.
- Singh, R., Singh, D. P., Savargaonkar, D., Singh, O. P., Bhatt, R. M., & Valecha, N. (2017). Evaluation of SYBR green I based visual loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for genus and species-specific diagnosis of malaria in *P. vivax* and *P. falciparum* endemic regions. *Journal of vector borne diseases*, *54*(1), 54.
- Souza-Neiras, W. C. D., Melo, L. M. S. D., & Machado, R. L. D. (2007). The genetic diversity of *Plasmodium vivax*: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, *102*(3), 245-254.
- Spencer, L. M., Gómez, A., & Collovini, E. (2016). Mecanismos de invasión del esporozoito y merozoito de *Plasmodium*. *Bionatura*, *1*(2), 39-44.
- Tao, Z. Y., Zhou, H. Y., Xia, H., Xu, S., Zhu, H. W., Culleton, R. L.,... & Liu, Y. B. (2011). Adaptation of a visualized loop-mediated isothermal amplification technique for field detection of *Plasmodium vivax* infection. *Parasites & vectors*, *4*(1), 115.
- The malERA Consultative Group on Diagnoses and Diagnostics (2011) A Research Agenda for Malaria Eradication: Diagnoses and Diagnostics. *PLOS Medicine* *8*(1): e1000396
- Uso de las pruebas en el Diagnóstico Rápido de la malaria: Segunda Edición (2006). Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 2006. ISBN 92 9061 088 3.
- White, N. J. (2011). Determinants of relapse periodicity in *Plasmodium vivax* malaria. *Malaria journal*, *10*(1), 297.
- Zheng, Z., & Cheng, Z. (2017). Advances in molecular diagnosis of malaria. In *Advances in clinical chemistry* (Vol. 80, pp. 155-192). Elsevier.

Zhou, D., Guo, J., Xu, L., Gao, S., Lin, Q., Wu, Q.... & Que, Y. (2014). Establishment and application of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) system for detection of cry1Ac transgenic sugarcane. *Scientific reports*, 4, 4912.

Zimmerman, P. A., & Howes, R. E. (2015). Malaria diagnosis for malaria elimination. *Current opinion in infectious diseases*, 28(5), 446-454.

ANEXOS

TABLAS

Tabla 1: Condiciones de amplificación de la PCR convencional.

Reactivos	1 Rx (µL)
<i>H₂O (Grado molecular)</i>	32.9
<i>Buffer</i>	5
<i>MgCl₂</i>	1.5
<i>dNTP's</i>	0.4
<i>Forward</i>	2.5
<i>Reverse</i>	2.5
<i>Accu III Enzyme</i>	0.2
<i>Muestra</i>	5
<i>Volumen Final</i>	50

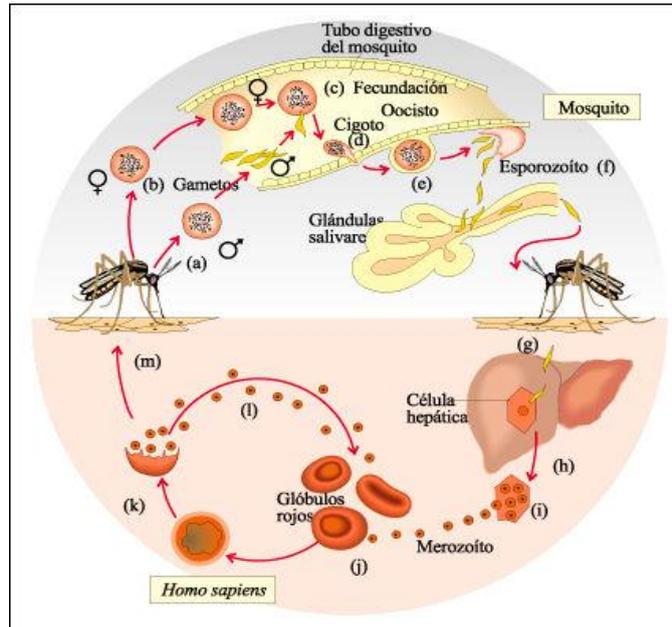
Tabla 2: Concentración final de los reactivos para la técnica LAMP.

Reactivos	Concentración Final (Total)	1 Rx (µL)
<i>H₂O (Grado molecular)</i>	-	11
<i>Buffer de amplificación isotérmica</i>	0.5X	1.25
<i>MgSO₄</i>	8mM*	1.75
<i>dNTP's</i>	1.75mM	1.75
<i>Rojo Neutro</i>	0.003%	0.75
<i>Primer F3</i>	0.2 µM	0.5
<i>Primer B3</i>	0.2 µM	0.5
<i>Primer FIP</i>	2 µM	0.5
<i>Primer BIP</i>	2 µM	0.5
<i>BST 2.0 DNA Polimerase</i>	8U/25 µL	1.5
<i>Muestra</i>	-	5
<i>Volumen Final</i>		25

(*) Incluye la concentración del *MgSO₄* del buffer de amplificación isotérmica.

Tabla 3: Resultados comparativos de las diferentes técnicas de diagnóstico.

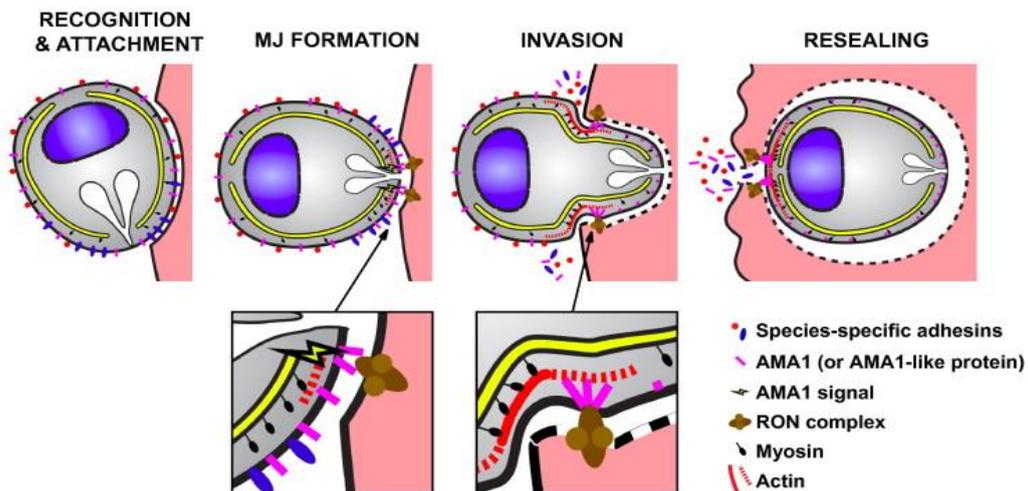
	Mangold PCR	LAMP Pv47	LAMP AMA-1	Microcopia
501118	++	++	++	++
501122	Negativo			
501183	++			
501218	++	++	++	++
501253	Negativo			
502027	++	++		
502037	++	++	++	
502044	++			
502071	++	++	++	
502111	<i>P. falciparum</i>	++		
502165	++			
502170	++		++	
502231	++	++	++	++
503055	<i>P. falciparum</i>			
503054		++	++	
503059	++	++	++	
503066				
503071				
503073	++	++	++	
503075	++		++	++
503088	++	++	++	++
503119	++		++	++
503121	++	++	++	++
503123				
503236	++		++	
503250	++		++	++
503260	++	++	++	++
503280	++	++	++	++
503284				++
503287	++	++	++	++
503299				



Ciclo de vida de *Plasmodium* sp.

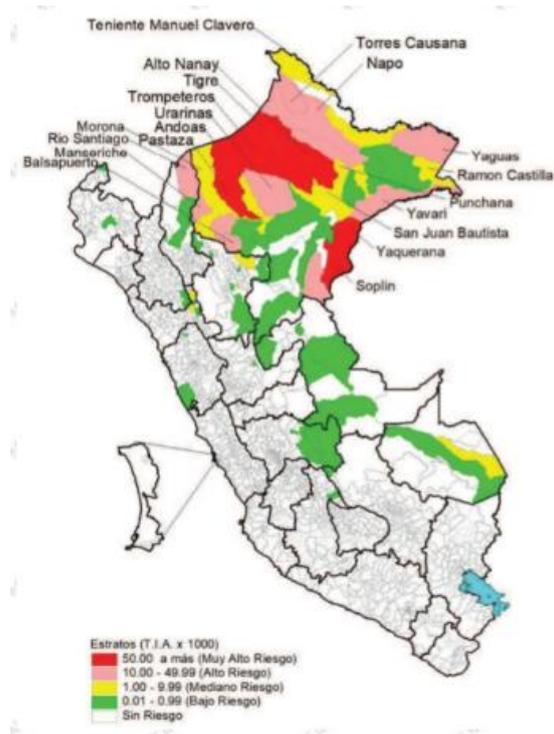
Recuperado de la página web:

<http://iesicaria.xtec.cat/sbg/BiologiaCurtis/Seccion%205/5%20-%20Capitulo%2028.htm>



Mecanismo de invasión del merozoíto al glóbulo rojo. Se resalta la posición del antígeno a pical de membrana en los diferentes estadios de invasión eritrocitaria y la función al complejo RON para la unión al glóbulo rojo.

Fuente: Harvey, K.L., *et al.* 2014.



Incidencia acumulada de malaria en el Perú.

Fuente: Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades

– MINSA. (*) Hasta la SE 22 – 2019.

ANEXOS 1: Combinaciones experimentales de cebadores para el ensayo preliminar.

<i>Id. Cebadores</i>		<i>Secuencia 5'--> 3'</i>	<i>E.1</i>	<i>E.2</i>	<i>E.3</i>	<i>E.4</i>
A1VF3	F3	AGAGAATTCGCTGTTAGC	X		X	
A1VB3	B3	TTTGATCCCCTGCCATGA	X			X
EFAM1	Cebador externo F3	AAGTGAAAAATGCAAAGTACA		X		X
ERAM1	Cebador externo B3	ATGTGGCATGTTTTATTCTTT		X	X	
A1VFIP	FIP	GGTCATTTCGCATTGGGGAAG- CTGTGGCTACAGGAGATC	X	X	X	X
A1VBIP	BIP	ACAATAGCGAACCTTAAGGCAA- CTGCACAAAGCTATATCGTTTA	X	X	X	X

ANEXO 2: Procedimiento de purificación del producto de amplificación.

1. Unificar los productos de amplificación a un tubo de 1.5ml – 2 en total: 58°C y 60°C).
2. Agregar 2 ½ volúmenes de alcohol absoluto según el volumen de la muestra – Se agregaron 200ml de alcohol ya que se tenía 80ml de muestra-.
3. Incubar a -20°C overnight.
4. Centrifugar los tubos a 13000rpm durante 20 minutos.
5. Eliminar el sobrenadante.
6. Dejar reposar 1 minuto boca abajo sobre un papel toalla.
7. Agregar 300µL de alcohol al 70% y mezclar.
8. Eliminar sobrenadante.
9. Secar boca arriba cubierto por un papel toalla durante 15 minutos.
10. Colocar los tubos con la tapa abierta cubiertos por un papel toalla en un hot plate a 60°C durante 15 minutos.
11. Agregar 15µL de agua de PCR, dejar reposar por 15 minutos.
12. Mezclar y dar un spin.

ANEXO 3: Procedimiento de Ligación de los productos al vector PCR®2.1 mediante el kit *T.A Cloning™ Kit, with pCR™2.1 Vector and One Shot™ TOP10 Chemically Competent E. coli*

En un tubo de 0.5ml preparar:

Reactivos	1 Rx (µL)
<i>5XT4 Ligase Reaction Buffer</i>	2
<i>PCR 2.1 Vector (25ng/ µL)</i>	2
<i>Producto de PCR – 60°C-</i>	5
<i>Express link T4 DNA ligase (5U)</i>	1
<i>TN4 DNA Ligase</i>	0.5

1. Homogenizar lentamente con la pipeta.
2. Incubar a 4°C overnight
3. Sellar con parafilm y almacenar a -20°C en caso de no usar.

ANEXO 4: Procedimiento de transformación por choque térmico en *E. coli OneShot® TOP10*.

1. Calentar el baño maría a 42°C.
2. Mezclar y dar un spin a los viales con el ligado.
3. Agregar 10µL del producto ligado a 100µL de bacterias *E. coli* (Lote: 1832715-B) químicamente competentes.
4. Incubar 45 minutos en hielo, homogenizar despacio con el hielo cada 5 – 10 minutos.
5. **Shock térmico:** Colocar el tubo en el baño maría a 42°C por dos minutos y volver a colocar en el hielo.

En ambiente estéril:

6. Agregar 250µL de medio S.O.C.
7. Incubar por 2 horas a 37°C.
8. Centrifugar a 5000rpm por dos minutos.
9. Resuspender con 100µL de medio S.O.C.
10. Agregar 7µL de ampicilina, homogenizar levemente.

ANEXO 5: Procedimiento lisis alcalina según “*Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Volume 1*”

1. Verter 1ml de medio de cada tubo en eppendorfs de 1.5ml
2. Centrifugar a 10 000rpm durante 2 minutos.
3. Agregar 150µL de elution buffer del kit Omega E.Z.N.A. ® Blood DNA Mini Kit, homogenizar dando golpes con el dedo.
4. Agregar 200µL de buffer de lisis.

Componentes del buffer de lisis para un volumen final de 1ml:

Reactivos	µL
<i>NaOH</i>	200
<i>H₂O PCR</i>	700
<i>SDS 1%</i>	100
<i>Volumen final</i>	1000

5. Agregar 150µL de acetato de sodio, homogenizar por inversión.
6. Incubar a 4°C por 5 minutos.

7. Repartir el sobrenadante en 2 eppendorfs de 1.5ml en volúmenes iguales (250 μ L c/u)
8. Agregar 1250 μ L de etanol absoluto en cada tubo.
9. Incubar a -20°C durante 2 horas.
10. Centrifugar a 10 000rpm por 30 minutos.
11. Eliminar el sobrenadante, evaporar el alcohol por 1 minuto con la tapa abierta boca abajo.
12. Agregar 1ml de alcohol al 70%.
13. Centrifugar a 10 000rpm por 5 minutos.
14. Descartar el etanol, secar boca abajo por 5 minutos.
15. Agregar 40 μ L de elution buffer del kit de extracción Omega E.Z.N.A. ® Blood DNA Mini Kit
16. Realizar una dilución 1/40.

ANEXO 6: Procedimiento extracción de plásmidos mediante el kit *ZymoPURE Plasmid*

Miniprep

1. Alicuotar 1.5ml de cultivo en tubos de 1.5ml.
2. Centrifugar a 3000g por 10 minutos
3. Eliminar el mayor volumen de sobrenadante posible
4. Agregar 250 μ L del *Zymo Pure 1*. Resuspender muy bien y mezclar.
5. Agregar 250 μ L del *Zymo Pure 2*. Homogenizar inmediatamente por inversión. Reposar a temperatura ambiente durante un máximo de 3 minutos.

6. Agregar 250µL del *Zymo Pure 3* previamente incubado a -20°C. Homogenizar mediante inversión.
7. Incubar a -20°C durante 5 minutos.
8. Centrifugar a 4000g durante 20 minutos
9. Transferir 600µL del sobrenadante a nuevos tubos de 1.5ml.
10. Agregar 275µL del *Zymo Pure Binding Buffer* al sobrenadante alicuotado. Homogenizar como mínimo 8 veces mediante inversión.
11. Transferir 900µL a las columnas de extracción del kit. Incubar por dos minutos a temperatura ambiente.
12. Centrifugar a 5000g durante un minuto. Descartar el colector.
13. Agregar 800µL de *Zymo Pure Wash 1*. Centrifugar a 5000g durante 1 minuto.
14. Agregar 800µL de *Zymo Pure Wash 2*. Centrifugar a 5000g durante 1 minuto.
15. Agregar 200µL de *Zymo Pure Wash 2*. Centrifugar a 5000g durante 1 minuto.
16. Centrifugar al vacío a 10 000g durante un minuto.
17. Agregar 25µL de *Zymo Pure Elution Buffer*. Incubar a temperature ambiente por 2 minutos. Centrifugar a 10 000g durante un minuto.

ANEXO 7: Renovación de la aprobación del comité de ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia con el código de inscripción 100405.



CONSTANCIA R-025-03-17

El Presidente del Comité Institucional de Ética en Investigación (CIEI) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia hace constar que el comité institucional de ética en investigación aprobó la **RENOVACIÓN** del proyecto de investigación señalado a continuación.

Título del proyecto : "Elaboración de una plataforma de diagnóstico molecular diferencial para zika, dengue, chikungunya y malaria".

Código de inscripción : 100405

Investigador(es) principal (es) : Nolasco Cárdenas, Oscar Patricio

Cualquier enmienda, desviaciones y/u otras eventualidades deberá ser reportada a este Comité de acuerdo a los plazos y normas establecidas. El investigador reportará cada **6 meses** el progreso del estudio y alcanzará un informe al término de éste.

La presente **RENOVACIÓN** tiene vigencia desde el **06 de febrero del 2018** hasta el **05 de febrero del 2019**.

Así mismo el Comité toma conocimiento del Informe Periódico de Avances del estudio de referencia. Documento recibido en fecha 25 de enero del 2018.

Los trámites para su renovación deberán iniciarse por lo menos 30 días previos a su vencimiento.

Lima, 06 de febrero del 2018.


Dra. Frine Samalvides Cuba
Presidenta
Comité Institucional de Ética en Investigación



ANEXO 8: Características de los cebadores para el locus *ama-1* de *Plasmodium vivax*.

Cebadores	Secuencia 5'--> 3'	Tm	Longitud (pb)	Producto (pb)	%GC	Especificidad	Hairpin ΔG (kcal.mol ⁻¹)	Homodimero ΔG (kcal.mole ⁻¹)	Heterodimero ΔG (kcal.mole ⁻¹)
Forward	GGGCAAATTTTCGATTCTGT	55.45	19	211	42.11	<i>P. knowlesi</i> , <i>P. inui</i> .	0.52	-9.28	-6.14
Reverse	TCCCCATCAACACTGTAC	55.07	18		50.00		0.76	-3.65	
FIP	GCCGTTGTGCAATAAAATT TTTGT- AGTGTTACATCTTTAATACC AAACC								
BIP	CCACAAGAAGTAGACCCGG A- CCTCGATTGTTTCTTAATTTT TCTT								
Forward	TGCAGCATATATAAAGACGA AAT	55.93	23	206	30.43	<i>P. cynomolgi</i> , <i>P. coatneyi</i>	1.9	-7.50	-5.49
Reverse	GCCCTTTTCTCTACACAGT	56.04	19		47.34		0.78	-3.14	
FIP	TATCCTCGGCAGGACAATGC - AGAAATTAAGAAACAATCG AGGAAC								
BIP	GGAGAGTATCAAATGTCCCT GC- CGTAAAAGTTGCAGGACTG T								
A1VF3 (F3)	AGAGAATTCGCTGTTAGC	56.51	19	218	47.4	<i>P. coatneyi</i> , <i>P. knowlesi</i>	-0.54	-8.51	-3.14
A1VB3 (B3)	TTTGATCCCCTGCCATGA	57.68	18		50		1.8	-5.38	
FIP	GGTCATTTCGATTGGGGAAG -CTGTGGCTACAGGAGATC								
BIP	ACAATAGCGAACCTTAAGGC AA- CTGCACAAAGCTATATCGTT TA								
Forward	GCAGCTAGCTTTGTCATG	55.17	18	192	50.00	<i>P. inui</i> , <i>P. fieldi</i>	-0.64	-13.63	-8.28
Reverse	GAAGCTTTCATTTTATCTGG C	55.77	22		36.36		0.02	-10.23	
FIP	GGCATGTTTTATTCTTTTCGT CGT- GCAGGGGATCAAAATTCG								
BIP	ATGTTGTATTTATCAGCGCA GGAA- GAAGCAGAACACGGCATC								
Forward	CGTCCTACAGACACCCAG	57.88	18	187	61.11	<i>P. inui</i>	-1.48	-3.61	-1.95
Reverse	ACATTTTTCGCTCAAATACAC CA	56.76	22		31.82		-0.07	-5.84	
FIP	GACCCATATTTCTGCGCT G- TACGACGAAAAGAATAAAA CATGC								
BIP	GAGGTACTGCAGCCAGATG - TCATTTTATCTGGCTTGAAG C								
EFAM1 (F3 ext.)	AAGTGAAAATGCAAAGTA CA	54.19	21	340	33.30	<i>P. inui</i> , <i>P. fieldi</i>	1.08	-7.05	-6.57
ERAM1 (B3 ext.)	ATGTGGCATGTTTTATCTTT	55.7	21		28.57		0.93	-5.38	

ANEXO 9: Resumen del alineamiento de la secuencia consenso obtenida del secuenciamiento del producto de amplificación.

Descripción	Cobertura	Identidad	Acceso
<i>Plasmodium vivax</i> isolate Pv12-32 apical membrane antigen 1 gene	100%	100.00%	MH049570.1
<i>Plasmodium vivax</i> isolate Pv12-61 apical membrane antigen 1 gene	100%	100.00%	MH049568.1
<i>Plasmodium vivax</i> isolate Pv12-51 apical membrane antigen 1 gene	100%	100.00%	MH049559.1
<i>Plasmodium vivax</i> isolate Pv12-74 apical membrane antigen 1 gene	100%	100.00%	MH049559.1
<i>Plasmodium vivax</i> isolate Pv12-23 apical membrane antigen 1 gene	100%	100.00%	MH049558.1
<i>Plasmodium vivax</i> isolate Pv12-62 apical membrane antigen 1 gene	100%	100.00%	MH049550.1
<i>Plasmodium vivax</i> isolate ir1 apical membrane antigen 1 (AMA-1) gene	100%	100.00%	KF181626.1
<i>Plasmodium vivax</i> isolate NE35 apical membrane antigen 1 (AMA-1) gene	100%	100.00%	FJ491037.1
<i>Plasmodium vivax</i> isolate CH77 apical membrane antigen 1 (AMA-1) gene	100%	100.00%	FJ490981.1
<i>Plasmodium vivax</i> isolate NE4 apical membrane antigen 1 (AMA-1) gene	98%	100.00%	FJ491027.1
<i>Plasmodium vivax</i> isolate CH75 apical membrane antigen 1 (AMA-1) gene	98%	100.00%	FJ490980.1
<i>Plasmodium vivax</i> isolate 1287 apical membrane antigen-1 (AMA-1) gene	98%	100.00%	EU282775.1
<i>Plasmodium vivax</i> isolate 1033 apical membrane antigen-1 (AMA-1) gene	99%	99.68%	EU282820.1
<i>Plasmodium vivax</i> genome assembly, chromosome 9	100%	99.37%	LT841158.1
<i>Plasmodium vivax</i> isolate T143 apical membrane protein-1 (AMA-1) gene	98%	99.04%	FJ784899.1
<i>Plasmodium vivax</i> isolate 1473 apical membrane antigen-1 (AMA-1) gene	99%	100.00%	EU282810.1
<i>Plasmodium vivax</i> isolate Pv12-59 apical membrane antigen 1 gene	100%	99.68%	MH049571.1
<i>Plasmodium vivax</i> isolate 1033 apical membrane antigen-1 (AMA-1)	99%	99.68%	EU282820.1
<i>Plasmodium vivax</i> isolate PIIAMA10 apical membrane antigen 1 gene	98%	99.68%	JX624741.1
<i>Plasmodium vivax</i> isolate ir17 apical membrane antigen 1 (AMA-1) gene	100%	99.37%	JX624753.1
<i>Plasmodium vivax</i> isolate PIIAMA21 apical membrane antigen 1 gene	100%	99.37%	JX624752.1
<i>Plasmodium vivax</i> isolate CTRC60 apical membrane protein-1 (AMA-1) gene	100%	99.37%	FJ785047.1
<i>Plasmodium vivax</i> isolate 1573 apical membrane antigen-1 (AMA-1) gene	99%	99.37%	EU282809.1
<i>Plasmodium vivax</i> clone PviRioMetaA apical membrane antigen (ama1) gene	100%	99.05%	KJ569869.1
<i>Plasmodium vivax</i> isolate ir7 apical membrane antigen 1 (AMA-1) gene	100%	99.05%	KF181632.1
<i>Plasmodium vivax</i> isolate Pv12-60 apical membrane antigen 1 gene	98%	99.04%	MH049586.1
<i>Plasmodium vivax</i> isolate Pv12-10 apical membrane antigen 1 gene	98%	99.04%	MH049578.1
<i>Plasmodium vivax</i> isolate Pv12-20 apical membrane antigen 1 gene	98%	99.04%	MH049577.1
<i>Plasmodium vivax</i> isolate ir2 apical membrane antigen 1 (AMA-1) gene	98%	99.04%	KF181627.1
<i>Plasmodium vivax</i> isolate T143 apical membrane protein-1 (AMA-1) gene	98%	99.04%	FJ784899.1
<i>Plasmodium vivax</i> isolate Pv12-13 apical membrane antigen 1 gene	100%	98.74%	MH049576.1
<i>Plasmodium vivax</i> isolate Pv6 apical membrane antigen I gene	100%	98.74%	KX495573.1
<i>Plasmodium vivax</i> isolate Pv24 apical membrane antigen I gene	100%	98.74%	KX495510.1
<i>Plasmodium vivax</i> isolate Pv13 apical membrane antigen I gene	100%	98.73%	KX495575.1
<i>Plasmodium vivax</i> isolate Pv5 apical membrane antigen I gene	100%	98.73%	KX495572.1
<i>Plasmodium vivax</i> isolate N3-232 apical membrane antigen I gene	100%	98.73%	KX495564.1