



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

DISEÑO DE UN SISTEMA PET-PCR *IN HOUSE* PARA EL DIAGNÓSTICO

MOLECULAR DE *Plasmodium falciparum* Y *Plasmodium vivax*

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología

Autor:

MIRANDA LUCERO, Melissa

Asesor Interno: Mg. GUTIÉRREZ ROMÁN, Ana Isabel

Asesor Externo: Mg. NOLASCO CÁRDENAS, Oscar Patricio

Jurado:

Mg. YUPANQUI SICCHA, Gisella

Dr. IANNACONE OLIVER, Jose

Mg. MALDONADO PENA, Maria

LIMA – PERU

2019

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Proyecto Círculo para la implementación de una plataforma de diagnóstico molecular diferencial y TICs para la vigilancia de Zika, Dengue, Chikungunya y Malaria en Convenio Fondecyt 162-2016 y al Proyecto Colaborativo FA4 DGD-ITM 2017-2021 por el financiamiento para poder realizar esta tesis.

Así mismo, agradecer al grupo Malaria del Laboratorio de Investigación y Desarrollo (LID) del Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt (IMTAvH) y UPCH, y de manera especial a la Dra. Dionicia Gamboa, por brindarme las instalaciones, el entrenamiento en las técnicas y el soporte intelectual durante la realización del proyecto.

Agradezco a mi asesor y director del proyecto Círculo, Mg. Oscar Nolasco Cárdenas, por ofrecerme su paciencia, experiencia y constante apoyo y a mi asesora Mg. Ana Gutiérrez Román, por siempre brindarme una sonrisa cálida y un consejo, y tener las palabras adecuadas en todo momento.

Agradecer a todo el equipo de Malaria, pero en especial, a mis queridas co-tesistas, Ana Lucía Rosales Rosas y Scarlett Barrientos Peña, por compartir conmigo esta magnífica experiencia.

Finalmente, a mis padres, Marlene y Miguel, por su constante resiliencia y soporte durante, antes y después del desarrollo de esta tesis, por ser tan comprensivos durante toda mi aventura académica y profesional.

INDICE

RESUMEN 6

ABSTRACT 7

I.	INTRODUCCION	8
1.1.	DESCRIPCIÓN Y FORMULACIÓN DE PROBLEMA.....	9
1.2.	ANTECEDENTES	10
	Malaria en Perú.....	11
1.3.	OBJETIVOS.....	13
1.3.1.	OBJETIVO GENERAL.....	13
1.3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
1.4.	JUSTIFICACIÓN.....	14
II.	MARCO TEORICO	16
2.1	BASES TÉCNICAS SOBRE EL TEMA DE INVESTIGACIÓN	16
2.1.1	ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y TROPICALES	16
	2.1.2 MALARIA	16
2.1.2.1	SÍNTOMAS	17

2.1.2.2	DIAGNÓSTICO	17
2.1.2.2.1	GOTA GRUESA.....	18
2.1.2.2.2	PCR EN TIEMPO REAL 2.1.2.2.2.1 Sybr Green I	19
2.1.2.2.2.2	Sondas Taqman.....	19
2.1.2.2.3	PET-PCR	21
III.	METODO	22
3.1	TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	22
3.2	VARIABLES	26
3.2.1	VARIABLES DEPENDIENTES.....	26
3.2.2	VARIABLES INDEPENDIENTES	27
3.3	POBLACIÓN Y MUESTRA.....	28
3.4	INSTRUMENTOS.....	29
3.5	PROCEDIMIENTOS.....	31
	Metodología en Laboratorio:	31
3.6	ANÁLISIS DE DATOS	33
IV.	RESULTADOS	34
4.1	ETAPA 1: ESTANDARIZACION	34

4.1.1	DISEÑO Y SELECCIÓN DE CEBADORES	34
4.1.2	ANÁLISIS DE CEBADORES.....	41
4.1.3	ENSAYO PRELIMINAR DE AMPLIFICACIÓN.....	49
4.1.4	CONTROLES DE AMPLIFICACIÓN: CLONACIÓN DE ADN OBTENIDO DE UN PLÁSMIDO CON VECTOR.....	50
4.1.5	ESTANDARIZACIÓN DE CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN	52
4.1.5.1	CURVA DE TEMPERATURA	52
4.1.5.2	CURVA DE CONCENTRACIÓN DE CEBADORES	53
4.2	ETAPA 2: DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS	55
4.2.2	LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN Y LÍMITE DE DETECCIÓN (LOD) – SENSIBILIDAD ANALÍTICA.....	58
4.2.3	ESPECIFICIDAD ANALÍTICA	58
4.2.4	REPETITIVIDAD Y REPRODUCIBILIDAD PARA MÉTODOS CUANTITATIVOS	60
4.3	ETAPA 3: EVALUACIÓN DE MUESTRAS	62
V.	DISCUSION DE RESULTADOS.....	64
VI.	CONCLUSIONES	69
VII.	RECOMENDACIONES.....	69

RESUMEN

Por muchas décadas el diagnóstico de la malaria, enfermedad causada por el protozooario *Plasmodium spp.*, ha estado y sigue basado en el análisis microscópico de la gota gruesa. En el contexto del plan de fase hacia la eliminación de la Malaria, es importante detectar y tratar la malaria asintomática y subpatente para lo cual se requiere implementar nuevas herramientas diagnosticas como los sistemas de técnica molecular que permitan una alta sensibilidad y así eliminar los reservorios de la enfermedad. Con este fin, se desarrolló un sistema de amplificación PET (Photo-Induced Electron Transfer) PCR para comparar con otras plataformas molecular y determinar su sensibilidad y especificidad analítica. Se diseñaron cebadores específicos usando como genes de referencia PFr364 y Pvr47 para detectar *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax*, respectivamente. Se estandarizó las condiciones de amplificación para determinar la temperatura de alineamiento y la concentración de cebadores a usar. Así mismo, se evaluaron diferentes parámetros como el rango dinámico de amplificación, el límite de cuantificación, el límite de detección, la especificidad analítica, la repetitividad y reproducibilidad para métodos cuantitativos, tanto en sistema singleplex como en multiplex. Finalmente, se evaluó un grupo de muestras, previamente analizados por gota gruesa y qPCR SybrGreen, comparando los resultados obtenidos. En comparación con el sistema qPCR en SybrGreen, el sistema PET-multiplex permite la detección de *P. falciparum* y *P. vivax* indistintamente, sin el uso de herramientas adicionales como temperatura de melting, permitiendo la identificación de infecciones mixtas. Así el sistema PET permite la detección de infecciones menores a 1 parásito/ μ l, encontrándose en el rango de infecciones submicroscópicas.

Palabras Clave: Plasmodium, Malaria, PET-PCR, diagnóstico molecular

ABSTRACT

For many decades the diagnosis of malaria, a disease caused by the protozoan *Plasmodium spp.*, has been and continues to be based on the microscopic analysis of thick blood. In the context of the Plan towards the elimination of Malaria, it is important to detect and treat asymptomatic and subpatent malaria, for which it is necessary to implement new diagnostic such as molecular technique systems that allow high sensitivity and thus eliminate the reservoirs of the illness. To this end, a PET (Photo-Induced Electron Transfer) PCR amplification system was developed to compare with other molecular platforms and determine their sensitivity and analytical specificity. Specific primers were designed using as reference genes PFr364 and Pvr47 to detect *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*, respectively. The amplification conditions were standardized to determine the alignment temperature and the concentration of primers to be used. Likewise, different parameters were evaluated such as the dynamic range of amplification, the limit of quantification, the limit of detection, the analytical specificity, the repeatability and reproducibility for quantitative methods, both in singleplex and multiplex systems. Finally, we evaluated a group of samples, previously analyzed by thick drop and qPCR SybrGreen, comparing the results obtained. In comparison with the qPCR system in SybrGreen, the PET-multiplex system allows the detection of *P. falciparum* and *P. vivax* without the use of additional tools such as melting temperature, allowing the identification of mixed infections. So, PET system allows the detection of infections less than 1 parasite / μ l, being in the range of submicroscopic infections.

Keywords: Plasmodium, Malaria, PET-PCR, molecular diagnosis

I. INTRODUCCION

La Malaria es una enfermedad causada por el protozoo parásito del género *Plasmodium*, que es transmitido por el mosquito hembra *Anopheles sp.* Existen 4 especies que causan malaria humana: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*. De las especies que causan malaria no humana, *P. knowlesi* ha sido recientemente reportado para infectar humanos en el sureste de Asia con aumento en la frecuencia, pero no hay evidencia hasta el momento de transmisión humano-humano. Dentro de las especies que causan malaria humana y representan la mayor amenaza están *P. falciparum* y *P. vivax*, siendo la más peligrosa. *P. falciparum* que además es la responsable de la mayoría de las muertes relacionadas a malaria. Fuera del África subsahariana, *P. vivax* cuenta con aproximadamente la mitad de los casos y predomina en países que son candidatos para la eliminación de la enfermedad, este parásito cuenta con más del 70% de los casos en países que tienen menos de 5 000 casos por año. (World Health Organization, 2017). Esta enfermedad es considerada como problema de salud, cuyo incremento en la transmisión y factores de riesgo, la han ubicado como uno de los principales problemas de las zonas tropicales y subtropicales del territorio peruano. (Dirección General de Epidemiología, 2017).

En el Perú, *Plasmodium spp* tiene un patrón epidémico definido, y está caracterizado por ser cíclico y estacional. Además, está asociado geográfica y ecológicamente a zonas tropicales amazónicas, y desérticas irrigadas de la costa norte. Observando este comportamiento, desde el año 2011, se ha visto un incremento progresivo de los casos de malaria causados por *P. vivax* y *P. falciparum*, siendo mayor el incremento de esta última (MINSA & Dirección General de Epidemiología, 2017).

1.1. DESCRIPCIÓN Y FORMULACIÓN DE PROBLEMA

Por muchas décadas el diagnóstico de esta enfermedad ha estado y sigue basado en el análisis microscópico de la gota gruesa como “*Gold Standard*”. Sin embargo, para lograr un diagnóstico y tratamiento oportuno, es necesario tener en cuenta distintos aspectos: el acceso de los pacientes a los servicios; la disponibilidad de la capacidad diagnóstica, que involucra microscopistas bien entrenados, infraestructuras funcionales; además de un control y una garantía de calidad. La microscopía de luz no permite detectar bajas cargas parasitarias, y el esquema de diagnóstico solo está enfocado en la detección de pacientes sintomáticos, resultando en la subestimación de la prevalencia de la enfermedad en comparación con la herramienta de diagnóstico molecular, PCR (Britton, Cheng, & McCarthy, 2016; Wongsrichanalai, Barcus, Muth, Sutamihardja, & Wernsdorfer, 2007).

Existe una variedad de métodos en la vigilancia epidemiológica y en la investigación de esta enfermedad. Uno de los métodos de diagnóstico ampliamente utilizado en la investigación en malaria son los métodos moleculares, entre los que destaca la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés). Hay una amplia variación en la sensibilidad de las numerosas variantes de PCR que se han desarrollado para el diagnóstico de laboratorio de la malaria (Alemayehu et al., 2013). El diagnóstico molecular más usado para malaria se realiza usando la molécula intercaladora del ADN Sybr Green I que tiene la propiedad de unirse al surco menor del ADN blanco amplificado durante el reconocimiento del cebador y la extensión de cada ciclo en el PCR. En contraste, el sistema Taqman, que es altamente específico y reproducible, utiliza sondas fluorogénicas para detectar los productos de PCR

mediante la actividad exonucleasa 5' de la Taq polimerasa (Liu et al., 2006). Las principales desventajas de estas técnicas consisten en que SYBR Green I es propensa a fallar su especificidad por lo que debe de asegurarse las condiciones óptimas de amplificación, y para el caso de las sondas Taqman se necesita del diseño de una sonda diferente para cada secuencia blanco (Applied Biosystems & Life Technologies, 2014; Ferreira, do Rosário, & Cravo, 2006).

1.2. ANTECEDENTES

Desde el año 2000, se han logrado progresos sustanciales en la lucha contra la malaria. A pesar de esto, el número de países que eran endémicos de malaria en 2000 y que notificaron menos de 10 000 casos de malaria, aumentaron de 37 en 2010 a 46 en 2017. En el caso de Perú, se ha mostrado un aumento en la incidencia de casos para el 2017 con respecto al 2010. (WHO, 2018)

A pesar de este notable progreso, la malaria continúa teniendo un impacto devastador en la salud y los medios de vida de las personas. Las estimaciones actualizadas indican que 212 millones de casos ocurrieron globalmente solo en el 2015.

Reconociendo la necesidad de acelerar los avances en la reducción de la incidencia de la malaria, la OMS elaboró la Estrategia técnica mundial para la lucha contra la malaria 2016- 2030 (GTS) (OMS, 2017c), esta se complementa con el plan de promoción de la lucha contra la malaria, Acción e Inversión para combatir la Malaria 2016-2030 (AIM) (WHO, 2015). En el planteamiento de estas estrategias se hace hincapié - la necesidad de un acceso universal a las intervenciones para la prevención, el diagnóstico y el tratamiento de la malaria, que todos los países deberían acelerar

los esfuerzos encaminados a la eliminación de la malaria, y que la vigilancia de la malaria debe ser una intervención fundamental (United Nations, 2017) (WHO, 2016). Así mismo, en nuestro país, se viene implementando el Plan Malaria Cero 2017-2021, en donde contempla el uso de herramientas moleculares para el diagnóstico de esta enfermedad.

Malaria en Perú

En el Perú, la malaria entre el 2001 y el 2011, ha mostrado una disminución de casos del 67

% comparado con el año 2000, restringiéndose en la costa norte límite con Ecuador e incrementándose en la región nororiental del Perú (departamento de Loreto) que limita con Brasil, Colombia y Ecuador (Mateo, 2013).

Recién a partir del año 2006, los indicadores de incidencia de la malaria mostraron una tendencia hacia su decrecimiento sostenido. Esta tendencia hacia el decrecimiento general, observada en esos años, puede ser atribuida, en parte, a la intervención del Proyecto de Control de la Malaria en las Zonas Fronterizas de la Región Andina (PAMAFRO) en Perú, desde el año 2005 hasta el 2009; así como de la Red Amazónica de Vigilancia de la Resistencia a los Antimaláricos (RAVREDA-AMI). No obstante, en el año 2008 el Perú ocupaba el tercer lugar en reportar el mayor número de casos de malaria entre los países de Sud América y el Caribe (Bustíos Romaní, 2014). En el periodo 2000- 2011, como se muestra en la figura 1, se observó una tendencia decreciente de casos por año, sin embargo, desde el año 2012 se observa un incremento de casos, especialmente en la región Loreto, con una tendencia casi estacionaria en los últimos 3 años (Chapillequen, 2017; Mateo, 2013).

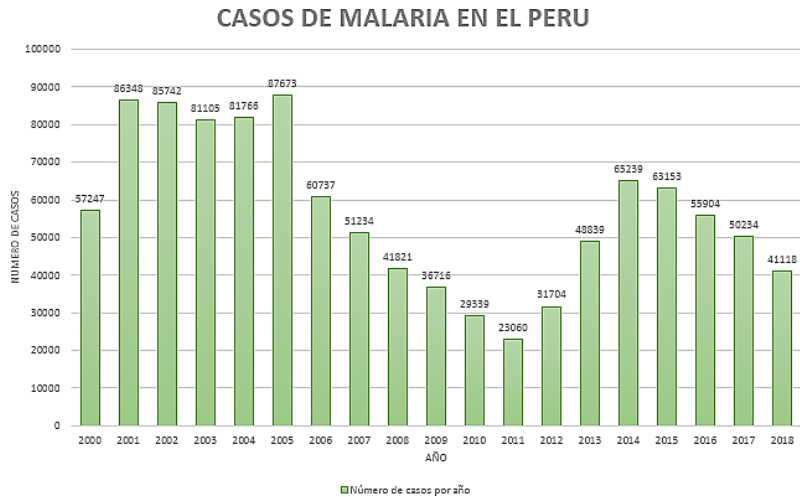


Figura 1. Comportamiento epidemiológico de la malaria en el Perú. Adaptado del Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades – MINSa (Chapillequen, 2017; MINSa, 2018)

Con el propósito de aumentar los esfuerzos contra esta enfermedad, se aprobó en el 2017 el Plan Malaria Cero 2017-2021 (MINSa, 2017) (Figura 2), en la región Amazónica, con el fin de desarrollar un programa de eliminación de la Malaria con enfoque comunitario e intercultural.

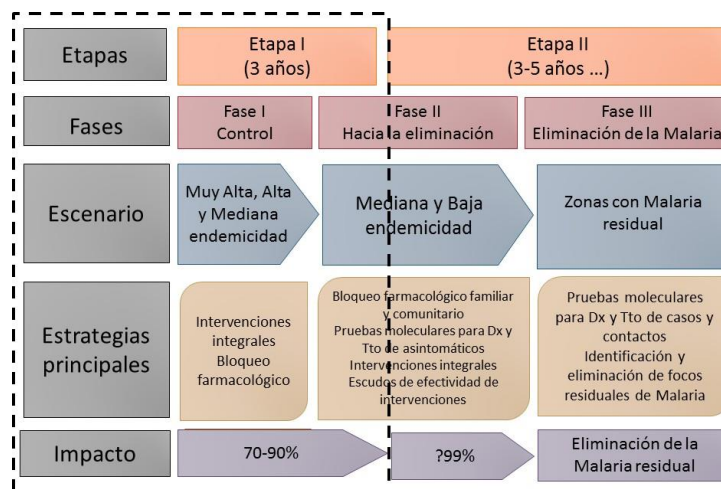


Figura 2. Plan Malaria Cero 2017-2021. (MINSa, 2017)

En el marco de la fase II y III de este plan, el desarrollo de técnicas moleculares como PET- PCR diseñada *in house* permitirá la identificación del parásito de manera específica y sensible en el laboratorio de referencia, donde se confirmarán los diagnósticos obtenidos en campo tanto por microscopio como otras técnicas serológicas y moleculares.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

Diseñar un sistema PET-PCR *in house* para el diagnóstico de *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum* más específica y sensible con respecto a qPCR (SybrGreen I).

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Búsqueda, diseño y estandarización de cebadores para su uso en PET-PCR *in house*.
2. Evaluar la sensibilidad y especificidad analítica del sistema PET-PCR *in house*.
3. Evaluar la eficiencia y límite de cuantificación, como también la reproducibilidad para métodos cuantitativos para el sistema PET-PCR *in house*
4. Comparar la sensibilidad y especificidad del PET-PCR *in house* con respecto a qPCR (Sybr Green I).

1.4. JUSTIFICACIÓN

En el desarrollo del plan de fase hacia la eliminación de la malaria es importante detectar y tratar la malaria asintomática y subpatente para lo cual se requiere de implementar herramientas de diagnósticos como los sistemas de técnica molecular que permitan una alta sensibilidad y así eliminar los reservorios de la enfermedad. El reciente sistema de amplificación PET (**P**hoto-induced **E**lectron **T**ransfer) PCR permite obtener resultados similares a los del sistema Taqman, con la ventaja de contar con el fluoróforo incorporado a los cebadores y no necesita de una sonda adicional, consiguiendo diferenciar a las especies de *Plasmodium* causantes de malaria.

Como consecuencia del aumento notable de casos de Malaria en la Amazonia durante los últimos 5 años, y un incremento notorio de infecciones de *Plasmodium falciparum*, es necesario implementar un método eficiente, sensible y específico para la vigilancia y el diagnóstico oportuno de esta enfermedad endémica de la Amazonia Peruana. Diseñar un sistema de diagnóstico basado en PET-PCR *in house* nos permitirá validar aquellos obtenidos en campo, y de esta manera contar con una herramienta más adecuada para la detección y búsqueda de pacientes asintomáticos y con infecciones submicroscópicas. Con

la reciente implementación del plan Malaria Cero, se espera que dentro de 3 a 5 años nuestro país entre en fase de eliminación de esta enfermedad, donde la gota gruesa y las pruebas rápidas perderán relevancia y técnicas de alta sensibilidad como la técnica de PET propuesta cobrará mayor importancia. (MINSA, 2017).

II. MARCO TEORICO

2.1 BASES TÉCNICAS SOBRE EL TEMA DE INVESTIGACIÓN

2.1.1 ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y TROPICALES

Según la OMS (WHO, 2017a), las enfermedades infecciosas son aquellas causadas por microorganismos patógenos como las bacterias, los virus, los parásitos o los hongos. Estas enfermedades pueden transmitirse, directa o indirectamente, de una persona a otra. Así mismo, se define también como enfermedad tropical aquellas que ocurren únicamente, o principalmente, en los trópicos, haciendo referencia a las enfermedades infecciosas que predominan en climas calientes y húmedos, como el paludismo, la leishmaniasis, la esquistosomiasis, la oncocercosis, la filariasis linfática, la enfermedad de Chagas, la tripanosomiasis africana y el dengue (OMS, 2017a).

2.1.2 MALARIA

El paludismo, o malaria, es una enfermedad potencialmente mortal causada por parásitos que se transmiten al ser humano por la picadura de mosquitos hembra infectados del género *Anopheles* (OMS, 2017b). Los parásitos de la malaria son organismos unicelulares pertenecientes al género *Plasmodium*. La malaria humana se debe a cuatro especies que causan cuatro tipos de enfermedad palúdica: *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. vivax*. Las cuatro especies de malaria humana no se distribuyen de manera uniforme entre las zonas del mundo afectadas por el paludismo y su importancia relativa varía entre zonas

y dentro de ellas, según la región geográfica. *P. falciparum* es la especie más común y predomina en África al sur del Sahara. *P. vivax* predomina en los subtrópicos y coexiste con *P. falciparum* en Asia tropical, las Américas tropicales y el Cuerno de África. *P. ovale* se encuentra en África y esporádicamente en Asia sudoriental y el Pacífico occidental. *P. malariae* tiene una distribución geográfica similar a *P. falciparum*, pero su incidencia es menor y su distribución es irregular (World Health Organization, 2017).

2.1.2.1 SÍNTOMAS

La malaria es una enfermedad febril aguda. En un individuo no inmune, los síntomas suelen aparecer entre 10 y 15 días tras la picadura del mosquito infectivo. Puede resultar difícil reconocer el origen palúdico de los primeros síntomas (fiebre, dolor de cabeza y escalofríos), que pueden ser leves. Si no se trata en las primeras 24 horas, el paludismo por *P. falciparum* puede agravarse, llevando a menudo a la muerte. En las zonas donde el paludismo es endémico, las personas pueden adquirir una inmunidad parcial, lo que posibilita la aparición de infecciones asintomáticas (OMS, 2017b).

2.1.2.2 DIAGNÓSTICO

Los signos y síntomas clínicos no pueden distinguir *P. vivax* de *P. falciparum* o muchas otras causas de enfermedad febril. Por lo tanto, la confirmación parasitológica mediante examen microscópico de un frotis de sangre con Giemsa (es decir, microscopía), o el uso de un ensayo inmunocromatográfico que emplea anticuerpos monoclonales contra el antígeno parasitario (es decir, un RDT), son necesarios. Los

estadios parasitarios que se pueden observar en el diagnóstico por microscopía son los asexuados (trofozoitos y esquizontes) y los sexuados (gametocitos), (Ministerio de Salud y Protección Social, 2015)

2.1.2.2.1 GOTA GRUESA

Esta prueba se considera el “*gold standard*” para el diagnóstico de la malaria a nivel mundial. Consiste en obtener una gota de sangre esparciéndola rápida y uniformemente con la ayuda de una lámina auxiliar hasta formar una gota gruesa de 1 cm de diámetro. De preferencia, se realiza el homogeneizado de la muestra en una sola dirección, en forma concéntrica (de adentro hacia fuera o viceversa). Posterior a esto, se realiza la coloración con Giemsa, mediante procedimientos estandarizados. Los parásitos de malaria toman con la coloración un aspecto determinado en la gota gruesa y el frotis que permite el reconocimiento del tamaño y la forma del parásito. El núcleo del parásito (cromatina) es generalmente redondo y se colorea de un rojo intenso (rojo grosella), el citoplasma toma diferentes formas, desde una forma de anillo a una totalmente irregular y se colorea siempre de azul, aunque la tonalidad puede variar ligeramente. (MINSAL & INS, 2003). El límite de detección para expertos microscopistas es de aproximadamente 4-20 parásitos / μ l de sangre, pero en los entornos clínicos, la microscopía se considera poco fiable por debajo de 50 parásitos / μ L. (WHO, 2017b).

2.1.2.2.2 PCR EN TIEMPO REAL

2.1.2.2.2.1 Sybr Green I

SYBR Green I fluoresce fuertemente cuando se une a ADN de doble cadena, pero la fluorescencia se minimiza cuando el ADN se encuentra libre en solución. La principal limitación de este intercalador reside en su unión no específica a cualquier ADN de doble cadena. En consecuencia, SYBR Green I puede unirse a los dímeros de cebadores, productos inespecíficos, así como el amplicón de destino, con errores en la cuantificación. Por lo tanto, los ensayos cuantitativos utilizando este colorante debe emplear cebadores diseñados altamente específicos con un mínimo riesgo de la formación de dímeros de cebadores y condiciones de reacción bien optimizadas. Una característica esencial de SYBR Green I es la capacidad de obtener una curva de fusión del producto, que revela la presencia de amplicones inespecíficos o la formación de dímero de cebadores (Bell & Ranford-Cartwright, 2002). Estas propiedades hacen que SYBR-Green I tenga aplicaciones dentro de la biología molecular, incluyendo la detección de ADN en análisis de PCR en tiempo real, para el registro de la cinética de la digestión enzimática de DNA tanto en solución como in situ y para tinción de cromosomas y ensayos de detección de DNA. (Dragan et al., 2012) Dada su unión no específica, SYBR Green I no se pueden utilizar en reacciones multiplex. (Bell & Ranford-Cartwright, 2002)

2.1.2.2.2.2 Sondas Taqman

La reacción de PCR aprovecha la actividad de la nucleasa 5' de AmpliTaq Gold® DNA Polymerase para escindir una sonda TaqMan® durante la PCR. La Taq ADN

polimerasa puede escindir nucleótidos 5' terminal de la cadena de ADN que se desplaza mientras sintetiza una nueva hebra. La sonda TaqMan es un oligonucleótido corto, de secuencia específica, que se une dentro de la región delimitada por los cebadores, conteniendo un fluoróforo indicador en el extremo 5' y un represor o quencher en el extremo 3' de la sonda.

El fluoróforo indicador y el *quencher* forman un par receptor-receptor FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer). A medida que avanza la amplificación, la sonda TaqMan se hibrida con la secuencia diana *downstream* de uno de los cebadores. Durante la reacción, la escisión de la sonda separa el fluoróforo indicador y el *quencher*, que da como resultado una fluorescencia incrementada de la sonda. Cuando la sonda está intacta, la proximidad del fluoróforo indicador con el *quencher* da como resultado la supresión de la fluorescencia principalmente mediante la transferencia de energía de tipo Förster (Förster, 1948; Lakowicz, J.R., 2006). Durante el PCR, si el blanco de interés está presente, la sonda se hibrida entre los sitios de los cebadores *Forward* y *Reverse*. La actividad nucleolítica de 5' a 3' de una enzima Taq polimerasa libera el fluoróforo del *quencher* sólo si la sonda se hibrida con el ADN diana. Los fragmentos de la sonda son reemplazados por el ADN diana, y continúa la polimerización de la hebra. El extremo 3' de la sonda se bloquea para evitar la extensión de la sonda durante la PCR. Este proceso ocurre en cada ciclo y no interfiere con la acumulación exponencial del producto. El aumento de la señal de fluorescencia se detecta sólo si la secuencia diana es complementaria a la sonda y el producto se amplifica durante la PCR, siendo la señal de fluorescencia emitida proporcional a la cantidad del amplicón acumulado. Debido a estos requisitos, no se detecta

amplificación inespecífica. (Applied Biosystems & Life Technologies, 2014; Didenko, 2001; Nagy et al., 2017)

2.1.2.2.3 PET-PCR

En esta técnica, el extremo 5' de uno de los cebadores se modifica mediante la adición de una cola de oligonucleótido de 17 bases. Esta secuencia de cola genérica forma una estructura secundaria en lazo que consiste en un tallo de 6 pares de bases, bucle de 3 nucleótidos, un fluoróforo único unido a 5' y dos desoxiguanosina situadas en la región de saliente opuesta, como se observa en la figura 3. En ausencia de amplificación, esta cola forma un bucle y permanece en una conformación cerrada dando como resultado un efecto apagado de la fluorescencia debido a la proximidad de cuatro bases G (es decir, los dos salientes GG y dos residuos GG complementarios en la formación de horquilla) a través del mecanismo de fotoinducción por transferencia de electrones (PET); De ahí el nombre PET-PCR. Cuando hay amplificación de ácidos nucleicos, se abre la estructura de bucle de tallo del cebador PET. La fluorescencia del cebador de PET aumenta durante la amplificación cuando tiene lugar una extensión de la hebra complementaria, esto se debe al efecto de desactivación de los dos residuos de guanosa situados en las posiciones 5' y también debido a la formación de la cadena de ADN complementaria. (Lucchi et al., 2013)

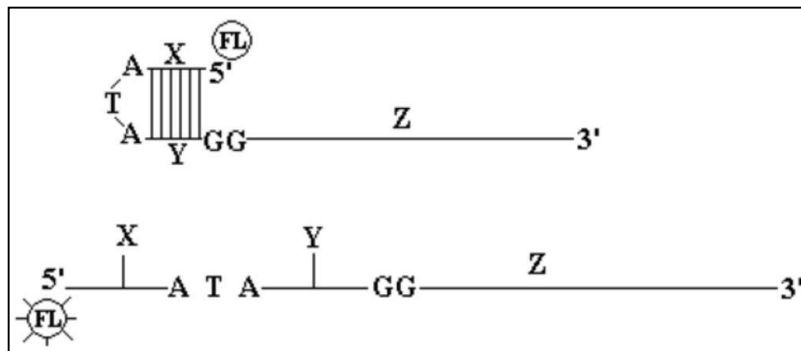


Figura 3. Diseño del cebador PET-PCR. Tomado de Lucchi et al., 2013

III. METODO

3.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN

El presente trabajo es de tipo observacional descriptivo, donde se analizó una nueva prueba diagnóstica, PET-PCR, en comparación con los métodos estándar (“*Gold Standard*” Microscopia y qPCR). Como se muestra en la figura 4, se realizó en 3 etapas:

Etapa 1: Estandarización

Para ello se seleccionó y diseñó cebadores en base a las secuencias obtenidas en las bases de datos *online* de los genes de ARNr 18 s y COX1 para el cebador general de especie

Plasmodium spp., y los genes Pfr364 y Pvr47 para *Plasmodium falciparum* y *P. vivax*, respectivamente. A los cebadores *reverse* se les adicionó un fluoróforo único (FAM o HEX). Se consideró como parámetros la temperatura óptima de hibridación y extensión, contenido de GC (%), formación de homodímeros, heterodímeros y

estructuras secundarias que fueron evaluados utilizando las herramientas bioinformáticas disponibles *online* Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) y Oligoanalyzer (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>).

Una vez obtenidos los cebadores, se realizó una primera evaluación de las condiciones de amplificación usando controles de la cepa 3D7 y una mezcla de muestras clínicas positivas para *P. vivax* para los cebadores generales y específicos. Con la evidencia de amplificación del producto el target fue clonado para realizar la determinación de los parámetros de la reacción de PCR

Etapas 2: Determinación de parámetros

Se evaluó los parámetros que son requeridos para determinar el desempeño de una reacción de PCR cuando se comparan diferentes condiciones de reacción. Para una rigurosa evaluación, estos parámetros deben ser evaluados juntos.

1. Rango Dinámico de amplificación: Para evaluar apropiadamente la eficiencia de la PCR, un mínimo de 3 replicados y un mínimo de 5 logs de concentración del blanco son necesarios. La razón de este nivel de rigor sugerido se demuestra ante la posible variación matemática de la pendiente o la eficiencia obtenida al probar diluciones sobre 1 log vs 5 log. Para determinar de manera precisa la eficiencia de una reacción de PCR, es necesario una serie de diluciones de 5 log empleadas en la amplificación. Una pendiente de $-3.3 \pm 10\%$ refleja una eficiencia de $100\% \pm 10\%$. Una reacción de PCR con una baja eficiencia tendrá una baja sensibilidad. (ThermoFisher Scientific, 2018)

2. Sensibilidad Analítica y Límite de detección (LOD): La sensibilidad analítica refiere al número mínimo de copias en una muestra que puede ser medidas con precisión en un ensayo. Típicamente, es expresada como el límite de detección (LOD), que es la concentración que puede ser detectada con certeza razonable (95% de probabilidad es comúnmente usada), con un procedimiento analítico determinado. (Bustin et al., 2009)

3. Límite de cuantificación (LOQ): Se refiere a la menor cantidad de analito medido en una muestra que puede ser determinada cuantitativamente con precisión clara bajo condiciones experimentales establecidas. (Forootan et al., 2017)

4. Especificidad Analítica: Refiere al ensayo de qPCR que detecta apropiadamente una secuencia blanca en relación a otras, no específicas, presentes en la muestra. (Bustin et al., 2009)

5. Eficiencia: En un ensayo diseñado correctamente deberá, en ausencia de sustancias interferentes en la matriz de muestra, amplificar el ADN objetivo con al menos un 90% de eficiencia (Eficiencia = 1.8). La eficiencia es instrumento dependiente, la estimación de la eficiencia por medio de una curva estándar implica generar una serie de diluciones seriadas, frecuentemente en 10 veces, a partir de una solución de concentración conocida. Las muestras estándar así preparadas se analizan mediante qPCR que mide el ciclo de cuantificación (Cq) usando los procedimientos a evaluar, para esto se construye una gráfica de los Cq versus el logaritmo de las concentraciones y se espera que sea lineal con una

pendiente negativa. Para una serie de dilución de 10 veces, la pendiente es -3.33 cuando E = 100% (Eficiencia = 2). (Svec, Tichopad, Novosadova, Pfaffl, & Kubista, 2015).

6. Repetitividad y Reproducibilidad para métodos cuantitativos: La repetitividad (precisión a corto plazo o varianza intraensayo) refiere a la precisión y robustez de un ensayo con las mismas muestras analizadas en el mismo ensayo. Puede ser expresada como la desviación estándar (SD) de la varianza del Cq. En cambio, la reproducibilidad (precisión a corto plazo o varianza interensayo) refiere a la variación en resultados entre ensayos o entre diferentes laboratorios y es típicamente expresada como la SD o Coeficiente de Variación (CV) del número de copias a concentraciones (Bustin et al., 2009). La desviación estándar (raíz cuadrada de la varianza) es la medida más común de la precisión. Si la data tiene muchos puntos cercanos a la media, la desviación estándar es pequeña, si muchos puntos están lejos de la media, la desviación estándar es amplia. Un conjunto de datos con un suficiente número de replicados forma aproximadamente una distribución normal (ThermoFisher Scientific, 2018)

Etapa 3: Evaluación de muestras

Finalmente, se probará el método con un grupo de muestras clínicas obtenidas de Loreto, mediante búsqueda activa.

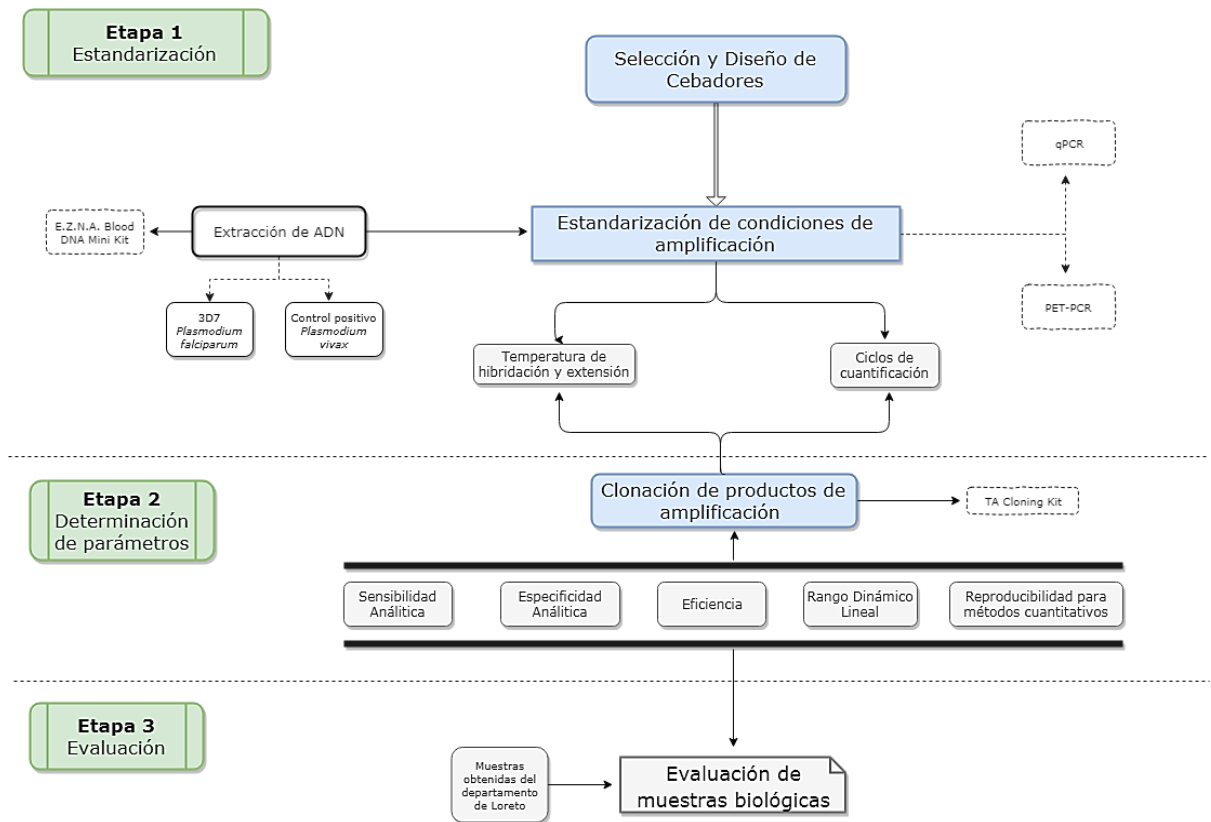


Figura 4. Flujograma de trabajo.

3.2 VARIABLES

3.2.1 VARIABLES DEPENDIENTES

- Ciclo de cuantificación: Esta variable es una de tipo cuantitativa continua y representó el número exponencial derivado de la intersección del umbral y una curva de amplificación dada y es una medida de concentración relativa de la presencia del ADN blanco en la reacción de qPCR (Lefever et al., 2009)
- Eficiencia de la reacción: Es una variable continua y se determinó a partir de la pendiente de la porción lineal logarítmica de la curva de calibración. (Bustin et al., 2009)

- Coeficiente de variación: Es una variable cuantitativa continua hallada entre diferentes concentraciones de muestras.
- Límite de detección (LOD): Es una variable cuantitativa continua y se definió como la concentración más baja a la que se detectan el 95% de las muestras positivas. (Bustin et al., 2009)

3.2.2 VARIABLES INDEPENDIENTES

- Cebadores diseñados: Es una variable categórica nominal que se obtuvo mediante un análisis *in silico* de las secuencias depositadas en las principales bases de datos en línea.
- Concentración de cebadores: Es una variable categórica nominal, la cual fue modificada para optimizar la repetitividad, exactitud, eficiencia y límite de detección y cuantificación.
- Temperatura de hibridación: Es una variable categórica nominal, la cual fue modificada para optimizar la repetitividad, exactitud, eficiencia y límite de detección y cuantificación.
- Concentración de las muestras a amplificar: Es una variable categórica nominal, la cual fue modificada para optimizar la repetitividad, exactitud, eficiencia y límite de detección y cuantificación.

3.3 POBLACIÓN Y MUESTRA

Se trabajó con diferentes tipos de muestra dependiendo de la etapa de estudio.

Etapa 1: Estandarización

Se usaron muestras de controles estándar de la cepa 3D7 para el caso de *P. falciparum* y una mezcla de muestras de controles positivos para *P. vivax* con parasitemia conocida determinada por qPCR.

Etapa 2: Determinación de parámetros

Del producto de amplificación obtenido en la etapa 1, se prepararon controles mediante la técnica de clonación. El plásmido se usó para generar concentraciones conocidas del target de amplificación.

Etapa 3. Evaluación de muestras.

En esta etapa se usó un grupo de muestras de pacientes obtenidas en el departamento de Loreto.

3.4 INSTRUMENTOS

Para el desarrollo de los procesos de estandarización y análisis de muestras se usaron diversos equipos, materiales y reactivos, según detallado en la tabla 1.

Tabla 1. Lista de equipos, materiales y reactivos utilizados.

	Tipo	Descripción
Equipos	Termociclador en tiempo real	CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System #1855195
	Termobloque	SmartBlock™ 1,5 ml, thermoblock for 24×1,5 ml reaction vessels, EPPE5360000.038
	Termomezclador	ThermoMixer® C, without block EPPE5382000.031
	Centrífuga	Centrifuge 5424, non-refrigerated, with Rotor FA-45-24-11, keypad, 230 V/50 – 60 Hz
	Placa Térmica	Fisher Scientific™ Isotemp™ Stirring Hotplate NA

	Tipo	Descripción
Fluorómetro	Vortex	CAT SP88850206 Fischer Scientific Fisherbrand™ Mini Vortex Mixer Qubit Catalog No. Q32857 Serial No. 45250-208. Made for Invitrogen by Turner BioSystems
Incubadora		Binder Modelo BD056-230V Número de catálogo 9010-0323
Puntas para pipeta con filtro		E00102-A- 0.1-10UL filtered ultra micro extra long clear pipet tip for P-10; COD AXYGEN SCIENTIFIC: TXLF-10-1u, E00494-A- 20UL filter tips for P-20; A000 tips por bolsa ; COD AXYGEN SCIENTIFIC: TF-20-1u, E00322-A- 100UL Universal Fit Filter TIPS; 1000 tips por bolsa; COD AXYGEN SCIENTIFIC: TF-100-1u, E00450-A- 200UL universal fit filter tips; 1000 tips por bolsa ; COD AXYGEN SCIENTIFIC: TF-200-1u, E00315-A- 1000UL universal fit filter tips; 1000 tips por bolsa; COD AXYGEN SCIENTIFIC: TF-1000-1u, E00239-A- 1.5ML boil-proof microtubes; 500 tubos por caja; COD AXYGEN SCIENTIFIC: MCT-150-C-1u, E00239-A- 2ML boil-proof microtubes; 500 tubos por caja; COD AXYGEN SCIENTIFIC: MCT-200-C-1u
Materiales		
Microtubos		"Hard-Shell® Low-Profile Thin-Wall 96-Well Skirted
	Placa para PCR	PCR Plates (50 uni) Hard-Shell® 96-Well PCR Plates, low profile, thin wall, skirted, white/white, barcoded #HSP9955" Biorad
Laminas selladoras adhesivas		Microseal® 'B' Adhesive Seals (100 uni) Biorad
Kit de extracción de ADN		E.Z.N.A.® Blood DNA Mini Kit (200 Reacciones)
	Enzima	TaqMan™ Environmental Master Mix 2.0 (200 Reacciones)
	Etanol	Etanol absoluto CAS 64-17-5, 107017 - Merck Millipore
Reactivos		TOPO™ TA Cloning™ Kit for Sequencing, with
	Kit de clonación	One Shot™ TOP10 Chemically Competent <i>E. coli</i> . Catalog number: K457501. ThermoFisher Scientific
Medio S.O.C.		Número de catálogo: 15544034 Invitrogen
	Caldo LB	Medio de crecimiento para bacterias en polvo, Sigma-Aldrich (Merck) L3022-1KG
	Cebadores	Ver lista en tabla N°2

3.5 PROCEDIMIENTOS

Para obtener los datos del procedimiento de PCR, tanto de los protocolos usados como los datos cuantitativos, de fluorescencia, ciclos de amplificación, entre otros, se utilizó el software Biorad CFX Manager previamente instalado en el termociclador de tiempo real.

Estos datos se recolectaron mediante el uso de plantillas de Excel para obtener los resultados de repetitividad, exactitud, eficiencia y límite de detección y cuantificación, como también la reproducibilidad para métodos cuantitativos.

Metodología en Laboratorio:

Extracción de ADN genómico: Se realizó siguiendo el protocolo de extracción del E.Z.N.A. ® Blood DNA Mini Kit modificado (Omega, 2017). Para aproximadamente 20 µL de muestra, se agregó 250 µL de TEN 2X, 180 µL de agua destilada estéril y 50 µL de SDS al 10% se incubó por una hora a 65°C. Luego, se agregó 25 µL de Proteasa OB e incubar nuevamente por 30 minutos. Finalizado el periodo de incubación, se centrifugó a 12 500 rpm por 3 minutos. El contenido fue transferido a un tubo de 2 ml y se agregó 500 µL de Buffer BL y 500 µL de Etanol Absoluto. Se mezcló usando vórtex y se transfirió 500 µl a un tubo colector con columna y centrifugó a 8000 rpm por 1 minuto, repetir este paso una vez más. Agregar 500 µL de Buffer HBC y centrifugar a 8000 rpm por un minuto. Luego agregar 700 µL de Buffer Wash y centrifugar a 8000 rpm por un minuto, repetir este paso una vez más. Finalmente, se centrifugó a 12 500 rpm por 3 minutos para desechar cualquier rastro de alcoholes de la columna y agregó 50 µL de Buffer de elución precalentado a 65°C a la columna.

Incubar a 65°C por 5 minutos y centrifugar a 12 500 rpm por 1 minuto. Almacenar a 4°C si se usara inmediatamente o a -20°C por un largo periodo.

Selección de target de amplificación de ácidos nucleicos: Se diseñó cebadores específicos para *P. falciparum* basados en el gen de pfr364, *P. vivax* basado en el gen Pv47, y para el género Plasmodium basados en genes mitocondriales y ribosomales (Demas et al., 2011; Snounou & Singh, 2002). Finalmente, se modificaron los cebadores para su aplicación en PET según lo reportado por Lucchi et al., 2013.

Clonación de controles referenciales: Se utilizó el protocolo de clonamiento de Invitrogen TA Cloning KIT Top10. Para esto se realizó un PCR punto final a las muestras de cultivo de *Plasmodium falciparum* y muestras de sangre positivas de *Plasmodium vivax*, usando los cebadores que contienen a la secuencia target para las técnicas de qPCR y PET-PCR. Con el producto de PCR obtenido, se procedió a realizar la ligación al vector pCR®2.1, para continuar con el proceso de transformación en cepa de TOP10 *E. coli*. Finalmente, se hizo crecer las colonias en Medio S.O.C durante toda la noche, y una vez obtenidas las colonias, se seleccionaron y se cultivaron en caldo LB para obtener una mayor proporción del plásmido. (Invitrogen, 2013)

Protocolo Estandar PET (Lucchi et al., 2013)

La amplificación de *Plasmodium spp.* fue realizada en 20 µL de reacción conteniendo 2X Taqman Environmental Master Mix 2.0 (Applied BioSystems), 125 nM de cada cebador, forward y reverse y 2 µL de ADN de la muestra. Las reacciones fueron realizadas bajo las siguientes condiciones de amplificación: Inicio a 95°C por 10

minutos, seguido de 45 ciclos de denaturación a 95° por 10 segundos e hibridación a 60°C. El canal de fluorescencia fue seleccionado para cada set de cebadores marcados con fluoróforos y los valores del ciclo umbral (Cq) fueron grabados al final del paso de hibridación. Cualquier muestra con un valor de Cq de 40.5 o por debajo fue considerado positivo.

3.6 ANÁLISIS DE DATOS

Para evaluar adecuadamente la eficiencia de PCR, se necesitó un mínimo de 3 repeticiones y de 5 logs de concentración del analito. A este procedimiento se le denominó rango dinámico de amplificación. La razón de este nivel de rigor sugerido se demuestra ante la posible variación matemática de la pendiente o la eficiencia obtenida al probar diluciones sobre 1 log vs. 5 logs (ThermoFisher Scientific, 2018). Se realizó 9 diluciones seriadas de las cuales se colocó para la reacción a partir de la tercera dilución hasta la novena dilución, usando un blanco de reacción.

Se evaluó asimismo la repetibilidad (o varianza intraensayo) referida como la precisión y robustez del ensayo con las mismas muestras analizadas repetidamente en el mismo ensayo. Puede ser expresado como la desviación estándar de la varianza del Cq. Mientras que la reproducibilidad (o varianza interensayo) refiere a la variación en los resultados entre ensayos o diferentes laboratorios y es típicamente expresada como la desviación estándar o el coeficiente de variación del número de copias o concentraciones. Los valores de Cq generados de diferentes ensayos son sujetos a una variación inherente entre ensayos. (Bustin et al., 2009)

IV. RESULTADOS

4.1 ETAPA 1: ESTANDARIZACION

4.1.1 DISEÑO Y SELECCIÓN DE CEBADORES

Para el diseño de los cebadores se usó la herramienta bioinformática *online* Primer BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) para la obtención de los cebadores. Estos cebadores fueron diseñados sin adicionar la cola de oligonucleótidos de la técnica PET. El objetivo fue analizar si los cebadores por si mismos podían amplificar las regiones de los genes blancos seleccionados, el gen mitocondrial Cox1 y el gen ribosomal ARNr 18s para los cebadores del género *Plasmodium*, los genes subteloméricos Pfr364 para *Plasmodium falciparum* y Pvr47 para *P. vivax*. Una vez obtenidas las secuencias, se procedió a un análisis de amplificación usando como muestras curvas estándar de *Plasmodium falciparum* 3D7 y muestras positivas de *Plasmodium vivax*. Todos los cebadores amplificaron para las muestras controles seleccionados.

Posteriormente, se continuó con la adición de la cola de oligonucleótidos al cebador *reverse* para su desarrollo de la técnica PET, consiguiendo la lista de cebadores señalada en la Tabla 2.

Tabla 2. Lista de cebadores diseñados para su uso en el sistema PET-PCR

Código de Set	Cebadores	Secuencia	Tamaño de amplicón (pb)	Eficiencia
	PCoxQF	GTCATTATCTCCTGTAGCTGTAG		
PETPAN2	FAM-	aggcgcatagcgcctggAATGTATACTTC	328	-
	PCoxQR	AGGATGTCCAA		
	P18QF	ATTCAGATGTCAGAGGTGAA		
PETPAN3	FAM-	aggcgcatagcgcctggTAAGGTAAGTAA	243	1.57
	P18QF	GGAAGCAA		
	Pfr364QF	CCGGAAATTCGGGTTTTAGAC		
PETPF2	HEX-	aggcgcatagcgcctggGTGTGTGCAAC A	242	1.54
	Pfr364QR	TCATAATCATCA		
	Pfr364FO	AG GTACGCCAAC ATGGAT		
PETPF3	HEX-	aggcgcatagcgcctggGTGTGTGCAAC A	195	1.53
	Pfr364QR	TCATAATCATCA		
	PV47LF3	AACACCTCCCACCAATCA		
PETPV1	FAM-	aggcgcatagcgcctggGTGTGAATTATC	211	1.73
	Pv47QR	GAAGGCATAA		

Se usó muestras controles de *Plasmodium falciparum* 3D7 y muestras positivas de *Plasmodium vivax* para determinar la amplificación de los cebadores consiguiendo los

resultados mostrados en la tabla 1. Los cebadores para Cox1 y los cebadores para ARNr18S no amplificaron de manera eficiente por lo que se descartó su uso en posteriores análisis. De los cebadores para *P. falciparum* y *P. vivax* se seleccionaron los siguientes cebadores, según la Tabla 3.

Tabla 3. Cebadores seleccionados para la evaluación en sistema PET

Código De Set	Cebadores	Secuencia	Eficiencia
	Pfr364F3	CACTAGGTACGCCAACAT	
PETPF4	HEX- Pfr364B3	aggcgcatagcgcctggACCCACAATTTTGATTG AGATG	1.53
	PV47LF3	AACACCTCCCACCAATCA	
PETPV1	FAM- Pv47QR	aggcgcatagcgcctggGTGTGAATTATCGAAGG CATAA	1.73

Debido a que la eficiencia de la reacción para ambos blancos era baja, se optó por modificar los cebadores colocando esta vez la cola de oligonucleótidos en los cebadores *forward*, y evaluar la intensidad de fluorescencia y la eficiencia de la reacción, como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Set de cebadores seleccionados mostrando la cola de oligonucleótidos tanto en el cebador *forward* como en el cebador *reverse*

Código De Set	Cebadores	Secuencia	Eficiencia
PETPF4	HEX- Pfr364F3	aggcgcatagcgcctggCACTAGGTACG CCAACAT	1.82
	Pfr364B3 Pfr364F3	ACCCACAATTTTGATTGAGATG CACTAGGTACGCCAACAT	
PETPF5	HEX- Pfr364B3	aggcgcatagcgcctggACCCACAATTTT GATTGAGATG	1.53
	PV47LF3	AACACCTCCCACCAATCA	
PETPV1	FAM- Pv47QR	aggcgcatagcgcctggGTGTGAATTAT CGAAGGCATAA	1.73
	FAM- Pv47LF3	aggcgcatagcgcctgg AACACCTCCCACCAATCA	
PETPV2	Pv47QR		1.76

La eficiencia de la reacción y la intensidad de fluorescencia aumentó cuando la cola de oligonucleótidos se encontraba en el cebador *forward*, como se muestra en la tabla 3. Para saber a qué podía deberse este cambio de comportamiento de los cebadores, se evaluó la estabilidad interna de cada set de cebadores usando la herramienta bioinformática Primer Premier Versión 5.00 (Premier Biosoft)

Esto se hizo con el fin de comparar la estabilidad cuando presentaban la cola de oligonucleótidos adicional.

Para el caso de *P. falciparum* el cebador *Forward* gráficamente era más estable que el cebador *Reverse*. La estabilidad del cebador en el extremo 5' era mayor en el cebador *Forward* por lo que permitió una mayor estabilidad en la reacción ante la

presencia de la cola de oligonucleótidos del sistema.

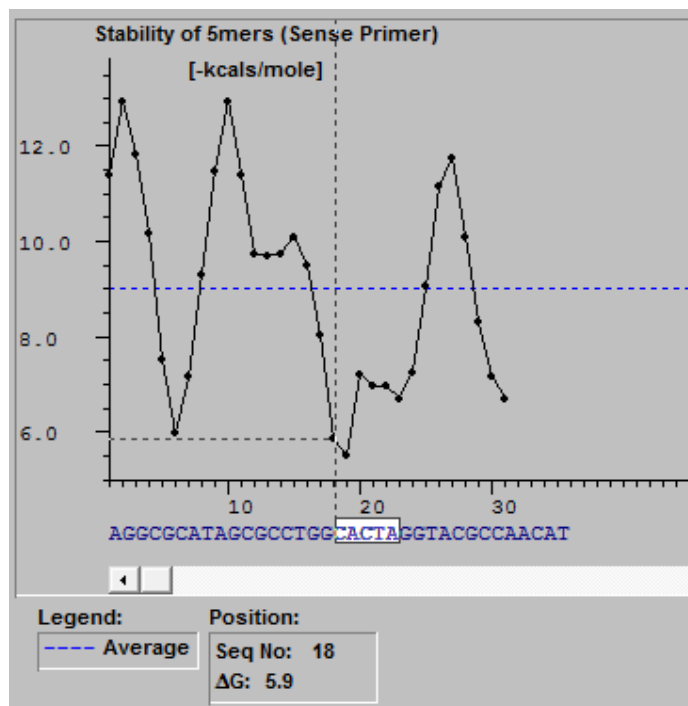


Figura 5. Análisis de estabilidad interna para el cebador *Forward* de *P. falciparum*.

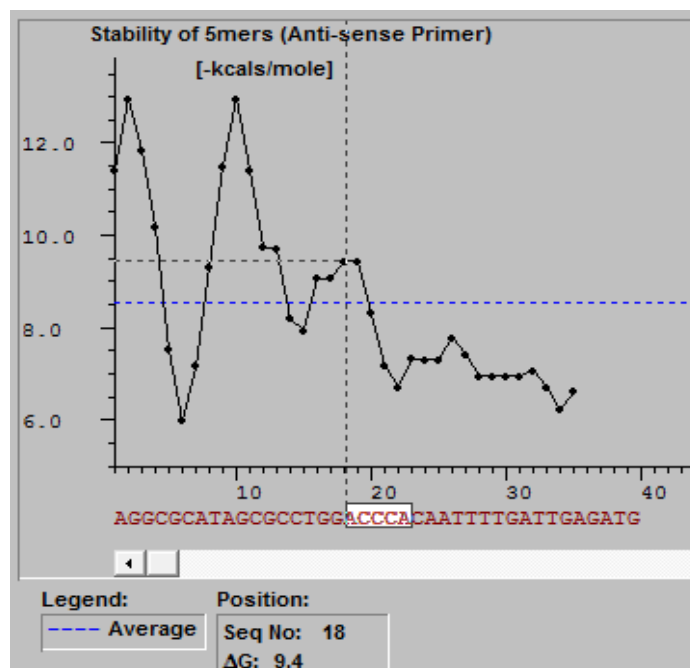


Figura 6. Análisis de estabilidad interna para el cebador *Reverse* de *P. falciparum*.

En el caso de *P. vivax* se observó que la posición de la cola no afectaba la estabilidad de los cebadores, dado que presentaron el mismo comportamiento en ambos casos. Tanto en el extremo 3' como en el extremo 5' se observa estabilidad lo que permitió que la reacción se realice adecuadamente.

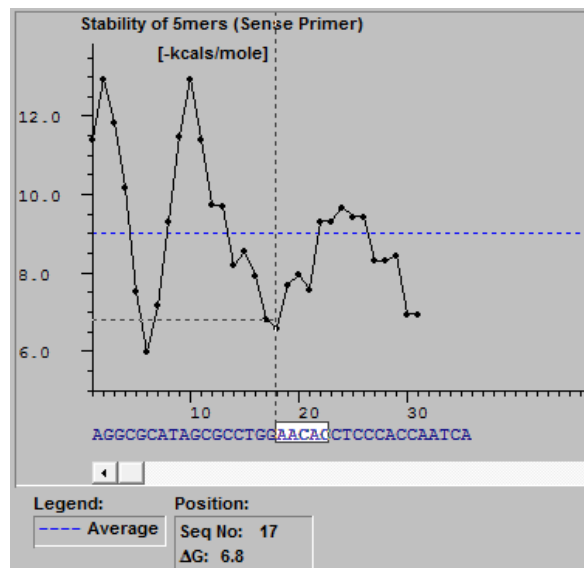


Figura 7. Análisis de estabilidad interna para el cebador *Forward* de *P. vivax*.

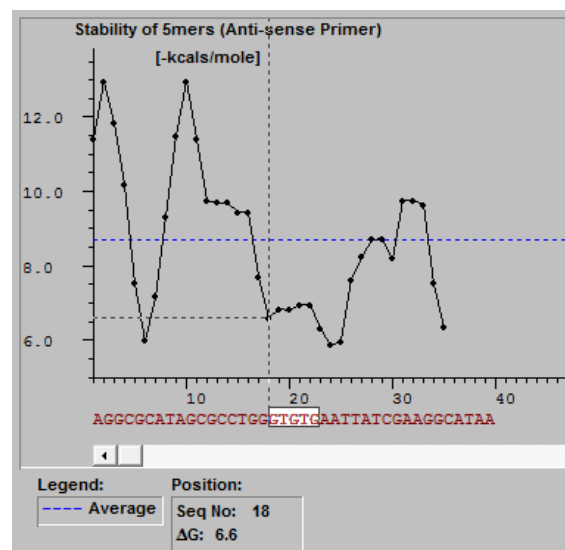


Figura 8. Análisis de estabilidad interna para el cebador *Reverse* de *P. vivax*.

Finalmente, de los 4 pares de cebadores obtenidos se seleccionaron 2 sets para ser probados posteriormente. Estos sets se analizaron con la herramienta bioinformática *online* Primer BLAST.

Tabla 5. Características *in silico* de los sets de cebadores seleccionados.

Set	Cebador	Secuencia	Temperatura de hibridación	Contenido de GC (%)	Tamaño de amplicón (pb)
PETPF4	HEX-	aggcgcatagcgcctggCACTAG	53.97	50.00	229
	Pfr364F3	GTACG			
		CCAACAT			
	Pfr364B3	ACCCACAATTTTGATTGA	55.23	36.36	
		GATG			
PETPV2	FAM-	aggcgcatagcgcctgg	55.54	50.00	211
	Pv47LF3	AACACCTCCCACCAATCA			
	Pv47QR	GTGTGAATTATCGAAGGC			
		ATAA	54.64	36.36	

4.1.2 ANÁLISIS DE CEBADORES

Los cebadores se analizaron para obtener la formación de homodímeros, heterodímeros y otras estructuras con la ayuda de la herramienta bioinformática *online* Oligoanalyzer. (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>)

Cebadores para *Plasmodium falciparum*

Cebador *Forward*: Pfr364F3

Al utilizar el programa Primer BLAST encontramos los siguientes datos sobre -la longitud, el contenido de G-C y la temperatura de melting en base a la secuencia:

SEQUENCE	5'- CAC TAG GTA CGC CAA CAT -3'
COMPLEMENT	5'- ATG TTG GCG TAC CTA GTG -3'
LENGTH	18
GC CONTENT	50 %
MELT TEMP	51.7°C

Figura 9. Análisis del cebador *forward* específico para *P. falciparum*

Análisis de estructura secundaria (hairpin)

Se registró una estructura en forma de hairpin con un ΔG de -0.81 y una temperatura de melting de 36.4°C, por lo que la formación de esta estructura no es posible.


Structure Name	Image	$\Delta G(\text{kcal.mole}^{-1})$	T_m (°C)
1		-0.81	36.4

Figura 10. Estructura secundaria formada por el cebador *forward* específico para *P. falciparum*

Análisis de homodímeros

El homodímero detectado para la secuencia tiene un ΔG de -4.16 que es 8 veces menor al ΔG para que la secuencia del cebador se alinee a la secuencia diana, por lo tanto, no genera secuestro del cebador y permite la amplificación de este.

Dimer Sequence:	
5'- CACTAGGTACGCCAACAT -3'	
Maximum Delta G: -32.66 kcal/mole	
<hr/>	
Delta G: -4.16 kcal/mole Base Pairs: 4	
5'	CACTAGGTACGCCAACAT
3'	TACAACCGCATGGATCAC

Figura 11. Comparación del delta G del cebador *forward* específico para *P. falciparum* y el homodímero formado entre ellos.

Cebador Reverse: Pfr364B3

Al utilizar la herramienta bioinformática Primer BLAST encontramos los siguientes datos sobre la longitud, el contenido de G-C y la temperatura de melting en base a la secuencia:

SEQUENCE	5'- ACC CAC AAT TTT GAT TGA GAT G -3'
COMPLEMENT	5'- CAT CTC AAT CAA AAT TGT GGG T -3'
LENGTH	22
GC CONTENT	36.4%
MELT TEMP	51.5 °C

Figura 12. Análisis del cebador *reverse* específico para *P. falciparum*

Análisis de estructura secundaria (hairpin)

Se observa una estructura en forma de hairpin con un ΔG de -2.21 y una temperatura de melting de 45.4°C, por lo que la formación de esta estructura no es posible a la temperatura de hibridación del cebador es mayor.

Structure Name	Image	$\Delta G(\text{kcal.mole}^{-1})$	T_m (°C)
1		-2.29	45.4

Figura 13. Estructura secundaria formada por el cebador *reverse* específico para *P. falciparum*

Análisis de homodímeros

El homodímero detectado para la secuencia tiene un ΔG de -5.37 que es 7 veces menor al ΔG para que la secuencia del cebador se alinee a la secuencia diana, por lo tanto, no genera secuestro del cebador y permite la amplificación de este.

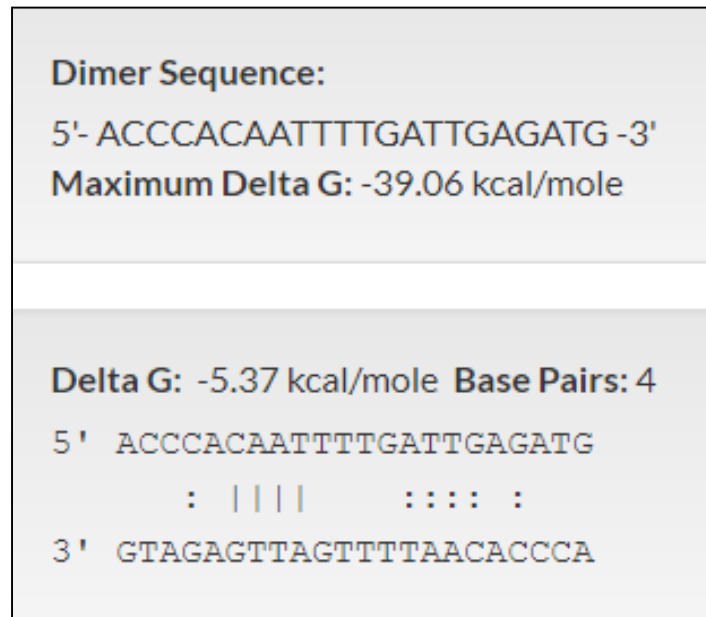


Figura 14. Comparación del delta G del cebador *reverse* específico para *P. falciparum* y el homodímero formado entre ellos.

Análisis de heterodímeros

Se observó la formación de una estructura de heterodímero entre los cebadores seleccionados para esta reacción. Sin embargo, el ΔG es de -4.41 kcal/mol, siendo 9 veces menor al ΔG para la hibridación del cebador a la secuencia blanco. Por esto, no hay secuestro de cebador y se permite la hibridación correcta del cebador a la secuencia diana.

Análisis de estructura secundaria (hairpin)

El análisis realizado con el programa no registro formación de hairpin para este cebador. Análisis de homodímeros

El homodímero detectado para la secuencia tiene un ΔG de -1.47 que es 23 veces menor al ΔG para que la secuencia del cebador se alinee a la secuencia diana, por lo tanto, no genera secuestro del cebador y permite la amplificación de este.

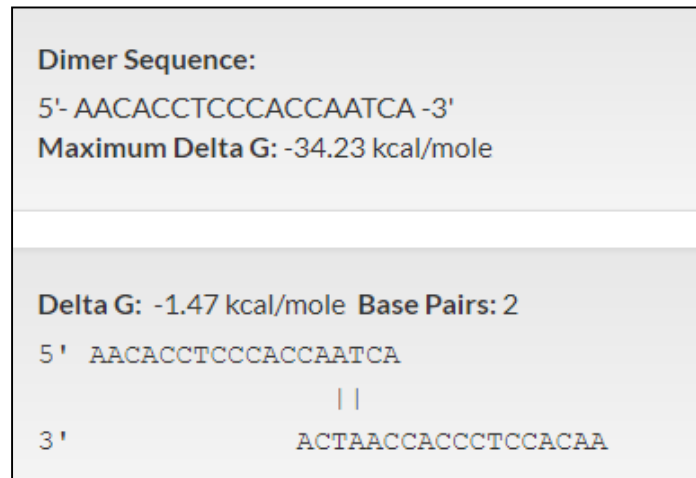


Figura 17. Comparación del delta G del cebador *forward* específico para *P. vivax* y el homodímero formado entre ellos.

Cebador Reverse: Pvr47QR

Al utilizar Primer BLAST encontramos los siguientes datos sobre la longitud, el contenido de G-C y la temperatura de melting en base a la secuencia:

SEQUENCE	5'- GTG TGA ATT ATC GAA GGC ATA A -3'
COMPLEMENT	5'- TTA TGC CTT CGA TAA TTC ACA C -3'
LENGTH	22
GC CONTENT	36.4%
MELT TEMP	50.8°C

Figura 18. Análisis del cebador *reverse* específico para *P. vivax*

Análisis de estructura secundaria (hairpin)

De las 4 estructuras posibles a formarse, se observó que todas se encuentran en un intervalo de ΔG entre 0.41 y 1.48 y con temperatura de melting muy inferiores a la de unión del cebador a la cadena molde (1.7°C a 13.2°C) por lo que la probabilidad de formarse estas estructuras secundarias durante el proceso de amplificación es descartada.





Structure Name	Image	$\Delta G(\text{kcal.mole}^{-1})$	T_m (°C)
1		0.41	13.2
2		0.72	12.4
3		1.14	1.7
4		1.38	8.4

Figura 19. Estructura secundaria formada por el cebador *reverse* específico para *P.*

vivax

Análisis de homodímeros

El homodímero detectado para la secuencia tiene un ΔG de -6.76 que es 6 veces menor al ΔG para que la secuencia del cebador se hibride a la secuencia diana, por lo tanto, no genera secuestro del cebador y permite la amplificación de este.

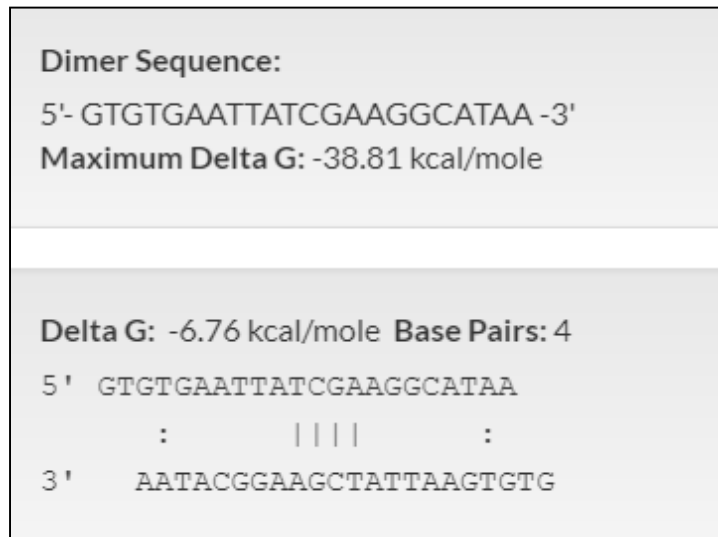


Figura 20. Comparación del delta G del cebador *reverse* específico para *P. falciparum* y el homodímero formado entre ellos.

Análisis de heterodímeros

Se observó la formación de una estructura de heterodímero entre los cebadores seleccionados para esta reacción. Sin embargo, el ΔG es de -4.41 kcal/mol, siendo 9 veces menor al ΔG para el anclaje del cebador a la secuencia molde. Por esto, no hay secuestro de cebador y se permite la hibridación correcta del cebador a la secuencia diana.

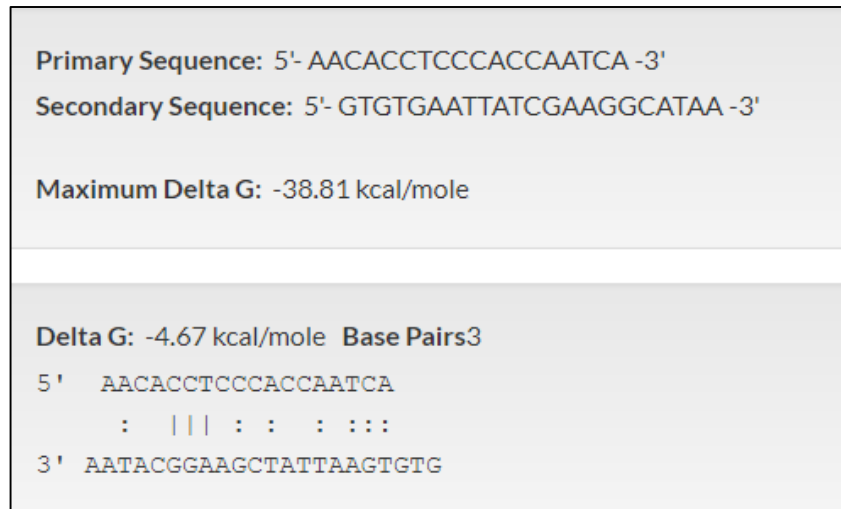


Figura 21. Comparación del delta G de los cebadores específicos para *P. vivax* y el heterodímero formado entre ellos.

4.1.3 ENSAYO PRELIMINAR DE AMPLIFICACIÓN

Se realizó un ensayo preliminar con las condiciones básicas de PCR, usando los cebadores diseñados y seleccionados previamente mencionados en la tabla 4, sin considerar la cola de oligonucleótidos, en un sistema de SybrGreen para evaluar el producto de amplificación, con condiciones básicas en PCR SybrGreen, usando ADN de un cultivo estándar de *Plasmodium falciparum* 3D7 y una mezcla de muestras positivas para *Plasmodium vivax*.

El producto obtenido se secuenció por la compañía MacroGen con metodología Sanger. La secuencia obtenida correspondía a la del producto esperado para los cebadores, por lo que se usó este producto para la posterior clonación y obtención de controles de amplificación.

4.1.4 CONTROLES DE AMPLIFICACIÓN: CLONACIÓN DE ADN OBTENIDO DE UN PLÁSMIDO CON VECTOR

Se preparó una curva de diluciones (1 en 10) a partir del stock obtenido (tabla 6), que fueron usadas en las evaluaciones posteriores como estándar.

Tabla 6. Diluciones preparadas a partir del stock obtenido de la clonación del vector con producto de amplificación de los cebadores seleccionados correspondiente para *P. falciparum*.

<i>Plasmodium falciparum</i>		
Plásmido (ng/μl)	Copias	Parásitos equivalentes/μl
1.72	373632540.59	18681627.03
0.172	37363254.06	1868162.70
0.0172	3736325.41	186816.27
0.00172	373632.54	18681.63
0.000172	37363.25	1868.16
0.0000172	3736.33	186.82
0.00000172	373.63	18.68
0.000000172	37.36	1.87
0.000000086	18.68	0.93
1.72E-08	3.74	0.19
8.6E-09	1.87	0.09
1.72E-09	0.37	0.02

Tabla 7. Diluciones preparadas a partir del stock obtenido de la clonación del vector con producto de amplificación de los cebadores seleccionados correspondiente para *P. vivax*.

<i>Plasmodium vivax</i>		
Plásmido (ng/μl)	Copias	Parásitos equivalentes/μl
1.94	427632118.28	38875647.12
0.194	42763211.83	3887564.71
0.0194	4276321.18	388756.47
0.00194	427632.12	38875.65
0.000194	42763.21	3887.56
0.0000194	4276.32	388.76
0.00000194	427.63	38.88
0.000000194	42.76	3.89
0.000000097	21.38	1.94
1.94E-08	4.28	0.39
9.7E-09	2.14	0.19
1.94E-09	0.43	0.03

4.1.5 ESTANDARIZACIÓN DE CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN

4.1.5.1 CURVA DE TEMPERATURA

Se realizó un ensayo para determinar la temperatura ideal en el que pudiera observarse una mejor curva de amplificación y mayor detección de fluorescencia. Se trabajó con 3 diluciones por duplicado en 8 puntos de temperatura en un rango de 53°C a 60°C. Se escogió la temperatura en base a cuál era la que mejor se adecuaba para su uso en un sistema multiplex, obteniéndose como resultado 55.8, adaptándola a 56°C para su uso en los ensayos posteriores.

Tabla 8. Resultados de la evaluación de eficiencia de la curva de temperatura.

Rango de Temperatura (°C)	<i>Plasmodium falciparum</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
60	1.58	1.70
59.6	1.75	1.60
58.8	1.75	1.66
57.5	1.69	1.66
55.8	1.82	1.76
54.4	1.77	1.60
53.5	1.77	1.89
53	1.75	1.75

4.1.5.2 CURVA DE CONCENTRACIÓN DE CEBADORES

Se realizó un ensayo para determinar a qué concentración de cebador se haría la estandarización del protocolo. Para esto, considerando que la concentración final del cebador en el mix fue de 125 nM para el protocolo estándar, se usó una curva de concentraciones en el intervalo superior e inferior a este. La curva evaluada incluyó concentraciones finales de 100 nM, 200nM y 400nM.

Tabla 9. Resultados de la evaluación de eficiencia de la curva de concentración de cebadores.

Concentración Final de Cebadores	<i>Plasmodium falciparum</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
100 nM	1.66	1.60
200 nM	1.75	1.81
400 nM	1.72	1.72

Se observó que la concentración con mayor eficiencia para ambos blancos fue la de 200 nM, por lo que se trabajó con esta concentración para los análisis posteriores.

Una vez obtenidas la temperatura y concentración de cebadores, se determinó las condiciones finales de reacción, como se detalla en la tabla 10.

Tabla 10. Condiciones de amplificación en el sistema PET-PCR *in house*

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1	95°C	10'	1 ciclo
2	95°C	10''	1 ciclo
3	56°C	30'' + Lectura de fluorescencia	1 ciclo
4	60°c	20''	1 ciclo
5		Repetir 2 a 4	45 ciclos

4.2 ETAPA 2: DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS

4.2.1 RANGO DINÁMICO DE AMPLIFICACIÓN. Sistema singleplex:

Para el sistema singleplex se utilizó una curva de plásmido cuantificado que fue específica para cada set de cebadores. Para probar los cebadores de *P. falciparum* se utilizó una curva de *P. falciparum*, así como para evaluar los cebadores de *P. vivax* se usó una curva estándar de *P. vivax*.

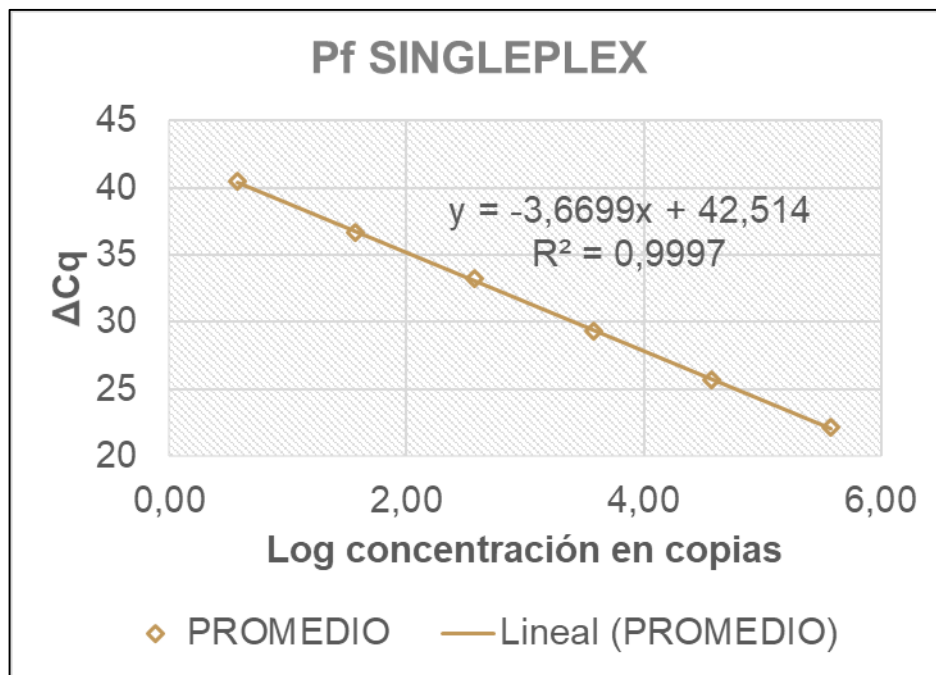


Figura 22. Rango dinámico de amplificación para el sistema *singleplex* usando como blanco curva estándar plasmídico de *P. falciparum*. Eficiencia de la reacción: 1.88

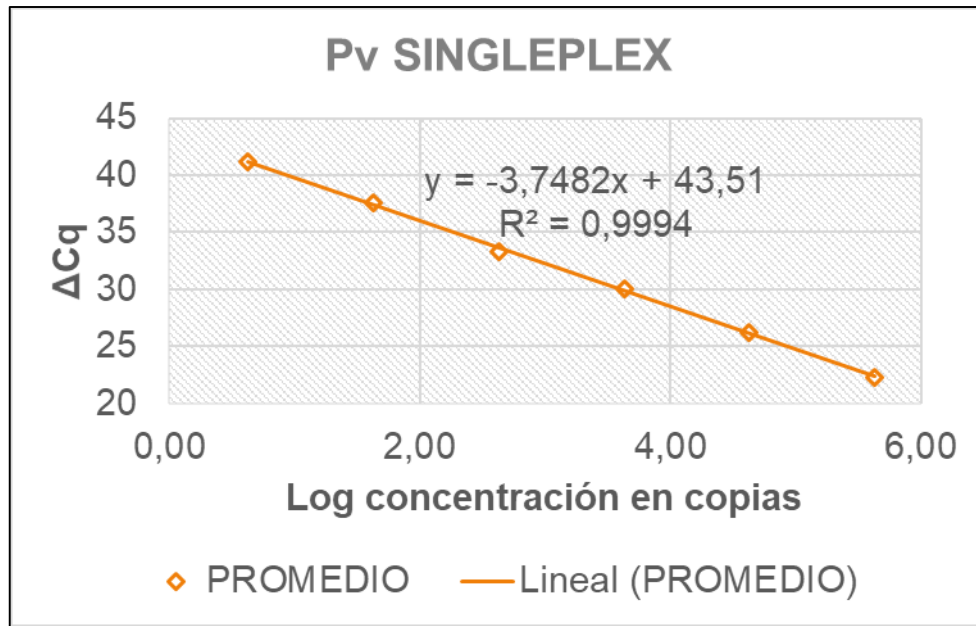


Figura 23. Rango dinámico de amplificación para el sistema *singleplex* usando como blanco curva estándar plasmídico de *P. vivax*. Eficiencia de la reacción: 1.84

Sistema multiplex:

Para el sistema multiplex se utilizó una curva de plásmido cuantificado que fue específica para cada set de cebadores, para probar los cebadores de *P. falciparum* en el sistema se utilizó una curva de *P. falciparum* así como para evaluar los cebadores de *P. vivax* se usó una curva estándar de *P. vivax*.

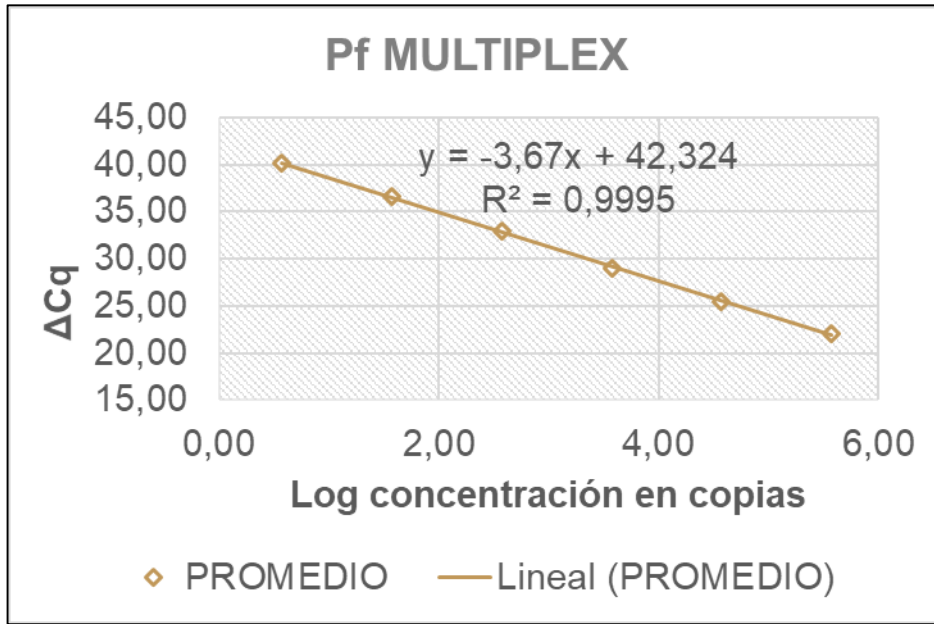


Figura 24. Rango dinámico de amplificación para el sistema *multiplex* usando como blanco una curva estándar plasmídico de *P. falciparum*. Eficiencia de la reacción: 1.9

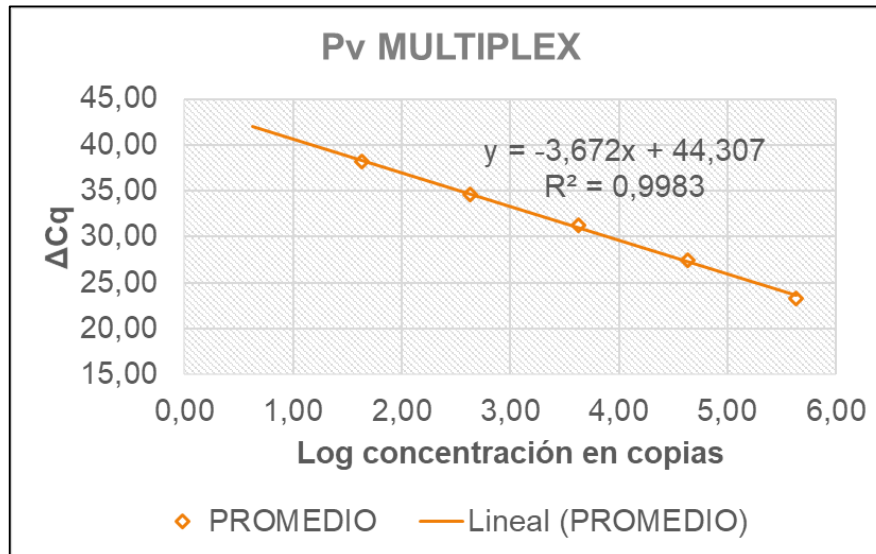


Figura 25. Rango dinámico de amplificación para el sistema *multiplex* usando como blanco curva estándar plasmídico de *P. vivax*. Eficiencia de la reacción: 1.86

4.2.2 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN Y LÍMITE DE DETECCIÓN (LOD) – SENSIBILIDAD ANALÍTICA

Se evaluó el límite de detección (LOD) usando la curva de plásmidos estándar preparada previamente. Se obtuvieron los resultados mostrados en la tabla 11 teniendo en cuenta que la cantidad de parásitos equivalentes para *P. falciparum* era 20 por copia de plásmidos y 11 parásitos equivalentes por copia para *P. vivax*

Tabla 11. Resultados del límite de detección usando plásmidos control.

Blanco	Sistema	Cq	Plásmido ng/μl	Copias	Parásitos equivalentes	Eficiencia de la reacción
P. falciparum	SINGLEPLEX	34.88	8.6E-08	18.68	0.93	1.75
P. falciparum	MULTIPLEX	37.98	8.6E-08	18.68	0.93	1.80
P.vivax	SINGLEPLEX	35.60	1.94E-07	42.76	3.89	1.75
P.vivax	MULTIPLEX	37.09	1.94E-07	42.76	3.89	1.78

4.2.3 ESPECIFICIDAD ANALÍTICA

Se utilizó muestras estándar de *Plasmodium vivax* Sal I, *Plasmodium falciparum* 3D7, *Plasmodium malariae* y *Plasmodium ovale* proporcionadas por el CDC. Además, se evaluó la especificidad analítica usando los controles de plásmidos para *P. vivax* y *P. falciparum*, así como una muestra de cultivo de *P. falciparum* cuantificada. Los controles de plásmidos como las cepas estándar para ambos blancos amplificaron solo en aquellas reacciones que presentaron los cebadores específicos. Los controles de *Plasmodium ovale* y *P. malariae* no amplificaron en ninguno de los sistemas.

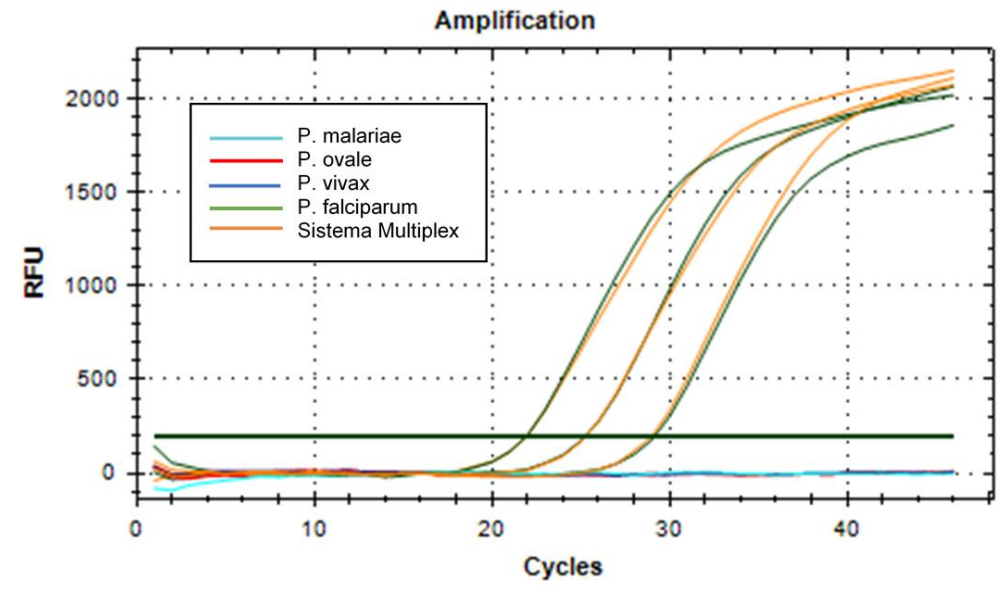


Figura 26. Curva de amplificación evaluando la especificidad para *Plasmodium vivax*.

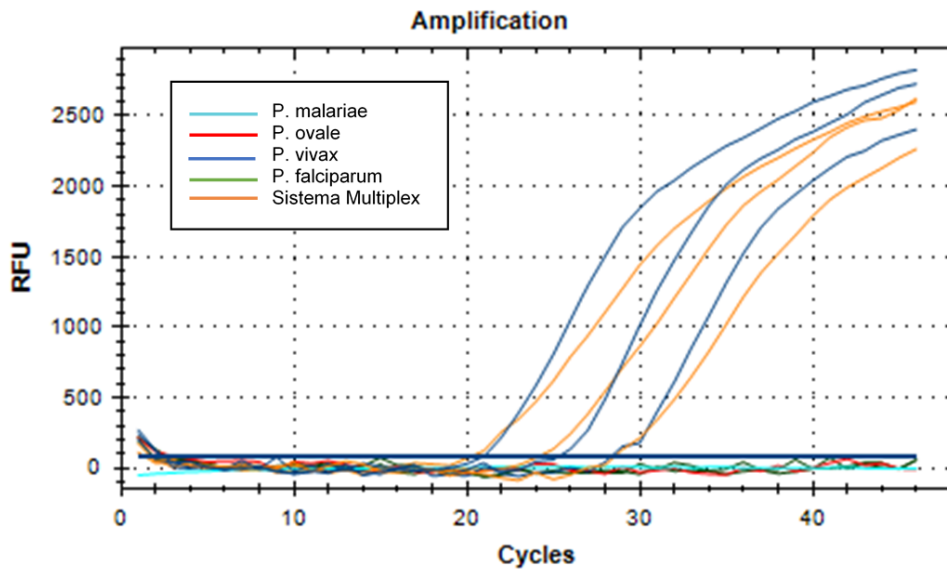


Figura 27. Curva de amplificación evaluando la especificidad para *Plasmodium falciparum*.

4.2.4 REPETITIVIDAD Y REPRODUCIBILIDAD PARA MÉTODOS CUANTITATIVOS

Se evaluó a partir de diluciones seriadas 1/10 la repetitividad y reproducibilidad del ensayo en 7 ensayos, cada uno por triplicado, dando un total de 21 eventos por dilución. Se usó 5 puntos como se detalla en las tablas 12 y 13, en donde se evaluó la desviación estándar y el coeficiente de variación del sistema, usando el paquete estadístico Stata/SE 12.0

Tabla 12. Ensayo de repetitividad (Desviación estándar *SD*) y reproducibilidad (Coeficiente de Variación *CV*) para el sistema de detección de *Plasmodium falciparum*.

Copias	Parásitos equivalentes	Singleplex			Multiplex		
		Media	SD	CV*	Media	SD	CV*
373632.54	18681.63	22.015	0.117	0.079	22.105	0.125	0.089
37363.25	1868.16	25.562	0.126	0.084	25.525	0.241	0.171
3736.33	186.82	28.96	0.155	0.104	28.72	0.199	0.137
373.63	18.68	33.04667	0.173	0.119	32.75	0.066	0.045
37.36	1.87	36.426	0.203	0.134	36.6775	0.256	0.167

*Coeficiente de variación basado en cuantificación de parásitos equivalentes

Tabla 13. Ensayo de repetitividad (Desviación estándar *SD*) y reproducibilidad (Coeficiente de Variación *CV*) para el sistema de detección de *Plasmodium vivax*.

Copias	Parásitos equivalentes	Singleplex			Multiplex		
		Media	SD	CV*	Media	SD	CV*
427632.12	38875.65	22.562	0.166	0.112	23.10667	0.107	0.080
42763.21	3887.56	26.635	0.200	0.127	27.075	0.127	0.098
4276.32	388.76	30.6975	0.260	0.157	30.99	0.205	0.150
427.63	38.88	34.025	0.249	0.170	34.205	0.281	0.187
42.76	3.89	37.91	0.088	0.055	38.15	0.259	0.184

*Coeficiente de variación basado en cuantificación de parásitos equivalentes

4.3 ETAPA 3: EVALUACIÓN DE MUESTRAS

Se analizó un grupo de 31 muestras al azar para evaluar el desempeño del sistema en singleplex y en multiplex.

Con el sistema en singleplex, se obtuvo como resultado un total de 6 muestras positivas para *P. falciparum* y 9 para *P. vivax*, de las cuales 3 fueron infecciones mixtas. Se puede observar resultados similares con el sistema Multiplex, en donde se detectó 7 muestras positivas para *P. falciparum* y 6 muestras positivas para *P. vivax*, detectando 3 infecciones mixtas. Entre ambos sistemas, se detectó la presencia de 8 muestras con *P. falciparum* y 9 para *P. vivax*, hallándose en total 4 muestras con infecciones mixtas.

Tabla 14. Resultados de evaluación de muestras obtenidas en Iquitos, Loreto, Perú.

	Singleplex Multiplex				PET
	Pfr364	Pvr47	Pfr364	Pvr47	TOTAL
Negativos	17	16	12	19	10
<i>P. falciparum</i>	11	0	12	0	8
<i>P. vivax</i>	0	12	0	7	9
Mixtos		3		5	4

Por medio del uso de una curva estándar se pudo hallar la parasitemia de cada una de las muestras, detectando para *Plasmodium falciparum* 0.05 parásitos/ μ l y para *P. vivax*, 0.04 parásitos/ μ l.

Estos resultados fueron comparados con los obtenidos previamente tanto por microscopia como por un sistema de detección de qPCR en SybrGreen basado en Mangold *et al.*, (2005). De estas muestras, se encontró que 13 tenían una parasitemia menor a 1 parásito/ μ l, por lo que no podían ser comparables entre sistemas.

Tabla 15. Resultados comparativos de las muestras evaluadas en 3 métodos. Microscopia (Gold Standard), qPCR SybrGreen y PET-PCR

Diagnóstico	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. falciparum</i> + <i>P. vivax</i>	Negativos
Microscopía	2	7	0	22
qPCR SybrGreen	7	22	0	2
PET-PCR	8	9	4	10

V. DISCUSION DE RESULTADOS

El uso de nuevas herramientas moleculares para el diagnóstico de la malaria permitirá poder detectar pacientes asintomáticos en un contexto de búsqueda activa de pacientes. La técnica de PET-PCR presentada puede ser considerada como una herramienta útil para la detección de infecciones submicroscópicas. Mediante la estandarización, se demostró que puede ser implementada para su uso en el contexto hacia la eliminación de la Malaria.

El uso de nuevas secuencias blancos específicos, altamente sensibles, multicopias y que permitan el desarrollo de plataformas de diagnóstico permitirán un mejor diagnóstico de la malaria. El diseño de cebadores altamente específicos para cada especie permitió detectar infecciones mixtas mediante el uso de un sistema en multiplex.

Con la estandarización de temperatura y concentración de cebadores se evaluó el sistema. Para la curva de temperatura, se escogió la que mejor se adecuaba para su uso en el sistema multiplex, y poder evaluar todos los parámetros siguientes y que sean los sistemas comparables, por lo que se seleccionó la temperatura de 56°C debido a que la eficiencia de la amplificación eran las más altas. Se escogió así mismo, la concentración final de cebadores de 200 nM, debido a que mostró mayor estabilidad y emisión de fluorescencia en comparación con las otras concentraciones, y se procedió con las siguientes evaluaciones.

Se evaluó también la eficiencia (E) de la PCR. Este resultado se observa en cada una de las curvas construidas con las diluciones estándar a partir de plásmido. Si bien es cierto, la pendiente varía en relación con el método (singleplex o multiplex), el valor se conserva cercano al 3.3 y con una eficiencia entre 1.84 y 1.9 (92% - 95%), manteniendo la reproducibilidad del ensayo. (Bustin et al., 2009)

La precisión de las estimaciones del Límite de detección (LoD) y el Límite de Cuantificación (LoQ) depende principalmente de los incrementos de concentración entre las muestras estándar. (Forootan et al., 2017). El LoD para *P. falciparum* se encuentra en

18.68 copias equivalentes para ambos sistemas (singleplex y multiplex) y para *P. vivax* se encuentra en 42.76 copias equivalentes, en ambos sistemas, representando a 0.93 y 3.89 parásitos equivalentes/ μL , respectivamente. Este límite de detección se encuentra por debajo de lo reportado previamente por Lucchi et al., 2013, en donde reportaron 3.2 parásitos por μl como mínima concentración detectada usando una curva estándar de *Plasmodium falciparum*. La desviación estándar (SD) se mantuvo constante en todos los puntos, de igual modo, el coeficiente de variación (CV) se mantuvo por debajo de 35% (0.35) (Tablas 12 y 13), demostrando la reproducibilidad del ensayo. (Bustin et al., 2009)

En cada uno de los sistemas se evidenció la amplificación de cepas estándar de *Plasmodium falciparum* 3D7 y *Plasmodium vivax* Sall. Así mismo, se observó que la amplificación para

P. falciparum se da en el mismo Cq independientemente del sistema en que se evalúe (Singleplex o Multiplex), a diferencia de *P. vivax*, en donde se aprecia que la curva en

el sistema Multiplex decae, y la eficiencia disminuye. Esto puede deberse a la competencia existente entre los fluoróforos de ambos cebadores. FAM se caracterizó por emitir más fluorescencia que HEX, exigiendo más energía a la reacción de amplificación para estos cebadores.

Las muestras evaluadas nos permiten evaluar el sistema en un contexto más real que usando muestras estandarizadas debido a que en estas podría haber la presencia de inhibidores que estarían afectando el sistema. Debido a la baja parasitemia en algunas muestras, solo se detectó como positivo en uno de los sistemas, por lo que al manifestar la presencia de la secuencia blanco en uno de los sistemas se consideró como positivo. Para el caso de las muestras mixtas, se contempló ambos sistemas en la categorización.

A lo largo de los años, el uso del gen 18rRNA se consideró como elección lógica debido a su secuencia altamente conservada, la habilidad de obtener cebadores universales para su amplificación y el hecho de que se conocía como un gen multicopia presente en todos los organismos que se habían examinado hasta el año 2002. El subsecuente análisis de las secuencias de los genomas de Plasmodium reveló que el blanco del gen 18sRNA solo está presente en 4 de las 8 no-tándem y divergentes copias, dependiendo de la especie, en contraste con el caso de otros genomas eucariotas que tienen cientos de copias en tándem del clúster del gen 18rRNA. (Demas et al., 2011). El uso de diferentes blancos para cada especie permite la diferenciación específica de estas, y su vez, permite distinguir la existencia de infecciones mixtas en una muestra.

El qPCR usando metodología Taqman se caracteriza por su especificidad de la sonda marcada con un fluoróforo. Este fluoróforo reportero se encuentra en el extremo 5', y es liberado de la sonda por la actividad exonucleasa de la Taq polimerasa durante el paso de extensión en cada ciclo de amplificación. En cambio, el principio de cuantificación de los productos amplificados por SybrGreen está basado en la unión de la molécula fluorescente al surco menor del ADN amplificado durante los pasos de alineamiento y extensión del PCR, por lo que muestra una menor especificidad. (Muhamad, Chaijaroenkul, Congpuong, & Na-Bangchang, 2011). Usando qPCR con SybrGreen solo se permite la amplificación del género Plasmodium, debido a que solo utiliza un blanco de amplificación, el gen ribosomal 18S, y el poder distinguir entre especies queda limitado a la observación del pico de melting, siendo esto un proceso que puede llegar a ser subjetivo por diversos factores (competencia entre blancos, dímeros de cebadores, interferencias con la muestra) que no permiten un resultado plenamente objetivo. Así mismo, por el uso de un solo blanco de amplificación, no se pueden detectar infecciones mixtas. Usando la técnica de PET, la competencia entre blancos disminuye y permite reconocer la existencia de infecciones mixtas, independiente a la relación proporcional entre las parasitemias de estas.

A pesar de que ambos sistemas presentan una alta sensibilidad analítica, la detección de *P. vivax* usando el gen Pvr47 presenta una reducción en el hallazgo de casos infectados, en comparación con el gen ribosomal 18S usado en la plataforma de qPCR SybrGreen. Esto sugiere que es necesario buscar un nuevo blanco que tenga mayor grado de detección.

Usando una curva estándar, se pudo hallar la parasitemia de cada una de las

muestras, detectando para *Plasmodium falciparum* 0.05 parásitos/ μ l en ambos sistemas, y para *P. vivax*, 0.04 parásitos/ μ l en ambos sistemas. Las parasitemas obtenidas son mucho menores de lo que se puede cuantificar por microscopía, (Wongsrichanalai et al., 2007) (Alemayehu et al., 2013) permitiendo detectar infecciones submicroscópicas.

VI. CONCLUSIONES

- Los cebadores diseñados permiten la detección específica de *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum*.
- En comparación con el sistema qPCR en SybrGreen basado en Mangold, el sistema PET-multiplex permite la detección de *P. falciparum* y *P. vivax* indistintamente, sin el uso de herramientas adicionales como temperatura de melting, permitiendo la identificación de infecciones mixtas
- El límite de detección y cuantificación del sistema PET se encuentran en el rango de detección de infecciones submicroscópicas, por lo que se permite la detección de infecciones submicroscópicas menores a 1 parásito/ μl

VII. RECOMENDACIONES

- Se requiere, en un futuro estudio, validar el diseño y comprobar la sensibilidad y especificidad clínica, así como los valores predictivos positivos y negativos asociándolo con la prevalencia de la enfermedad en el Perú.

VIII. REFERENCIAS

- Alemayehu, S., Feghali, K. C., Cowden, J., Komisar, J., Ockenhouse, C. F., & Kamau, E. (2013). Comparative evaluation of published real-time PCR assays for the detection of malaria following MIQE guidelines. *Malaria Journal*, *12*, 277. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-12-277>
- Applied Biosystems, & Life Technologies. (2014). *TaqMan® Universal PCR Master Mix* (Manual de Usuario). Retrieved from https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/4304449_TaqManPCRMM_UG.pdf
- Bell, A. S., & Ranford-Cartwright, L. C. (2002). Real-time quantitative PCR in parasitology. *Trends in Parasitology*, *18*(8), 337–342.
- Britton, S., Cheng, Q., & McCarthy, J. S. (2016). Novel molecular diagnostic tools for malaria elimination: a review of options from the point of view of high-throughput and applicability in resource limited settings. *Malaria Journal*, *15*, 88. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1158-0>
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., ... Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, *55*(4), 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Bustíos Romaní, C. (2014). *La Malaria y el Dengue en la Historia de la Salud Pública Peruana: 1821-2011* (1st ed.). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Retrieved from <http://historia-de-la-salud-en-el-peru.webnode.es/news/la-malaria-y-el-dengue-en-la-historia-de-la-salud-publica-peruana-1821-20112/>

- Chapillequen, F. (2017, 29 abril). Situación epidemiológica de la Malaria en el Perú, a la SE 17 – 2017. *Boletín Epidemiológico Del Peru*, 26(17), 551–554.
- Demas, A., Oberstaller, J., DeBarry, J., Lucchi, N. W., Srinivasamoorthy, G., Sumari, D., ... Kissinger, J. C. (2011). Applied genomics: data mining reveals species-specific malaria diagnostic targets more sensitive than 18S rRNA. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(7), 2411–2418. <https://doi.org/10.1128/JCM.02603-10>
- Didenko, V. V. (2001). DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications. *BioTechniques*, 31(5), 1106–1116, 1118, 1120–1121.
- Dirección General de Epidemiología. (2017). Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Metaxenicas. Retrieved September 11, 2017, from http://www.dge.gob.pe/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=613&Itemid=397
- Dragan, A. I., Pavlovic, R., McGivney, J. B., Casas-Finet, J. R., Bishop, E. S., Strouse, R. J., ... Geddes, C. D. (2012). SYBR Green I: Fluorescence Properties and Interaction with DNA. *Journal of Fluorescence*, 22(4), 1189–1199. <https://doi.org/10.1007/s10895-012-1059-8>
- Ferreira, I. D., do Rosário, V. E., & Cravo, P. V. (2006). Real-time quantitative PCR with SYBR Green I detection for estimating copy numbers of nine drug resistance candidate genes in Plasmodium falciparum. *Malaria Journal*, 5, 1. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-5-1>
- Forootan, A., Sjöback, R., Björkman, J., Sjögreen, B., Linz, L., & Kubista, M. (2017). Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-

- time PCR (qPCR). *Biomolecular Detection and Quantification*, 12, 1–6.
<https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.04.001>
- Förster, T. (1948). Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen Der Physik*, 437(1–2), 55–75. <https://doi.org/10.1002/andp.19484370105>
 - Invitrogen. (2013). *TA Cloning KIT User Guide*.
 - Lakowicz, J.R. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (3ra ed.). Springer.
 Retrieved from <http://www.springer.com/gp/book/9780387312781>
 - Lefever, S., Hellemans, J., Pattyn, F., Przybylski, D. R., Taylor, C., Geurts, R., ...Vandesompele, J. (2009). RDML: structured language and reporting guidelines for real-time quantitative PCR data. *Nucleic Acids Research*, 37(7), 2065–2069.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkp056>
 - Liu, Y., Cai, X., Zhang, X., Gao, Q., Yang, X., Zheng, Z., ... Huang, X. (2006). Real time PCR using TaqMan and SYBR Green for detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. *Journal of Microbiological Methods*, 65(1), 21–31.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.06.007>
 - Lucchi, N. W., Narayanan, J., Karell, M. A., Xayavong, M., Kariuki, S., DaSilva, A. J., ... Udhayakumar, V. (2013). Molecular diagnosis of malaria by photo-induced electron transfer fluorogenic primers: PET-PCR. *PloS One*, 8(2), e56677.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056677>
 - Mangold, K. A., Manson, R. U., Koay, E. S. C., Stephens, L., Regner, M., Thomson, R. B.,... Kaul, K. L. (2005). Real-Time PCR for Detection and Identification of *Plasmodium* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(5), 2435–2440.
<https://doi.org/10.1128/JCM.43.5.2435-2440.2005>

- Mateo, S. (2013, June). ¿Re-emergencia de la malaria en el Perú? Reflexiones sobre el control de la Malaria. *Boletín Epidemiológico (Lima)*, 22(22), 474–475.
- Ministerio de Salud y Protección Social. (2015). *Manual para el Diagnóstico de Malaria no complicada en puestos de diagnóstico y tratamiento* (1a ed.). Bogotá, Colombia: Milenio Editores. Retrieved from <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Red-Nacional-Laboratorios/Documentos%20de%20inters%20SRNL/Manual%20para%20el%20%20Diagnostico%20de%20Malaria%20no%20complicada%20en%20puestos%20de%20diagn%C3%B3stico%20y%20tratamiento%20%20ISBN%202015.pdf>
- MINSA. RESOLUCIÓN MINISTERIAL N° 244-2017/MINSA (2017).
- MINSA. (2018, December 20). Reporte epidemiológico de la Malaria en el Peru - Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades. Retrieved December 20, 2018, from http://www.dge.gob.pe/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=14&Itemid=154
- MINSA, & Dirección General de Epidemiología. (2017). *Reporte de Malaria en el Peru*. MINSA, & INS. (2003). *Manual de Procedimientos de Laboratorio para el Diagnóstico de Malaria*. Lima.
- Muhamad, P., Chaijaroenkul, W., Congpuong, K., & Na-Bangchang, K. (2011). SYBR Green I and Taqman Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Methods for the Determination of Amplification of Plasmodium falciparum Multidrug Resistance-1 Gene (PFMDR1). *Journal of Parasitology*, 97(5), 939–942.

<https://doi.org/10.1645/GE-2792.1>

- Nagy, A., Vitásková, E., Černíková, L., Křivda, V., Jiřincová, H., Sedlák, K., ... Havlíčková, M. (2017). Evaluation of TaqMan qPCR System Integrating Two Identically Labelled Hydrolysis Probes in Single Assay. *Scientific Reports*, 7. <https://doi.org/10.1038/srep41392>
- Omega. (2017). *Blood DNA Mini Kit Guide User*. Retrieved from <http://omegabiotek.com/store/wp-content/uploads/2013/04/D3392-Blood-DNA-Mini-Kit-BL-Combo-Jan-2017-Online.pdf>
- OMS. (2017a, August 1). Enfermedades tropicales. Retrieved August 2, 2017, from http://www.who.int/topics/tropical_diseases/es/
- OMS. (2017b, August 1). Paludismo. Retrieved August 2, 2017, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/es/>
- OMS. (2017c, August 6). Estrategia Técnica Mundial contra la Malaria 2016-2030. Retrieved August 7, 2017, from http://www.who.int/malaria/areas/global_technical_strategy/es/
- Snounou, G., & Singh, B. (2002). Nested PCR analysis of Plasmodium parasites. *Methods in Molecular Medicine*, 72, 189–203. <https://doi.org/10.1385/1-59259-271-6:189>
- Svec, D., Tichopad, A., Novosadova, V., Pfaffl, M. W., & Kubista, M. (2015). How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomolecular Detection and Quantification*, 3, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2015.01.005>
- ThermoFisher Scientific. (2018, February 4). Real-Time PCR: Understanding Ct.

- Retrieved April 2, 2018, from <https://www.thermofisher.com/ht/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-pcr-understanding-ct.html>
- United Nations. (2017, August 6). Sustainable Development Goals: 17 Goals to Transform Our World. Retrieved August 7, 2017, from <http://www.un.org/sustainabledevelopment/>
 - WHO. (2015). *AIM 2016-2030 — Roll Back Malaria*. Retrieved from <http://www.rollbackmalaria.org/about-rbm/aim-2016-2030>
 - WHO. (2016). *World Malaria Report*.
 - WHO. (2017a, August 1). Enfermedades infecciosas. Retrieved August 2, 2017, from http://www.who.int/topics/infectious_diseases/es/
 - WHO. (2017b, August 3). Control and elimination of Plasmodium vivax malaria – A technical brief. Retrieved August 4, 2017, from <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241509244/en/>
 - WHO. (2018). WHO | World malaria report 2018. Retrieved December 20, 2018, from <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2018/report/en/>
 - Wongsrichanalai, C., Barcus, M. J., Muth, S., Sutamihardja, A., & Wernsdorfer, W. H. (2007). A review of malaria diagnostic tools: microscopy and rapid diagnostic test (RDT). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 77(6 Suppl), 119–127.
 - World Health Organization. (2017). *A framework for malaria elimination*. Geneva.