



**UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA**

**FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA
“ALBERTO CAZORLA TALLERÍ”**

**ESTANDARIZACIÓN DE UNA PCR MULTIPLEX EN TIEMPO REAL
PARA EL DIAGNÓSTICO DE LEPTOSPIROSIS Y MALARIA.**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA

AUTOR:

Katherine Lozano Untiveros

ASESOR:

Dra. Patricia Sheen Cortavarria

CO-ASESOR:

Dr. Jorge Odon Alarcon Villaverde

LIMA - PERÚ

2023

La presente tesis se realizó en el marco del proyecto “Desarrollo de Plataformas para el Diagnóstico y Vigilancia Molecular de Infecciones que cursan con Síndrome Febril y Síndrome Diarreico Agudos, el cual se encuentra financiado por el FONDECYT y se desarrolló en colaboración con el Centro de Investigaciones Tecnológicas, Biomédicas y Medioambientales (CITBM) de la UNMSM, y el Instituto Nacional de Salud (INS).

Entidad de ejecución: Centro de Investigaciones Tecnológicas, Biomédicas y Medioambientales (CITBM-UNMSM). Laboratorio de Epidemiología Molecular y Genética (LEMyG).

DEDICATORIA

La presente investigación está dedicada para mi hija Dandara Caterina que desde mi vientre representa algo sui géneris para entender la vida desde una perspectiva diferente y para mi novio Cesar Torrejon Iliquin por su amor, y paciencia.

Para mi abuelo Salomón Untiveros Herrera, que estará siempre en mi mente y corazón.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigaciones Tecnológicas, Biomédicas y Medioambientales (CITBM-UNMSM)), Laboratorio de Epidemiología Molecular y Genética (LEMyG) bajo la dirección del Dr. Jorge Odon Alarcon Villaverde, donde se desarrolló la presente tesis de investigación.

A mi asesora de Tesis, Dra. Patricia Sheen Cortavarría por las enseñanzas, amistad brindada y ser un ejemplo de profesionalismo, y motivación para la formación de mujeres científicas en nuestro país.

Estandarización de una PCR Multiplex en Tiempo Real para el Diagnóstico de Leptospirosis y Malaria

INFORME DE ORIGINALIDAD



FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.unp.edu.pe Fuente de Internet	1%
2	patents.google.com Fuente de Internet	1%
3	hdl.handle.net Fuente de Internet	<1%
4	www.jove.com Fuente de Internet	<1%
5	Jose Matta-Chuquisapon, Esther Valencia-Bazalar, Carlos Sevilla-Andrade, Helí Jaime Barrón-Pastor. "Filogenia y resistencia de cepas de Escherichia coli productoras de betalactamasas de espectro extendido a los antibióticos en pacientes con cáncer hospitalizados en Perú", Biomédica, 2022 Publicación	<1%
6	goadmin.ifrc.org Fuente de Internet	<1%

INDICE DE CONTENIDOS

1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	MARCO TEÓRICO	3
2.1	Malaria <i>vivax</i> y malaria <i>facilparum</i>	3
2.2	Leptospirosis	5
3.	ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN	6
4.	IMPORTANCIA DEL ESTUDIO	7
5.	HIPOTESIS / OBJETIVOS	9
5.1	HIPOTESIS	9
5.2	OBJETIVOS	9
-	Objetivo general	9
-	Objetivos específicos	9
6.	MATERIALES Y MÉTODOS	10
6.1	Obtención de controles de <i>Plasmodium falciparum</i> , <i>Plasmodium vivax</i> y <i>Leptospira spp.</i>	10
6.2	Extracción de ADN	13
6.3	Diseño de los cebadores y sondas específicas	13
6.4	Protocolo de optimización del qPCR-Monoplex y qPCR-Multiplex	16
6.5	Sensibilidad analítica y límite de detección (LOD)	17
6.6	Repetibilidad y Robustez	18
7.	RESULTADOS	19
7.1	Evaluación de los nucleótidos y análisis de especificidad	19
7.2	Optimización de parámetros analíticos	23
7.3	Sensibilidad de detección de qPCR- Monoplex y qPCR- Multiplex	25
7.4	Sensibilidad analítica	33
7.5	Repetibilidad y Robustez	37
7.6	Límite de detección (LOD)	38
8.	DISCUSION	40
9.	ESTUDIOS FUTUROS	43
10.	CONCLUSIONES	44
11.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	45
12.	ANEXOS	48

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Controles positivos de ADNg de Pfr364 y Pvr47 de *P.falciparum*(Pf) y *P.vivax*(Pv) usando PCR convencional : Gel de agarosa al 3% de amplicones de Pfr364 de 200pb y Pvr47 de 130pb. 100 pb, marcador molecular de 100 pares de bases..... 19
- Figura 2.** Controles positivos de ADNg de los genes LipL32 y Rrs a partir de cepas de *Leptospira interrogans* usando PCR convencional: Gel de agarosa al 3% de amplicones de LipL32 de 170 pb y de Rrs de 158pb. LIc, *L.interrogans* (Serogrupo canicola). LIs, *L. interrogans* (Serogrupo Sejroe). 100pb, marcador molecular de cien pares de bases. C+, control positivo del Kit de amplificación de Ultra Pure TaqPCR Mix. 20
- Figura 3.** Amplificación de ADNg de controles negativos para malaria y leptospirosis. CP: Control positivo. CE: control de especificidad. Fluoroforos: HEX, Cy5 y ROX. Pf: *P.falciparum*. Pv: *P. vivax*. Lepto: *Leptospira spp.*..... 22
- Figura 4.** Gradiente de temperaturas de hibridación desde 55 a 63 °C analizado por picos de fusión de amplicones de Pfr364 para *P. falciparum* (Pf), Pvr47 para *P. vivax* (Pv) y Rrs para *Leptospira spp.* (Ls) usando HRM- qPCR..... 24
- Figura 5.** Picos de fusión de amplicones del gen *Rrs* para *Leptospira spp.* (a: curva verde), Pvr47 para *P. vivax* (b: curva púrpura) y Pfr364 para *P. falciparum* (c: curva naranja) usando qPCR-HRM a 56 ° C de temperatura de hibridación. 25
- Figura 6.** Productos de amplificación del qPCR-Monoplex y qPCR- Duplex para *Leptospira spp.* (genes de amplificación: Rrs y LipL32) y *P. vivax* (Secuencia de amplificación: Pvr47) analizado por electroforesis de gel de agarosa al 3%. Gráfica inferior muestra las curvas de amplificación del qPCR-Duplex amplificando LipL32 y Pvr47. M: marcador de 100 pb, donde la última banda brillante corresponde al tamaño de 100 pb. 27
- Figura 7.** Curvas de amplificación usando qPCR-Duplex para las siguientes combinaciones de dianas moleculares: A) qPCR-Duplex para *Rrs* (*Leptospira spp.*) y Pvr47(*P. vivax*). B) qPCR-Dúplex para *Rrs* y Pfr364 (*P. falciparum*). C) qPCR-Dúplex para Pfr364 y Pvr47. *Leptospira spp* (Ls, curvas verdes), *Plasmodium vivax* (Pv, curvas moradas) y *P. falciparum* (Pf, curvas naranjas). RFU: Relative Fluorescence Units. 28
- Figura 8.** Optimización de concentraciones finales de cebadores y sonda para el formato “qPCR-Multiplex FVL” para la detección de *Leptospira spp.* (L), *P. vivax* (Pv) y *P. falciparum* (Pf) en varias concentraciones de cebadores visualizado en gel de agarosa al 3%. PF: Primer forward. PR: Primer reverse. **I:** 0.6 nM (PF y PR de *Leptospira spp.*), 0.4 nM (PF y PR de *P.vivax*), y 0.4 nM (PF y PR de *P.falciparum*) . **II:** 0,4 nM (PF y PR de *Leptospira spp.*), 0,4 nM (PF y PR de *P.vivax*) y 0,4 nM (PF y PR de *P.falciparum*). **III:** 0.2nM (PF y PR de *Leptospira spp.*), 0.4 nM (PF y PR de *P.vivax*) y 0.4 nM (PF y PR de *P.falciparum*). Las concentraciones de ADN

purificado de *P. falciparum* y *P. vivax* se mantuvieron constantes , mientras que el ADN de *Leptospira* fue diluido en el orden de 1/10 correspondiendo a las diluciones de 10^{-6} a 10^{-9} (a hacia d) de izquierda a derecha para la amplificación de *Leptospira*..... 30

Figura 9. Curvas de amplificación del “qPCR-Multiplex FVL” de *Leptospira* spp. (L), *P. vivax* (Pv) y *P. falciparum*(Pf). El gráfico insertado muestra los amplicones para el qPCR múltiple en un gel de agarosa al 3% donde la primera columna representa el marcador de 50 pb, la segunda y la tercera columna se usaron diferentes concentraciones de ADN template representando diferentes concentraciones de controles positivos, con las tres dianas moleculares (Pfr364, Pvr47, Rrs) amplificados en una sola reacción. 31

Figura 10. Curvas de amplificación usando qPCR-Monoplex(a) y qPCR-Multiplex FVL (b) para Rrs. (curvas verdes), Pvr47(curvas moradas) y Pfr364 (curvas naranjas). 32

Figura 11. Curvas de amplificación para *Rrs* (A), Pvr47 (B) y Pfr364 (C) usando la plataforma “qPCR-Multiplex FVL”. Cada curva de amplificación corresponde a la dilución de amplicones de ADN de 10^{-5} a 10^{-8} (a hacia d). Se realizaron tres réplicas por punto de dilución, representadas por las curvas superpuestas para cada dilución. Lepto: *Leptospira* spp. Pv: *P. vivax*. Pf: *P. falciparum*. 34

Figura 12. Curva estándar de Pfr364 (ROX), Pvr47 (Cy5) y Rrs (HEX). Análisis de regresión lineal usando las plataformas qPCR-Monoplex (A) y qPCR-Multiplex FVL (B). Eficiencia de la amplificación(E) y Coeficiente de determinación (R^2) fueron obtenidos de la regresión lineal de cada gen. 35

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Dianas moleculares para la amplificación de <i>P.falciparum</i> , <i>P.vivax</i> y <i>Leptospira</i> spp., para el desarrollo de la plataforma “qPCR-Multiplex FVL”.....	10
Tabla 2. Microorganismos usados en la presente investigación	12
Tabla 3. Cebadores usados en la plataforma “qPCR-Multiplex FVL”.....	15
Tabla 4. Sondas usadas en la plataforma “qPCR-Multiplex FVL”.....	15
Tabla 5. Límite de detección (LOD) amplificado por qPCR-Monoplex para los genes <i>Rrs</i> y <i>LipL32</i> de identificación de <i>Leptospira</i> spp.	26
Tabla 6. Valores de <i>C_q</i> comparativo usando “qPCR-Multiplex FVL” y qPCR-Monoplex	36
Tabla 7. Ensayo de repetibilidad para el “qPCR-Multiplex FVL”.	37
Tabla 8. Límite de detección (LOD) por diana molecular usando el “qPCR-Multiplex FVL”...	39

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

SFA	:	Síndrome Febril Agudo
PCR	:	Reacción en Cadena de la Polimerasa
qPCR	:	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
PCR Nested	:	PCR anidado
MAT	:	Test de micro aglutinación
ADN	:	Ácido desoxirribonucleico
ADNdc	:	Ácido desoxirribonucleico de doble cadena
ARN	:	Ácido ribonucleico
rARN	:	Ácido ribonucleico ribosomal
NCBI	:	Centro Nacional de Información Biotecnológica
GENBANK	:	Banco de Genes
BLAST	:	Herramienta básica de búsqueda de alineación local
Cq	:	Ciclo de cuantificación
NTC	:	Control sin el blanco molecular de interés
NT	:	Control negativo
LOD	:	Límite de detección
Tm	:	Temperatura de Fusión
Ta	:	Temperatura de Hibridación o anillamiento
CDC	:	Centros de Control y Prevención de Enfermedades
RDT	:	Prueba de diagnóstico rápido
PDB	:	Banco de datos de proteínas
INS	:	Instituto Nacional de Salud
CITBM	:	Centro de Investigaciones Tecnológicas, Biomédicas y Medioambientales
UNMSM	:	Universidad Nacional Mayor de San Marcos
OMS	:	Organización Mundial de la Salud
WOAH	:	Organización Mundial de Salud Animal
qPCR-Multiplex FVL	:	PCR Multiplex en tiempo real de detección simultanea de <i>P.falci-parum</i> (F), <i>P.vivax</i> (V) y <i>Leptospira</i> (L).
RFU	:	Unidades de fluorescencia relativa

RESUMEN

Varias de las enfermedades con etiología infecciosa causada por una variedad de patógenos cursan inicialmente con síndrome febril agudo (SFA) y han sido reconocidos como un grupo importante de enfermedades que es difícil de diferenciar debido a su similitud en los síntomas. Los SFA como malaria producida por *P. falciparum*, malaria producida por *P. vivax* y leptospirosis deben ser consideradas como sospecha principal en áreas tropicales debido a la alta prevalencia y mortalidad. Los índices de letalidad debido a la falta de un diagnóstico oportuno son altos entre los pacientes con malaria por *P. falciparum* y leptospirosis. Se han reportado problemas en el diagnóstico de malaria debido al desarrollo de infecciones con bajo nivel de parasitemia. Además, se ha reportado problemas en la detección de infecciones mixtas de malaria y no detección de coinfecciones de malaria y leptospirosis. Así, la OMS ha recomendado el desarrollo de un método qPCR-Multiplex para identificar simultáneamente y en una sola reacción diferentes patógenos.

La presente investigación, diseñó y estandarizó una PCR Multiplex en tiempo real denominado “qPCR-Multiplex FVL”, capaz de identificar simultáneamente *P.falciparum*, *P.vivax* y *Leptospira spp.* Se diseñaron cebadores y sondas para identificar simultáneamente infecciones con bajo nivel de parasitemia usando secuencias subteloméricas de múltiples copias, Pfr364 para *P.falciparum*, Pvr47 para *P.vivax* y el gen *Rrs* (16S ARNr) para identificar *Leptospira spp.*

El “qPCR-Multiplex FVL” amplificó simultáneamente con éxito las tres dianas Pfr364, Pvr47 y *Rrs*, manteniendo su eficiencia de amplificación a pesar del formato de multiplexación. El análisis de regresión con la construcción de curvas estándares mostró valores de eficiencia de amplificación de 93 % para Pfr364, 106 % para Pvr47 y 103 % para *Rrs* con valores de $R^2 > 0,997$. Además, mostró un límite de detección altamente sensible adecuado para identificar niveles tan bajos como 0.46 copias de Pfr364 para *P.falciparum*, 0.06 copias de Pvr47 para *P.vivax* y 0.63 copias de *Rrs* para *Leptospira spp.* No se encontró reacción cruzada con otros microorganismos relacionados a ambos tipos de patógeno.

La presente investigación diseñó y desarrolló una plataforma de “qPCR-Multiplex FVL” eficaz para el diagnóstico de infecciones simples y coinfecciones de malaria y leptospirosis, con el potencial de identificar simultáneamente infecciones de baja densidad parasitaria.

Palabras clave: qPCR-Multiplex, Malaria, Leptospirosis, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Leptospira spp.*, Pfr364, Pvr47, *Rrs*.

ABSTRACT

Acute febrile illnesses such as *P.falciparum* Malaria, *P.vivax* Malaria, and Leptospirosis should be primarily suspected in tropical areas due to the high prevalence and high fatality rate. Case fatality ratios due to the lack of timely diagnosis are high among patients with *P.falciparum* Malaria and Leptospirosis. Additionally, *P.vivax* Malaria and *P.falciparum* Malaria diagnosis have been reported issues in identifying infections with low-level parasitemia. Furthermore, problems in the detection of mixed malaria infections and non-detection of malaria and leptospirosis coinfections have been reported. Therefore, the WHO has recommended the development of a qPCR-Multiplex method to simultaneously identify different pathogens in a single reaction.

In this study, we designed and developed a “Multiplex FVL qPCR” capable of concurrently identifying three targets: Pfr364, Pvr47, and *Rrs*. Primers and probes were designed to identify concurrently multicopy sequences Pfr364 for *P.falciparum*, and Pvr47 for *P.vivax* identification with low-level parasitemia, and *Rrs* (*16S rRNA*) for *Leptospira spp.* identification.

This “Multiplex FVL qPCR” assay successfully identified Pfr364, Pvr47, and *Rrs* concurrently, maintaining its effectiveness despite the multiplexing format. A regression analysis using the multiplex assay showed efficiency values of 93 % for Pfr364, 106 % for Pvr47, and 103 % for *Rrs* with R^2 values > 0.997 . Also, the Multiplex FVL qPCR assay successfully displayed a highly sensitive limit of detection, suitable for identifying levels as low as 0.46 copies of Pfr364, 0.06 copies of Pvr47, and 0.63 copies of *Rrs* for *P.falciparum*, *P.vivax*, and *Leptospira spp.*, respectively. Additionally, no cross-reaction was detected with another related microorganism.

This study presents a promising “Multiplex FVL qPCR” platform for the diagnosis of single and coinfections of malaria and leptospirosis, with the potential to identify concurrently low-density parasites.

Keywords: Multiplex qPCR, Malaria, Leptospirosis, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Leptospira spp.*, Pfr364, Pvr47, *Rrs*.

1. INTRODUCCIÓN

Varias de las enfermedades con etiología infecciosa cursan inicialmente con síndrome febril agudo (SFA) particularmente en los trópicos. El SFA ha sido reconocido como un grupo importante de enfermedades que es difícil de diferenciar debido a su similitud en los síntomas [1]. Entre las más letales se cita etiologías parasitarias como malaria, y bacterianas como leptospirosis, con altas tasas de mortalidad por la severidad de la enfermedad asociado a la ausencia de diagnóstico; viéndose exacerbado durante la pandemia de COVID-19 [2, 3].

En las Américas; Brasil, Colombia, Venezuela y Perú son consideradas áreas endémicas de malaria, particularmente en la selva amazónica donde el parásito más prevalente es *Plasmodium vivax*, seguido por *Plasmodium falciparum*[4]. La infección por *P. falciparum* (malaria *falciparum*), *P. vivax* (malaria *vivax*) y *Leptospira spp.* patogénicas(leptospirosis), puede causar la muerte sin un diagnóstico y tratamiento oportuno [2, 4].

Para el control de la malaria, la identificación correcta de la especie es fundamental para garantizar un tratamiento adecuado. Para leptospirosis, aunque es una enfermedad que se puede tratar fácilmente con antibióticos, en ausencia de tratamiento, la mortalidad está asociado a daño renal, meningitis, insuficiencia hepática, y dificultad respiratoria [2, 5]. En dicho contexto, el diagnóstico oportuno y el tratamiento adecuado son esenciales para reducir la mortalidad, especialmente en malaria *falciparum* y leptospirosis.

Para diagnosticar malaria, la microscopía óptica y las pruebas rápidas de diagnóstico de antígenos (RDT) son las más usadas en el punto de atención al paciente según el reporte mundial de malaria del 2021[6]; sin embargo, dichos métodos de diagnóstico no pueden detectar de manera confiable las infecciones de baja densidad. Adicionalmente, todas las RDTs positivas deben ser seguidas por microscopía para determinar la especie de *Plasmodium* para determinar el tipo de tratamiento. Frente a dichos inconvenientes una amplia variedad de pruebas moleculares de detección por PCR convencional y PCR en tiempo real (qPCR) han reportado mejores resultados de sensibilidad comparados con microscopia y las RDTs[7–11]. Sin embargo, se ha reportado problemas de diagnóstico para identificar infecciones mixtas de malaria con bajo nivel de parasitemia por qPCR usando el gen ribosomal *18S* [9, 12]. Así, para aumentar la sensibilidad en la detección de

infecciones de bajo nivel de parasitemia en malaria, los esfuerzos se han centrado en utilizar nuevas dianas moleculares no ribosómicas como las secuencias Pfr364 y Pvr47 de copias múltiples con gran potencial en la detección ultra sensible para malaria[12, 13].

Para leptospirosis las pruebas de diagnóstico serológicas como la prueba de aglutinación microscópica serológica (MAT) confirman la enfermedad en una fase tardía. Sin embargo, aunque el MAT sigue siendo el "estándar de oro" en el diagnóstico de leptospirosis, este método adolece de sensibilidad y requiere una experiencia considerable [5].

Adicional a las brechas a superar en el diagnóstico de ambas etiologías, en el 2021 se realizó un meta análisis donde se reportó la prevalencia de coinfección por malaria y leptospirosis en pacientes febriles con desarrollo de una sepsis severa[14]. En América del Sur la prevalencia de coinfección ha sido pobremente estudiada y fue reportada recientemente solo en Venezuela[15] por lo que requiere urgentemente ser investigada.

Por otro lado, en 2017 un importante estudio en la región Loreto en Perú, confirmó la prevalencia de malaria *vivax* y malaria *falciparum* con muy bajo nivel de parasitemia en individuos asintomáticos[16]. La ausencia de síntomas evita la administración de tratamiento y los convierte en potenciales reservorios de *Plasmodium*. En este escenario resulta urgente el desarrollo de una prueba molecular altamente sensible que apunte a la detección de infecciones de baja parasitemia en malaria y leptospirosis.

Por lo tanto, la introducción de nuevos métodos de diagnóstico molecular que apunten a la detección múltiple y simultánea para el tratamiento de emergencia y control de diferentes enfermedades infecciosas tropicales se incluye en las prioridades de la OMS[6]. En tal sentido, uno de los métodos altamente sensibles y utilizados recientemente para la identificación simultánea de múltiples patógenos incluye el uso de plataformas qPCR-Multiplex que tienen como objetivo la detección simultánea de varias dianas moleculares en una sola reacción. Así, el presente estudio diseñó cebadores usando dianas moleculares promisorias de naturaleza subtelomérica y de múltiples copias por genoma usando una plataforma de qPCR múltiple en tiempo real llamado "qPCR-Multiplex FVL".

La presente investigación diseñó y estandarizó la plataforma "qPCR-Multiplex FVL" para la detección simultánea de tres blancos moleculares; dos del tipo multicopia no ribosómicos, Pfr364

para *P. falciparum*, Pvr47 para *P. vivax*, y un ribosómico, *Rrs* para el diagnóstico de *Leptospira spp.* La estandarización de la plataforma “qPCR-Multiplex FVL” determinó la eficiencia de amplificación y el límite de detección de cada gen con el potencial de identificar simultáneamente infecciones de baja densidad parasitaria de malaria *falciparum*, malaria *vivax* y leptospirosis.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Malaria *vivax* y malaria *falciparum*

Malaria es causada por una infección con *Plasmodium*, un parásito intracelular que infecta glóbulos rojos y células del hígado en humanos. Existen 5 tipos de especies de *Plasmodium* que causan malaria en humanos, incluyendo *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium ovale*, y *Plasmodium malariae*, de las cuales la infección producida por *P.falciparum* es mortal. Para el 2021, se informó que *P. falciparum* era el parásito más generalizado en África, el sudeste de Asia, el mediterráneo oriental y la región del pacífico occidental. *P. vivax* es menos agresiva; pero puede establecer un estado crónico de infección en el hígado siendo el agente causal de malaria de mayor distribución en el mundo, y las otras especies tales como *P.knowlesi*, *P.ovale*, y *P.malariae* son menos frecuentes [4, 17].

En las Américas, existen áreas endémicas de malaria, particularmente en la selva amazónica de Brasil, Colombia, Venezuela y Perú, donde el parásito más prevalente es *P.vivax*, seguido por *P. falciparum*[4]. La infección por *P.falciparum* puede causar la muerte y requiere un diagnóstico oportuno y una intervención de emergencia. En Perú, en el periodo 2022, el Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades reportó la incidencia acumulada (I.A.) por 100 mil habitantes para malaria *falciparum* y malaria *vivax*; alcanzando 12.12 y 66.09, respectivamente[18]. Siendo que para el periodo 2022 hasta la semana epidemiológica 50, la región de Loreto notifica el 83.80% (21 807) de los casos de malaria del país.

La identificación y diagnóstico correcto de la especie de *Plasmodium* son críticos para asegurar un apropiado curso de la terapia contra malaria. El examen microscópico de sangre total sigue siendo el "estándar de oro" para la confirmación de laboratorio de malaria. Sin embargo, la sensibilidad

y especificidad de dicha metodología son dependientes de la habilidad del personal y comparados con los métodos de diagnóstico molecular la sensibilidad es ampliamente superada[19]. Así en áreas en donde malaria no es endémica, es altamente desafiante mantener un experto debido a que el científico de laboratorio promedio no realiza esta prueba con regularidad. Por otro lado, pruebas de diagnóstico alternativas conocidas como las RDTs están siendo usadas en zonas endémicas para el diagnóstico de malaria en el punto de atención al paciente. Las RDTs validadas y disponibles en el mercado hasta el 2022, detectan 2 antígenos de malaria diferentes; uno es específico para *P. falciparum* y el otro se encuentra en las 4 especies de malaria[17]. Sin embargo, todas las RDTs positivas deben ser seguidas por microscopía para determinar la especie de malaria y cuantificar la proporción de glóbulos rojos infectados, que son dos indicadores de pronóstico importantes [4, 6]. Adicionalmente, entre septiembre de 2020 y septiembre de 2021, en 13 países donde la malaria es endémica, se reportaron supresiones de los genes *pfhrp2* y *pfhrp3* y que fueron indetectables por estas pruebas disminuyendo la sensibilidad de las RDTs en pacientes infectados por parásitos de malaria que contienen dicha mutación [17, 20]. Además hasta la actualidad según el reporte del 2022 de la WHO no existe RDTs validadas que puedan distinguir entre *P.falciparum* y *P.vivax*[17]. En general cabe resaltar que tanto la microscopía óptica y las RDTs no pueden detectar de manera confiable las infecciones de baja densidad de *Plasmodium* y han sido ampliamente superados en sensibilidad por qPCR [12, 17, 21] .

El blanco molecular más común utilizado para el diagnóstico molecular(PCR/ qPCR) de malaria desde 1993 ha sido el gen *18S* [7, 8] . Sin embargo, la búsqueda de nuevos blancos moleculares más sensibles están siendo explorados y probados debido al reporte de problemas de sensibilidad usando el gen *18S*, con el objetivo de identificar infecciones con bajo nivel de parasitemia, característico de infecciones por *P.vivax* [9, 12, 13]. Por tanto, los esfuerzos se han centrado en utilizar nuevas dianas moleculares no ribosómicos de naturaleza multicopia para la detección altamente sensible de infecciones de baja densidad e infecciones mixtas de malaria[12]. Así, dianas moleculares de tipo no ribosómico como Pfr364 presente en 41 copias por genoma de *P.falciparum* y Pvr47 presente en 14 copias por genoma de *P.vivax* son blancos prometedores para aumentar la sensibilidad, al ser secuencias de múltiples copias [12, 13] .

2.2 Leptospirosis

Leptospirosis es una enfermedad zoonótica causada por espiroquetas del género *Leptospira*. La leptospirosis es considerada una de las principales enfermedades infecciosas desatendidas debido a la subestimación de los casos reales, siendo considerada una infección emergente transmitida entre animales y humanos con alta incidencia en climas tropicales [2, 5]. Presenta características clínicas similares en comparación con otras enfermedades infecciosas tropicales comunes tales como malaria, dengue, fiebres entéricas e infecciones por rickettsiosis, que pueden explicar esta subestimación [1, 22]. Aunque la leptospirosis se trata fácilmente con antibióticos, la mortalidad por falta de diagnóstico temprano es un problema de salud importante en los países en desarrollo. En los últimos años se ha convertido en un serio problema, particularmente en la Amazonía, y su incremento puede ser debido a las determinantes ambientales persistentes como fuertes estaciones de lluvia e inundaciones correlacionadas con brotes repentinos de la bacteria. En Perú, en el periodo 2022 hasta la semana epidemiológica 50, el Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades reportó la incidencia acumulada (I.A.) de 214.28 por 100 mil habitantes para leptospirosis; siendo la región de Madre de Dios la que presentó el I.A. más alto en Perú [18].

Así, en ausencia de tratamiento, la mortalidad por leptospirosis está asociada al daño renal, meningitis, insuficiencia hepática, y dificultad respiratoria [10, 22].

Los métodos de diagnóstico de leptospirosis recomendados por la CDC, incluyen (i) las pruebas de diagnóstico de apoyo tales como las pruebas serológicas comerciales basadas en IgM (ELISA IgM, InmunoDot y Lateral Flow Test), (ii) las pruebas de diagnóstico confirmatorias tales como la prueba de aglutinación microscópica serológica (MAT) y (iii) pruebas moleculares como PCR/ qPCR [3, 22]. Las pruebas serológicas IgM con resultados negativos a partir de muestras recogidas en la primera semana de enfermedad, no descartan la enfermedad por lo que los resultados deben confirmarse usando uno de los métodos de diagnóstico confirmatorios tales como PCR/ qPCR [10, 23] y MAT. Las pruebas moleculares de PCR confirman la enfermedad en la fase aguda de la infección y la prueba del MAT para detección de anticuerpos, confirman la enfermedad en una fase tardía, 5 a 14 días después del inicio de la enfermedad. En este escenario, aunque la prueba del MAT para

leptospirosis sigue siendo el "estándar de oro" en el diagnóstico confirmatorio de leptospirosis, no es útil para ser aplicada para un diagnóstico temprano[22].

Así, para combatir la infección por leptospirosis es indispensable tratar la enfermedad en una fase aguda de la infección, por lo que las pruebas de diagnóstico confirmatorias como el PCR/ qPCR son las más idóneas considerando que las *Leptospiras* están presentes en la sangre los primeros 4 a 6 días de la enfermedad. La importancia en el tratamiento de la infección en la fase aguda requiere indispensablemente el uso de métodos de diagnóstico moleculares sensibles que podría permitir el desarrollo de pruebas rápidas innovadoras en un futuro próximo[24].

3. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

Actualmente, con el auge de la genómica existen diversos métodos de identificación molecular que ofrecen alternativas efectivas para la detección molecular de diferentes patógenos. Sin embargo, una amplia variedad de estas metodologías se restringen al diagnóstico por separado de cada enfermedad incluso en formatos múltiples de diagnóstico, para identificar las 5 especies de *Plasmodium* que producen malaria [7, 8, 11, 19, 25] y diferentes especies de *Leptospiras* patogénicas en leptospirosis[10, 23, 26, 27]. Como el tratamiento de malaria depende directamente del tipo de especie de *Plasmodium* es importante la identificación de la especie. Así, en 2004, uno de los primeros ensayos usando qPCR múltiple fue desarrollado por Rougemont y colaboradores, en donde fueron diseñado cebadores para detectar una región altamente conservada del gen *18S* ARNr para identificar 4 especies de *Plasmodium* [8]. Sin embargo, a pesar de su buen performance en la identificación de cada especie se reportó posteriormente problemas usando el gen *18S* para la detección de infecciones de baja densidad producidos por *P. vivax* y *P. falciparum* [9, 12]. Para superar dichos inconvenientes, uno de los métodos recientemente utilizados para la identificación múltiple y altamente sensible incluye el uso de plataformas qPCR-Multiplex que abarcan la identificación molecular usando genes y/o secuencias no ribosomales de múltiples copias en un genoma, que apunten a una detección altamente sensible de infecciones de baja densidad, infecciones mixtas en malaria y coinfecciones de malaria y leptospirosis [12, 13, 21].

Notablemente, cabe resaltar que en 2014, Waggoner y colaboradores desarrollaron una qPCR-Multiplex dirigida a la detección múltiple de Dengue, Malaria y Leptospirosis [28]. A fin de tener

una respuesta diagnóstica para turistas que retornaban de países en desarrollo Waggoner y colaboradores desarrollaron una prueba de amplificación de ácido nucleico usando genes ribosomales del tipo *18S* para identificar *Plasmodium spp.* y *16S* para identificar *Leptospira spp.* Desafortunadamente, dicha metodología no identifica a *P.vivax* uno de los parásitos más prevalente de América causante de malaria. Además no diferencia entre *P.vivax*, *P.ovale* y *P.malariae*.

4. IMPORTANCIA DEL ESTUDIO

Considerando su posición y ubicación geográfica, nuestro país tiene regiones tropicales y subtropicales en donde la incidencia y letalidad de malaria y leptospirosis es alta. La alta incidencia de infecciones mixtas de malaria con casos no diagnosticados debido a la baja parasitemia [16, 19], y falsos negativos debido a la baja sensibilidad de las pruebas actuales de diagnóstico representa un problema serio de salud pública en los países endémicos. Notablemente, en 2017 en un estudio realizado por Carrasco-Escobar y colaboradores confirmaron la prevalencia de malaria *vivax* y malaria *falciparum* con muy bajo nivel de parasitemia en individuos asintomáticos en la región Loreto en Perú [16]. La ausencia de síntomas, evita la administración de tratamiento y los convierte en potenciales reservorios de los parásitos de malaria. En dicho escenario para combatir una transmisión pasiva de malaria por personas asintomáticas, resulta urgente de establecer diagnósticos oportunos y aleatorios con metodologías moleculares de alta sensibilidad. Sumado a esto el reporte de desarrollo de enfermedades febriles severas [2] y sepsis severa debido a la coinfección de malaria *falciparum* y leptospirosis en pacientes que habitan áreas tropicales [29] empeora el escenario donde se necesitan acciones urgentes .

En dicho contexto es importante destacar que la coinfección de malaria y leptospirosis fue documentado principalmente en India, Tailandia, Camboya y Pakistán[14, 30]. En América del Sur hay una escasa o nula información de estudios de prevalencia de dicha coinfección y se debería dirigir estudios urgentemente[31]. Por ejemplo uno de los pocos datos de prevalencia de coinfección fue recientemente reportado la presencia de Leptospirosis en pacientes con Malaria en un área endémica del sur de Venezuela[15]. En consecuencia, el diagnóstico simultáneo de malaria y leptospirosis puede desempeñar un papel importante en la reducción de la gravedad de la enfermedad y duración del tratamiento. Por lo tanto, la introducción de nuevos métodos de

diagnóstico de qPCR-Multiplex como la “qPCR-Multiplex FVL” que apunten a una detección molecular altamente sensible con una eficiencia de amplificación que no se vea afectado por la multiplexación tienen el potencial de identificar simultáneamente infecciones de baja densidad parasitaria de malaria *falciparum*, malaria *vivax* y leptospirosis. Además, constituye una necesidad prioritaria tanto para tener un diagnóstico altamente sensible que oriente al manejo de (i) mono infecciones, (ii) infecciones mixtas de diferentes especies de *Plasmodium*, y (iii) coinfecciones de malaria y leptospirosis, dirigido hacia la detección temprana de brotes.

5. HIPOTESIS / OBJETIVOS

5.1 HIPOTESIS

La prueba molecular para el diagnóstico simultáneo de *P.falciparum*, *P.vivax* y *Leptospira spp.*, mediante el PCR en tiempo real múltiple (“qPCR-Multiplex FVL”) tienen una alta concordancia para la detección simultánea de las tres dianas moleculares en una sola reacción.

5.2 OBJETIVOS

- **Objetivo general**

- Estandarización de un “qPCR-Multiplex FVL” sensible para el diagnóstico simultáneo de *P. falciparum*, *P. vivax* y *Leptospira spp.*

- **Objetivos específicos**

- Optimizar las condiciones óptimas de qPCR-Multiplex para la identificación simultánea de malaria *falciparum* usando la secuencia Pfr364, malaria *vivax* usando la secuencia Pvr47 y leptospirosis evaluando los genes *LipL32*, y *Rrs*.
- Comparar los ciclos de cuantificación (Cq) en la amplificación de los genes individuales versus la amplificación simultánea de cada gen en una sola reacción.
- Determinar la eficiencia de las amplificaciones individuales de Pfr364, Pvr47 y *Rrs* usando qPCR-Monoplex versus el qPCR-Multiplex.
- Determinar el límite de detección del método de amplificación con los mejores Cqs.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Obtención de controles de *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* y *Leptospira spp.*

El ADN genómico (ADNg) de *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* y *Leptospira spp.*, fueron usados como controles positivos para la estandarización del qPCR múltiple. Los controles positivos para ambas etiologías fueron validados por las respectivas metodologías “estándar de oro” y fueron proporcionados por el Instituto Nacional de Salud (INS) de Perú. Adicional todos los controles positivos involucrados en la presente investigación fueron confirmados por PCR y qPCR en el Laboratorio de Epidemiología Molecular y Genética (LEMyG) del Centro de Investigaciones Tecnológicas, Biomédicas y Medioambientales (CITBM) de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Las dianas moleculares de tipo no ribosómico como Pfr364 presente en 41 copias por genoma de *P.falciparum* y Pvr47 presente en 14 copias por genoma de *P.vivax* fueron usados para el diagnóstico de malaria (Tabla 1) .

Tabla 1. Dianas moleculares para la amplificación de *P.falciparum*, *P.vivax* y *Leptospira spp.*, para el desarrollo de la plataforma “qPCR-Multiplex FVL”.

	Diana 1	Diana 2	Diana 3
Etiología	<i>Plasmodium falciparum</i> (F)	<i>Plasmodium vivax</i> (V)	<i>Leptospira spp.</i> (L)
Secuencia / Gen	Pfr364	Pvr47	<i>Rrs</i> (16S ARNr)
Naturaleza del gen y secuencias	Región SB2 subtelomérica repetitiva	Región subtelomérica repetitiva no codificante	ARN ribosomal codificante 16S (<i>Rrs</i>)
Número de copias por genoma	41 copias	14 copias	2 copias

Los antígenos y material genómico de *Leptospira spp.*, fueron proporcionados por el “Laboratorio de Referencia de Zoonosis Bacteriana” del INS. Como se muestra en detalle en la tabla 2, se obtuvieron tres cepas patógenas de *Leptospira spp.*, a partir de cultivo en medio base EMJH (BD, No Cat: 279410) más medio de enriquecimiento específico para leptospira (Difco Leptospira Enrichment EMJH) a 30 °C durante 7-9 días. A continuación, se analizó la presencia de la bacteria bajo microscopía de campo oscuro y se realizó un segundo subcultivo por siete días más hasta obtener 10⁷ células/ml. La presencia de la bacteria se confirmó mediante microscopía de campo oscuro y qPCR dirigida al gen ribosomal *Rrs*.

El ADNg de *P. vivax* y *P. falciparum* fueron proporcionados por el “Laboratorio de Referencia de Malaria” del INS. En resumen, el material genético fue validado previamente mediante microscopía (Gota Gruesa), PCR anidado y qPCR (*18S* ARNr) siendo validados como controles positivos del INS.

Para evaluar la especificidad analítica en el proceso de estandarización de la metodología “qPCR-Multiplex FVL”, se obtuvo ADNg de otros microorganismos tales como: *Plasmodium malariae*, *Trypanosoma cruzi*, *Trichomonas tenax*, *Leishmania spp.*, y *Escherichia coli.*, proporcionados por el Instituto de Medicina Tropical-UNMSM y la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco (Tabla 2). También se evaluó ADNg de 4 controles negativos que no involucren amplificación de malaria y leptospirosis proporcionados por el CITBM de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

De acuerdo al manual de procedimientos de la Universidad Peruana Cayetano Heredia y por sus características este proyecto con código SIDISI 103195 no requiere evaluación por el Comité Institucional de Ética en Humanos o en Animales.

Tabla 2. Microorganismos usados en la presente investigación

Patógenos	Cultivo células /ml	Microscopia (Gota Gruesa)	qPCR-16S ¹ (Cq)	Nested PCR/ qPCR ²	PCR	qPCR-Multiplex FVL (Cq)
<i>Plasmodium falciparum</i>	n.a.	+++	n.a.	Pos/ Pos	-	Positivo (12.13)
<i>Plasmodium vivax</i>	n.a.	++	n.a.	Pos/ Pos	-	Positivo (12.52)
<i>Plasmodium malariae</i> *	n.a.	++	n.a.	Pos(Pos)	-	Negativo
<i>Leptospira santarosai</i> (Sero. Hebdomadis)	10 ⁷	-	Positivo (25.32)	n.a.	Positivo ³	Positivo (17.33)
<i>Leptospira interrogans</i> (Sero. Canicola)	10 ⁷	-	Positivo (24.43)	n.a.	Positivo ³	Positivo (17.21)
<i>Leptospira interrogans</i> (Sero. Sejroe)	10 ⁷	-	Positivo (24.22)	n.a.	Positivo ³	Positivo (18.02)
<i>Trypanosoma cruzi</i> *	n.a.	n.a.	-	n.a.	Positivo	Negativo
<i>Trichomonas tenax</i> *	n.a.	n.a.	-	n.a.	Positivo	Negativo
<i>Escherichia coli</i> *	n.a.	n.a.	-	n.a.	Positivo	Negativo
<i>Leishmania spp.</i> *	n.a.	n.a.	-	n.a.	Positivo	Negativo

¹PCR dirigida al 16S ARNr para la identificación de Leptospirosis * Microorganismos utilizados para determinar la especificidad analítica. ²qPCR dirigida a la amplificación de regiones del gen 18S ARNr para la identificación de *P.falciparum*, *P.vivax*, y *P.malariae*. ³ PCR dirigida al gen *LipL32* para la identificación de Leptospiras patógenas. Sero. = serogrupo. n.a.= no aplicable. Positivo (Pos).

6.2 Extracción de ADN

El ADNg de las *Leptospiras* cultivadas y sangre total se extrajeron usando el kit de extracción de ADN gSYNC™ (Geneaid Taiwán, No Cat: GS300) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la extracción del ADNg de las cepas de la bacteria *Leptospira*, estas se cultivaron en medio base EMJH suplementado con un medio de enriquecimiento específico para leptospira (Difco *Leptospira enrichment*) hasta alcanzar 10^7 células por mililitro. Luego se tomó 1 mL de cada cepa en un tubo eppendorf y se centrifugaron a 5000 g durante 10 min y se descargó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 180 μ l de tampón de elución el cual se usó para el aislamiento de ADN. Dicha concentración bacteriana aseguró una lisis celular eficiente con una hora de incubación con 20 μ l de 65 mg de proteinasa K a 56°C. Para la extracción del ADNg de *P. falciparum* y *P. vivax*, se utilizaron muestras de sangre total almacenadas en tubos con EDTA para evitar la coagulación. El ADN extraído se almacenó a -20°C hasta su uso.

Posteriormente se preparó productos de PCR de cada gen (amplicones) a partir del ADNg de cada etiología por PCR convencional y se purificaron mediante columnas DFH. En resumen, para la producción de amplicones de ADN de los genes Pfr364, Pvr47 y *Rrs*, se utilizó el kit de PCR convencional utilizando una enzima TAQ polimerasa de alta fidelidad (Ultra Pure TaqPCR Mix, Geneaid. No Cat: UTM200) y los cebadores específicos de cada gen (Tabla 3). Paso seguido se verificó la producción de amplicones cuantificando el producto de PCR y verificando la calidad de los productos de PCR usando NanoDrop One/One. Seguidamente se purificó cada amplicón por separado usando el kit de purificación de productos de PCR (GenePHlow Gel/PCR Kit, Geneaid. No Cat. FC33506). Finalmente se verificó la concentración y calidad de producto de PCR purificado para su posterior uso (Anexo 3).

6.3 Diseño de los cebadores y sondas específicas

Todos los cebadores y las sondas marcadas con un fluoróforo y quencher (Tabla 3 y 4) se diseñaron utilizando el software Primer3, con excepción de los cebadores y la sonda de la secuencia Pfr364 que se fueron diseñados y validados previamente [28]. El diseño del “qPCR-Multiplex FVL” tiene como objetivo la detección simultánea de tres blancos moleculares para lo cual se utilizaron secuencias nucleotídicas anotadas disponibles en el GenBank. Todas las especificaciones para el

diseño de cebadores para plataformas qPCR-Multiplex fueron cubiertos siguiendo recomendaciones de artículos especializados[32]. Así, se tuvo especial cuidado para evitar la formación de heterodimeros, homodimeros, y estructuras hairpin. El análisis de la formación de dichas estructuras secundarias se realizó usando el software Beacon Designer (www.premierbiosoft.com/molecular_beacons/index.html).

Se utilizó en su mayoría secuencias nucleotídicas anotadas de América Latina, debido a la endemicidad de malaria y leptospirosis en los países que conforman dichas regiones. Los cebadores y las sondas para la detección de *P.falciparum* y *P.vivax* fueron diseñados a partir de las secuencias subteloméricas Pfr364 y Pvr47, respectivamente ambas con un gran potencial para identificar infecciones de baja densidad por parásitos de *P.falciparum* y *P.vivax* (Tabla 3 y 4) [12, 13]. Para *P.vivax*, las secuencias de Pvr47 se descargaron del GenBank y se alinearon utilizando el algoritmo ClustalW. A partir de los alineamientos múltiples, se obtuvo una serie de secuencias consenso de Pvr47 los cuales se usaron como plantilla para generar los cebadores y las sondas para el ensayo “qPCR-Multiplex FVL”, siendo elegidas los nucleótidos con mejor rendimiento. La sonda Pvr47 se marcó con el fluoróforo Cy5 con el Black Hole Quencher (BHQ). Posteriormente, se analizaron las secuencias de cebadores sugeridas para evitar la formación de estructuras secundarias entre ellas, cruciales para el ensayo qPCR-Multiplex. La sonda Pfr364 para *P.falciparum* contiene al fluoróforo ROX con un BHQ.

Para la identificación de *Leptospira spp.* patogénicas se seleccionó una región de consenso altamente conservado del gen *Rrs* que codifica el ARNr 16S. La región conservada del gen *Rrs* fue publicada previamente utilizándose 704 secuencias [33] y fue utilizada para el diseño de cebadores y sondas para la presente plataforma qPCR. La sonda para el gen *Rrs* se marcó con el fluoróforo HEX. Adicional para evaluar el mejor performance dentro de un sistema qPCR múltiple, se diseñó cebadores adicionales para la identificación de Leptospiras evaluándose una región patógena del gen de la proteína *LipL32* una importante lipoproteína de la membrana externa, obteniendo una región de consenso. Las secuencias de la proteína *LipL32* se obtuvieron del Protein Data Bank (PDB) y se alinearon 73 secuencias PDB usando el software ConSurf (<https://consurf.tau.ac.il/>). Las secuencias de *LipL32* se evaluaron de la misma forma que el gen *Rrs*, evitando la formación de estructuras secundarias entre todas las secuencias del ensayo múltiple. Análisis posteriores para los genes y secuencias que son parte de la plataforma “qPCR-

Multiplex FVL” fueron realizados usando qPCR evaluando el rendimiento de amplificación en sistema qPCR-Monoplex y qPCR-Multiplex.

Finalmente, se utilizó la herramienta básica de búsqueda de alineación local (BLAST) para evaluar posibles reacciones cruzadas.

Tabla 3. Cebadores usados en la plataforma “qPCR-Multiplex FVL”.

Agente infeccioso	Gen/ Secuencia	Secuencia cebadores	Tm (°C)	GC (%)	Amplicón (pb)
<i>P.falciparum</i>	Pfr364	PF: GCGACTAGTTCATTCGACTCAGA	58.9	47.8	200
		PR: GGAATTGCCACAAGGTTGGAAA	58.4	45.5	
<i>P.vivax</i>	Pvr47	PF: GTGGGACTGAATTCGGTTGATT	57.43	45.4	130
		PR: TCAAGCAAATACATTCTTACGCGA	58.53	37.5	
<i>Leptospira spp.</i>	Rrs	PF: CGGGAGGCAGCAGTTAAGAA	58.04	55	158
		PR: ACGTAGTTAGCCGGTGCTTT	57.69	50	

Pb, pares de bases. GC%, porcentaje de guanina y citosina. PF, primer forward. PR, primer reverse. Tm, temperatura de fusión. Los cebadores PF y PR del fragmento Pfr364 fueron reportados previamente [28].

Tabla 4. Sondas usadas en la plataforma “qPCR-Multiplex FVL”.

Sondas de hidrolisis	5'= Fluoroforo; 3'= Quencher	GC (%)	Homodím ero	Hairpin
Sonda_Pfr364*	ROX-ATACCGCTGCATCGCGGTGCA-BHQ2	62	-6.2	-6.2
Sonda_Pvr47	Cy5-TGGGATACGTAACAGTTTCCCTTTCCC-BHQ2	48.15	-4.8	-3.3
Sonda_Rrs	HEX-AACCCTGAAGCAGCGACGCC-BHQ1	65	-2.9	-1.1

GC%, porcentaje de guanina y citosina. *La sonda Pfr364 fue reportada previamente [28]: sin embargo para la presente plataforma qPCR-Multiplex se usó un fluoroforo diferente al ya publicado.

6.4 Protocolo de optimización del qPCR-Monoplex y qPCR-Multiplex

La optimización y evaluación del qPCR-Multiplex FVL se realizó siguiendo los protocolos de estandarización de The World Organization for Animal Health (WOAH fundada como OIE) para metodologías qPCRs múltiples y una guía internacional de validación de metodologías qPCR [34, 35]. La estandarización del “qPCR-Multiplex FVL” se llevó a cabo usando la mezcla de reacción ([Luna® Universal Probe qPCR Master Mix Protocol \(M3004\) | NEB](#)) previamente validado por New England Biolabs(NEB) para uso en sistemas qPCR-Monoplex y qPCR-Multiplex. Para la estandarización de las reacciones de qPCR se utilizó dos termocicladores de PCR en tiempo real: (i) Sistema de detección de CFX96 Touch qPCR Bio-Rad, y un (ii) Sistema de qPCR Thermo Scientific™ PikoReal™. La estandarización se realizó evaluando primero el rendimiento de los ensayos para cada gen por separado usando qPCR-Monoplex con cada par de cebadores específicos (Forward y Reverse) y una sonda, seguido de la estandarización de los qPCRs múltiples que involucra a amplificación de dos (qPCR-Duplex) y tres genes (qPCR-Triplex) en una sola reacción. La estandarización desarrolló y optimizó los siguientes parámetros: (i) Temperaturas de hibridación o anillamiento (T_a) de los cebadores, (ii) concentraciones de oligonucleótidos, (iii) número de ciclos de PCR, (iv) eficiencia de amplificación y (v) límite de detección (LOD).

En detalle, la estandarización de la T_a de los cebadores se llevó a cabo primero por qPCR-Monoplex para cada gen con el objetivo de evaluar una gradiente de temperaturas de hibridación en las que los cebadores y sondas hibridan con la secuencia blanco. Posteriormente se realizó un análisis post amplificación con el objetivo de evaluar los productos de amplificación específicos y posible presencia de productos inespecíficos a diferentes temperaturas de hibridación usando qPCR de fusión de alta resolución (High Resolution Melting) [11]. Así, se evaluó los picos de fusión de cada amplicón sometido a una gradiente de diferentes T_a que oscilaron entre 55 y 63 °C por 30 segundos en donde se inspeccionó los picos de fusión de los amplicones. Luego se determinó la T_a óptimo para los tres genes y se verificó la amplificación por el “qPCR-Multiplex FVL”.

Se evaluaron diferentes concentraciones de cebadores forward, reverse y sondas que oscilaron entre 200 y 500 nM. El régimen de ciclaje para la “qPCR-Multiplex FVL” siguió una etapa inicial que se mantuvo constante durante el proceso de optimización y consistió en un solo paso de 95 °C por 60 s seguido de 40 ciclos de un perfil de temperatura en dos etapas de 95 °C durante 15 s y 56

°C durante 30 s. Los resultados de la qPCR se basaron en las lecturas de fluorescencia tomadas por el termociclador en tiempo real, que se utilizan para calcular una lectura de referencia para cada reacción. Si la señal fluorescente es lineal y no se observa ningún aumento después de 40 ciclos, se asume que la muestra es negativa. En todas las reacciones de qPCR, el ciclo de cuantificación (Cq) fue realizado automáticamente por el sistema de detección de PCR en tiempo real CFX96 (BioRad) utilizando parámetros predeterminados. Los valores de Cq representan el ciclo de PCR en el que la fluorescencia aumentó por encima de un umbral definido para cada parcela de amplificación.

En cada ejecución se incluyeron preparaciones de (i) control positivo con ADN de los tres patógenos (*P.falciparum*, *P.vivax* y *Leptospira spp*) , (ii) control NTC(non template control) que es un control sin presencia de ningún fragmento de los tres blancos moleculares de interés, (iii) control negativo del sistema usando como template agua de PCR y (iv) un control interno para evaluar la presencia de posibles inhibidores en la reacción de amplificación (Anexo 6).

6.5 Sensibilidad analítica y límite de detección (LOD)

Para determinar la sensibilidad analítica y LOD del gen *Rrs* para la identificación de *Leptospiras* patogénicas se utilizaron ADN a partir de las cepas de *L. interrogans* serogrupo Sejroe y *L. santarosai* serogrupo Hebdomadis como extracto de ADNg de las células cultivadas (10^7 células/ml) (Anexo 1). Para las muestras de referencia de malaria, se utilizó ADNg a partir de sangre total confirmadas positivas para *P. falciparum* y *P. vivax* (Anexo 2). Se produjeron productos de PCR de ADNg para cada gen a partir del ADN extraído y posteriormente purificado. En detalle la concentración y calidad de ADN se midió utilizando un espectrofotómetro NanoDrop One/One (Thermo Fisher Scientific) y los geles de agarosa (Anexo 1-4). Se usaron diluciones seriadas de amplicones de ADN purificado al décimo (1/10) para obtener las curvas estándares de cada gen usando el sistema “qPCR-Multiplex FVL”. Cada curva estándar se construyó trazando los valores de Cq obtenidos frente a una serie de concentraciones crecientes conocidas de ácido nucleico. El número de copias de ADN de doble cadena (ADNdc) se expresó usando la siguiente ecuación.

$$\text{Número de copias} = \frac{(X \text{ ng} * 6.022 \times 10^{23} \text{ moléculas/mol})}{(N * 660 \text{ g/mol}) * 1 \times 10^9 \text{ ng/g}}$$

Siendo “X”, la masa de ADN presente en nanogramos(ng), “N” es la longitud del amplicón de ADN en pares de bases (pb) y 660 g/mol es la masa promedio de un pb de ADN.

Para el LOD, se prepararon curvas estándar a partir de las diluciones seriadas del orden 1/10 de productos de ADN de cada diana molecular. El LOD se definió como la concentración mínima de ácido nucleico que da un resultado positivo. La sensibilidad analítica se determinó mediante la eficiencia de amplificación (E) del ensayo qPCR. La eficiencia de amplificación se calculó a partir de la ecuación expresada a continuación: Siendo "S", la pendiente de la curva estándar. Los criterios considerados para la validación del ensayo qPCR-Multiplex FVL, fueron la eficiencia de amplificación y el coeficiente de determinación (R^2) [34, 35].

$$E = 10^{-1/S} - 1$$

6.6 Repetibilidad y Robustez

Para el ensayo de repetibilidad, se midieron muestras caracterizadas para cada gen con tres repeticiones por cada muestra, según las recomendaciones de la WAOH[34]. Se evaluó una muestra con alta y una muestra con baja carga patógena. La evaluación se basó en la medición estadística de la imprecisión como la desviación estándar (DESV) y el coeficiente de variación (CV). Para evaluar la robustez de la metodología “qPCR-Multiplex FVL”, se usaron variables como: (i) diferentes marcas de mezclas de reacción qPCR, y diferentes termocicladores qPCR. En detalle se utilizó tres termocicladores de qPCR diferentes, el termociclador GDS Rotor-Gene Q (Sigma Aldrich), el sistema de PCR en tiempo real Thermo Scientific™ PikoReal™ y el termociclador CFX96 (BioRad).

7. RESULTADOS

7.1 Evaluación de los nucleótidos y análisis de especificidad

Los cebadores y las sondas de la plataforma “qPCR-Multiplex FVL” se diseñaron para amplificar simultáneamente tres dianas moleculares de, 200 pb de Pfr364, 130 pb de Pvr47, y 158 pb del gen *Rrs* para la identificación molecular de malaria *falciparum*, malaria *vivax* y leptospirosis, respectivamente (Tabla 3 y 4). Con el ADNg de cada microorganismo, se amplificó, cuantificó y verificó la calidad del ADN usando el espectrofotómetro NanoDrop One/One (Anexo 1 y 2). Posteriormente las secuencias de Pfr364, Pvr47 y el gen *Rrs* fueron amplificados con éxito primero por PCR convencional obteniéndose productos de PCR de bandas únicas con los tamaños esperados (Fig. 1 y 2). Adicional se amplificó y purificó los productos de PCR específicos de las secuencias Pfr364, Pvr47 y del gen *Rrs* para su posterior uso (Anexo 3).

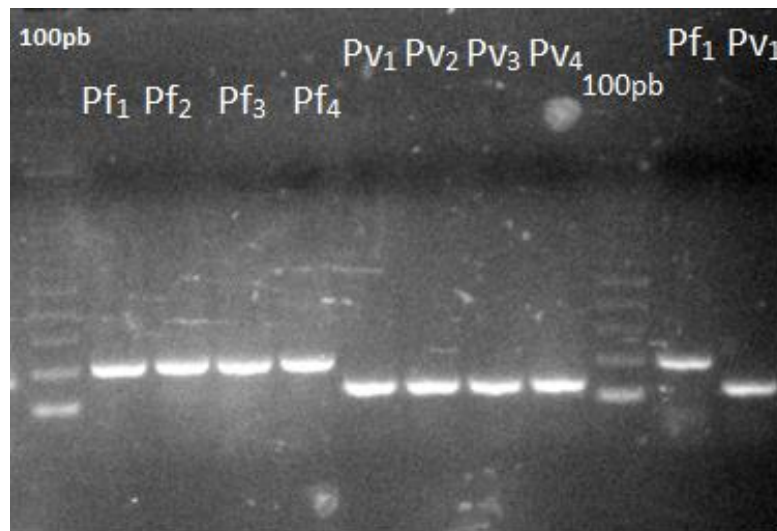


Figura 1. Controles positivos de ADNg de Pfr364 y Pvr47 de *P.falciparum*(Pf) y *P.vivax*(Pv) usando PCR convencional : Gel de agarosa al 3% de amplicones de Pfr364 de 200pb y Pvr47 de 130pb. 100 pb, marcador molecular de 100 pares de bases.

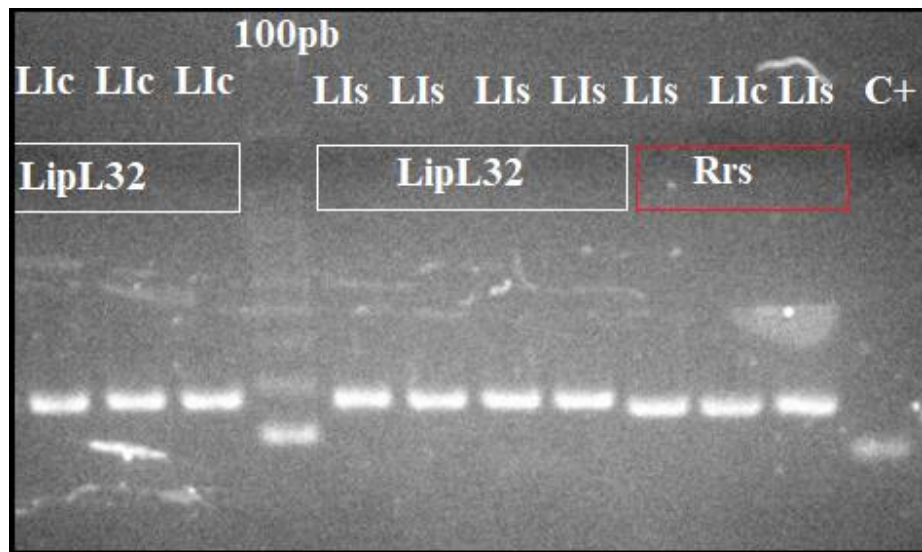


Figura 2. Controles positivos de ADNg de los genes *LipL32* y *Rrs* a partir de cepas de *Leptospira interrogans* usando PCR convencional: Gel de agarosa al 3% de amplicones de *LipL32* de 170 pb y de *Rrs* de 158pb. Llc, *L.interrogans* (Serogrupo canicola). Lis, *L. interrogans* (Serogrupo Sejroe). 100pb, marcador molecular de cien pares de bases. C+, control positivo del Kit de amplificación de Ultra Pure TaqPCR Mix.

Ninguna de las secuencias de los cebadores y sondas del sistema diseñado para el “qPCR-Multiplex FVL” mostró reacciones cruzadas, ni formación de homodímeros, ni heterodímeros entre todos los oligonucleótidos que forman parte del sistema qPCR-Multiplex propuesto en la presente investigación.

Los cebadores forward, reverse de la secuencia Pvr47 (N° de acceso GenBank U03079.1) fueron diseñados en la región conservada en la posición 1471 a 1600 y la sonda en la posición 1514 a 1540. Los cebadores y la sonda Pfr364 para la identificación de *P. falciparum* se publicaron previamente [28] y mostraron un buen rendimiento dentro de nuestra plataforma “qPCR-Multiplex FVL”, al no formar homodímeros y heterodímeros con los demás cebadores de la plataforma.

Los cebadores y la sonda para identificar *Leptospiras* patogénicas fueron altamente discriminatorios y se separaron del grupo de *Leptospiras* saprófitas. Los cebadores forward,

reverse del gen *Rrs* (N° de acceso GenBank: KY092986.1) fueron diseñados en la región conservada en la posición 220 a 420 y la sonda en la región 280 a 364, mostrando una identidad de secuencia del 100 %. Adicional para evaluar el mejor rendimiento de los cebadores y sondas para la identificación de leptospirosis usando la plataforma “qPCR-Multiplex FVL”, se diseñó cebadores (N° de acceso GenBank: AY461907.1) para un fragmento de la bacteria que ubica una región patógena de la proteína *LipL32*. Las secuencias específicas del gen *LipL32* se muestran a continuación: Cebador forward, *LipL32-F*: 5'-CCGGACGGTTTAGTCGATGG-3'. Cebador reverse, *LipL32-R*: 5'-TTTTCTTCTGGGGTAGCCGC-3'. Se seleccionó la región de la sonda denominada *LipL32-S*: 5'-FAM- TGAGCCAGGCGACGGAGACT–BHQ1-3'.

Se verificó la amplificación por PCR convencional de 170 pb del fragmento de *LipL32* mostrando una banda específica para las *Leptospiras* patógenas (Fig. 2).

Los análisis de especificidad *in silico* de los cebadores del “qPCR-Multiplex FVL” se determinó primero usando la herramienta BLAST del portal web NCBI, donde no se encontró ninguna similitud con secuencias no relacionadas a los tres genes involucrados en la amplificación simultánea de la plataforma qPCR múltiple. Seguido se evaluó la especificidad *in vitro* analizando ADNg de *Plasmodium malariae*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania spp.*, *Trichomonas tenax*, y *Escherichia coli*, no detectando amplificación usando la plataforma “qPCR-Multiplex FVL” (Tabla 2). Adicional, se evaluó ADNg de 4 controles negativos a malaria y leptospirosis, no detectando amplificación (Fig. 3).

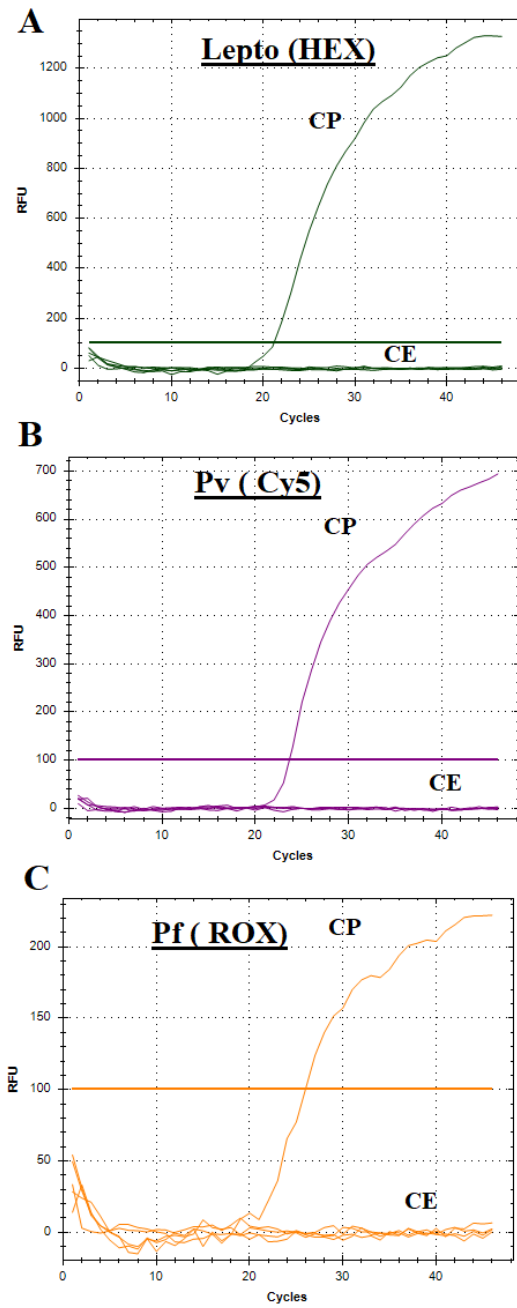


Figura 3. Amplificación de ADN_g de controles negativos para malaria y leptospirosis. CP: Control positivo. CE: control de especificidad. Fluoróforos: HEX, Cy5 y ROX. Pf: *P.falciparum*. Pv: *P. vivax*. Lepto: *Leptospira spp.*

7.2 Optimización de parámetros analíticos

Se evaluó la gradiente de temperaturas de hibridación (T_a) en el rango de 55 a 63 °C usando qPCR, verificando una amplificación positiva para Pfr364, Pvr47 y *Rrs* en todo el intervalo de T_a analizadas (Fig. 4 y 5). Seguidamente se analizó los picos de fusión aplicando las T_a de 55 °C a 63 °C con el objetivo de analizar los productos de PCR de cada gen usando qPCR-HRM (Fig. 1). El análisis post amplificación de los picos de fusión muestra un solo pico de fusión para Pfr364 y *Rrs* a las T_a de 55 a 57 °C (Fig. 4A). Por otro lado, para el amplicón de Pvr47, se detectó la formación de un pico bien definido a una temperatura de fusión (T_m) de 82.5 °C y la formación de un segundo pico de fusión a un T_m de 77 °C que aumenta ligeramente en tamaño a T_a mayores de 58 °C (Fig. 4B). Así, se verificó la presencia de este segundo pico de fusión para Pvr47 en el intervalo de temperaturas de hibridación de 58 a 63 °C (Fig. 4B). Sin embargo, como se observa en la Fig. 4B para T_a menores de 57 °C dicho pico de fusión ($T_m = 77$ °C) disminuye en tamaño. Así, para las T_a en el rango de 55 a 57 °C se verifica la formación de un único pico de fusión definido para los tres genes, lo que resulta óptimo para un ensayo de qPCR-Multiplex. Así, para posteriores análisis la temperatura de 56 °C, fue seleccionada como la T_a adecuado para amplificar simultáneamente las secuencias Pfr364, Pvr47 y el gen *Rrs* usando la plataforma “qPCR-Multiplex FVL” propuesta en la presente investigación (Fig. 5).

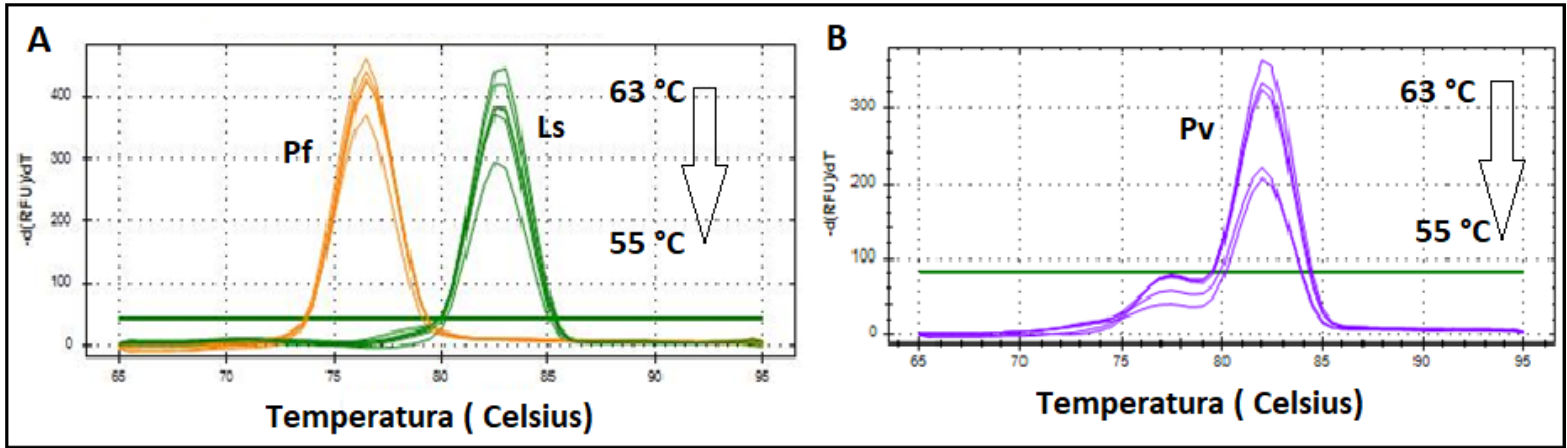


Figura 4. Gradiente de temperaturas de hibridación desde 55 a 63 °C analizado por picos de fusión de amplicones de Pfr364 para *P. falciparum* (Pf), Pvr47 para *P. vivax* (Pv) y Rrs para *Leptospira spp.* (Ls) usando HRM- qPCR.

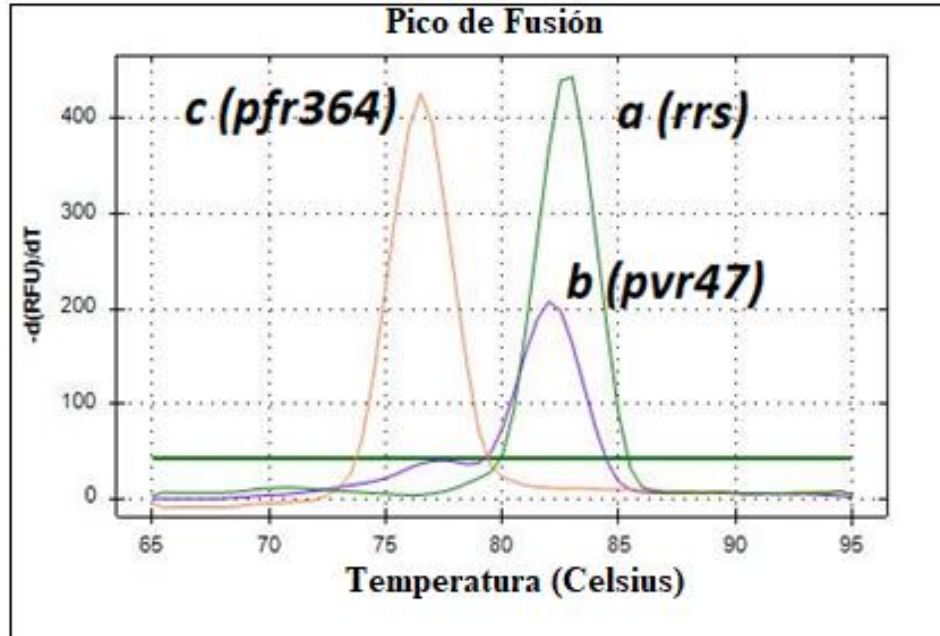


Figura 5. Picos de fusión de amplicones del gen *Rrs* para *Leptospira spp.* (a: curva verde), Pvr47 para *P. vivax* (b: curva púrpura) y Pfr364 para *P. falciparum* (c: curva naranja) usando qPCR-HRM a 56 ° C de temperatura de hibridación.

7.3 Sensibilidad de detección de qPCR- Monoplex y qPCR- Multiplex

La sensibilidad analítica para la identificación de *Leptospira spp.*, fue analizada primero usando qPCR-Monoplex amplificando por separado los genes *Rrs* y *LipL32* con el objetivo de evaluar el mejor performance de amplificación de cada gen y su posterior desempeño usando el sistema qPCR múltiple. El gen *Rrs* mostró una mayor sensibilidad analítica en comparación con el gen *LipL32*, obteniendo una mayor sensibilidad (Tabla 5).

Tabla 5. Límite de detección (LOD) amplificado por qPCR-Monoplex para los genes *Rrs* y *LipL32* de identificación de *Leptospira spp.*

Patógeno	Gen	Valores de Cq de diluciones seriadas en función a células/mL							
		10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰
<i>Leptospira spp.</i>	<i>LipL32</i>	18.6	21.92	25.06	29	34.52(LOD)	neg	-	
	<i>Rrs</i>	18.34	21.6	25.03	28.54	32.25	35.61	37.75(LOD)	neg

Seguidamente se evaluó el rendimiento usando qPCR-Duplex para la identificación simultánea de *Leptospira spp.* (*LipL32* y *Rrs*) y *P. vivax*(Pvr47) con las siguientes combinaciones de dianas moleculares: (i) *Rrs* y Pvr47, y (ii) *LipL32* y Pvr47; mostrando ambos amplicones definidos usando qPCR-Duplex para *Rrs* y Pvr47 (Fig. 6). Contrariamente la amplificación usando qPCR-Duplex para *LipL32* y Pvr47 amplifica solo el gen *LipL32* mas no Pvr47. Así, el gen *Rrs* fue seleccionado para la identificación de *Leptospira* usando nuestra “qPCR-Multiplex FVL”. Estos resultados se ven reforzados por el uso del gen *Rrs* como un blanco molecular ventajoso y ampliamente usado que permite la detección de *Leptospiras* patógenas [10, 23]. Adicional se realizó un ensayo qPCR-Dúplex mostrado en la Fig. 7, para la identificación de *Leptospira spp.* (*Rrs*), *P. falciparum* (Pfr364) y *P. vivax* (Pvr47) con las siguientes combinaciones de dianas moleculares: (i) Pfr364 y Pvr47 (*P. falciparum* y *P. vivax*), (ii) Pvr47 y *Rrs* (*P. vivax* y *Leptospira spp.*), y (iii) Pfr364 y *Rrs* (*P. falciparum* y *Leptospira spp.*)

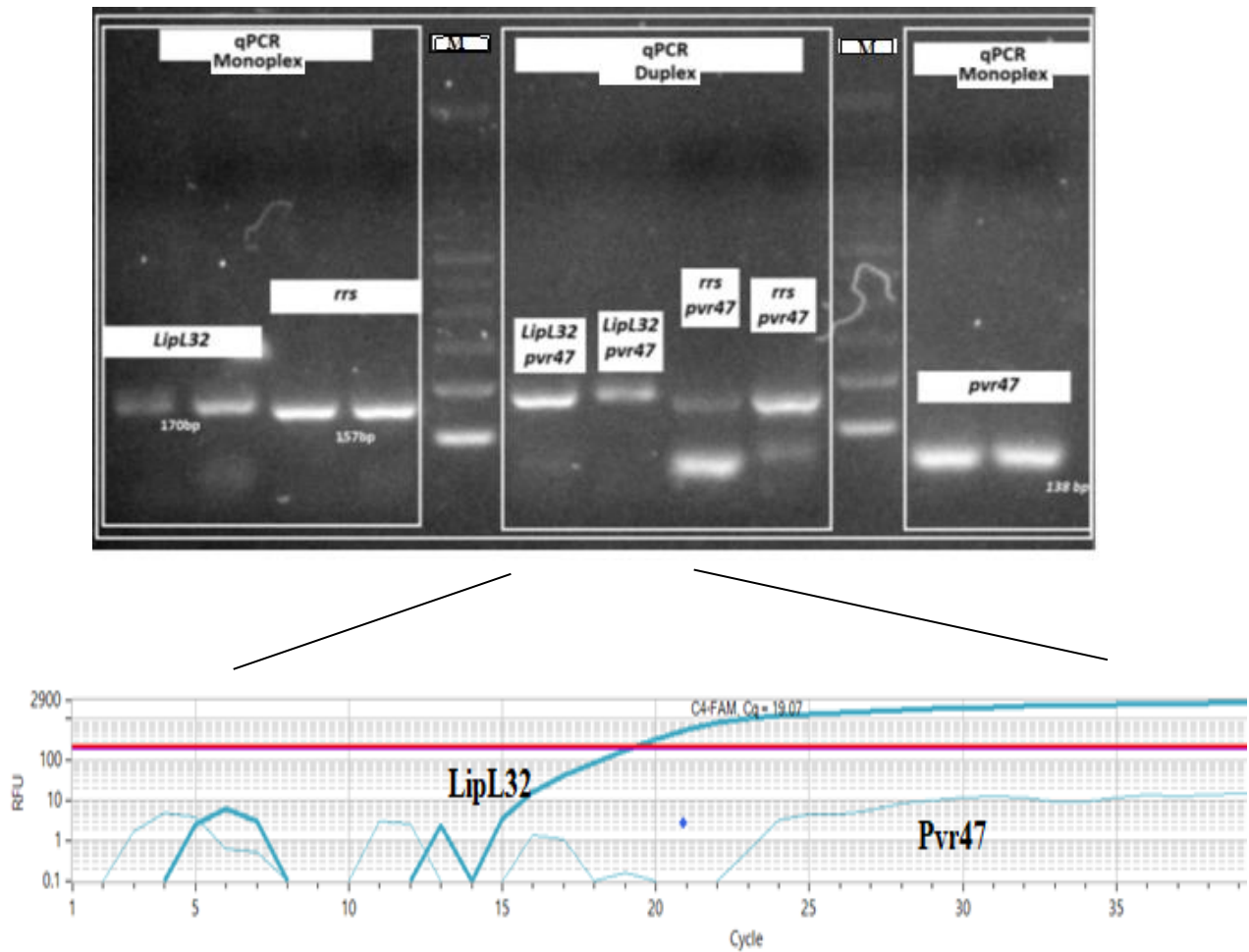


Figura 6. Productos de amplificación del qPCR-Monoplex y qPCR- Duplex para *Leptospira spp.* (genes de amplificación: *Rrs* y *LipL32*) y *P. vivax* (Secuencia de amplificación: Pvr47) analizado por electroforesis de gel de agarosa al 3%. Gráfica inferior muestra las curvas de amplificación del qPCR-Duplex amplificando *LipL32* y Pvr47. M: marcador de 50 pb.

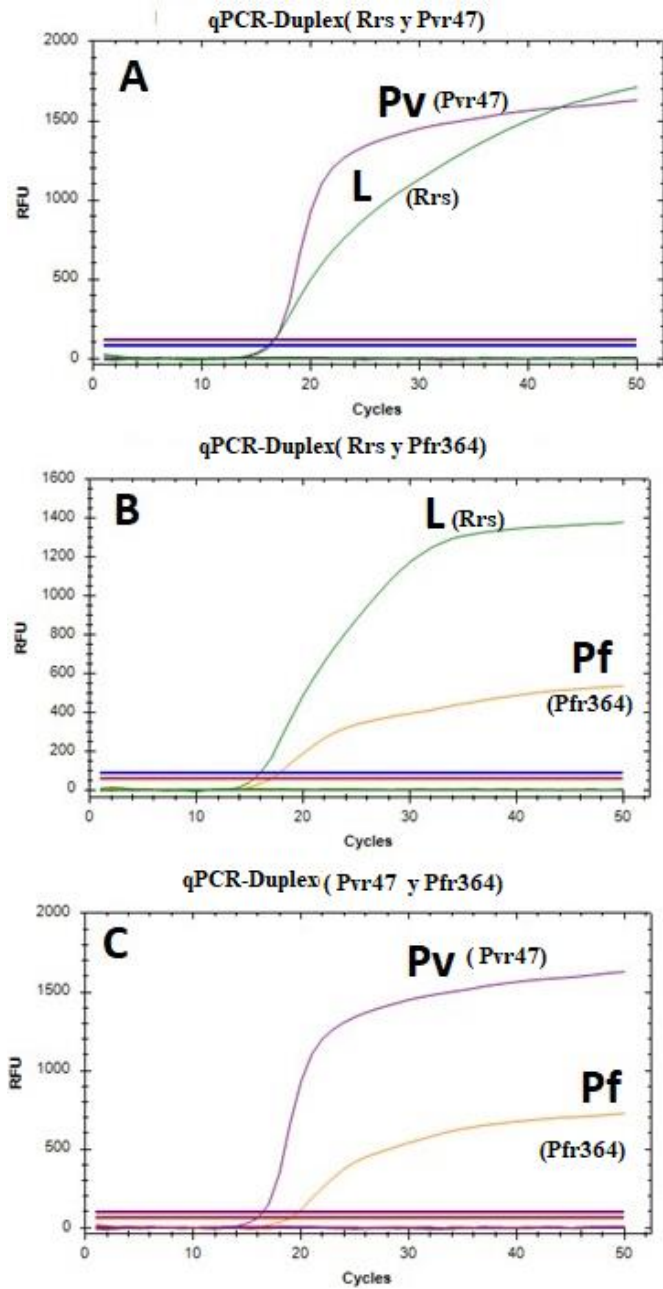


Figura 7. Curvas de amplificación usando qPCR-Duplex para las siguientes combinaciones de dianas moleculares: A) qPCR-Duplex para *Rrs* (*Leptospira spp.*) y Pvr47(*P. vivax*). B) qPCR-Dúplex para *Rrs* y Pfr364 (*P. falciparum*). C) qPCR-Dúplex para Pfr364 y Pvr47. *Leptospira spp* (Ls, curvas verdes), *Plasmodium vivax* (Pv, curvas moradas) y *P. falciparum* (Pf, curvas naranjas). RFU: Relative Fluorescence Units.

Como muestra las curvas de amplificación usando el qPCR-Duplex se verificó la amplificación simultánea múltiple para todas las combinaciones que involucran a las dianas moleculares seleccionados como parte del ensayo “qPCR-Multiplex FVL” propuesto en la presente investigación (Fig. 7).

Las concentraciones entre 200 y 400 nM de cada pareja de cebadores fueron evaluadas primero en el formato qPCR-Monoplex y seguidamente fue reevaluado y analizado usando el “qPCR-Multiplex FVL” como se muestra en la figura 8. En resumen, la reacción final del “qPCR-Multiplex FVL” se basó en un volumen de reacción total de 25,0 μ l. Las concentraciones finales de cebadores y sondas comprende una concentración de 400 nM de cebadores de Pfr364 y 500 nM de la sonda Pfr364 marcada con el fluoroforo ROX para la identificación *P. falciparum*, 400 nM de cebadores de Pvr47 y 200 nM de la sonda Pvr47 marcada con Cy5 para la identificación de *P. vivax*. Para la identificación de *Leptospira spp.*, se usó 200 nM de cebadores *Rrs* con 200 nM de la sonda *Rrs* marcada con el fluoroforo HEX. Dichas concentraciones finales resultaron en el mejor rendimiento experimental en el formato “qPCR-Multiplex FVL” propuesto en la presente investigación (Fig.8-III). Finalmente, el ensayo “qPCR-Multiplex FVL” identificó simultáneamente con éxito los tres patógenos en una sola reacción (Fig. 9) y sin pérdida de sensibilidad debido a la multiplexación (Tabla 6). Importante de destacar con las condiciones finales optimizadas no se obtuvieron diferencias significativas en los valores de Cq del qPCR-Monoplex y qPCR-Multiplex tal como se observa en la Tabla 6, aunque se observó una ligera disminución en la fluorescencia en las curvas de amplificación usando el qPCR-Multiplex; pero sin modificación de los valores de Cq (Fig. 10).

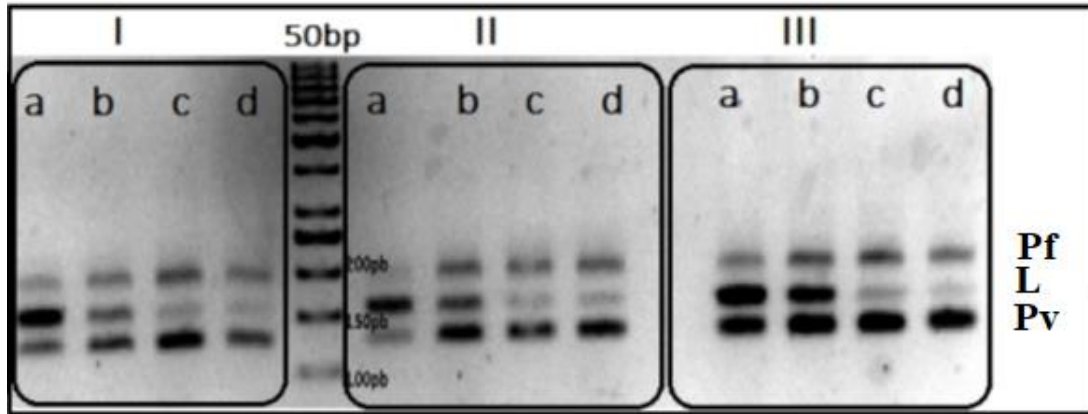


Figura 8. Optimización de concentraciones finales de cebadores y sonda para el formato “qPCR-Multiplex FVL” para la detección de *Leptospira spp.* (L), *P. vivax* (Pv) y *P. falciparum* (Pf) en varias concentraciones de cebadores visualizado en gel de agarosa al 3%. PF: Primer forward. PR: Primer reverse. **I:** 0.6 nM (PF y PR de *Leptospira spp.*), 0.4 nM (PF y PR de *P. vivax*), y 0.4 nM (PF y PR de *P. falciparum*). **II:** 0.4 nM (PF y PR de *Leptospira spp.*), 0.4 nM (PF y PR de *P. vivax*) y 0.4 nM (PF y PR de *P. falciparum*). **III:** 0.2nM (PF y PR de *Leptospira spp.*), 0.4 nM (PF y PR de *P. vivax*) y 0.4 nM (PF y PR de *P. falciparum*). Las concentraciones de ADN purificado de *P. falciparum* y *P. vivax* se mantuvieron constantes, mientras que el ADN de *Leptospira* fue diluido en el orden de 1/10 correspondiendo a las diluciones de 10^{-6} a 10^{-9} (a hacia d) de izquierda a derecha para la amplificación de *Leptospira*.

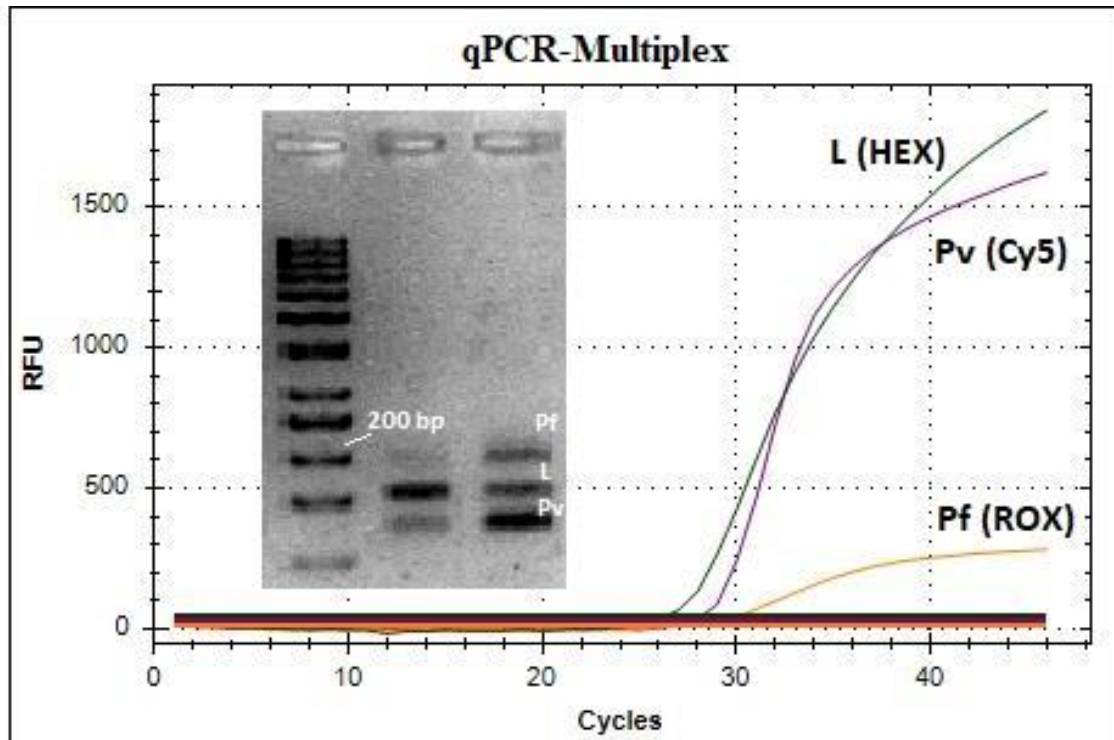


Figura 9. Curvas de amplificación del “qPCR-Multiplex FVL” de *Leptospira spp.* (L), *P. vivax* (Pv) y *P.falciparum*(Pf). El gráfico insertado muestra los amplicones para el qPCR múltiple en un gel de agarosa al 3% donde la primera columna representa el marcador de 50 pb, la segunda y la tercera columna se usaron diferentes concentraciones de ADN template representando diferentes concentraciones de controles positivos, con las tres dianas moleculares (Pfr364, Pvr47, *Rrs*) amplificados en una sola reacción.

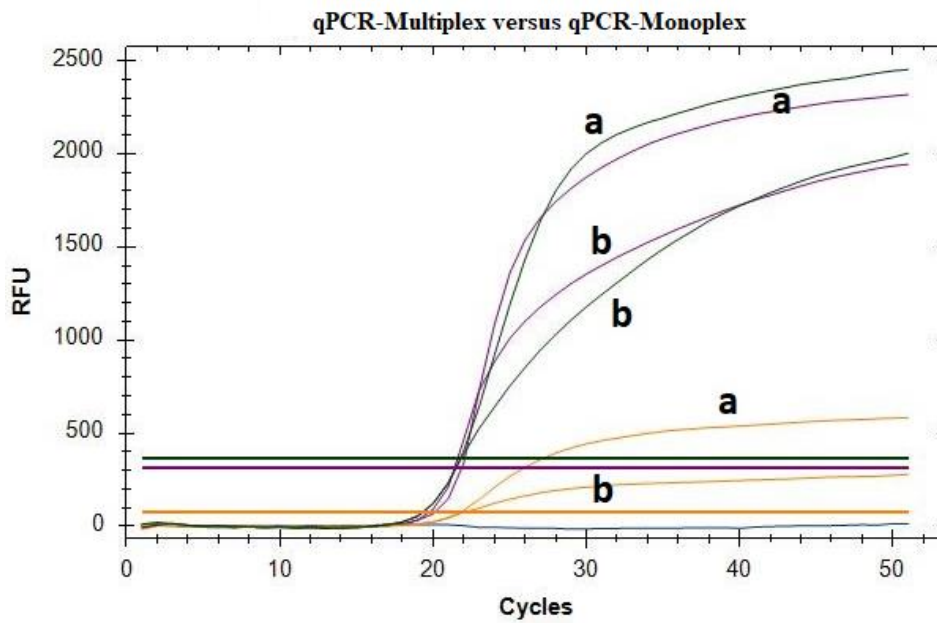


Figura 10. Curvas de amplificación usando qPCR-Monoplex(a) y qPCR-Multiplex FVL (b) para *Rrs*. (curvas verdes), Pvr47(curvas moradas) y Pfr364 (curvas naranjas).

7.4 Sensibilidad analítica

La concentración stock de amplicones purificados para la obtención de las curvas estándares fue de 55 ng/μl, 42,5 ng/μl y 54,5 ng/μl para las secuencias Pfr364(*P.falciparum*), Pvr47(*P.vivax*) y el gen *Rrs*(*Leptospira spp.*), respectivamente (Anexo 3). Para la construcción de las curvas estándares se amplificó las diluciones seriadas de 1/10 de amplicones purificados de cada diana (Fig. 11). Se realizó un análisis de regresión lineal con los datos del ensayo qPCR con el objetivo de calcular la eficiencia de amplificación (E) y el coeficiente de determinación (R^2) de cada diana usando los valores cuantitativos extraídos a partir de las curvas de amplificación del qPCR-Monoplex y del qPCR-Multiplex FVL (Fig. 12).

En la Fig. 12 se muestra el análisis de regresión lineal para cada gen para determinar la E y R^2 . En resumen, la amplificación de cada gen fue evaluada usando el “qPCR-Multiplex FVL” versus el qPCR-Monoplex y fue realizado en 3 réplicas para cada dilución seriada. Como se muestra en la figura 8, el análisis de regresión utilizando el “qPCR-Multiplex FVL” mostró valores de eficiencia de amplificación de 93 % para Pfr364(*P.falciparum*), 106 % para Pvr47(*P.vivax*) y 102.5 % para *Rrs*(*Leptospira spp.*) con valores de $R^2 > 0,997$. Los valores de eficiencia usando el qPCR-Monoplex fueron 94,3 % para Pfr364, 97.3 % para Pvr47 y 98.5 % para *Rrs* con valores de $R^2 > 0.999$.

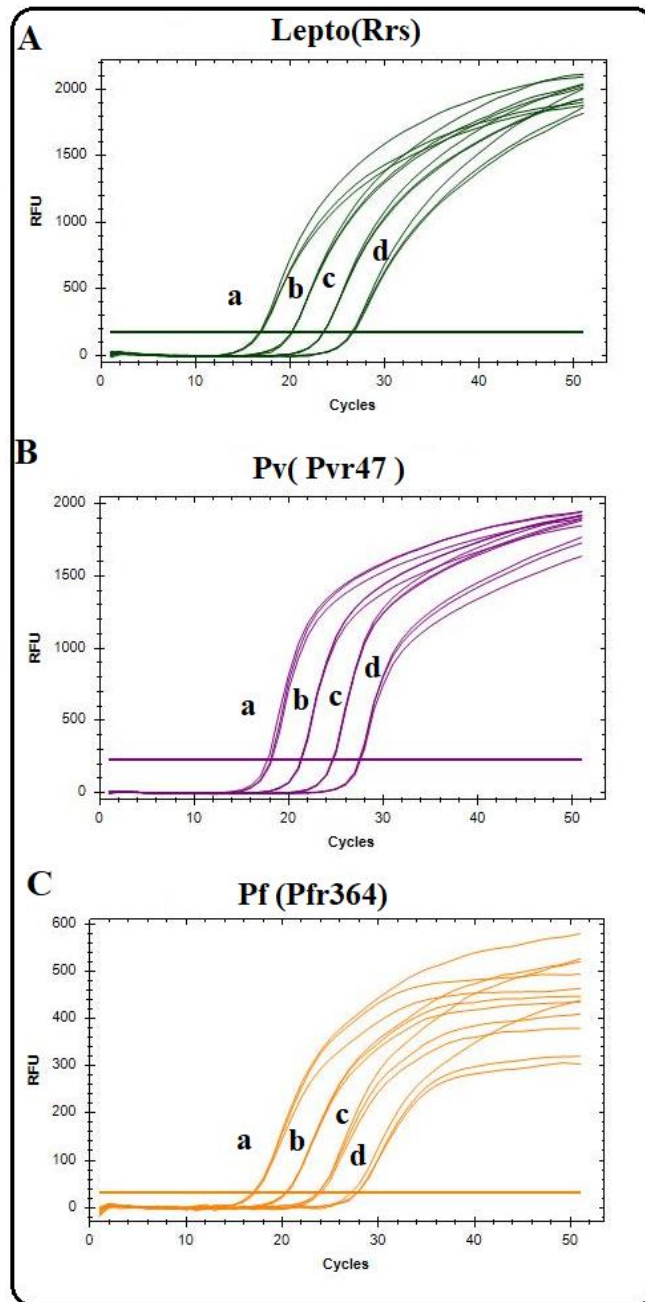


Figura 11. Curvas de amplificación para *Rrs* (A), *Pvr47* (B) y *Pfr364* (C) usando la plataforma “qPCR-Multiplex FVL”. Cada curva de amplificación corresponde a la dilución de amplicones de ADN de 10^{-5} a 10^{-8} (a hacia d). Se realizaron tres réplicas por punto de dilución, representadas por las curvas superpuestas para cada dilución. Lepto: *Leptospiriosis spp.* Pv: *P. vivax*. Pf: *P. falciparum*.

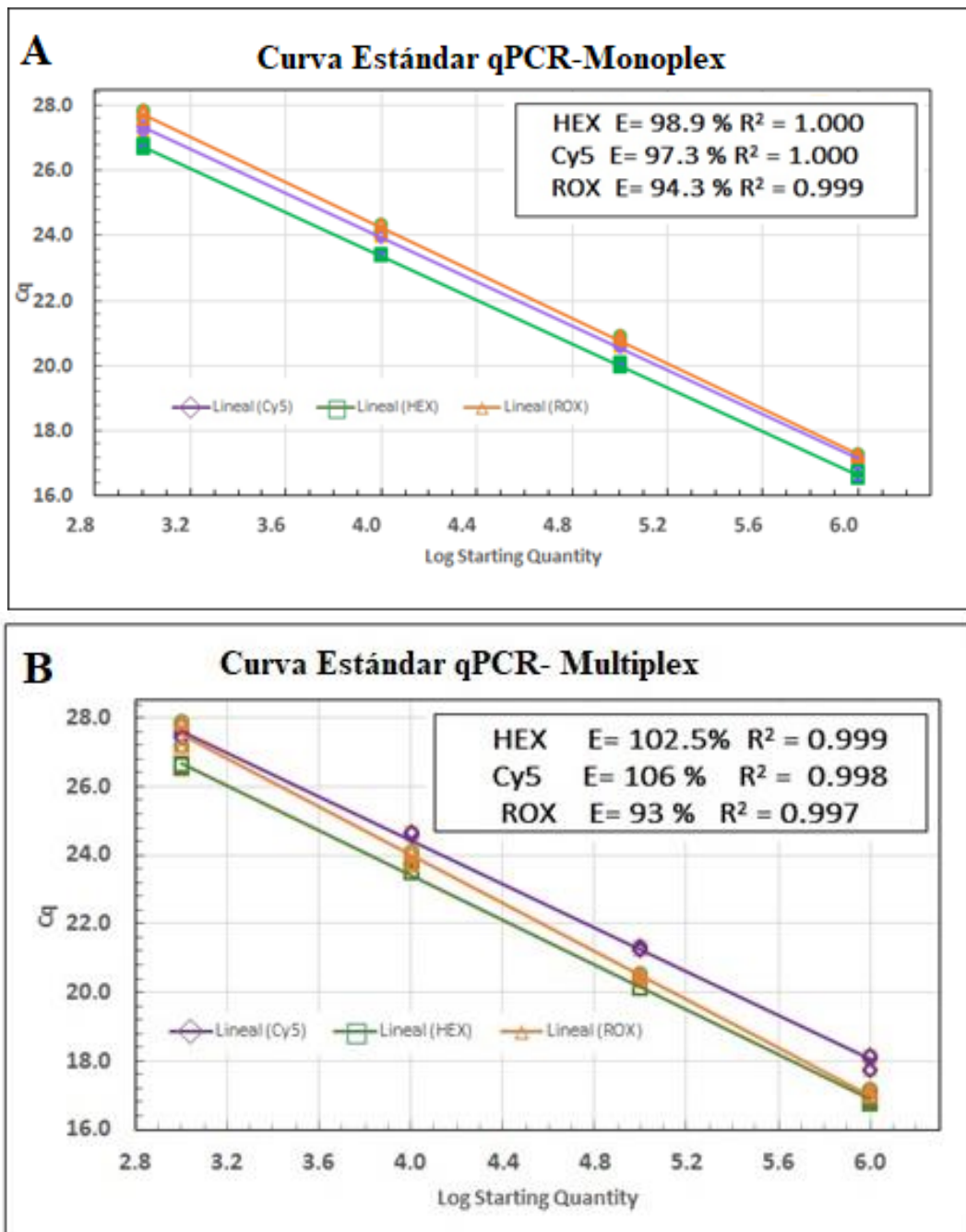


Figura 12. Curva estándar de *Pfr364* (ROX), *Pvr47* (Cy5) y *Rrs* (HEX). Análisis de regresión lineal usando las plataformas qPCR-Monoplex (A) y qPCR-Multiplex FVL (B). Eficiencia de la amplificación(E) y Coeficiente de determinación (R²) fueron obtenidos de la regresión lineal de cada gen.

Tabla 6. Valores de Cq comparativo usando “qPCR-Multiplex FVL” y qPCR-Monoplex

Patógeno	[Amplicones de ADN]* ng	qPCR	Valores de Cq de diluciones seriadas (1/10) de ADN			
			10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸
<i>P.falciparum</i> (Pfr364)	100	Multiplex	17.5	20.3	23.8	27.6
		Monoplex	16.8	20.4	23.6	27.3
<i>P.vivax</i> (Pvr47)	85	Multiplex	17.5	20.9	24.1	27.1
		Monoplex	17.7	20.5	23.9	27.1
<i>Leptospira spp</i> (Rrs)	109	Multiplex	16.7	20.1	23.5	26.5
		Monoplex	16.6	20.0	23.3	26.0

* Cantidad de ADN stock

7.5 Repetibilidad y Robustez

La Tabla 7 muestra una buena repetibilidad de los resultados, con un coeficiente de variación (CV) $\leq 0,6$ % para muestras con carga alta y $CV \leq 0,1$ % para muestras con carga baja de patógenos. El rendimiento de la amplificación simultánea usando el “qPCR-Multiplex FVL” mostró el mismo patrón de amplificación sin verse afectado por las variables evaluadas. Los resultados muestran valores de Cq relativos para la misma muestra analizada usando diferentes termocicladores (datos no mostrados).

Tabla 7. Ensayo de repetibilidad para el “qPCR-Multiplex FVL”.

Patógeno	Tipo de muestras	Media (X)	DESV	CV (%)
<i>P.falciparum</i>	Carga alta	16.93	0.10	0.6
	Carga baja	25.42	0.03	0.1
<i>P.vivax</i>	Carga alta	17.6	0.10	0.5
	Carga baja	33.16	0.005	0.01
<i>Leptospira spp.</i>	Carga alta	16.7	0.05	0.3
	Carga baja	34.9	0.03	0.08

DESV, desviación estándar. CV, coeficiente de variación. Media(X)= Cq promedio.

7.6 Límite de detección (LOD)

El LOD para un ensayo de qPCR es la concentración mínima de ácido nucleico que arroja un resultado positivo [34]. Para determinar el LOD, se construyeron curvas estándar con los amplicones de ADN purificados para cada diana (Pfr364, Pvr47 y *Rrs*) usando diluciones seriadas del blanco oscilando entre 629 y 0.63 copias para *Leptospira spp.*, de 596 a 0.06 copias para *P. vivax* y de 456 a 0.46 copias para *P. falciparum* (Anexo 4). Los valores de ciclo umbral (Cq) de 37.16, 37.77 y 39.54 ($Cq \leq 37.16$, $Ct \leq 37.77$, $Ct \leq 39.54$) se utilizaron para definir la positividad en la identificación de las concentraciones mínimas de Pfr364, Pvr47 y *Rrs*, respectivamente (Tabla 8). Mediante el uso de un análisis de regresión probit basado en una escala logarítmica, fue posible demostrar que el ensayo del “qPCR-Multiplex FVL” presentó un 95 % de probabilidad de detectar niveles tan bajos como 0.46 copias de Pfr364, 0.06 copias de Pvr47 y 0.63 copias de *Rrs* para *P. falciparum*, *P. vivax* y *Leptospira spp.*, respectivamente (Anexo 4).

La positividad a la mínima concentración de ácido nucleico analizado cuantitativamente con los valores de Cq se verifica gráficamente con las curvas de amplificación de las diluciones seriadas de ADN para cada diana molecular involucrada (Anexo 5).

Tabla 8. Límite de detección (LOD) por diana molecular usando el “qPCR-Multiplex FVL”.

Patógeno (Secuencia/ Gen)	[ADN] (2µl)	Número de copias(2µl)	Valores de Cq de diluciones seriadas de amplicones de ADN					
			10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹¹	10 ⁻¹²	10 ⁻¹³	10 ⁻¹⁴
<i>P.falciparum</i> (Pfr364)	100 ng	4.56x 10 ¹¹	31.25	35.12	36.82	37.16*	neg	-
<i>P.vivax</i> (Pvr47)	85 ng	5.96 x 10 ¹¹	29.94	33.41	35.26	36.67	37.77*	neg
<i>Leptospira spp</i> (Rrs)	109 ng	6.29 x 10 ¹¹	31.55	34.72	36.71	39.54*	neg	-

Dilución seriada de 1/10 de amplicón de ADN purificado de *P. falciparum*-Pfr364, *P. vivax*-Pvr47 y *Leptospira spp*-Rrs amplificado usando el “qPCR-Multiplex FVL”. *LOD

8. DISCUSION

La presente investigación, desarrolló y estandarizó un “qPCR-Multiplex FVL” altamente sensible para la detección simultánea de *P.falciparum*, *P.vivax* y *Leptospira spp.* Dicha plataforma propuesta en la presente investigación, amplifica con éxito las tres dianas moleculares; Pfr364, Pvr47, *Rrs* cumpliendo los criterios establecidos para validar metodologías de PCR en tiempo real [34, 35]. La estandarización de dicha plataforma múltiple comprendió la evaluación y análisis de rendimiento analítico, sensibilidad, especificidad, así como la reproducibilidad y la repetibilidad. Dentro de los criterios a seguir, se dio especial atención a evaluar puntos críticos como: (i) formación de productos de PCR inespecíficos, (ii) amplificaciones preferenciales en presencia de múltiples cebadores, y (iii) evitar la disminución de la sensibilidad debido a la multiplexación.

La especificidad analítica usando el “qPCR-Multiplex FVL” fue evaluada usando diferentes microorganismos. Así, no se detectó reacciones cruzadas, de especies relacionadas tales como *P. malariae*, *P.ovale*, *P. knowlesi*, *Escherichia coli*, *Leishmania spp.*, *Trypanosoma cruzi*, y *Trichomonas tenax*. Se evaluaron en detalle una gradiente de temperaturas de hibridación (T_a) que permitió la amplificación de los tres blancos moleculares en una sola reacción usando el “qPCR-Multiplex FVL”. Así, con el objetivo de evaluar la T_a idóneo de amplificación, se hizo un análisis más estricto post amplificación de los amplicones por cada diana usando el qPCR de fusión de alta resolución (qPCR-HRM). Así, se seleccionó la T_a que mostró un único pico de fusión característico para cada gen. Dicho T_a fue capaz de amplificar los tres genes en un solo tubo de reacción usando nuestra plataforma “qPCR-Multiplex FVL” (Fig. 5).

Para abordar la posible ocurrencia de amplificaciones preferenciales usando la plataforma “qPCR-Multiplex FVL”, la estandarización abordó la optimización por etapas, que involucró primero la evaluación usando el qPCR-Monoplex, seguido por el qPCR-Duplex y qPCR-Multiplex consecutivamente. Así, se detectó una amplificación preferencial usando el qPCR-Duplex de la secuencia Pvr47 sobre el gen *LipL32*. Es importante destacar que la amplificación por qPCR-Monoplex de cada diana Pvr47 y *LipL32* por separado, dio como resultado los tamaños esperados y que dicha amplificación preferencial solo se observó usando el sistema qPCR-Duplex (Fig. 6). Así, para el proceso de estandarización que involucra la identificación de *Leptospira spp.*, en

nuestra plataforma se optó por el diseño de cebadores y una sonda de un fragmento del gen ribosomal *Rrs* (*16S* ARNr), altamente conservado y que ha sido ampliamente usado con éxito para la detección de *Leptospiras* patogénicas en sistemas qPCR validados previamente [10, 23, 26]. La elección de una nueva diana molecular (*Rrs*) altamente conservado se hizo con el fin de fomentar la igualdad de amplificación de diferentes genes en una sola reacción.

La ocurrencia de una amplificación preferencial en plataformas qPCR múltiples es poco probable, pero puede ocurrir debido a diferentes mecanismos de selección que explican la preferencia en amplificación como propiedades inherentes del blanco y de las secuencias que lo flanquean [36, 37]. En tal sentido se necesita estudios más esclarecedores para identificar los factores responsables de una mayor eficacia vinculante entre los cebadores y la diana molecular a amplificar.

Referente a la disponibilidad de otras plataformas qPCR múltiples que identifiquen malaria o leptospirosis hasta la actualidad se tiene disponible diferentes ensayos de qPCR-Monoplex y qPCR-Multiplex para identificar *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale* [8, 9, 11, 13, 19, 25, 28], así como las principales especies de *Leptospiras* patogénicas [10, 23, 27]. Importante de mencionar que el desarrollo de algunas de las plataformas múltiples para cada infección por separado, reportaron una disminución de la sensibilidad del qPCR múltiple debido a la multiplexación. Adicional, se reportó problemas con la diferenciación de *P. vivax* y *P. knowlesi* en una sola reacción [11]. En tal sentido, la estandarización de un sistema qPCR-Multiplex, sin disminuir la sensibilidad de amplificación debido a la multiplexación es uno de los principales obstáculos a superar. Notablemente, la presente investigación consiguió desarrollar y estandarizar de manera exitosa un sistema denominado “qPCR-Multiplex FVL” que identifica simultáneamente las especies más prevalentes de malaria en las Américas y el grupo de *Leptospiras* patogénicas, sin comprometer o disminuir la eficiencia de amplificación debido a la multiplexación. Así, la diferencia entre las eficiencias de amplificación, obtenidas para Pfr364, Pvr47 y *Rrs* usando nuestra plataforma “qPCR-Multiplex FVL” versus el qPCR-Monoplex, no superó el 13 % en las secuencias y genes evaluados cumpliendo uno de los principales criterios para validar un ensayo qPCR-Multiplex acorde con guías internacionales de validación [34, 35].

Importante de resaltar que hasta la fecha, ninguna metodología qPCR múltiple fue desarrollada para la detección múltiple y simultánea de *P. falciparum*, *P. vivax* y *Leptospira spp.*, en una sola

reacción. Por lo tanto, teniendo en cuenta que la prevalencia de malaria y leptospirosis puede presentarse como mono infección, infecciones mixtas y también como coinfección en zonas endémicas[14], el ensayo “qPCR-Multiplex FVL” resulta prometedor en su desarrollo y uso por ser de gran ayuda para un diagnóstico y tratamiento oportuno de la malaria y leptospirosis en Perú.

Los resultados obtenidos en la presente investigación nos entregan una metodología “qPCR-Multiplex FVL” prometedora para la identificación de malaria *falciparum*, malaria *vivax* y leptospirosis usando secuencias repetitivas de copias múltiples del tipo subteloméricas con un LOD menor a una copia por gen. Pfr364, Pvr47 y *Rrs* son secuencias de copias múltiples que están presentes en 41, 14 y 2 copias por genoma de *P. falciparum*, *P.vivax*, y *Leptospira spp.*, respectivamente por lo que son dianas moleculares propuestas previamente para obtener una mejor sensibilidad. Nuestra plataforma “qPCR-Multiplex FVL” usando las secuencias Pfr364 y Pvr47 consiguió detecciones de *P. falciparum* y *P.vivax* con un límite de detección menor a 0.1 parásitos/ μ l y 0.315 parásitos/ μ l de *Leptospira spp* (Anexo 4). Teniendo en cuenta que *Plasmodium* se detectan de forma rutinaria a niveles de 1 a 10 parásitos/ μ l usando el *18S* ARNr qPCR[13], se corrobora una alta sensibilidad de nuestra plataforma con resultados prometedores para la detección de infecciones de baja densidad. Importante de resaltar que nuestros resultados usando dianas subteloméricas de copias múltiples son respaldados con estudios previos donde validaron detecciones ultrasensibles de *P.vivax* y *P.falciparum* alcanzando un límite de detección de 0.03 a 0.15 parásitos / μ l en sangre usando dianas como Pfr364, Pvr47, y TARE-2 [9, 13, 21].

9. ESTUDIOS FUTUROS

Para conocer la sensibilidad y especificidad de la plataforma “qPCR-Multiplex FVL”, estudios en campo deben ser abordados con un n muestral significativo que abarque un muestreo aleatorio de diferentes regiones endémicas para Malaria y Leptospirosis en Perú. La evaluación inter laboratorio y evaluación en ciego usando nuestra plataforma seguirían el proceso de validación en campo acorde con guías de validación de metodologías qPCR [35]. El tipo de muestra recomendado para los estudios de campo es el uso sangre total de pacientes que cumplan las definiciones de SFA siguiendo los siguientes criterios de inclusión[1] : (i) mayor igual a 12 años, (ii) temperatura mayor a 37.5 °C por más de tres días, sin signos de foco infeccioso definido (tipo infecciones estomacales, faringitis, heridas cutáneas y otros), (iii) residencia por más de dos semanas en las áreas de estudios, y (iv) dispuesto a permitir el uso de sus muestras para futuros estudios que abarquen SFA.

10. CONCLUSIONES

1. Los mejores resultados de la plataforma “qPCR-Multiplex FVL” después de ser estandarizada para un volumen de reacción total de 25µl fueron: 400 nM de cebadores Pfr364 con 500 nM de sonda Pfr364 para la identificación de *P.facilparum*, 400 nM de cebadores Pvr47 con 200 nM de sonda Pvr47 para la identificación de *P.vivax*, 200 nM de cebadores *Rrs* y 200 nM de sonda *Rrs*. Con un régimen de ciclaje de 40 ciclos a 95 °C por 15 s y una Ta de 56 °C por 30s.
2. El límite de detección obtenido usando la plataforma “qPCR-Multiplex FVL” amplificó hasta 0.46 copias de *Pfr364* para *P.falciparum*, 0.06 copias de Pvr47 para *P.vivax*, y 0.63 copias de *Rrs* para *Leptospira spp.*
3. El análisis de regresión utilizando el “qPCR-Multiplex FVL” mostró valores de eficiencia de amplificación de 93 % para Pfr364 (*P.falciparum*), 106 % para Pvr47 (*P.vivax*) y 103 % para *Rrs* (*Leptospira spp.*) con valores de $R^2 > 0.997$; lo que demuestra la capacidad de la presente plataforma para amplificar eficientemente las tres dianas a pesar del formato de multiplexación.
4. No se detectó ninguna reacción cruzada, con *Plasmodium malariae*, *Escherichia coli*, *Leishmania spp.*, *Trypanosoma cruzi*, y *Trichomonas tenax* usando la plataforma “qPCR-Multiplex FVL”.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. **Cabezas C, Donaires F.** Syndromic approach for the diagnosis and management of acute febrile infectious diseases in emergencies. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 2017;34:316–322.
2. **Prasad N, Murdoch DR, Reyburn H, Crump JA.** Etiology of severe febrile illness in low- and middle-income countries: A systematic review. *PLoS One* 2015;10:1–25.
3. **Gupta N, Wilson W, Ravindra P, Joylin S, Bhat R, et al.** Clinical profile, management and outcome of patients with leptospirosis during the times of covid-19 pandemic: A prospective study from a tertiary care centre in south india. *Infez Med* 2021;29:393–401.
4. **Recht J, Siqueira AM, Monteiro WM, Herrera SM, Herrera S, et al.** Malaria in Brazil, Colombia, Peru and Venezuela: Current challenges in malaria control and elimination. *Malar J* 2017;16:1–18.
5. **World Health Organization WHO.** Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. ISBN 92 4 154589 5
6. **WHO.** *World Malaria Report 2021*. <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2021> (2021).
7. **Snounou G, Viriyakosol S, Xin Ping Zhu, Jarra W, Pinheiro L, et al.** High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* 1993;61:315–320.
8. **Rougemont M, Van Saanen M, Sahli R, Hinrikson HP, Bille J, et al.** Detection of four Plasmodium species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays. *J Clin Microbiol* 2004;42:5636–5643.
9. **Belachew M, Wolde M, Nega D, Gidey B, Negash L, et al.** Evaluating performance of multiplex real time PCR for the diagnosis of malaria at elimination targeted low transmission settings of Ethiopia. *Malar J* 2022;21:1–9.
10. **Backstedt BT, Buyuktanir O, Lindow J, Wunder EA, Reis MG, et al.** Efficient detection of pathogenic leptospires using 16S ribosomal RNA. *PLoS One* 2015;10:1–18.
11. **Schneider R, Lamien-Meda A, Auer H, Wiedermann-Schmidt U, Chiodini PL, et al.** Validation of a novel FRET real-time PCR assay for simultaneous quantitative detection and discrimination of human Plasmodium parasites. *PLoS One* 2021;16:1–12.
12. **Amaral LC, Robortella DR, Guimarães LFF, Limongi JE, Fontes CJF, et al.** Ribosomal and non-ribosomal PCR targets for the detection of low-density and mixed malaria infections. *Malar J* 2019;18:1–14.
13. **Demas A, Oberstaller J, DeBarry J, Lucchi NW, Srinivasamoorthy G, et al.** Applied genomics: Data mining reveals species-specific malaria diagnostic targets more sensitive than 18S rRNA. *J Clin Microbiol* 2011;49:2411–2418.
14. **Wilairatana P, Mala W, Rattaprasert P, Kotepui KU, Kotepui M.** Prevalence of Malaria and Leptospirosis Co-Infection among Febrile Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Trop Med Infect Dis*. 2021;6(3):122.
15. **Forero-Peña DA, Carrión-Nessi FS, Lopez-Perez M, Sandoval-de Mora M, Amaya ID, et al.** Seroprevalence of viral and bacterial pathogens among malaria patients in an endemic area of southern Venezuela. *Infect Dis Poverty* 2023; 12: 33.
16. **Carrasco-Escobar G, Miranda-Alban J, Fernandez-Miñope C, Brouwer KC, Torres K, et al.** High prevalence of very-low Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax parasitaemia carriers in the Peruvian Amazon:

- Insights into local and occupational mobility-related transmission. *Malar J* 2017;16:1–15.
17. **Organisation WH.** *World malaria report 2022.* Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
 18. **Yslache L.** Boletines epidemiológicos – CDC MINSA Boletín Epidemiológico del Perú SE 50-2022 (del 11 al 17 de diciembre 2022) Situación epidemiológica de la COVID-19 en el Perú. Análisis y situación de defunciones durante la quinta ola en Lima Metropolitana y en la. *Boletines epidemiológicos – CDC MINSA* 2022;2058–2061.
 19. **Dormond L, Jatón-Ogay K, De Vallière S, Genton B, Bille J, et al.** Multiplex real-time PCR for the diagnosis of malaria: Correlation with microscopy. *Clin Microbiol Infect* 2011;17:469–475.
 20. **Berhane A, Anderson K, Mihreteab S, Gresty K, Rogier E, et al.** Major threat to malaria control programs by plasmodium falciparum lacking histidine-rich protein 2, Eritrea. *Emerg Infect Dis* 2018;24:462–470.
 21. **Hofmann N, Mwingira F, Shekalaghe S, Robinson LJ, Mueller I, et al.** Ultra-Sensitive Detection of Plasmodium falciparum by Amplification of Multi-Copy Subtelomeric Targets. *PLoS Med* 2015;12:1–21.
 22. **Karpagam KB, Ganesh B.** Leptospirosis: a neglected tropical zoonotic infection of public health importance—an updated review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2020;39:835–846.
 23. **Pérez LJ, Lanka S, DeShambo VJ, Fredrickson RL, Maddox CW.** A Validated Multiplex Real-Time PCR Assay for the Diagnosis of Infectious Leptospira spp.: A Novel Assay for the Detection and Differentiation of Strains From Both Pathogenic Groups I and II. *Front Microbiol* 2020;11:1–18.
 24. **Picardeau M, Bertherat E, Jancloes M, Skouloudis AN, Durski K, et al.** Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: Current tools and emerging technologies. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014;78:1–8.
 25. **Veron V, Simon S, Carme B.** Multiplex real-time PCR detection of P. falciparum, P. vivax and P. malariae in human blood samples. *Exp Parasitol* 2009;121:346–351.
 26. **Villumsen S, Pedersen R, Borre MB, Ahrens P, Jensen JS, et al.** Novel TaqMan PCR for detection of Leptospira species in urine and blood: Pit-falls of in silico validation. *J Microbiol Methods* 2012;91:184–190.
 27. **Ahmed A, Engelberts MFM, Boer KR, Ahmed N, Hartskeerl RA.** Development and Validation of a Real-Time PCR for Detection of Pathogenic Leptospira Species in Clinical Materials. 2009;4:4–11.
 28. **Waggoner JJ, Abeynayake J, Balassiano I, Lefterova M, Sahoo MK, et al.** Multiplex nucleic acid amplification test for diagnosis of dengue fever, malaria, and leptospirosis. *J Clin Microbiol* 2014;52:2011–2018.
 29. **Srinivas R, Agarwal R, Gupta D.** Severe sepsis due to severe falciparum malaria and leptospirosis co-infection treated with activated protein C. *Malar J* 2007;6:1–5.
 30. **Yong LS, Koh KC.** A Case of Mixed Infections in a Patient Presenting with Acute Febrile Illness in the Tropics. *Case Rep Infect Dis* 2013;2013:1–3.
 31. **Md-Lasim A, Mohd-Taib FS, Abdul-Halim M, Mohd-Ngesom AM, Nathan S, et al.** Leptospirosis and coinfection: Should we be concerned?. *Int J Environ Res Public Health.* 2021;18(17):9411.
 32. **Kimura Y, Soma T, Kasahara N, Delobel D, Hanami T, et al.** Edesign: Primer and enhanced internal probe design tool for quantitative PCR experiments and genotyping assays. *PLoS One* 2016;11:1–22.
 33. **Bedir O, Kilic A, Atabek E, Kuskucu AM, Turhan V, et al.** Simultaneous detection and differentiation of pathogenic and nonpathogenic Leptospira spp. by multiplex real-time PCR (TaqMan) assay. *Polish J Microbiol* 2010;59:167–173.
 34. **World Organization for Animal Health.** *OIE - Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial*

Animals - 2022. <https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-code-online-access/?id=169&L=1&htmlfile=preface.htm> (2022).

35. **Broeders S, Huber I, Grohmann L, Berben G, Taverniers I, et al.** Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. *Trends Food Sci Technol* 2014;37:115–126.
36. **Manta FS de N, Jacomasso T, Rampazzo R de CP, Moreira SJM, Zahra NM, et al.** Development and validation of a multiplex real-time qPCR assay using GMP-grade reagents for leprosy diagnosis. *PLoS Negl Trop Dis* 2022;16:e0009850.
37. **Markoulatos P, Siafakas N, Moncany M.** Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. *J Clin Lab Anal* 2002;16:47–51.

12. ANEXOS

Anexo 1

Tabla 9. Concentración y calidad de ADN genómico de cepas patogénicas de *Leptospira spp.*

Cepa	Serogrupo	[ADN]	Ratio A₂₆₀	Nominación
Leptospira		ng/μl	/ A₂₈₀	INS
<i>Leptospira santarosai</i> (LS)	<i>Hebdomadis</i>	11,3	1,94	Cepa 16
<i>Leptospira interrogans</i> , (LI _c)	<i>Canicola</i>	12,7	1,93	Cepa 8
<i>Leptospira interrogans</i> (LI _s)	<i>Serogrupo</i> <i>Sejroe</i>	11,7	1,95	Cepa 6

Anexo 2

Tabla 10. Concentración y calidad de ADN genómico de controles positivos de *P. falciparum* y *P. vivax*

ADNg	Tipo de muestra	[ADN] ng/μl	Ratio (A₂₆₀ / A₂₈₀)
<i>P.falciparum</i> (1)	Sangre total	19,8	1,95
<i>P.falciparum</i> (2)	Sangre total	20,15	1,96
<i>P.falciparum</i> (3)	Sangre total	12,72	2,04
<i>P.vivax</i> (1)	Sangre total	21,94	1,93
<i>P.vivax</i> (2)	Sangre total	14,4	1,91

Anexo 3

Tabla 11. Amplicones de Pfr364, Pvr47 y Rrs.

Producto de PCR	Longitud de ADN (pb)	[ADN Amplificado] (OD _{260/280})	[ADN Purificado] (OD _{260/280})	[ADN _{usado}] (2µl)	Número de copias de ADN(2µl)
Pfr364(<i>P.falciparum</i>)	200	670 ng/µl (1.12)	55 ng/µl (1.90)	110ng	4.562×10 ¹¹
Pvr47(<i>P.vivax</i>)	130	680 ng/µl (1.2)	42.5 ng/µl (1.94)	85 ng	5.96 ×10 ¹¹
Rrs (<i>Leptospira spp</i>)	158	700 ng/µl (1.13)	54.5 ng/µl (1.91)	109 ng	6.29 ×10 ¹¹

Las concentraciones iniciales de amplicón de ADN para cada gen se alcanzaron mediante PCR convencional utilizando los cebadores específicos para cada gen. y posteriormente se purificaron. Se agregaron 2 µl de ADNdc por reacción.

Anexo 4

Tabla 12. Limite detección (LOD) en función al número de copias por secuencia/ gen

Orden de Dilución Pfr364 (1/10)	Número de copias Pfr364	<i>P. falciparum</i>-Pfr364 (Cq)
10 ⁻⁹	456	31.25
10 ⁻¹⁰	45.6	35.12
10 ⁻¹¹	4.56	36.82
10 ⁻¹²	0.456 (LOD)*	37.16
Orden de Dilución Pvr47 (1/10)	Número de copias Pvr47	<i>P. vivax</i>-Pvr47 (Cq)
10 ⁻⁹	596	29.94
10 ⁻¹⁰	59.6	33.41
10 ⁻¹¹	5.96	35.26
10 ⁻¹²	0.596	36.67
10 ⁻¹³	0.0596 (LOD)*	37.77
Orden de Dilución <i>Rrs</i> (1/10)	Número de copias <i>Rrs</i>	<i>Leptospira spp</i>-<i>Rrs</i> (Cq)
10 ⁻⁹	629	31.55
10 ⁻¹⁰	62.9	34.72
10 ⁻¹¹	6.29	36.71
10 ⁻¹²	0.629 (LOD)*	39.54

Diluciones seriadas de 1/10 de amplicones de ADN purificado de *P. falciparum*-Pfr364, *P. vivax*-Pvr47 y *Leptospira spp*-*Rrs* amplificado por “qPCR-Multiplex FVL”. * LOD equivalente en parásitos/ µl: 0.01 de *P.falciparum*, 0.004 de *P.vivax* y 0.315 de *Leptospira spp*.

Anexo 5

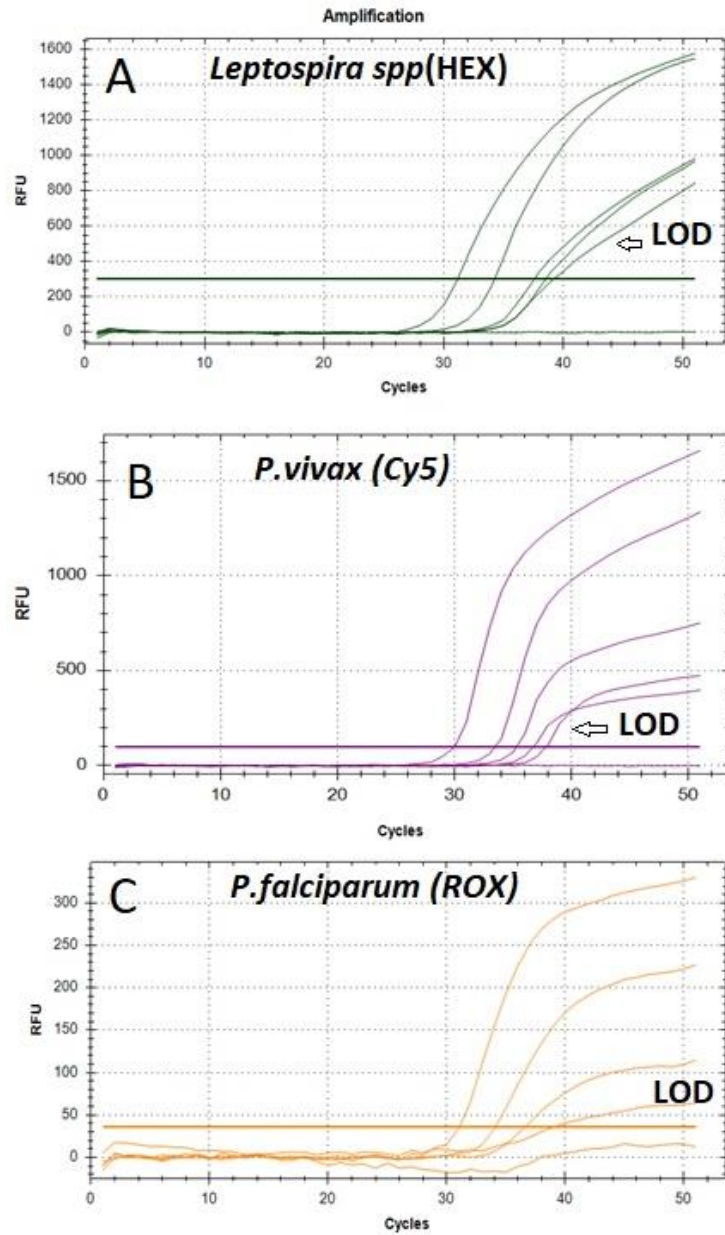


Figura 12. Límite de detección para el gen *Rrs* (A), *Pvr47* (B) y *Pfr364* (C) amplificados por qPCR-Multiplex. Cada gráfico representa la curva de amplificación de diluciones de amplicones de ADN purificado en el orden de dilución de 1/10.

Anexo 6

Tabla 13. Controles de PCR

Control	Patógeno	Carga de <i>Leptospira</i> / Concentración	Cq
Control positivo 1	<i>Leptospira Interrogans</i> <i>Serogrupo: Canicola</i>	10 ⁷ células por mililitro	25.32
Control positivo 2	<i>Leptospira Interrogans</i> <i>Serogrupo: Sejroe</i>	10 ⁷ células por mililitro	28.03
Control positivo 3	<i>Leptospira Santarosai</i>	10 ⁷ células por mililitro	24.22
Control Interno	<i>Leptospira Interrogans</i> <i>Serogrupo: Sejroe</i>	10 ⁴ células por mililitro	33.94
Control Positivo I	<i>Plasmodium vivax</i>	14,40 ng/μl	26.41
Control Positivo I	<i>Plasmodium falciparum</i>	12.72 ng/μl	22.16
Control ambiental*	-	-	No amplifico
Control negativo de sistema	-	-	No amplifico

*Control ambiental. Para evaluar contaminación ambiental dejando el tubo eppendorf destapado durante todo el proceso de manipulación y colocación de los reactivos y template.