



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**  
FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA

**Desempeño de la técnica de Amplificación Isotérmica Mediada  
por Horquillas (LAMP) en la detección de *Plasmodium* en la  
Región Amazónica**

Anthony Wilder Gave Zúñiga

Tesis para optar el título de Licenciado en Biología

Lima - Perú

**2017**

*Agradezco este trabajo a mis padres y hermano por su apoyo y ánimos que me dieron durante todo este tiempo.*

*A los compañeros del Laboratorio de Malaria. Cada idea y comentario fueron recibidos para culminar este trabajo; en especial a la Dra. Dionicia Gamboa, quien en su búsqueda de eliminar al parásito de la malaria de la región, me permitió realizar esta investigación y me guío hasta el final.*

TESIS APROBADA EL 30 DE JUNIO DE 2017, EN LA CIUDAD DE LIMA, PRESIDIENDO SU EVALUACIÓN LAS JURADAS:

- **Presidenta**

Dra. Luz Carbajal Arroyo

- **Vocal**

Dra. Cristina Guerra Giraldez

- **Secretaria**

Blga. Luz Marina Pacheco Lechuga

**BAJO LA ASESORIA DE LA** Dra. Dionicia Gamboa Vilela

## Índice

I.	Introducción.....	1
II.	Marco Teórico.....	3
i.	Malaria en el mundo.....	3
ii.	Malaria en el Perú.....	4
iii.	Ciclo de vida de <i>Plasmodium spp.</i> .....	6
iv.	Cuadro Clínico.....	8
v.	Individuos Asintomáticos y baja densidad parasitaria.....	8
vi.	Métodos de diagnóstico.....	9
1.	Métodos de diagnóstico estándar.....	9
2.	Métodos de diagnóstico molecular.....	11
3.	LAMP.....	12
vii.	Justificación del estudio.....	16
III.	Pregunta de investigación.....	17
IV.	Objetivos.....	17
i.	Objetivo General.....	17
ii.	Objetivos Específicos.....	17
V.	Materiales y métodos.....	17
1.	Consentimiento ético.....	17
2.	Área de estudio.....	17
3.	Selección de muestras.....	18
4.	Extracción de ADN.....	20
5.	Diagnósticos de las muestras.....	20
5.1	Determinación del parásito por LAMP.....	20
5.2	Detección del parásito por nested PCR (nPCR).....	21
5.3	Detección del parásito por PCR en Tiempo Real.....	22
6.	Cuantificación de la densidad parasitaria.....	24
7.	Análisis estadístico.....	24

<b>VI. Resultados .....</b>	<b>24</b>
<b>VII. Discusión .....</b>	<b>30</b>
<b>VIII. Conclusiones .....</b>	<b>33</b>
<b>IX. Referencias bibliográficas .....</b>	<b>33</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>41</b>

## Resumen

En los últimos años se ha reportado la presencia de individuos asintomáticos con infecciones submicroscópicas de *Plasmodium spp.* en la Región Amazónica quienes pasan desapercibidos al sistema rutinario de diagnóstico (microscopía y las pruebas de diagnóstico rápido) y al no ser tratados, se convierten en reservorios de la malaria. Por otro lado, existen pruebas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), más sensibles, pero a la vez más complejas y costosas. Existe un nuevo método de diagnóstico molecular llamado Amplificación Isotérmica Mediada por Horquillas (LAMP), cuya principal ventaja es el mínimo requerimiento de equipo y entrenamiento.

En el presente estudio se determinó la efectividad de la prueba LAMP, en 503 muestras que incluían individuos asintomáticos infectados con malaria y controles sanos provenientes de la Amazonia Peruana, versus dos PCRs en Tiempo Real, uno para detectar a *Plasmodium spp.* (qPCR-PgMt) y otro para diferenciar la especie (PCR-18S).

La prueba LAMP detectó 4 veces más individuos infectados con malaria en comparación con la microscopía. En las muestras con infecciones a *Plasmodium spp.* LAMP tuvo una sensibilidad de 92.1% (88.1% - 95.1%) y 92.5% (88.4% - 95.5%) en comparación con qPCR-PgMt y qPCR-18S, respectivamente. Comparando LAMP a la técnica de qPCR-18S, la detección de *P. falciparum* tuvo una sensibilidad del 75.8% (57.7% - 88.9%), mientras que para *P. vivax* fue del 88.3% (83.1% - 92.4%). Existe una relación directa entre la densidad parasitaria y la sensibilidad de LAMP, siendo capaz de detectar muestras con más de 1 parásito/ $\mu$ L de sangre para los casos de *Plasmodium spp.* y *P. vivax*, mientras que a densidades mayores a 10 parásitos/ $\mu$ L, LAMP detecta *P. falciparum* con una sensibilidad del 100%

En este estudio se observó que la técnica LAMP no fue lo suficientemente sensible para detectar infecciones con densidades parasitarias por debajo de 1 parásito/ $\mu$ L, pero tiene lo necesario para poder ser empleado como método de diagnóstico de campo al tener una sensibilidad mayor que las pruebas de

diagnóstico de rutina; pero se tiene que mejorar su sensibilidad y la detección de especies de parásitos que no sean *P. falciparum*.

**Palabras Claves:** Malaria, LAMP, diagnóstico

## **Abstract**

In recent years the presence of asymptomatic individuals with submicroscopic infections of *Plasmodium spp* has been reported in the Amazon Region, who go unnoticed to the routine diagnostic system (microscopy and rapid diagnostic tests) and when they are not treated, become reservoirs of malaria. On the other hand, there are molecular tests like Polymerase Chain Reaction (PCR), more sensitive, but at the same time more complex and expensive. There is a new molecular diagnostic method called Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP), whose main advantage is the minimum requirement of equipment and training.

In the present study the effectiveness of the LAMP test was determined in 503 samples that included asymptomatic individuals infected with malaria and healthy controls from the Peruvian Amazon, versus two Real-Time PCRs, one to detect *Plasmodium spp* (qPCR-PgMt) And another to differentiate the species (PCR-18S).

The LAMP test detected 4 times more individuals infected with malaria compared to microscopy. In samples with *Plasmodium spp*. LAMP had a sensitivity of 92.1% (88.1% - 95.1%) and 92.5% (88.4% - 95.5%) compared to qPCR-PgMt and qPCR-18S, respectively. Comparing LAMP to the qPCR-18S technique, the detection of *P. falciparum* had a sensitivity of 75.8% (57.7% - 88.9%), whereas for *P. vivax* it was 88.3% (83.1% - 92.4%). There is a direct relationship between the parasite density and the sensitivity of LAMP, being able to detect samples with more than 1 parasite /  $\mu\text{L}$  of blood for the cases of *Plasmodium spp*. and *P. vivax*, whereas at densities greater than 10 parasites /  $\mu\text{L}$ , LAMP detects *P. falciparum* with a sensitivity of 100%

In this study, it was observed that the LAMP technique was not sensitive enough to detect infections with parasite densities below 1 parasite /  $\mu\text{L}$ , but it has the necessary to be used as a field diagnostic method to have a sensitivity greater than the routine diagnostic tests; but their sensitivity and the detection of non-*P. falciparum* parasite species have to be improved.

**Key Words:** Malaria, LAMP, diagnostic



## I. Introducción

La Amazonía se caracteriza por ser una región con baja transmisión de malaria y con alta prevalencia de individuos asintomáticos, quienes son reservorios del parásito. Esta asintomatología puede ser resultado de un control del sistema inmune contra el parásito, reduciendo la carga parasitaria (1,2) y a su vez eliminando las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Esta reducción de la carga parasitaria ha sido reportada en varias regiones de la Amazonía, observándose más en las infecciones con *P. vivax* (3,4). Estas infecciones de baja carga parasitaria resultan inconvenientes al momento de realizar el diagnóstico en estos individuos debido al límite de detección de la prueba utilizada (5,6), lo que en consecuencia produce un mal diagnóstico. Además, estos diagnósticos solo se realizan en personas que acuden a los centros o puestos de salud con síntomas de la enfermedad. Por lo tanto, para un correcto control de la malaria con miras a su eliminación en la región, se debe realizar haciendo un tamizaje de toda la población, es decir buscar a todos los individuos que viven en zonas endémicas y realizarles el diagnóstico con el fin de identificar y tratar a todos los individuos infectados, tanto sintomáticos como asintomáticos.

En los centros de salud se emplea la microscopía como método de diagnóstico estándar, la cual permite identificar y cuantificar al tipo de parásito presente en la sangre (7). Sin embargo esta técnica tiene un límite de detección entre 50 a 100 parásitos/ $\mu$ L (6,8), por lo que infecciones debajo de este rango no serán identificadas convirtiéndose en falsos negativos, conociéndose como infecciones submicroscópicas. Una alternativa para identificar individuos infectados que no asisten a los puestos de salud por estar alejados o por no presentar síntomas, serían las Pruebas de Diagnóstico Rápido (PDR), las cuales identifican un antígeno del parásito y dan el resultado en corto tiempo. A pesar de ser un método que puede emplearse en una intervención de búsqueda activa de casos de malaria, tienen la limitante de poseer una eficiencia baja a concentraciones menores de 200 parásitos/ $\mu$ L (5), por lo que las infecciones submicroscópicas no serían detectadas. También está el inconveniente de detectar a *P. falciparum*, debido a la ausencia del gen *hrp2* cuya proteína es el blanco de muchas PDRs disponibles en el mercado(9,10). Por lo tanto, se deben buscar otros métodos

más sensibles para detectar concentraciones bajas de parásitos de la malaria en la sangre.

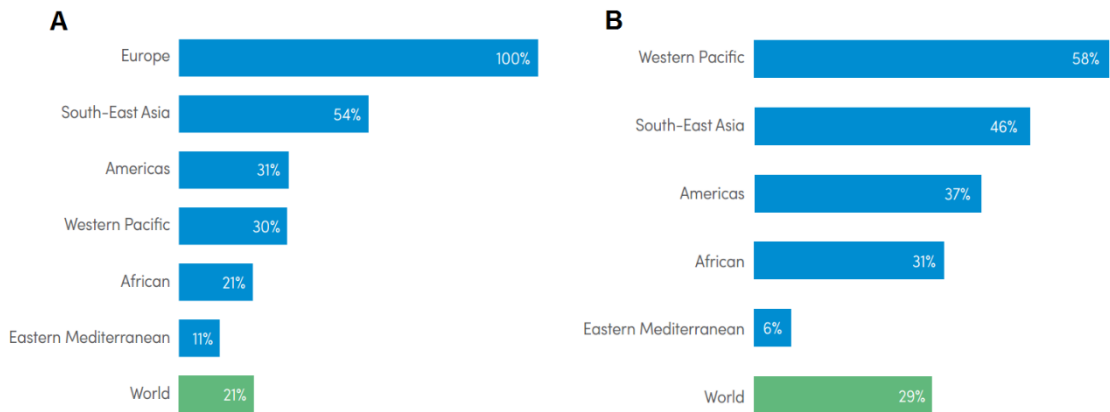
En trabajos de investigación se emplea, además de los métodos mencionados anteriormente, técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en Inglés) Nested o anidado y PCR en Tiempo Real que son más sensibles, ya que pueden detectar hasta 1 parásito/ $\mu$ L en el caso de *Plasmodium spp.*; y entre 1 y 5 parásitos/ $\mu$ L para *P. vivax* y *P. falciparum* (11–13). Estos métodos permiten identificar individuos asintomáticos con infecciones submicroscópicas en laboratorios referenciales o de investigación. El inconveniente de estas técnicas es el entrenamiento requerido por el personal, los reactivos y equipos necesarios para realizar estos experimentos, por lo que se necesitaría otro método que fuera igual de sensible que el PCR pero fácil de implementar en regiones alejadas con centros o puestos de salud con mínima infraestructura o sin ella.

Un nuevo método molecular que puede reemplazar al PCR es la Amplificación Isotérmica Mediada por Horquillas (Loop mediated isothermal amplification, LAMP), debido a que puede detectar infecciones submicroscópicas (cubriendo la deficiencia de la microscopía y PDR) en individuos asintomáticos, ya que se puede usar para búsquedas activas de individuos infectados en comunidades. Este método, que no necesita una gran inversión en capacitación, reactivos y equipos, consiste en un PCR a temperatura constante empleando cuatro cebadores que son específicos para la secuencia que se amplifica; permitiendo detectar al género *Plasmodium* y también para diferenciar la especie que está infectando. Se han reportado resultados con sensibilidad alta en comparación con la PCR nested, observándose una sensibilidad del 90% en la detección de *Plasmodium spp.* y 100% en la detección de *P. falciparum* (14). Por lo tanto, se espera que este resultado sea reproducible en la Región Amazónica, y que este método sirva para detectar individuos asintomáticos con infecciones submicroscópicas, para darles el tratamiento adecuado, interrumpiendo de esta manera la transmisión de la malaria con miras hacia su eliminación.

## II. Marco Teórico

### i. Malaria en el mundo

La malaria, enfermedad causada por el parásito *Plasmodium spp.*, es la responsable de haber infectado a 212 millones de personas y producir la muerte de 429 000 en el mundo durante el 2015 (15). La región de las Américas representa menos del 1% del total de los casos reportados, con un 69% de estos como infecciones por *P. vivax*. Estos reportes indican una disminución en referencia a los últimos cinco años, viéndose una reducción de la tasa de incidencia y mortalidad a nivel global del 21% y 29% respectivamente, y particularmente en la región de las Américas se ha observado una disminución de la tasa de incidencia en un 31% (Figura 1).



**Figura 1.** Reducción de tasa de incidencia (A) y mortalidad (B) de malaria durante los años 2010 – 2015. Fuente: WHO. World Malaria Report 2016 (15).

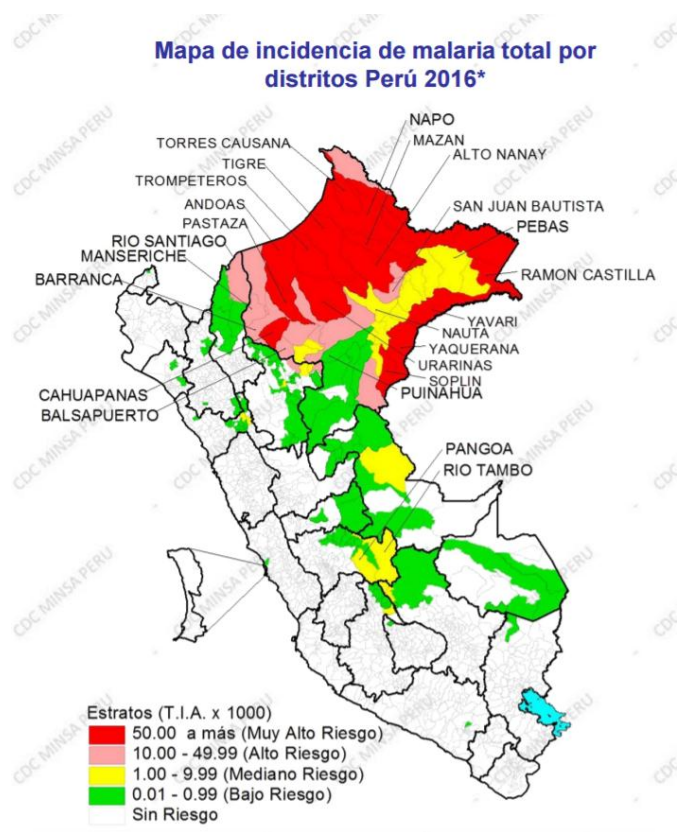
En esta región, los tres países con mayor número de casos reportados son Venezuela (30%), Brasil (24%) y Perú (19%). En Brasil, se ha reportado una disminución del 76,8% de casos en los últimos 15 años, con una frecuencia del 84% de infecciones causada por *P. vivax* (16). A pesar de este declive de casos clínicos de malaria, se ha reportado un incremento de la presencia de individuos infectados con *Plasmodium spp.*, pero que no presentan síntomas de la enfermedad (4,16–19) o con densidades parasitarias por debajo del límite de detección para las técnicas de diagnóstico rutinarias (20). Esta característica también se han reportado en otros países como en Guatemala (21); en

Venezuela donde se reporta una alta prevalencia del parásito, con un 24% de estos con infecciones asintomáticas (22); y en Perú se ha reportado también una alta presencia de individuos asintomáticos con bajas densidades parasitarias (23,24).

## **ii. Malaria en el Perú**

En el Perú, la distribución de la malaria se centra en la Región Amazónica con un total de 55 904 casos reportados en el país durante el 2016, donde el 96.6% de estos corresponden a la región de Loreto, clasificándola como una zona de alto riesgo, debido a la elevada incidencia del lugar, con 51.5 casos por cada mil habitantes; y 37 y 14.5 casos por mil habitantes para las especies *P. vivax* y *P. falciparum*, respectivamente (25). La transmisión en la región se caracteriza por tener periodos de altas tasas de infección en los meses de Febrero a Julio, debido a las temporadas de lluvia en la zona (24,26), y a la alta tasa de picadura del vector que transmite el parásito de la malaria en esta región, un mosquito de la especie *Anopheles darlingi* (24,27).

En los últimos años se ha reportado en esta región, que más del 70% de individuos infectados detectados por microscopia y/o PCR no presentan síntomas de la enfermedad (28,29), representando un problema serio al ser reservorios del parásito. También se observa que de este grupo de individuos asintomáticos, un 33% poseen una densidad parasitaria baja (24,28,29), lo cual hace difícil su detección con los métodos de diagnóstico de rutina y por ende no son tratados como corresponde manteniendo la transmisión de la enfermedad en esta región.



**Figura 2.** Incidencia de malaria en el Perú durante el 2016. Fuente: Ministerio de Salud – Dirección General de Epidemiología(25)

El manejo de la malaria en la Amazonía Peruana ha sido distinto en estos últimos años, en comparación a los otros países de las Américas. Entre el 2006-2010 hubo una buena respuesta a las medidas de control implementadas por el proyecto PAMAFRO (Control de malaria en zonas de frontera), financiado por el Fondo Global, disminuyendo la incidencia del parásito a 11.6 casos por cada mil habitantes (15,23,26). Sin embargo, al término del proyecto (2010-2011) hubo nuevamente un aumento del número de casos (15,23). Este resurgimiento pudo deberse a varios factores, la no continuidad de las medidas de control, el enfocarse solo en el diagnóstico y tratamiento de individuos que acuden a los centros de salud sin incluir a la gran proporción de individuos infectados con el parásito, pero que no presenta síntomas de la enfermedad, quienes se convierten en reservorios del parásito manteniendo la transmisión (24,30). Se puede incluir también la falla de las técnicas rutinarias de diagnóstico al no poder detectar infecciones con baja densidad parasitaria. (2,24,29,31).

Otro factor es la prevalencia y características de la especie presente en la región: *P. vivax* representa el 80% de los casos reportados y *P. falciparum* el 20% (15,25). En el caso de *P. vivax*, al poseer el estadio hipnozoito que se aloja en el hígado, los cuales al no ser eliminados completamente por el esquema de tratamiento actual, pueden producir nuevos episodios meses o años después de la primera infección (3,32). Por otro lado está *P. falciparum*, que a pesar de ser el parásito de menor incidencia en la Amazonía Peruana, también ha logrado evadir los tratamientos al no poder ser detectado por las PDRs basadas principalmente en HRP2 (9).

**Tabla 1.** Casos de Malaria por especies y por años en la Región Loreto entre el 2011 – 2015.

<b>Especies de <i>Plasmodium</i></b>	<b>2011</b>	<b>2012</b>	<b>2013</b>	<b>2014</b>	<b>2015</b>
<b><i>P. vivax</i></b>	9306	21183	35797	50717	47670
<b><i>P. falciparum</i></b>	2473	3965	7904	10375	12597
Notificados	11793	25148	43701	61093	60270

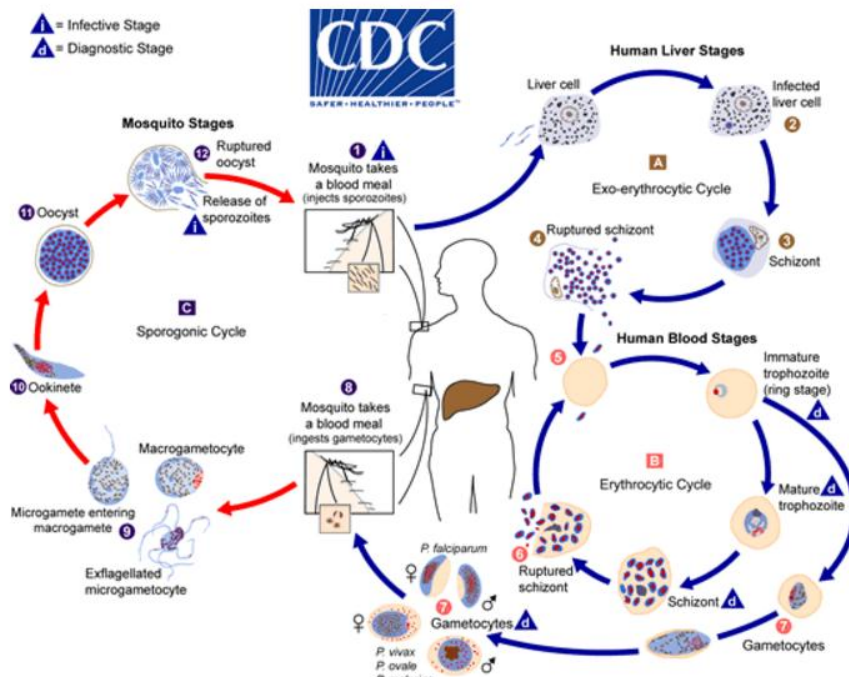
Fuente: Ministerio de Salud – Dirección General de Epidemiología (25)

### **iii. Ciclo de vida de *Plasmodium spp.***

El organismo Apicomplexa *Plasmodium* es un parásito metaxénico intracelular, que necesita de dos hospederos para completar su ciclo de vida. La transmisión se da por la picadura del mosquito hembra *Anopheles* (vector o primer hospedero). El parásito tiene como blanco los glóbulos rojos de los vertebrados hospederos (segundo hospedero) para completar su ciclo de vida. El ser humano puede ser infectado por 5 especies del parásito: *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. knowlesi* y *P. ovale*.

Para completar el ciclo de vida del parásito, el vector inocula los esporozoitos al segundo hospedero, a través de la picadura. El parásito ingresa al torrente sanguíneo para llegar a las células hepáticas, donde comienzan a duplicarse y posteriormente desarrollarse en esquizontes (ciclo exo-eritrocitario). En *P. vivax*

y *P. ovale*, existe un estadio llamado hipnozoitos, que se caracteriza por ser células que están en estado de dormancia dentro de las células hepáticas, las cuales pueden activarse y continuar su ciclo después de semanas o meses. Los merozoitos son liberados por medio de la ruptura de los esquizontes, volviendo a ingresar al torrente sanguíneo y comienzan a invadir a los glóbulos rojos desarrollándose en trofozoitos, dentro de la célula, los parásitos comienzan a dividirse y forman nuevos esquizontes (ciclo eritrocitario). Estos nuevos merozoitos son liberados y vuelven a infectar a otros glóbulos rojos, repitiendo el ciclo continuamente. Durante la maduración de los trofozoitos, estos pueden diferenciarse en gametocitos masculinos (microgametocitos) y gametocitos femeninos (macrogametocitos). Estos son ingeridos por el mosquito *Anopheles* durante su ingesta de sangre. Los gametocitos viajan al estómago del mosquito donde terminan de desarrollarse y se unen produciendo el cigoto. Este comienza a elongarse y tener movilidad volviéndose en ooquineto, invade las paredes intestinales del vector donde se multiplicará y desarrollará a oocisto. El oocisto sigue desarrollándose hasta romperse y liberar los esporozoitos, los cuales viajan hasta llegar a las glándulas salivales del vector, esperando a invadir nuevamente a otro hospedero, repitiendo el ciclo (33,34).



**Figura 3.** Ciclo de vida de *Plasmodium* spp. Fuente: Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) (33).

#### **iv. Cuadro Clínico**

La sintomatología clásica de infecciones por *Plasmodium* es la fiebre, la cual está asociada a la ruptura y liberación de los merozoitos durante el ciclo eritrocítico. También se presentan otros síntomas como escalofríos, sudoración, dolor de cabeza, náuseas y vómitos. A medida que la infección del parásito prosigue, se presenta un cuadro clínico clásico de la malaria, que consiste en un periodo corto de escalofríos, seguido de un aumento de la temperatura corporal por un par de horas como mínimo; y finalmente una caída de la fiebre con aumento de sudoración. La periodicidad del ciclo febril depende de la especie de *Plasmodium* infectante: *P. vivax* y *P. ovale*, producen fiebres cada 48 horas; *P. malariae*, cada 72 horas, *P. falciparum*, es variable entre 36 y 48 horas; y *P. knowlesi*, produce fiebre de forma diaria (35,36).

#### **v. Individuos Asintomáticos y baja densidad parasitaria**

A pesar del control contra el parásito, que se basa en el tratamiento de individuos que presentan la enfermedad, en zonas de baja de transmisión se han reportado la presencia de individuos que no acuden a los centros hospitalarios ya que no presentan cuadros de fiebre, siendo estos reservorios para futuras transmisiones.

Las razones que producen esta asintomatología pueden deberse a la respuesta inmune del hospedero. Una de las razones es la respuesta parcial contra el parásito en individuos que han tenido episodios previos de la enfermedad, controlando la densidad de parásitos circulantes a niveles que no produzcan síntomas, observándose principalmente en individuos adultos (1,37). Otra adaptación es la regulación de la respuesta inflamatoria del individuo, reduciendo los niveles de señales inflamatorias y/o aumentando señales reguladoras de inflamación (1).



La reducción de la densidad parasitaria en individuos asintomáticos, puede ser un inconveniente al momento de realizar el diagnóstico; debido a que a la concentración de parásitos presentes en la sangre está por debajo del límite de detección de los métodos de diagnóstico rutinarios. Es más, en regiones de baja transmisión se ha observado que una gran proporción de individuos asintomáticos presentan bajas densidades parasitarias (2,37), por lo que se tendrá que recurrir a métodos más sensibles que detecten concentraciones mínimas.

## **vi. Métodos de diagnóstico**

### **1. Métodos de diagnóstico estándar**

La prueba de detección estándar a nivel global es la microscopía, que consiste en la tinción de una muestra de sangre colocada en una lamina de vidrio con colorante Giemsa para observar los estadios de trofozoito, esquizontes y gametocitos del parásito (31,33). Esta técnica tiene dos variantes con objetivos complementarios a la hora de realizar el diagnóstico. La microscopía por gota gruesa, cuyo nombre indica, se emplea una gota de sangre la cual es secada y posteriormente se le realiza la tinción. Este procedimiento permite observar una mayor cantidad a los parásitos ya que la muestra esta concentrada en una área de 1cm de diámetro; pero no se puede distinguir fácilmente a la especie ya que, al momento de la tinción, los glóbulos rojos comienzan a lisarse debido a que se encuentran en un medio hipotónico, liberando a los parásitos sin las estructuras características de cada especie. La otra variante complementaria es el frotis de sangre, donde se usa una cantidad menor de sangre, que es fijada con metanol permitiendo mantener las células intactas, por lo que se podrán observar a los parásitos dentro de los glóbulos rojos con sus características que diferencian a cada especie (38,39).

La microscopia es una técnica sencilla para identificar y cuantificar la cantidad de parásitos presentes en una muestra de sangre; pero está limitada por el entrenamiento del personal técnico, las condiciones del equipo (microscopio), el lugar donde se realiza el diagnóstico y tiende a fallar en densidades parasitarias

menores a 100 parásitos/ $\mu$ L (6,8,39,40). Adicionalmente, este método de diagnóstico al ser aplicable solo en centros de salud, los individuos que presenten los síntomas clásicos de malaria acudirán a estos lugares; pero no los individuos asintomáticos, por lo que no serán tratados y serán reservorios para posteriores transmisiones.

Otra técnica que se emplea para cubrir este inconveniente y diagnosticar a individuos que estén en áreas rurales alejadas, son las pruebas de diagnóstico rápido (PDR). Estas pruebas consisten en una inmunocromatografía, que detecta los antígenos del parásito. Las PDR emplean dos marcadores, para la detección de *Plasmodium*, se emplean antígenos contra la proteína Lactato Deshidrogenasa (LDH), mientras que para diferenciar infecciones de *P. falciparum*, se detecta la Proteína rica en Histidina 2 (HRP2) (5,38,39,41).

Las ventajas de esta técnica de diagnóstico son el fácil manejo, ya que no requiere una capacitación sofisticada, los resultados son rápidos ya que pueden obtenerse en menos de 20 minutos y la versatilidad de usarse en un centro de salud por técnicos de laboratorio como en comunidades rurales por promotores de salud o líderes comunitarios. Sin embargo, estas son solo empleadas cuando existen proyectos de control que financien su compra. A pesar de que la diferencia de costo de ambas pruebas sea de 1.2 dólares (42), a favor de las pruebas rápidas; el costo total que se emplearía para realizar el diagnóstico en una población grande sería elevada para financiarlo, además de tener un límite de detección de 200 a 500 parásitos/ $\mu$ L, lo que lo haría similar o menos sensible que la técnica de microscopía, por lo que no puede emplearse en individuos con baja densidad parasitaria (5,10,43). Adicionalmente, las PDRs presentan un inconveniente en el diagnóstico de *P. falciparum*, ya que estas al basarse en la detección de la proteína HRP2 no han podido ser detectados en ciertas regiones, como la Amazonia Peruana, debido a la existencia de una gran proporción de parásitos que carecen del gen que expresa a esta proteína (9).

## 2. Métodos de diagnóstico molecular

Para detectar a individuos asintomáticos y/o con baja densidad parasitaria es necesario emplear métodos más sensibles, por lo que se han venido desarrollando técnicas de diagnóstico molecular como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en Inglés) para la detección de ADN de estos parásitos en sangre. La PCR consiste en una reacción cíclica de duplicación de una secuencia de ADN específica usando como sustrato principal una cantidad de ADN proveniente de un organismo. En el caso de detectar al parásito, se busca amplificar una secuencia que sea específica al parásito y conservada a la vez para poder detectar a las distintas especies que infectan al hombre. Entre las secuencias que se usan para la detección están las secuencias mitocondriales y ribosomales del parásito.

Existen distintas variantes de PCR empleadas para detectar la presencia de parásitos de *Plasmodium* entre las que destacan el PCR nested o anidado (nPCR), que es considerada la prueba molecular estándar, ya que se amplifica una secuencia que se ubica dentro de otra que previamente ha sido amplificada. Esta técnica es altamente sensible y específica, detectando como secuencia diana la región 18S rDNA del parásito (13,39), que tiene como ventaja la de poseer variaciones entre especies permitiendo su identificación (44–46). Esta prueba tiene como límite de detección densidades parasitarias que van desde 0.1 parásitos/μL hasta 1 parásito/μL para detectar *Plasmodium spp.* (11,47,48); y 0.1 a 50 parásitos/μL y 0.1 a 3 parásitos/μL para los casos de *P. vivax* y *P. falciparum* respectivamente (11,46).

También está la PCR en Tiempo Real o PCR cuantitativo (qPCR), útil no solo para la detección sino también para la cuantificación de la carga parasitaria (12,49,50). Esta variante, al igual que la anterior, es una amplificación de una secuencia que en este caso es cuantificable debido al uso de marcadores como fluoróforos (12,50) que se unen a la doble hebra de ADN formada o sondas que son específicas a una determinada secuencia, permitiendo aumentar la sensibilidad de la prueba (51,52). La secuencia ribosomal 18S rDNA del parásito también es empleada para este tipo de método, con un límite de detección entre 0.05 y 5 parásitos/μL (11,12,53,54). Adicionalmente se están usando secuencias

que también dan un buen diagnóstico, pero el inconveniente es que solo detecta *Plasmodium spp*, como el caso del uso de secuencias mitocondriales (PgMt; por “Pan genomic mitochondrial sequence”), en las cuales se emplean secuencias consenso para los cinco parásitos que infectan al humano o también la secuencia del citocromo oxidasa b (55,56).

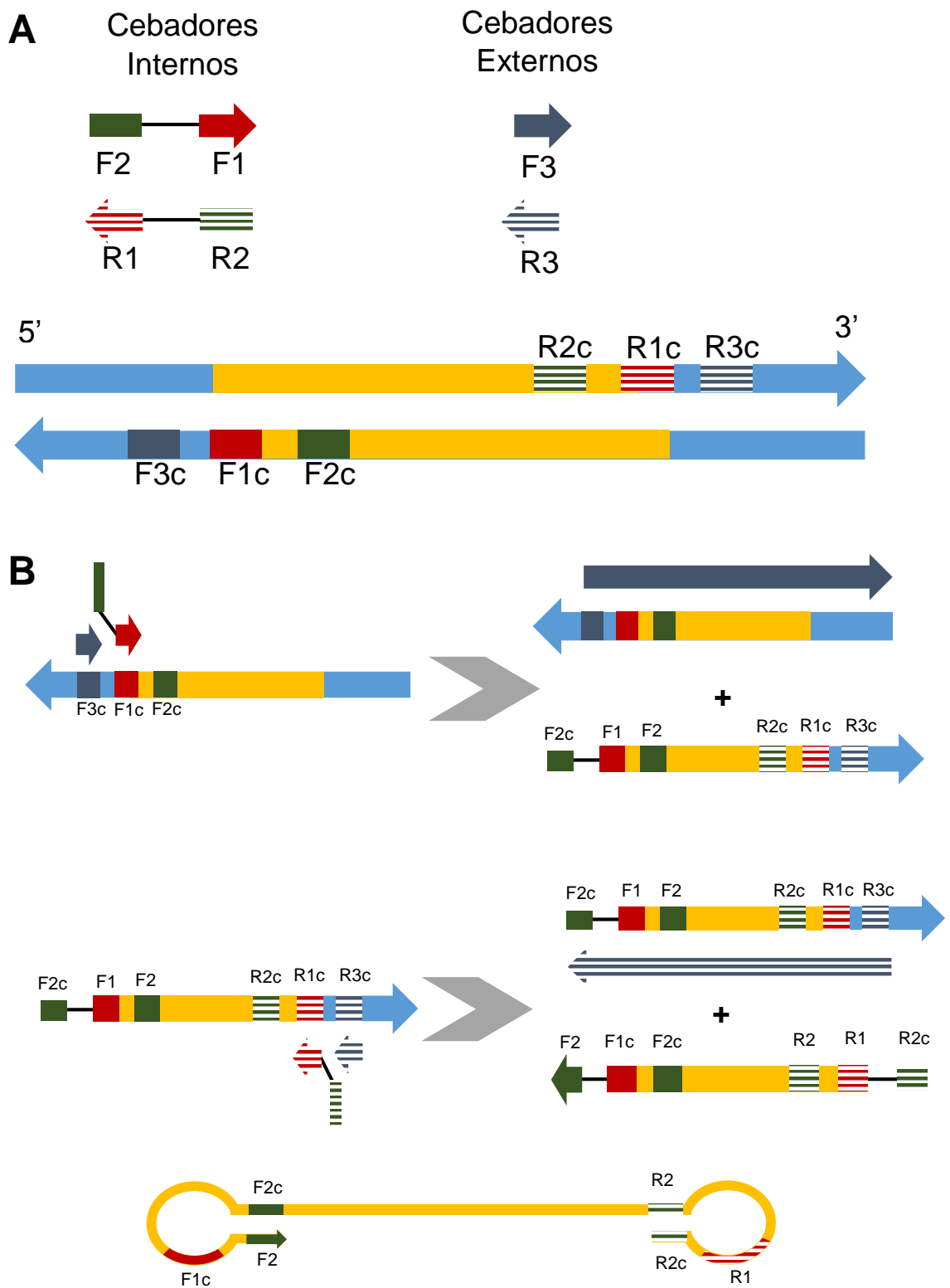
### 3. LAMP

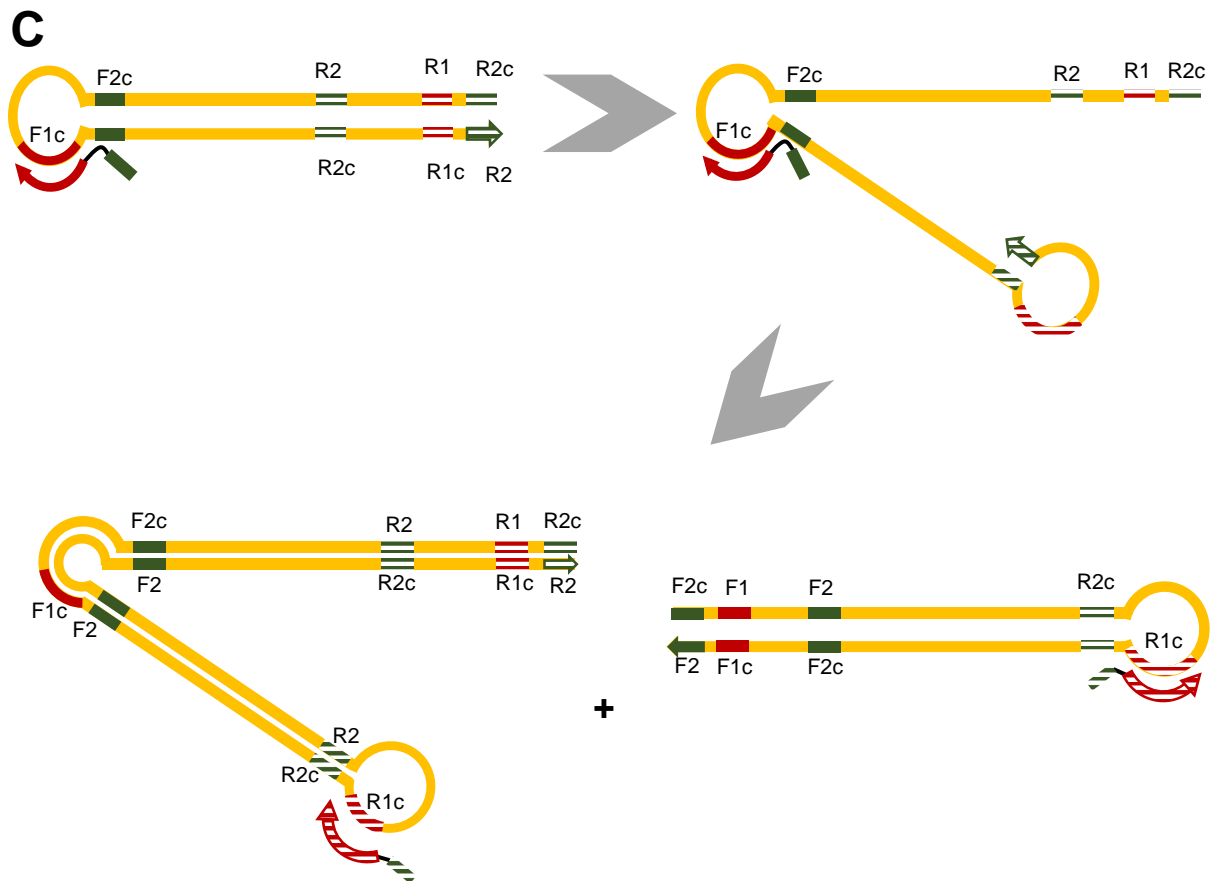
La Amplificación Isotérmica Mediada por Horquillas (LAMP, por sus siglas en inglés) es una variante de las PCR isotermales que ha generado mayor interés debido a su fácil manejo y bajo requerimiento técnico. Se caracteriza por realizar una mayor amplificación de ADN que un PCR convencional (hasta  $10^9$  copias) en un menor tiempo debido a su diseño (57), que consiste en reconocer seis secuencias del genoma mitocondrial del parásito (58) en base a 2 juegos de cebadores. El par de cebadores internos (F1, F2, R1 y R2) se caracteriza por poseer dos secuencias de reconocimiento; una que inicia la amplificación de la secuencia diana, y otra secuencia que es complementaria a una región interna del fragmento amplificado que se ubica cerca del cebador, permitiendo la formación de una horquilla. El otro par de cebadores (F3 y R3), llamados cebadores externos, se encuentran en menor concentración que los internos y se ubican fuera de la secuencia diana y son empleados para desplazar los productos amplificados por los cebadores internos (Figura 4A).

El proceso de reacción se divide en dos fases, donde se emplea una polimerasa proveniente del *Bacillus stearothermophilus* (Bst) que se caracteriza por realizar amplificaciones con desplazamiento de cadena, es decir permite realizar las reacciones de amplificación en cadenas de doble hebra, produciendo al final una hebra simple y otra doble. El proceso inicial, donde los cebadores internos comienzan a amplificar la secuencia diana y este producto posteriormente es desplazado por la amplificación realizada por el cebador externo, produciendo al final una hebra simple y otra doble. La hebra simple desplazada es empleada por otro cebador externo y el producto amplificado nuevamente es desplazado

por la amplificación de otro cebador externo, produciendo nuevamente una hebra doble y una hebra simple. Esta última se autohibrida en los dos extremos debido a las regiones complementarias causada por el cebador interno (Figura 4B). La región 3' de la hebra autohibridada se terminará de amplificar, formando el producto que es empleado en la siguiente fase del proceso.

El paso siguiente es la amplificación mediada por las horquillas, en donde solo se emplean los cebadores internos. Este proceso se inicia en la región libre de la horquilla del producto formado en el paso anterior. Un cebador interno comenzará a amplificarse y en ese proceso abrirá la horquilla, provocando que la doble hebra formada se separe. Esta separación causa que se forme una horquilla en uno de los extremos de la cadena separada, debido a las regiones complementarias que posee; la cual comenzará a amplificarse y desplazará la primera amplificación producida por el cebador interno. Obteniéndose como resultado una hebra del doble de tamaño y otra del mismo tamaño que la inicial, pero con una horquilla en el otro extremo de la cadena. Estos dos productos pasan por el mismo proceso continuamente produciéndose al final varios productos de distintos tamaños y las hebras iniciales (Figura 4C).





**Figura 4.** Representación esquemática del mecanismo de LAMP. La reacción tiene como secuencia blanco la región mitocondrial del parásito. Colores sólidos: secuencias *forward* de los cebadores. Colores con rayado: secuencias *reverse* de los cebadores. **A.** Esquema de cebadores y ubicación de secuencias de reconocimiento. **B.** Amplificación inicial de producción de hebras con horquillas **C.** Amplificación mediada por horquillas.

Otro beneficio de esta técnica es el requerimiento mínimo de capacitación del personal y/o empleo de equipos, ya que al ser un método que se realiza a temperatura constante (60°C - 65°C), no requiere del equipo complejo que necesita un PCR tradicional (59). Además, está la alta producción del subproducto magnesio pirofosfato, el cual se caracteriza por ser una molécula insoluble, es la que hace el diagnóstico más simple, ya que permite detectar de forma visual la turbidez de la reacción (59,60). También se puede mejorar este diagnóstico empleándose una sustancia que interactúe con el pirofosfato como un fluoróforo permitiendo un diagnóstico más sencillo, ya que se puede realizar

de forma visual o también empleando equipos como una lámpara UV, observándose una detección de hasta 5 parásitos/ $\mu$ L (61,62).

Es así que esta técnica ha sido reportada en diversas regiones endémicas con una sensibilidad mayor a la microscopia y en algunos casos mayores a las variantes de Nested y PCR en tiempo real. En regiones de alta transmisión como África, se han reportado sensibilidades desde el 95% (63–66). En el caso de Asia, estudios en individuos sintomáticos mostraron una sensibilidad del 90% (67–69), pero esta cae al 71% cuando se realiza en individuos asintomáticos (67). En un estudio realizado en Colombia, se observó una sensibilidad del 100% y 91.4% en detectar *P. falciparum* y *P. vivax* respectivamente, con un 98% de estos casos pertenecientes a individuos asintomáticos (14).

## **vii. Justificación del estudio**

La malaria en la Región Amazónica del Perú es una enfermedad que se caracteriza por ser una infección con alta proporción de individuos asintomáticos y/o con baja densidad parasitaria, que no pueden ser identificados por las pruebas diagnósticas de rutina. Existen otras pruebas de diagnóstico más sensibles, pero son muy costosas y complejas para emplearlas en tamizajes a nivel de toda la población en riesgo. Por consiguiente, para detectar individuos que están infectados con el parásito y no presenten síntomas de la enfermedad o que los parásitos estén en densidades bajas, se debe utilizar un método de diagnóstico sensible pero no muy complejo. La alta practicidad y sensibilidad reportada por LAMP aún no ha sido evaluada en escenarios de baja transmisión como nuestra Amazonia, por lo tanto este trabajo busca validar la prueba LAMP para identificar individuos infectados con malaria pero asintomáticos en comparación con las pruebas de PCR.



### **III. Pregunta de investigación**

Validar la prueba LAMP para la detección de individuos asintomáticos infectados con *Plasmodium*, comparándolos con pruebas moleculares tipo PCR.

### **IV. Objetivos**

#### **i. Objetivo General**

Determinar la sensibilidad de LAMP en comparación con nPCR, qPCR-18S, y qPCR-PgMt.

#### **ii. Objetivos Específicos**

- Determinar la especie del parásito a partir de sangre en papel filtro por medio de nPCR, qPCR-18S y qPCR-PgMt.
- Determinar la sensibilidad y especificidad del método LAMP en comparación con nPCR, qPCR-18S y qPCR-PgMt en la detección de *Plasmodium*.
- Determinar la sensibilidad del método LAMP en relación a la densidad parasitaria comparándola con qPCR-18S en la detección de *Plasmodium*.

### **V. Materiales y métodos**

#### **1. Consentimiento ético**

Todas las muestras provinieron del proyecto “Amplificación isotérmica mediada por horquilla (LAMP) para buscar malaria asintomática y creación de un banco de muestras”, Código SIDISI 63991, el cual cuenta con aprobación por el comité de ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Este proyecto fue financiado por FIND (Foundation for Innovative New Diagnostics).

#### **2. Área de estudio**

Las muestras recolectadas provienen de 11 comunidades localizadas en dos regiones en la región de Iquitos (Figura 5). Nueve comunidades se ubican alrededor del río Nanay; y se caracterizan por ser poblados que

están cercanos a la carretera Iquitos-Nauta (única carretera en esta región). Las otras dos comunidades se ubican en el distrito de Mazán, siendo estas de difícil acceso (solo por río), además de no tener acceso directo a centros de salud.



**Figura 5.** Localización de las comunidades que forman parte del estudio. La mayor parte se ubica en las cercanías del río Alto Nanay; mientras que dos se ubican en el distrito de Mazán.

### 3. Selección de muestras

Un total de 1157 participantes mayores de 3 años que no presentaron síntomas de la enfermedad durante los últimos 7 días previos a la toma de muestra y que no hubieran recibido terapia antimalárica en las últimas 4 semanas fueron seleccionados de las 11 comunidades (Tabla 2), los

cuales fueron diagnosticados por microscopía y LAMP. Todas las muestras que resultaron positivas por LAMP fueron incluidas para validarlas con las pruebas de PCR, sumando un total de 255. Adicionalmente, 248 muestras que representan un 30% de las muestras negativas fueron seleccionadas de forma aleatoria. Para el diagnóstico por los métodos moleculares, el procesamiento fue realizado en ciego, sin conocerse el resultado del diagnóstico realizado en las comunidades (LAMP y microscopia).

**Tabla 2:** Lista de comunidades, número de muestra y fecha de muestreo.

Comunidad	Provincia	Población	N	N positivos	N negativos	Fecha de muestreo
<b>Tarapoto (TA)</b>	Iquitos	210	84	63	21	Junio y Agosto, 2015
<b>Huaturi (HU)</b>	Iquitos	130	49	23	26	Abril y Junio, 2015
<b>San Pedro (SP)</b>	Iquitos	260	63	43	20	Mayo 2015
<b>Santa Rita (SR)</b>	Iquitos	480	29	14	15	Mayo y Junio, 2015
<b>San Pablo de Cuyana (SC)</b>	Iquitos	115	54	40	14	Julio 2015
<b>Loboyacu (LO)</b>	Iquitos	87	13	4	9	Julio 2015
<b>Santa Sofía (SS)</b>	Iquitos	50	8	7	1	Julio 2015
<b>Laguna Azul (LA)</b>	San Juan	375	22	3	19	Abril y Agosto, 2015
<b>Santa Clara de Nanay (SN)</b>	San Juan	1836	31	3	28	Abril a Mayo, 2015
<b>12 de Mayo (12M)</b>	San Juan	216	26	0	26	Mayo 2015
<b>Unión (UN)</b>	San Juan	720	27	3	24	Mayo 2015

<b>Urcomiraño (UM)</b>	Mazán	267	46	13	33	Junio 2015
<b>Libertad (LI)</b>	Mazán	264	51	39	12	Junio a Julio, 2015
<b>TOTAL</b>		5010	503	255	248	

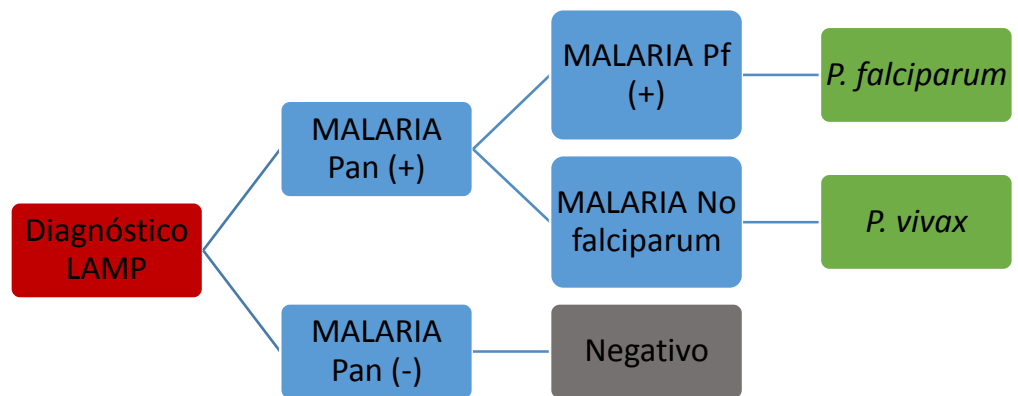
#### 4. Extracción de ADN

Las muestras tomadas en el campo fueron almacenadas a -20°C hasta su uso. En el laboratorio se extrajo el ADN de las muestras seleccionadas mediante el protocolo que incluye el kit E.Z.N.A® Blood DNA Mini Kit, cambiando el buffer BL y proteasa del kit por ATL y proteinasa K (buffers de Qiagen) (Ver Anexo A).

#### 5. Diagnósticos de las muestras

##### 5.1 Determinación del parásito por LAMP

El proceso de detección del parásito por LAMP se realizó en campo siguiendo el protocolo que se incluye en el LoopAmp MALARIA Pan/Pf detection kit (LMC 562, Eiken Chemical Co., Ltd. Tokyo, Japan) (Ver Anexo B). El kit incluye dos reacciones, una para la detección del género *Plasmodium* (MALARIA Pan), que tuvo como blanco una secuencia mitocondrial consenso para los cinco parásitos infectantes; mientras que la reacción MALARIA Pf, estuvo diseñada para detectar una secuencia mitocondrial específica contra *P. falciparum*. El diagnóstico de las muestras se realizó en base a lo descrito en la Figura 6.



**Figura 6.** Flujograma del diagnóstico por muestras realizadas por la técnica de LAMP

## 5.2 Detección del parásito por nested PCR (nPCR).

Se realizó según el protocolo de Singh, *et. al* (13) con unas variaciones en las temperaturas de hibridación. El proceso consistió en una reacción externa en 45  $\mu$ L de volumen final que contenía 1X Buffer de reacción, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTPs, 1 unidad de AccuStart Taq DNA Polymerase, 444 nM de cada cebador (F: 5-TCAAAGATTAAGCCATGCAAGTGA-3; R: 5-CCTGTTGTTGCCTTAAACTCC-3) y se usó 5  $\mu$ L de muestra. Las condiciones de PCR consistieron en una denaturación inicial a 95°C por 5 minutos, seguida por una amplificación por 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 1 minuto a 62°C, y 1 minuto a 72°C; y una extensión final a 72°C por 4 minutos. Los productos obtenidos fueron diluidos 100 veces y se realizaron las reacciones internas.

Para detectar la presencia del parásito se siguió basando en el trabajo de Singh, *et. al* (13). Se hizo una reacción a un volumen final de 25  $\mu$ L que contenía 1X Buffer de reacción, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTPs, 1 unidad de AccuStart Taq DNA Polymerase, 400 nM de cada cebador según indica el autor (F: 5-TTTTATAAGGATAACTACGGAAAAGCTGT-3; R: 5-TACCCGTCATAGCCATGTTAGGCCAATACC-3) y se empleó 5  $\mu$ L de muestra diluida de la reacción externa. Las condiciones de PCR

consistieron en una denaturación inicial a 95°C por 5 minutos, seguido por una amplificación por 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 25 segundos a 62°C, y 25 segundos a 72°C; y una extensión final a 72°C por 4 minutos.

Para determinar la especie de *Plasmodium* se realizó el mismo protocolo de reacción interna (13) , cambiando los cebadores por los propios de cada parásito (Tabla 3) y cambiando la temperatura de hibridación a 65°C.

**Tabla 3.** Secuencia de los cebadores para la determinación de especie de *Plasmodium*, según Singh, *et. al.*

Especie	Cebador	Secuencia	Tamaño esperado
<i>P. falciparum</i>	rFAL1	5'-TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT -3'	205
	rFAL2	5'-ACACAATGAACTCAATCATGACTACCCGTC- 3'	
<i>P. vivax</i>	rVIV1	5'- CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC-3'	117
	rVIV2	5'- ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTAA-3'	

### 5.3 Detección del parásito por PCR en Tiempo Real

#### 5.3.1 Detección de *Plasmodium spp* (qPCR-PgMt).

Se realizó según Polley, *et. al* (55); el cual consistió en una reacción en 20 µL de volumen final que contendrá 1X Buffer de reacción PerfeCTa® SYBR® Green FastMix (MgCl<sub>2</sub>, dNTPs AccuFast Taq DNA Polymerase, SYBR Green I dye, y estabilizadores), 100 nM de cada cebador usados por Haanshuss, *et. al* (48) (F: 5-TCGCTTCTAACGGTGAAC-3; R: 5-AATTGATAGTATCAGCTATCCATAG -3) y 5 µL de muestra. Los cebadores empleados tienen como secuencia diana una secuencia mitocondrial consenso que detecta las 5 especies de *Plasmodium spp.* que infectan al humano. Las condiciones de PCR consistieron en una denaturación inicial a 95°C por 2 minutos, seguido por una amplificación por 50 ciclos de 15

segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C, y 30 segundos a 68°C con adquisición continua de imagen, luego una extensión a 68°C por 1 minuto y 30 segundos. Finalmente una curva de hibridación o *melting* desde 7°C hasta 90°C con incremento de 0.5°C y adquisición de imagen cada 5 segundos. Los valores de Cq y Tm fueron otorgados por el software Bio-Rad CFX96TM Manager.

### **5.3.2 Detección y diferenciación de especies de *Plasmodium* (qPCR-18S).**

El trabajo se basó en el protocolo de Mangold, *et. al* (12); el cual se realizó una reacción en 25 µL de volumen final que contendrá 1X Buffer de reacción PerfeCTa® SYBR® Green FastMix (MgCl<sub>2</sub>, dNTPs AccuFast Taq DNA Polymerase, SYBR Green I dye, y estabilizadores), 300 nM de cada cebador (F: 5-TAACGAACGAGATCTTAA-3; R: 5-GTTCCTCTAAGAAGCTTT-3) y 5 µL de muestra. Los cebadores amplifican la secuencia 18S DNA del parásito, que se utiliza frecuentemente para diferenciar e identificar especies. Las condiciones de PCR consistieron en una denaturación inicial a 95°C por 2 minutos, seguido por una amplificación por 45 ciclos de 20 segundos a 95°C, 20 segundos a 52.0°C, y 30 segundos a 68°C con adquisición continua de imagen, luego una extensión a 68°C por 3 minutos. Finalmente una curva de hibridación o *melting* desde 65°C hasta 90°C con incremento de 0.5°C y adquisición de dato cada 5 segundos. Los valores de Cq y Tm fueron otorgados por el software Bio-Rad CFX96TM Manager. Los parásitos *P. vivax* y *P. falciparum* se diferencian por el contenido de GC que posee la región amplificada; siendo este último un valor de Tm menor.

## 6. Cuantificación de la densidad parasitaria

Se empleó una curva estándar con controles con una densidad parasitaria conocida (24500, 2450, 245, 24.5 y 2.45 parásitos/ $\mu$ L). Esta curva fue usada para la cuantificación de la carga parasitaria en las reacciones de PCR en Tiempo Real.

## 7. Análisis estadístico

Se realizó el cálculo de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN) de la prueba LAMP con un intervalo de confianza del 95% (Tabla 4), tomando como referencia las otras técnicas moleculares. También se realizó la sensibilidad en base a la densidad parasitaria.

**Tabla 4.** Cálculo de sensibilidad, especificidad, Valor Predictivo Positivo, Valor Predictivo Negativo.

	Referencia Positiva	Referencia Negativa
LAMP positivo	a	b
LAMP negativo	c	d
Sensibilidad: $a / (a+c)$		Especificidad: $d / (d+b)$
Valor Predictivo Positivo: $a / (a+b)$	Valor Predictivo Negativo: $d / (c+d)$	

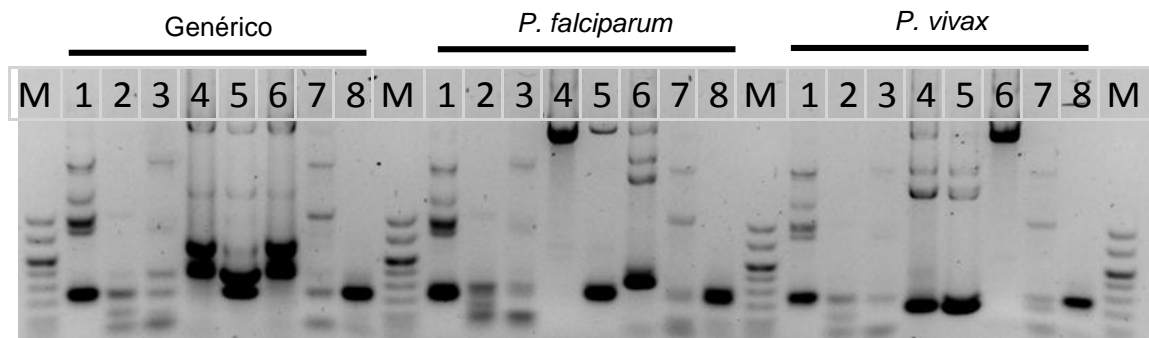
## VI. Resultados

### Estandarización del PCR anidado (nPCR)

Inicialmente se realizó el diagnóstico por nPCR siguiendo el procedimiento de Singh, *et. al*; sin embargo, se observó que las amplificaciones resultantes producían demasiadas inespecificidades que no permitía una diferenciación del producto deseado (Figura 7). Por lo que se decidió aumentar la temperatura de hibridación a 62°C y 65°C en los casos de la reacción de PCR externa y la



reacción de PCR que determina la especie, respectivamente, mejorando la especificidad (Ver Anexo C).



**Figura 7.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. **Carriles 1, 2 y 3:** Controles Negativos (Sangre sin parásitos). **4:** Control *P. vivax* 10 parásitos/ $\mu$ L. **5:** Control *P. vivax* 1 parásito/ $\mu$ L. **6:** Control *P. falciparum* 24.5 parásitos/ $\mu$ L. **7:** Control *P. falciparum* 2.45 parásitos/ $\mu$ L. **8:** Blanco.

### **Las técnicas moleculares de PCR detectan la misma proporción de muestras positivas que LAMP**

En el área de estudio se diagnosticaron 57 muestras como positivas a malaria por microscopía, mientras que por LAMP, 255 resultaron positivas para *Plasmodium*. De las muestras negativas, 248 fueron seleccionadas al azar para los análisis posteriores. En el laboratorio se realizó el diagnóstico molecular a 503 muestras de sangre impregnadas en papel filtro (como detalle anteriormente). Se observó que la técnica de qPCR-PgMt fue la que detectó la mayor cantidad de casos de infecciones de *Plasmodium* con 249 infecciones positivas y 254 negativas. El qPCR-18S detectó una cantidad ligeramente menor con 239 y 264 casos positivos y negativos respectivamente. A pesar de lograr estandarizar la técnica de nPCR, se observó que el límite de detección aumentó ligeramente a causa de las modificaciones realizadas, obteniéndose como resultado una detección de solo 136 casos positivos y 367 negativos, por lo que se decidió retirar esta técnica para posteriores análisis (Tabla 5).

**Tabla 5.** Detección del parásito *Plasmodium* por tipo de prueba de diagnóstico.

	Microscopía	nPCR	qPCR-PgMt <sup>1</sup>	qPCR-18S	LAMP
<i>P. vivax</i>	51	105	-	205	220 <sup>2</sup>
<i>P. falciparum</i>	5	16	-	33	35
Infección mixta	1	1	-	1	-
Otros <sup>3</sup>	-	14	-	-	-
<i>Plasmodium spp.</i>	57	136	254	239	255
Negativo	446	367	249	264	248
<b>TOTAL</b>	<b>503</b>	<b>503</b>	<b>503</b>	<b>503</b>	<b>503</b>

1. qPCR-PgMt solo detecta la presencia del parásito, mas no puede diferenciar la especie presente.

2. Detección de *P. vivax* determinado por infecciones *Plasmodium* NO *falciparum*.

3. Infecciones causadas por otras especies de *Plasmodium*.

### **LAMP posee una alta sensibilidad para detectar *Plasmodium spp.*, pero no las especies**

El siguiente procedimiento fue el análisis de la sensibilidad y especificidad que tiene la prueba de LAMP para detectar al parásito en comparación a las otras pruebas moleculares. En primer lugar se realizó la detección del género *Plasmodium spp.* observándose una alta sensibilidad para detectar al parásito, 92.1% (IC: 88.1% – 95.1%) y 92.5% (IC: 88.4% – 95.5%) al compararlos con las técnicas de qPCR-PgMt y qPCR-18S, respectivamente (Tabla 6). En el caso de la especificidad, al compararlo con qPCR-PgMt, la técnica pudo discriminar a un alto porcentaje de muestras negativas, 91.6% (87.4% – 94.7%); sin embargo, este porcentaje baja a 87.1% (82.5% – 90.9%) al comparársela con la qPCR-18S.

Por otro lado, el valor predictivo positivo de LAMP es mayor al compararlo con qPCR-PgMt con un valor del 91.8% (IC: 87.7% - 94.8%), mientras que al calcularlo en base al qPCR-18S, este es 86.7% (IC: 82.9% - 90.6%). En el caso del valor predictivo negativo, este resulta ser alto para ambos métodos con valores de 91.9% (IC: 87.8% - 95%) y 92.7% (IC: 88.8% - 95.6%), en base a qPCR-PgMt y qPCR-18S respectivamente.

**Tabla 6.** Sensibilidad y Especificidad de LAMP para detectar *Plasmodium spp.* con un intervalo de confianza del 95%.

	qPCR-Pgmt		Total	qPCR-18S		Total
	Positivo	Negativo		Positivo	Negativo	
<b>LAMP</b>						
<b>Positivo</b>	234	21	255	221	34	255
<b>Negativo</b>	20	228	248	18	230	248
<b>Total</b>	254	249	503	239	264	503
<b>Sensibilidad</b>	92.1% (88.1% – 95.1%)		92.5% (88.4% – 95.5%)			
<b>Especificidad</b>	91.6% (87.4% – 94.7%)		87.1% (82.5% – 90.9%)			
<b>VPP</b>	91.8% (87.7% – 94.8%)		86.7% (82.9% – 90.6%)			
<b>VPN</b>	91.9% (87.8% – 95.0%)		92.7% (88.8% – 95.6%)			

Posteriormente se hizo el análisis en base a las especies de la región en base al qPCR-18S. En general, LAMP no posee una sensibilidad alta para detectar a las especies de *Plasmodium*. Se observó que la sensibilidad de la prueba para detectar a los parásitos fue del 87.9% (IC: 82.6% - 92%) para *P. vivax* (Tabla 7); mientras que para *P. falciparum*, fue del 76.5% (IC: 58.8% – 89.3%) (Tabla 8). En cuanto a la especificidad, se obtuvo para el caso de *P. falciparum*, un valor del 98.1% (IC: 96.4% – 99.1%). Este resultado disminuye a un 86.9% (IC: 82.5% – 90.5%), para el caso de *P. vivax*.

**Tabla 7.** Sensibilidad y Especificidad de LAMP para detectar *Plasmodium vivax*. con un intervalo de confianza del 95%.

	qPCR-18S		Total
	Positivo	Negativo	
<b>LAMP</b>			
<b>Positivo</b>	181	39	220
<b>Negativo</b>	25	258	283
<b>Total</b>	206	297	503
<b>Sensibilidad</b>	87.9% (82.6% – 92.0%)		
<b>Especificidad</b>	86.9% (82.5% – 90.5%)		
<b>VPP</b>	82.3% (76.6% – 87.1%)		
<b>VPN</b>	91.2% (87.2% – 94.2%)		

En el caso de los valores predictivos de la técnica, LAMP tiene una mayor probabilidad de descartar infecciones por *Plasmodium*, con valores de 91.2% (IC: 87.2% – 94.2%) y 98.3% (IC: 96.7% – 99.3%) para los casos de *P. vivax* y *P. falciparum* respectivamente; pero con probabilidades del 82.3% (IC: 76.6% – 87.1%) y 74.3% (IC: 56.7% – 87.5%) para infecciones de *P. vivax* y *P. falciparum* respectivamente.

**Tabla 8.** Sensibilidad y Especificidad de LAMP para detectar *Plasmodium falciparum*. con un intervalo de confianza del 95%.

	qPCR-18S		Total
	Positivo	Negativo	
LAMP Positivo	26	9	35
LAMP Negativo	8	460	468
Total	34	469	503
Sensibilidad	76.5% (58.8% – 89.3%)		
Especificidad	98.1% (96.4% – 99.1%)		
VPP	74.3% (56.7% – 87.5%)		
VPN	98.3% (96.7% – 99.3%)		

**LAMP detecta *P. falciparum* a densidades parasitarias mayores a 10 parásito/μL de sangre.**

Se empleó una curva de calibración de controles con concentraciones conocidas en la qPCR-18S para extrapolar las densidades parasitarias de las muestras, permitiendo determinar la sensibilidad que tiene la prueba LAMP frente a estas cargas parasitarias. El análisis se hizo en base a cuatro grupos: muestras menores a 1 parásito/μL; entre 1 y 10 parásitos/μL; 10 y 100 parásitos/μL y mayores a 100 parásitos/μL.

A densidades menores a 1 parásito/μL, LAMP posee una sensibilidad poco eficiente para detectar a los parásitos, con un 80% (IC: 51.9% – 95.7%) y 81% (IC: 48.2% - 97.7%) para los casos de *Plasmodium spp.* y *P. vivax* respectivamente; mientras que para el caso de *P. falciparum*, LAMP no es capaz

de detectarlo (Tabla 9). Sin embargo, a densidades superiores a esta, la técnica comienza a detectar correctamente a los parásitos.

**Tabla 9.** Sensibilidad de LAMP en detectar *Plasmodium*. a distintas densidades parasitarias con un intervalo de confianza del 95%.

Densidad Parasitaria	Proporción	Sensibilidad
<b>&lt;0;1] parásito/μL</b>		
<i>Plasmodium spp.</i>	12/15	80% (51.9% - 95.7%)
<i>P. vivax</i>	9/11	81% (48.2% - 97.7%)
<i>P. falciparum</i>	0/3	-
<b>&lt;1;10] parásitos/μL</b>		
<i>Plasmodium spp.</i>	129/136	94.9% (89.7% - 97.7%)
<i>P. vivax</i>	107/116	92.2% (85.8% - 96.4%)
<i>P. falciparum</i>	15/20	75% (50.9% - 91.3%)
<b>&lt;10;100] parásitos/μL</b>		
<i>Plasmodium spp.</i>	54/58	93.1% (83.3% - 98.1%)
<i>P. vivax</i>	45/53	84.9% (72.4% - 93.3%)
<i>P. falciparum</i>	5/5	100% (47.8% - 100%)
<b>&gt;100 parásitos/μL</b>		
<i>Plasmodium spp.</i>	26/30	86.7% (69.3% - 96.2%)
<i>P. vivax</i>	20/25	80% (59.3% - 93.2%)
<i>P. falciparum</i>	5/5	100% (47.8% - 100%)

En el caso de *Plasmodium spp.* la sensibilidad de LAMP aumenta 94.9% (IC: 89.7% – 97.9%) en densidades mayores a 1 y menores a 10 parásitos/μL; 93.1% (IC: 83.3% – 98.1%), en muestras menores a 100 parásitos/μL y 86.7% (IC: 69.3% – 96.2%) en muestras que posean más de 100 parásitos/μL.

LAMP posee una alta sensibilidad para detectar *P. vivax* a partir de densidades parasitarias mayores a 1 parásito/μL con un valor de 92.2% (IC: 85.8% – 96.4%), 84.9% (IC: 72.4% – 93.3%) y 80% (IC: 59.3% – 93.2%) en muestras con densidades menores a 10 parásitos/μL, 100 parásitos/μL y mayores a esta última respectivamente.

La detección de *P. falciparum* siguió siendo baja a densidades mayores a 1 y menores a 10 parásitos /μL con un valor de 75% (IC: 50.9% – 91.3%). La técnica

comenzó a ser eficiente a partir de muestras mayores a 10 parásitos/ $\mu$ L con una sensibilidad del 100% (IC: 47.8% - 100%) para ambos grupos de densidad.

## VII. Discusión

La búsqueda de nuevos métodos de diagnóstico que sean sensibles y de fácil uso para ser empleadas en áreas rurales de la Amazonia, donde existe una alta proporción de individuos con infecciones submicroscópicas y asintomáticas, es de suma importancia para una correcta detección y posterior tratamiento contra el parásito en la región. El uso de la prueba de LAMP podría ser una alternativa, ya que cubre los dos factores que se requieren para un diagnóstico eficaz: buena sensibilidad/especificidad y fácil implementación en comunidades con mínimo requerimiento de personal entrenado y equipo.

La prueba de LAMP pudo detectar una mayor cantidad de individuos infectados con el parásito (50.7%) que la microscopía (11.3%), que es la técnica de diagnóstico estándar empleada por el Ministerio de Salud, lo que la convierte en una mejor herramienta para realizar diagnóstico en zonas rurales alejadas que no cuenten con un microscopio ni con personal capacitado. Por otro lado, las técnicas moleculares detectaron de igual manera la misma proporción de infecciones por *Plasmodium*, a excepción del nPCR. Una de las razones fue el alto límite de detección de la técnica, el cual se observó tanto en *P. falciparum* como *P. vivax*, después de realizarse la estandarización de la nPCR. Sumándole esta limitante con la presencia de muestras que corresponden a infecciones de baja densidad parasitaria, conllevaron a un sesgo de la detección por parte de la técnica.

La sensibilidad y especificidad de LAMP en el diagnóstico de infecciones por *Plasmodium spp*, ha sido alta con valores del 90% para ambos casos al compararlo con las PCR en Tiempo Real; siendo mayor al compararlo con la qPCR-PgMt. Esto es debido a que ambas pruebas tienen como secuencia blanco una región mitocondrial (48,58,70). Esta alta sensibilidad se ha reportado en otros estudios comparándolo con otros PCR en Tiempo Real (14,71,72) o con otros métodos de referencia (14,63,65,66,69,73). A pesar de la alta sensibilidad de detectar *Plasmodium spp.*, los valores de sensibilidad disminuyen cuando se

realiza la comparación en base a las especies, debido a la discordancia de resultados por los métodos de detección.

En el caso de la detección de *P. falciparum*, se esperaba una sensibilidad del 100%, debido al diseño del kit (14,65,74); pero se observó un resultado del 76.5%. Pese a ello, ha habido reportes de sensibilidades bajas de LAMP en regiones con baja densidad de parásitos (71,75), debido al límite de detección que tiene la técnica en detectarlos, que es de 5 parásitos/ $\mu$ L (58). En nuestro caso, las 8 muestras falsas negativas poseían densidades menores a 3 parásitos/ $\mu$ L, muy por debajo del límite de detección de LAMP, por lo que estas muestras solo fueron clasificadas como *Plasmodium spp.*

Por otro lado, la sensibilidad de LAMP para detectar *P. vivax*, fue mayor que la de *P. falciparum* con un 87.9%, pero con una gran proporción de falsos positivos. Entre las posibles razones está en el diseño del kit de LAMP, cuya función es la detección de *Plasmodium spp.* y *P. falciparum*. En este trabajo se asumió los resultados LAMP Pan positivo y LAMP No falciparum como *P. vivax*, debido a la alta prevalencia de esta especie en la región (25); pero se debe de tomar en cuenta la presencia de *P. malariae*, que ha sido reportado en países colindantes (76,77). Otro factor sería el diagnóstico que realiza la qPCR-18S, ya que esta técnica no puede diferenciar correctamente infecciones mixtas, debido a la proporción de especies de parásitos que puedan estar presentes en la muestra, por lo que los cebadores habrían amplificado el ADN de la especie que estaba en mayor concentración, ocultando la presencia del otro parásito.

Como se mencionó anteriormente, LAMP puede detectar una gran cantidad de infecciones por *Plasmodium*, pero muestra dificultades en diagnosticar correctamente infecciones de baja densidad parasitaria, observándose una relación directa entre la cantidad de muestras positivas con la densidad parasitaria. En densidades menores a 1 parásito/ $\mu$ L, la detección de *Plasmodium spp.* y *P. vivax* por parte de LAMP fue del 80% y 81% respectivamente; mientras que para *P. falciparum*, LAMP no pudo detectarlo, debido al límite de detección que posee LAMP (61,62,69), siendo un inconveniente en regiones donde existan individuos con baja densidad parasitaria y que también sean asintomáticos, dificultando su detección y por

ende una correcta eliminación del parásito de la región. Por otro lado, a partir de muestras con densidades mayores a 1 parásito/  $\mu\text{L}$ , LAMP posee una alta sensibilidad para detectar al parásito, siendo capaz de detectar en su totalidad a *P. falciparum* a estas densidades, siendo una herramienta tan eficaz como un PCR.

Como se describió, LAMP posee una alta sensibilidad para detectar *Plasmodium*, pero posee dificultades como el límite de detección, el diseño de la técnica y la comparación con otras técnicas de diagnóstico. Inicialmente, en la técnica LAMP se usó como secuencia diana la región 18S RNA (78), que es usado en las PCR de Tiempo Real para detectar a cada una de las especies, pero el límite de detección obtenido fue deficiente, siendo esta de 50 parásitos/ $\mu\text{L}$ ; por lo que se buscó otra secuencia conservada, seleccionando la región mitocondrial, dando como resultado una mayor sensibilidad de detectar hasta 5 parásitos/ $\mu\text{L}$  (58). Por otro lado, se tienen que mejorar la detección de las otras especies aparte de *P. falciparum*. En el caso de *P. vivax*, se están desarrollando kits que detecten otra secuencia mitocondrial específica para esta especie o una región conservada de la alfa-tubulina (67,79).

Como se observó, hay variabilidad en los resultados de sensibilidad según las secuencias diana y la concentración de ADN empleado en los procesos. Por lo tanto, para realizar un mejor análisis de comparación, se tiene que tomar en cuenta los procesos realizados en cada uno de los métodos de diagnóstico utilizados. En el caso de la técnica de LAMP, se emplea ADN de una extracción que consiste en un calentamiento de la muestra a alta temperatura (70); mientras que las técnicas de referencia pasan por varios procesos durante la extracción. Se ha visto que existe una pérdida del 39% de ADN total cuando se emplean columnas de extracción (80), lo que traería como consecuencia una diferencia de ADN que es empleado inicialmente en las técnicas de diagnóstico, provocando la discordancia de resultados al momento de compararlos.

Otra limitante en la variabilidad de la sensibilidad es el alto rango en el intervalo de confianza. En las infecciones por *P. falciparum* (Tabla 8), la cantidad de muestra recolectada fue baja, debido a la baja proporción de esta especie que es del 20% (15,25). Por otro lado, en la variabilidad del intervalo de confianza



según carga parasitaria (Tabla 9), se observaron dos escenarios: Una sensibilidad más precisa en la detección de *Plasmodium spp.* y *P. vivax* por parte de LAMP en los intervalos de 1 y 100 parásitos/ $\mu$ L; mientras que para *P. falciparum* se requiere aumentar el número de muestras para que el resultado sea más preciso en detectar a esta especie. Aparte, se observó que la sensibilidad disminuyó a densidades altas, debido al escaso número de muestras recolectadas en esa categoría (5 para *P. falciparum* y 25 para *P. vivax*). Otra razón sería la inconsistencia de resultados por parte del qPCR-18S en el momento de diagnosticar muestras con infecciones mixtas que están a diferente proporción, pudiéndose ocultar la presencia de una especie por la abundancia de la otra.

A pesar de que LAMP posee una sensibilidad y especificidad moderada, esto es suficiente para poder ser utilizada en regiones con una alta proporción de individuos asintomáticos y con infecciones submicroscópicas, a nivel de comunidades (búsquedas activas), permitiendo identificarlos, darles tratamiento y así controlar la transmisión del parásito con miras a su eliminación.

## VIII. Conclusiones

- LAMP detecta 4.5 veces más infecciones asintomáticas por *Plasmodium* que microscopía.
- LAMP detecta correctamente al parásito con una sensibilidad del 92.5%; 76.4% y 87.9% para los casos de *Plasmodium spp.*, *P. falciparum* y *P. vivax* respectivamente.
- LAMP posee una adecuada sensibilidad en detectar *Plasmodium spp.* y *P. vivax* a densidades parasitarias entre 1 y 100 parásitos/ $\mu$ L.

## IX. Referencias bibliográficas

1. de Mendonça VR, Barral-Netto M. Immunoregulation in human malaria: the challenge of understanding asymptomatic infection. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015 Dec;110(8):945–55.
2. Lin JT, Saunders DL, Meshnick SR. The role of submicroscopic malaria in malaria transmission: what is the evidence? Trends Parasitol. 2014 Apr;30(4):183–90.

3. Van den Eede P, Soto-Calle VE, Delgado C, Gamboa D, Grande T, Rodriguez H, et al. Plasmodium vivax sub-patent infections after radical treatment are common in Peruvian patients: results of a 1-year prospective cohort study. *PloS One*. 2011 Jan 28;6(1):e16257.
4. Tada MS, Ferreira R de GM, Katsuragawa TH, Martha RCD, Costa JDAN, Albrecht L, et al. Asymptomatic infection with Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax in the Brazilian Amazon Basin: to treat or not to treat? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012 Aug;107(5):621–9.
5. World Health Organization, FIND, CDC. Malaria Rapid Diagnostic Test Performance: results of WHO product testing of malaria RDTs: round 6 (2014-2015). 2015. 154 p.
6. Wongsrichanalai C, Barcus MJ, Muth S, Sutamihardja A, Wernsdorfer WH. A Review of Malaria Diagnostic Tools: Microscopy and Rapid Diagnostic Test (RDT). *American Society of Tropical Medicine and Hygiene*; 2007
7. WHO | Malaria microscopy quality assurance manual – Ver. 2. WHO.
8. Joanny F, Löhr SJ, Engleitner T, Lell B, Mordmüller B. Limit of blank and limit of detection of Plasmodium falciparum thick blood smear microscopy in a routine setting in Central Africa. *Malar J*. 2014;13:234.
9. Gamboa D, Ho M-F, Bendezu J, Torres K, Chiodini PL, Barnwell JW, et al. A large proportion of P. falciparum isolates in the Amazon region of Peru lack pfrp2 and pfrp3: implications for malaria rapid diagnostic tests. *PloS One*. 2010 Jan 25;5(1):e8091.
10. Bendezu J, Rosas A, Grande T, Rodriguez H, Llanos-Cuentas A, Escobedo J, et al. Field evaluation of a rapid diagnostic test (Parascreen) for malaria diagnosis in the Peruvian Amazon. *Malar J*. 2010 Jun 7;9:154.
11. Wang B, Han S-S, Cho C, Han J-H, Cheng Y, Lee S-K, et al. Comparison of Microscopy, Nested-PCR, and Real-Time-PCR Assays Using High-Throughput Screening of Pooled Samples for Diagnosis of Malaria in Asymptomatic Carriers from Areas of Endemicity in Myanmar. *J Clin Microbiol*. 2014 Jun;52(6):1838–45.
12. Mangold KA, Manson RU, Koay ESC, Stephens L, Regner M, Thomson RB, et al. Real-Time PCR for Detection and Identification of Plasmodium spp. *J Clin Microbiol*. 2005 May;43(5):2435–40.
13. Singh B, Bobogare A, Cox-Singh J, Snounou G, Abdullah MS, Rahman HA. A genus- and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. *Am J Trop Med Hyg*. 1999 Apr;60(4):687–92.
14. Vallejo AF, Martínez NL, González IJ, Arévalo-Herrera M, Herrera S. Evaluation of the Loop Mediated Isothermal DNA Amplification (LAMP) Kit for

Malaria Diagnosis in *P. vivax* Endemic Settings of Colombia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015 Jan 8;9(1).

15. WHO. World Malaria Report 2016. Geneva: World Health Organization; 2016
16. Ferreira MU, Castro MC. Challenges for malaria elimination in Brazil. *Malar J*. 2016 May 20;15(1):284.
17. Suárez-Mutis MC, Cuervo P, Leoratti FMS, Moraes-Avila SL, Ferreira AW, Fernandes O, et al. Cross sectional study reveals a high percentage of asymptomatic *Plasmodium vivax* infection in the Amazon Rio Negro area, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2007 Jun;49(3):159–64.
18. Fontoura PS, Finco BF, Lima NF, de Carvalho JF, Vinetz JM, Castro MC, et al. Reactive Case Detection for *Plasmodium vivax* Malaria Elimination in Rural Amazonia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016 Dec;10(12).
19. Alves FP, Durlacher RR, Menezes MJ, Krieger H, Silva LHP, Camargo EP. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations. *Am J Trop Med Hyg*. 2002 Jun;66(6):641–8.
20. Barbosa S, Gozze AB, Lima NF, Batista CL, Bastos M da S, Nicolete VC, et al. Epidemiology of Disappearing *Plasmodium vivax* Malaria: A Case Study in Rural Amazonia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Aug;8(8):e3109.
21. Lennon SE, Miranda A, Henao J, Vallejo AF, Perez J, Alvarez A, et al. Malaria elimination challenges in Mesoamerica: evidence of submicroscopic malaria reservoirs in Guatemala. *Malar J*. 2016;15(1).
22. Rodolfo H, de Donato M, Quijada I, Peña A. High prevalence of malaria infection in Amazonas State, Venezuela. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2007 Apr;49(2):79–85.
23. Soto-Calle V, Rosas-Aguirre A, Llanos-Cuentas A, Abatih E, DeDeken R, Rodriguez H, et al. Spatio-temporal analysis of malaria incidence in the Peruvian Amazon Region between 2002 and 2013. *Sci Rep*. 2017 Jan 16;7:40350.
24. Branch O, Casapia WM, Gamboa DV, Hernandez JN, Alava FF, Roncal N, et al. Clustered local transmission and asymptomatic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria infections in a recently emerged, hypoendemic Peruvian Amazon community. *Malar J*. 2005 Jun 23;4:27.
25. Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades, MINSA. Casos de malaria por departamentos del Perú, Semana 52 2016. 2016.

26. Rosas-Aguirre A, Gamboa D, Manrique P, Conn JE, Moreno M, Lescano AG, et al. Epidemiology of *Plasmodium vivax* Malaria in Peru. *Am J Trop Med Hyg*. 2016 Dec 28;95(6 Suppl):133–44.
27. Reinbold-Wasson DD, Sardelis MR, Jones JW, Watts DM, Fernandez R, Carbajal F, et al. Determinants of *Anopheles* seasonal distribution patterns across a forest to periurban gradient near Iquitos, Peru. *Am J Trop Med Hyg*. 2012 Mar;86(3):459–63.
28. Roshanravan B, Kari E, Gilman RH, Cabrera L, Lee E, Metcalfe J, et al. Endemic malaria in the Peruvian Amazon region of Iquitos. *Am J Trop Med Hyg*. 2003 Jul;69(1):45–52.
29. Rosas-Aguirre A, Speybroeck N, Llanos-Cuentas A, Rosanas-Urgell A, Carrasco-Escobar G, Rodriguez H, et al. Hotspots of Malaria Transmission in the Peruvian Amazon: Rapid Assessment through a Parasitological and Serological Survey. *PLOS ONE*. 2015 Sep 10;10(9):e0137458.
30. da Silva-Nunes M, Moreno M, Conn JE, Gamboa D, Abeles S, Vinetz JM, et al. Amazonian malaria: asymptomatic human reservoirs, diagnostic challenges, environmentally driven changes in mosquito vector populations, and the mandate for sustainable control strategies. *Acta Trop*. 2012 Mar;121(3):281–91.
31. World Health Organization. *Malaria Microscopy Quality Assurance Manual*. 2nd ed. 2016. 140 p.
32. Orjuela-Sánchez P, da Silva NS, da Silva-Nunes M, Ferreira MU. Recurrent parasitemias and population dynamics of *Plasmodium vivax* polymorphisms in rural Amazonia. *Am J Trop Med Hyg*. 2009 Dec;81(6):961–8.
33. Centers for Disease Control and Prevention. CDC - Malaria - About Malaria - Biology [Internet]. [cited 2017 Feb 21]. Available from: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/>
34. Crutcher JM, Hoffman SL. Malaria. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996.
35. Bartoloni A, Zammarchi L. Clinical Aspects of Uncomplicated and Severe Malaria. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2012 May; 4(1).
36. Singh B, Daneshvar C. Human Infections and Detection of *Plasmodium* knowlesi. *Clin Microbiol Rev*. 2013 Apr 1;26(2):165–84.
37. Lindblade KA, Steinhardt L, Samuels A, Kachur SP, Slutsker L. The silent threat: asymptomatic parasitemia and malaria transmission. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2013 Jun 1;11(6):623–39.

38. Tangpukdee N, Duangdee C, Wilairatana P, Krudsood S. Malaria diagnosis: a brief review. *Korean J Parasitol*. 2009 Jun;47(2):93–102.
39. Murphy SC, Shott JP, Parikh S, Etter P, Prescott WR, Stewart VA. Malaria diagnostics in clinical trials. *Am J Trop Med Hyg*. 2013 Nov;89(5):824–39.
40. Payne D. Use and limitations of light microscopy for diagnosing malaria at the primary health care level. *Bull World Health Organ*. 1988;66(5):621–6.
41. Makler MT, Piper RC, Milhous WK. Lactate Dehydrogenase and the Diagnosis of Malaria. *Parasitol Today*. 1998 Sep 1;14(9):376–7.
42. Aguirre R, Martín Á, Zavalaga L, Fernando L, Trelles de Belaunde M. Relación costo-efectividad del uso de pruebas rápidas para el diagnóstico de la malaria en la Amazonia peruana. *Rev Panam Salud Pública*. 2009 May;25(5):377–88.
43. Gomes LT, Tada MS, Katsuragawa TH, Povoá MM, Viana GM, Alecrim M das GC, et al. Low sensitivity of malaria rapid diagnostic tests stored at room temperature in the Brazilian Amazon Region. *J Infect Dev Ctries*. 2013 Mar 14;7(3):243–52.
44. Shi Y, Huang J, Su J, Hong Y, Li X, Zheng K, et al. [Nested PCR for malaria detection and Plasmodium species identification]. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi*. 2011 Aug;29(4):263–6.
45. Anthony C, Mahmud R, Lau YL, Syedomar SF, Sri La Sri Ponnampalavanar S. Comparison of two nested PCR methods for the detection of human malaria. *Trop Biomed*. 2013 Sep;30(3):459–66.
46. Fuehrer H-P, Fally MA, Habler VE, Starzengruber P, Swoboda P, Noedl H. Novel nested direct PCR technique for malaria diagnosis using filter paper samples. *J Clin Microbiol*. 2011 Apr;49(4):1628–30.
47. Li P, Zhao Z, Wang Y, Xing H, Parker DM, Yang Z, et al. Nested PCR detection of malaria directly using blood filter paper samples from epidemiological surveys. *Malar J*. 2014 May 8;13:175.
48. Haanshuus CG, Mohn SC, Mørch K, Langeland N, Blomberg B, Hanevik K. A novel, single-amplification PCR targeting mitochondrial genome highly sensitive and specific in diagnosing malaria among returned travellers in Bergen, Norway. *Malar J*. 2013 Jan 22;12:26.
49. Lucchi NW, Narayanan J, Karell MA, Xayavong M, Kariuki S, DaSilva AJ, et al. Molecular diagnosis of malaria by photo-induced electron transfer fluorogenic primers: PET-PCR. *PLoS One*. 2013;8(2):e56677.
50. Rougemont M, Van Saanen M, Sahli R, Hinrikson HP, Bille J, Jaton K. 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 Dec;42(12):5636–43.

51. Lee M-A, Tan C-H, Aw L-T, Tang C-S, Singh M, Lee S-H, et al. Real-time fluorescence-based PCR for detection of malaria parasites. *J Clin Microbiol.* 2002 Nov;40(11):4343–5.
52. Elsayed S, Plewes K, Church D, Chow B, Zhang K. Use of molecular beacon probes for real-time PCR detection of *Plasmodium falciparum* and other plasmodium species in peripheral blood specimens. *J Clin Microbiol.* 2006 Feb;44(2):622–4.
53. Kamau E, Tolbert LS, Kortepeter L, Pratt M, Nyakoe N, Muringo L, et al. Development of a highly sensitive genus-specific quantitative reverse transcriptase real-time PCR assay for detection and quantitation of plasmodium by amplifying RNA and DNA of the 18S rRNA genes. *J Clin Microbiol.* 2011 Aug;49(8):2946–53.
54. Hermsen CC, de Vlas SJ, van Gemert GJA, Telgt DSC, Verhage DF, Sauerwein RW. Testing vaccines in human experimental malaria: statistical analysis of parasitemia measured by a quantitative real-time polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg.* 2004 Aug;71(2):196–201.
55. Polley SD, Bell D, Oliver J, Tully F, Perkins MD, Chiodini PL, et al. The design and evaluation of a shaped filter collection device to sample and store defined volume dried blood spots from finger pricks. *Malar J.* 2015 Feb 5;14:45.
56. Farrugia C, Cabaret O, Botterel F, Bories C, Foulet F, Costa J-M, et al. Cytochrome b gene quantitative PCR for diagnosing *Plasmodium falciparum* infection in travelers. *J Clin Microbiol.* 2011 Jun;49(6):2191–5.
57. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000 Jun 15;28(12):e63.
58. Polley SD, Mori Y, Watson J, Perkins MD, González IJ, Notomi T, et al. Mitochondrial DNA targets increase sensitivity of malaria detection using loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol.* 2010 Aug;48(8):2866–71.
59. Poon LLM, Wong BWY, Ma EHT, Chan KH, Chow LMC, Abeyewickreme W, et al. Sensitive and inexpensive molecular test for falciparum malaria: detecting *Plasmodium falciparum* DNA directly from heat-treated blood by loop-mediated isothermal amplification. *Clin Chem.* 2006 Feb;52(2):303–6.
60. Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Nov 23;289(1):150–4.
61. Lucchi NW, Ljolje D, Silva-Flannery L, Udhayakumar V. Use of Malachite Green-Loop Mediated Isothermal Amplification for Detection of *Plasmodium* spp. *Parasites.* PLoS ONE. 2016 Mar; 11(3).

62. Britton S, Cheng Q, Sutherland CJ, McCarthy JS. A simple, high-throughput, colourimetric, field applicable loop-mediated isothermal amplification (HtLAMP) assay for malaria elimination. *Malar J.* 2015 Aug 28;14:335.
63. Hopkins H, González IJ, Polley SD, Angutoko P, Ategeka J, Asiimwe C, et al. Highly sensitive detection of malaria parasitemia in a malaria-endemic setting: performance of a new loop-mediated isothermal amplification kit in a remote clinic in Uganda. *J Infect Dis.* 2013 Aug 15;208(4):645–52.
64. Oriero EC, Okebe J, Jacobs J, Van geertruyden J-P, Nwakanma D, D'Alessandro U. Diagnostic performance of a novel loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay targeting the apicoplast genome for malaria diagnosis in a field setting in sub-Saharan Africa. *Malar J.* 2015 Oct 9;14.
65. Sema M, Alemu A, Bayih AG, Getie S, Getnet G, Guelig D, et al. Evaluation of non-instrumented nucleic acid amplification by loop-mediated isothermal amplification (NINA-LAMP) for the diagnosis of malaria in Northwest Ethiopia. *Malar J.* 2015 Jan 28; 14.
66. Hayashida K, Kajino K, Simukoko H, Simuunza M, Ndebe J, Chota A, et al. Direct detection of falciparum and non-falciparum malaria DNA from a drop of blood with high sensitivity by the dried-LAMP system. *Parasit Vectors.* 2017 Jan 13;10(1):26.
67. Britton S, Cheng Q, Grigg MJ, Poole CB, Pasay C, William T, et al. Sensitive Detection of Plasmodium vivax Using a High-Throughput, Colourimetric Loop Mediated Isothermal Amplification (HtLAMP) Platform: A Potential Novel Tool for Malaria Elimination. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016 Feb 12;10(2):e0004443.
68. Patel JC, Lucchi NW, Srivastava P, Lin JT, Sug-aram R, Aruncharus S, et al. Field Evaluation of a Real-Time Fluorescence Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay, RealAmp, for the Diagnosis of Malaria in Thailand and India. *J Infect Dis.* 2014 Oct 15;210(8):1180–7.
69. Piera KA, Aziz A, William T, Bell D, González IJ, Barber BE, et al. Detection of Plasmodium knowlesi, Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) in a co-endemic area in Malaysia. *Malar J.* 2017 Jan 13;16(1):29.
70. Foundation for innovative new diagnostics FIND. Manual of Standard Operating Procedures for malaria LAMP. [Internet]. Geneva, Tokyo, London; 2012. Available from: <http://www.finddx.org/wp-content/uploads/2016/04/SOP-LAMP-Malaria-Aug2012.pdf>
71. Cook J, Aydin-Schmidt B, González IJ, Bell D, Edlund E, Nassor MH, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for point-of-care detection of asymptomatic low-density malaria parasite carriers in Zanzibar. *Malar J.* 2015 Jan 28;14.

72. Aydin-Schmidt B, Xu W, González IJ, Polley SD, Bell D, Shakely D, et al. Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Accurately Detects Malaria DNA from Filter Paper Blood Samples of Low Density Parasitaemias. *PLoS ONE*. 2014 Aug; 9(8).
73. Lucchi NW, Gaye M, Diallo MA, Goldman IF, Ljolje D, Deme AB, et al. Evaluation of the Illumigene Malaria LAMP: A Robust Molecular Diagnostic Tool for Malaria Parasites. *Sci Rep*. 2016 Nov; 6.
74. Ocker R, Prompunjai Y, Chutipongvivate S, Karanis P. Malaria diagnosis by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) in Thailand. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2016 Apr; 58.
75. Aydin-Schmidt B, Morris U, Ding XC, Jovel I, Msellem MI, Bergman D, et al. Field Evaluation of a High Throughput Loop Mediated Isothermal Amplification Test for the Detection of Asymptomatic Plasmodium Infections in Zanzibar. *PloS One*. 2017;12(1):e0169037.
76. Niño CH, Cubides JR, Camargo-Ayala PA, Rodríguez-Celis CA, Quiñones T, Cortés-Castillo MT, et al. Plasmodium malariae in the Colombian Amazon region: you don't diagnose what you don't suspect. *Malar J*. 2016 Nov 29;15(1):576.
77. Scopel KKG, Fontes CJF, Nunes AC, Horta MF, Braga EM. High prevalence of Plasmodium malariae infections in a Brazilian Amazon endemic area (Apiacás-Mato Grosso State) as detected by polymerase chain reaction. *Acta Trop*. 2004 Mar;90(1):61–4.
78. Han E-T, Watanabe R, Sattabongkot J, Khuntirat B, Sirichaisinthop J, Iriko H, et al. Detection of four Plasmodium species by genus- and species-specific loop-mediated isothermal amplification for clinical diagnosis. *J Clin Microbiol*. 2007 Aug;45(8):2521–8.
79. Dinzouna-Boutamba S-D, Yang H-W, Joo S-Y, Jeong S, Na B-K, Inoue N, et al. The development of loop-mediated isothermal amplification targeting alpha-tubulin DNA for the rapid detection of Plasmodium vivax. *Malar J*. 2014 Jun 30;13:248.
80. Kemp BM, Winters M, Monroe C, Barta JL. How much DNA is lost? Measuring DNA loss of short-tandem-repeat length fragments targeted by the PowerPlex 16® system using the Qiagen MinElute Purification Kit. *Hum Biol*. 2014;86(4):313–29.



## **Anexos**

### **A. Extracción de ADN por E.Z.N.A® Blood DNA Mini Kit.**

1. Colocar la muestra de papel filtro un tubo.
2. Agregar 250 µL de PBS.
3. Incubar por 65°C por una hora, vortexeando cada 20 minutos.
4. Agregar 25 µL de Proteinasa K e incubar por 30 minutos.
5. Centrifugar a 13000g por 5 minutos.
6. Transferir el líquido a un nuevo tubo.
7. Agregar 1 volumen de ATL y 1 volumen de etanol absoluto. Vortexear la mezcla.
8. Centrifugar brevemente para dejar caer el líquido a la base del tubo.
9. Insertar la columna del kit en un tubo colector.
10. Transferir la muestra a la columna.
11. Centrifugar a 10000g por un minuto.
12. Descarta el tubo colector.
13. Insertar un nuevo tubo colector a la columna del kit.
14. Agregar 500 µL de Buffer HBC.
15. Centrifugar a 10000g por un minuto.
16. Descarta el filtrado y reusar el tubo colector.
17. Agregar 700 µL de buffer de lavado.
18. Centrifugar a 10000g por un minuto.
19. Descarta el filtrado y reusar el tubo colector.
20. Repetir los pasos 17-19 para un segundo paso de lavado.
21. Centrifugar la columna vacía a 10000g por dos minutos.
22. Transferir la columna a un tubo de 1.5 mL.
23. Agregar 50 µL de buffer de elución precalentado a 65°C.
24. Dejar reposar la columna con el buffer por 5 minutos.
25. Centrifugar a 13000g por un minuto.
26. Almacenar la muestra a -20°C hasta su uso.

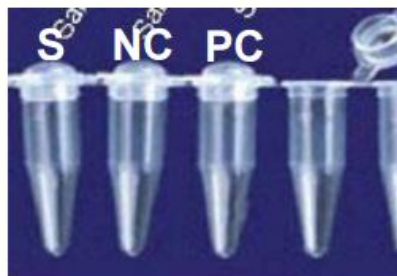
### **B. Diagnóstico por la técnica de LAMP.**

## 1. Preparación de la muestra

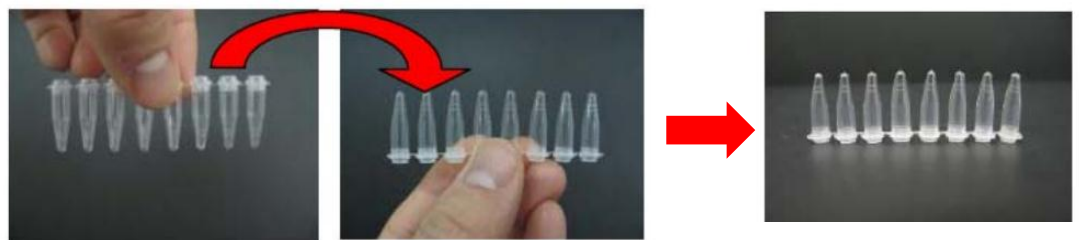
- Se emplea 60  $\mu\text{L}$  de sangre total, la cual se mezcla con el buffer de extracción (400 mM NaCl, 40mM Tris pH 6.5, 0.4% SDS) en un tubo.
- Se calienta la mezcla a 95°C por exactamente 5 minutos. Pasado el tiempo, centrifugar a 10000g por 3 minutos.
- Se transfiere 30  $\mu\text{L}$  del sobrenadante a un nuevo tubo que contiene 345  $\mu\text{L}$  de agua estéril a grado molecular.

## 2. Amplificación por LAMP

- Se toma 30  $\mu\text{L}$  de la muestra preparada en uno de los tubos del kit. También se dispensa 30  $\mu\text{L}$  de los controles positivos y negativos.



- Se invierte el tubo para hidratar los reactivos liofilizados en la tapa por 2 minutos.



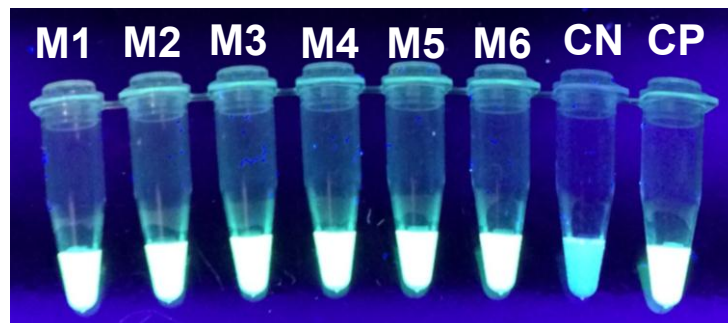
- Se vuelve a invertir los tubos hasta 5 veces para que los reactivos estén completamente disueltos. Repetir el procedimiento para el otro kit de detección.



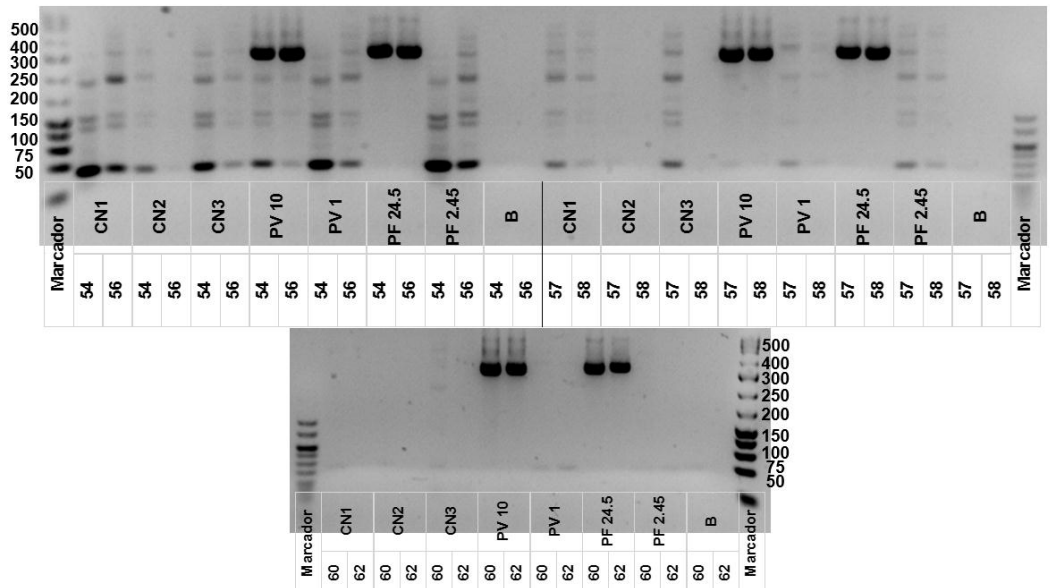
- Para iniciar la amplificación se calienta las muestras a 65°C por 40 minutos y se detiene la reacción con un aumento de temperatura a 80°C por 5 minutos.

### 3. Diagnóstico de muestra

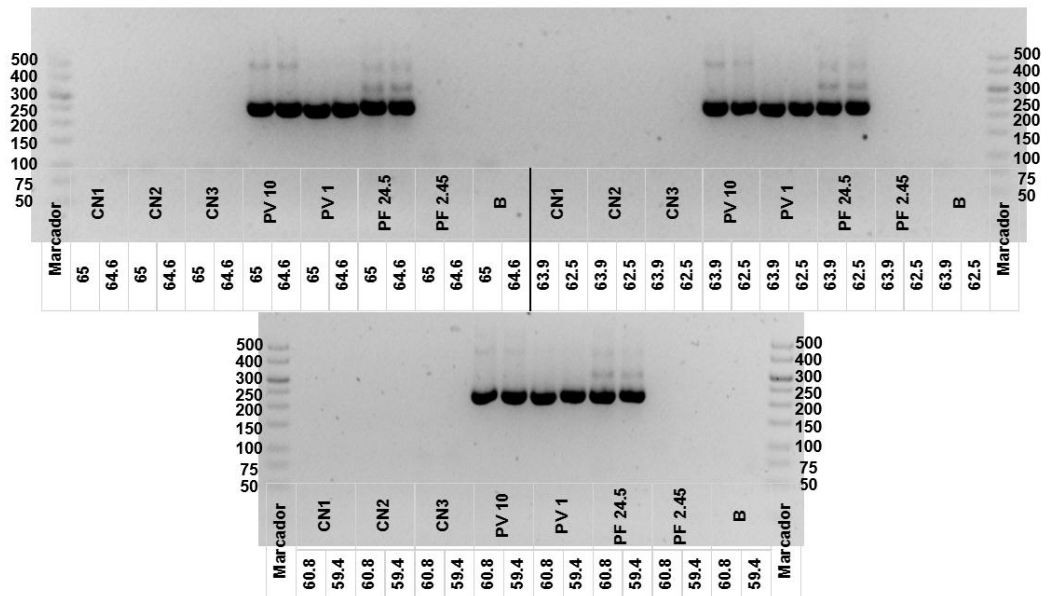
El resultado del diagnóstico se realiza usando una lámpara de rayos UV, observándose los siguientes resultados: emisión de fluorescencia verde indica una reacción positiva; mientras que la no emisión, da un resultado negativo.



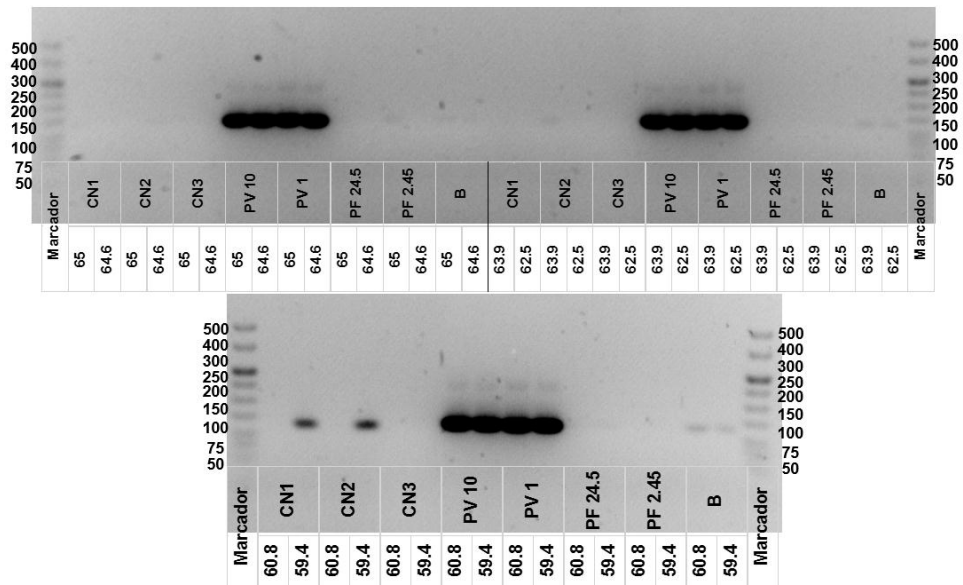
### C. Estandarización del nPCR



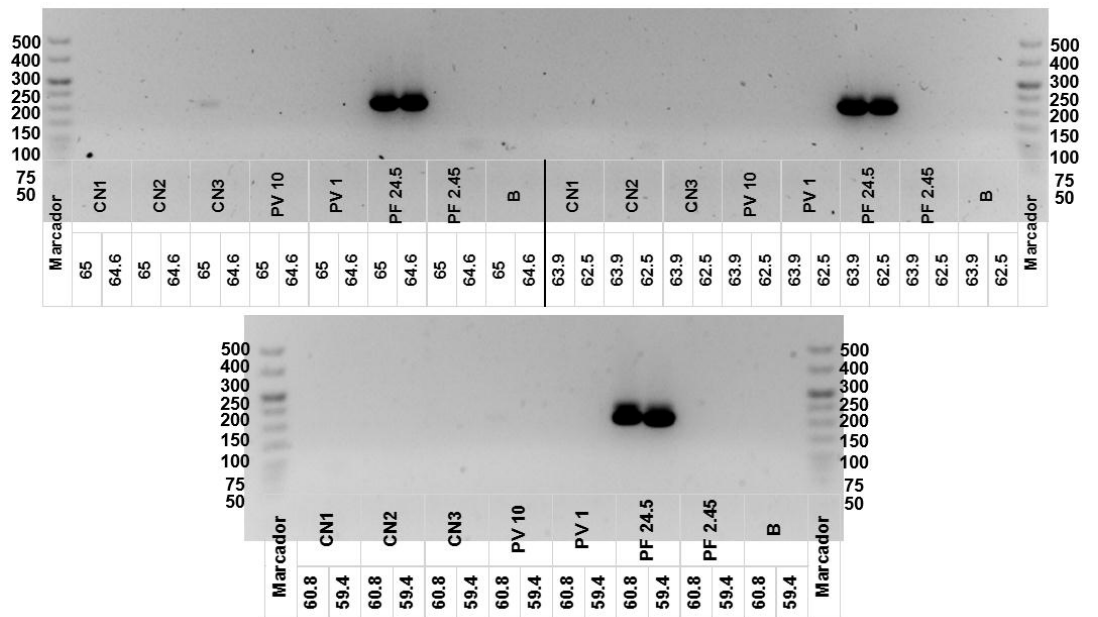
**Anexo 1.** Curva de Temperatura (54°C – 62°C) del PCR externo. CN: Control Negativo. PV: *P. vivax*. PF: *P. falciparum*



**Anexo 2.** Curva de Temperatura (60°C – 65°C) del PCR *Plasmodium* spp. CN: Control Negativo. PV: *P. vivax*. PF: *P. falciparum*



**Anexo 3.** Curva de Temperatura (60°C – 65°C) del PCR *Plasmodium vivax*. CN: Control Negativo. PV: *P. vivax*. PF: *P. falciparum*



**Anexo 3.** Curva de Temperatura (60°C – 65°C) del PCR *Plasmodium falciparum*. CN: Control Negativo. PV: *P. vivax*. PF: *P. falciparum*