



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**

AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA  
MEDIADA POR BUCLE PARA LA  
DETECCIÓN COLORIMÉTRICA DE  
BLANCOS MULTICOPIAS DE  
*Plasmodium vivax* Y *Plasmodium*  
*falciparum*.

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS DE LA VIDA

OSCAR PATRICIO NOLASCO CARDENAS

LIMA – PERÚ

2022



**ASESOR**

**DIONICIA GAMBOA VILELA. PHD.**

**JURADO DE TESIS**

PRESIDENTE

DRA. MANUELA RENEE VERASTEGUI PIMENTEL

VOCAL (ES)

DR. HOLGER MAITA MALPARTIDA

DRA. VANESSA KARINA ADAUI SICHERI

SECRETARIO (A)

DRA. MÓNICA JEHNKY PAJUELO TRAVEZAÑO

**DEDICATORIA.**

A mis padres Martha y Julio quienes iniciaron mis días

Y a mis hermanos Julio, Rosa y Clara junto a quienes camino.

## **AGRADECIMIENTOS.**

A mi asesora Dionicia Gamboa PhD, por haber permitido integrarme al grupo malaria de la UPCH, y a todas aquellas invaluable personas que he conocido y con quienes compartí gratas horas de trabajo.

## **FUENTES DE FINANCIAMIENTO.**

El desarrollo del estudio fue posible por el financiamiento brindado de:

Proyecto de Cooperación Belga para el Desarrollo (DGD) a través del proyecto de colaboración Acuerdo Marco 4 (FA4) entre el IMTAvH y el Instituto de Medicina Tropical de Amberes

Proyecto “Desarrollo de Investigación Traslacional para Enfermedades Infecciosas Endémicas de la Amazonía – FOGARTY”. Número: 2D43TW007120-11A1

TEAM Project 2018: JOINT EFFORTS FOR THE ELIMINATION OF MALARIA IN THE PERUVIAN AMAZON Consejo Inter universitario Flamenco - Iniciativa Sur (VLIR-USO PE2018TEA470A102)

Beca COBIAN de la Facultad de Ciencias y Filosofía,  
Universidad Peruana Cayetano Heredia.

# AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR BUCLE PARA LA DETECCIÓN COLORIMÉTRICA DE BLANCOS MULTICOPIAS DE PLASMODIUM VIVAX Y PLASMODIUM FALCIPARUM

## INFORME DE ORIGINALIDAD

8%

INDICE DE SIMILITUD

7%

FUENTES DE INTERNET

6%

PUBLICACIONES

3%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

1

[cybertesis.unmsm.edu.pe](http://cybertesis.unmsm.edu.pe)

Fuente de Internet

1%

2

[revistabiomedica.org](http://revistabiomedica.org)

Fuente de Internet

<1%

3

Submitted to University of Nevada Reno

Trabajo del estudiante

<1%

4

[www.nap.edu](http://www.nap.edu)

Fuente de Internet

<1%

5

Submitted to Napier University

Trabajo del estudiante

<1%

6

[www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)

Fuente de Internet

<1%

7

[www.ajtmh.org](http://www.ajtmh.org)

Fuente de Internet

<1%

8

[revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe](http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe)

Fuente de Internet

<1%

## TABLA DE CONTENIDOS:

### RESUMEN

### ABSTRACT

<b>I</b>	<b>INTRODUCCION .....</b>	<b>1</b>
1.1	<i>Antecedentes del Diagnóstico de Malaria .....</i>	<i>5</i>
1.2	<i>Planteamiento del problema.....</i>	<i>10</i>
1.3	<i>Justificación.....</i>	<i>12</i>
<b>II</b>	<b>OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>13</b>
2.1	<i>Objetivos específicos.....</i>	<i>13</i>
<b>III</b>	<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>14</b>
3.1	<i>Población, muestra u objeto de estudio.....</i>	<i>14</i>
3.1.1	<i>Descripción de muestras empleadas en el desarrollo y validación de un método LAMP colorimétrico “in house” para Plasmodium vivax y Plasmodium falciparum.....</i>	<i>14</i>
a)	<i>Muestras referenciales. ....</i>	<i>14</i>

b)	Muestras sanguíneas clasificadas en grupos de infecciones microscópicas, submicroscópicas y negativas empleadas para la selección de las pruebas LAMP colorimétricas “in house”.....	15
3.1.2.	Descripción de las muestras empleadas en la comparación de LAMP comercial y LAMP colorimétrico diseñado para <i>Plasmodium vivax</i> y <i>Plasmodium falciparum</i> .....	18
3.1.3	Descripción de muestras de colecta activa y pasiva empleadas en la evaluación del LAMP colorimétrico “in house” para la detección de <i>P. vivax</i> y de <i>P. falciparum</i> .....	20
3.2	<i>Procedimientos y técnicas</i> .....	23
3.2.1	Procedimientos y técnicas empleados en el desarrollo y validación del LAMP colorimétrico “in house”.....	23
3.2.1.1	Diseño de cebadores del LAMP colorimétrico “in house”.....	23
3.2.1.2	Diagnóstico por LAMP colorimétrico “in house”. .....	26
3.2.1.3	Diagnóstico molecular por PCR en tiempo real como método de clasificación de muestras submicroscópicas en la evaluación del LAMP colorimétrico “in house” empleando sangre entera. ....	30
3.2.2	Procedimientos y técnicas empleados en la evaluación de la prueba comercial LAMP. ....	31
3.2.2.1	Diagnóstico por microscopía .....	31
3.2.2.2	Diagnóstico por LAMP comercial.....	32
3.2.2.3	Diagnóstico molecular de referencia en la evaluación comparativa de la prueba comercial LAMP y el LAMP colorimétrico “in house”. ....	33

3.2.3	Procedimientos y técnicas empleados en la validación del LAMP colorimétrico “ <i>in house</i> ” empleando muestras sanguíneas impregnadas en papel filtro de colecta activa y pasiva.....	34
3.2.3.1.	Diagnóstico por microscopía .....	34
3.2.3.2.	Diagnóstico por LAMP colorimétrico “ <i>in house</i> ” de muestras sanguíneas impregnadas en papel filtro.....	34
3.2.3.3	Diagnóstico molecular de referencia para la evaluación de LAMP colorimétrico con muestras impregnadas con papel filtro.....	35
3.3	<i>Aspectos éticos</i> .....	39
3.4	<i>Plan de análisis</i> .....	40
<b>IV</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>42</b>
4.1.	<i>Desarrollo y evaluación de una prueba de LAMP colorimétrico “in house” empleando blancos de amplificación multicopia para el diagnóstico diferencial molecular de P. vivax y P. falciparum.</i> .....	42
4.1.1	Límite de detección de LAMPs diseñados .....	44
4.1.2.	Especificidad analítica de LAMPs diseñados.....	46
4.1.3	Evaluación de los LAMPs diseñados con muestras sanguíneas de infecciones microscópicas, submicroscópicas y negativas a <i>Plasmodium</i> ....	48
4.1.3.1.	Evaluación de los LAMPs diseñados para detectar <i>P. vivax</i> .....	48
4.1.3.2.	Evaluación de los LAMPs diseñados para detectar <i>P. falciparum</i> .....	52
4.1.3.3.	Evaluación de los LAMPs diseñados para la detección de <i>P. vivax</i> y <i>P. falciparum</i> .....	55

4.1.3.4. Distribución de la densidad parasitaria y su relación con la positividad de PvCOX1-LAMP y Pfr364-LAMP .....	57
4.2 <i>Evaluación de LAMP comercial y un nuevo diseño de LAMP colorimétrico “in house”</i> .....	59
4.2.1 Comparación de la detección del género <i>Plasmodium</i> por Loopamp™ Malaria Pan Detection Kit y el resultado del LAMP colorimétrico “in house” .....	59
4.2.2 Comparación de la detección de la especie <i>P. vivax</i> por Loopamp™ Malaria Pv Detection Kit y el resultado del PvCOX1-LAMP colorimétrico “in house” .....	63
4.2.3 Evaluación del esquema combinado del Loopamp™ Malaria Pan Detection Kit y Loopamp™ Malaria Pv Detection Kit. ....	67
4.3 <i>Evaluación del diagnóstico de malaria empleando LAMP colorimétrico en muestras de sangre impregnada en papel filtro provenientes de colecta activa y pasiva.</i> .....	68
4.3.1 Detección de <i>Plasmodium vivax</i> y <i>Plasmodium falciparum</i> en muestras de colecta pasiva de la comunidad nativa de Nueva Jerusalén.....	68
4.3.2 Detección de <i>Plasmodium vivax</i> y <i>Plasmodium falciparum</i> en muestras de colecta activa de la comunidad nativa de Nueva Jerusalén. ....	74
4.3.3 Distribución de la densidad parasitaria y la positividad de LAMP colorimétrico en muestras de colecta activa y pasiva .....	80
<b>V DISCUSIÓN</b> .....	<b>82</b>
<b>VI CONCLUSIONES</b> .....	<b>89</b>

<b>VII RECOMENDACIONES .....</b>	<b>91</b>
<b>VIII LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....</b>	<b>92</b>
<b>IX REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS: .....</b>	<b>94</b>
<b>X ANEXOS</b>	

## RESUMEN

El diagnóstico temprano y específico es uno de los principales objetivos en las estrategias para el control de la malaria.

El presente estudio evalúa la tecnología de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP del inglés *Loop-mediated isothermal amplification*), validando un sistema comercial y desarrollando un sistema LAMP colorimétrico “*in house*” empleando secuencias de genes multicopia para la detección de *Plasmodium vivax* y de *Plasmodium falciparum* mediante la visualización directa del cambio de coloración del indicador rojo neutro de amarillo a fucsia en las reacciones positivas.

Los límites de detección (LOD del inglés *Limit of detection*) de las pruebas desarrolladas se estimaron entre 2.4 y 3.7 parásitos/ $\mu$ l de sangre. El mejor desempeño para la detección de *P. vivax*, fue obtenido con el blanco de amplificación *COXI*, mientras que el diseño con el blanco de amplificación *Pfr364* fue el más específico para la detección de *P. falciparum*.

En el diagnóstico para *P. vivax* y *P. falciparum*, los resultados empleando sangre entera indican que el LAMP colorimétrico “*in house*” puede detectar entre el 36,6 y 80.2 % de infecciones submicroscópicas. La máxima capacidad de detección se logró empleando ADN purificado con filtros de sílice; sin embargo, una preparación rápida de la muestra (Hervido y Centrifugado), mostro resultados tan confiables como los obtenidos por microscopía en muestras de sangre entera o sangre impregnada en papel filtro.

## PALABRAS CLAVES

Malaria, LAMP, Diagnóstico molecular, Amplificación isotérmica.

## **ABSTRACT**

Early and specific diagnosis is one of the main objectives in malaria control strategies.

The present study assesses Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technology, validating a commercial system and developing an *in-house* colorimetric LAMP system using multicopy gene sequences to detect *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* with direct visualization of the color change of the neutral red indicator from yellow to fuchsia in the positives reactions.

The limits of detection (LOD) of the test developed were estimated to be between 2.4 and 3.7 parasites/ $\mu$ l of blood. The best performance for the *P. vivax* detection was obtained with the *COXI* amplification target, while the design with the *Pfr364* amplification target was the most specific for *P. falciparum* detection.

In the *P. vivax* and *P. falciparum* diagnosis, the results using whole blood sample indicate that the colorimetric LAMP in-house can detect between 36.6 and 80.2% of submicroscopic infections. The maximum detection capacity of colorimetric LAMP in-house was achieved using purified DNA with silica filter; however, a rapid sample preparation (Boil & Spin) showed result as reliable as those obtained by microscopy in samples of whole blood or blood impregnated on filter paper.

## **KEY WORDS**

Malaria, LAMP, Molecular Diagnostic, Isothermal amplification.

## I INTRODUCCION

La eliminación y control de la malaria a nivel mundial ha logrado grandes avances en las dos primeras décadas del siglo XXI. Sin embargo, la morbilidad sigue siendo alta en regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo [1].

Los reportes de casos del sistema de vigilancia de malaria en el Perú han mostrado una tendencia decreciente, con zonas de alta y baja transmisión en áreas periurbanas y en mayor grado en áreas rurales [2].

Durante el 2021 la región de Loreto notificó el 85.5% (15096 /17657) de los casos de malaria, de los cuales el 77.2% (11659/15096) fueron infecciones por *Plasmodium vivax* y el 22.8% (3437/15096) fueron infecciones por *Plasmodium falciparum* [2]. Estos casos corresponden al diagnóstico microscópico, no cuantificándose los casos que quedan sin diagnosticar por su nivel de parasitemia submicroscópica (subpatente) y los casos que no ocasionan síntomas (asintomáticos) porque estas personas no acuden a un centro de salud en búsqueda de diagnóstico y tratamiento. Diversos estudios han indicado que los casos asintomáticos y subpatentes superan al número de casos de infecciones patentes o diagnosticadas por microscopía [3 -7].

Desafortunadamente para las áreas rurales y remotas, el acceso a un centro de atención primaria puede demorar de 1 a 5 días [8], y el diagnóstico de malaria por microscopía no siempre tiene buenas condiciones de calidad debido a que los centros de salud rurales frecuentemente presentan un mayor deterioro de los microscopios y la capacitación de los técnicos de laboratorio no es constante como en regiones más próximas al área urbana.

De esta manera, el diagnóstico en los centros de atención primaria de salud se apoya en Pruebas de Diagnóstico Rápido (PDR) que por tener la misma sensibilidad diagnóstica que la microscopia es de utilidad solo cuando la microscopia no puede desarrollarse en óptimas condiciones [11].

Bajo este contexto, el Ministerio de Salud ha desarrollado el “Plan malaria cero” desde el 2017 enfocándose en el control de la malaria en la región Loreto procurando mantener una capacitación constante del personal de los centros de salud primario para lograr un diagnóstico por microscopia óptimo y tratamiento oportuno [12].

Las actividades de control del vector transmisor, de capacitación del personal de salud y de búsqueda activa mediante barridos hematológicos, permitieron que el “Plan malaria cero” logre una reducción importante en el número de casos reportados y para reforzar este avance contra la malaria se ha puesto en marcha el “Plan hacia la eliminación de la malaria en el Perú 2022-2030”, que propone con mayor énfasis el uso de diagnóstico molecular.

El diagnóstico molecular de la malaria mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), empleando PCR en tiempo real o PCR cuantitativo (qPCR) podría cambiar el panorama epidemiológico debido a su alta sensibilidad [11]. Sin embargo, por sus requerimientos tecnológicos no están disponibles para ser aplicados en el diagnóstico en puestos de atención primaria.

Bajo esta perspectiva y a la búsqueda de una herramienta molecular que acompañe al diagnóstico microscópico de la malaria, es necesario promover el desarrollo, la evaluación, implementación y adaptación de métodos moleculares

simples, como la técnica de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP abreviación del inglés: *Loop-mediated isothermal amplification*).

El presente estudio se enfoca en obtener evidencias para el empleo de la técnica LAMP y se desarrolla en dos etapas principales:

La primera etapa, comprende:

La comparación de la tecnología LAMP de los kits comerciales Loopamp™ MALARIA Pan detection kit y Loopamp™ MALARIA Pv detection kit *versus* el LAMP colorimétrico “*in house*”. En esta etapa se diseñaron pruebas LAMP con blancos de amplificación multicopia evaluándose en un sistema LAMP colorimétrico dependiente del cambio de pH, de esta manera en una reacción con ADN que contenga la secuencia del blanco de amplificación se producirá la síntesis de ADN causando la reduciendo el pH del medio la cual es evidenciada y evaluada por el cambio del indicador rojo neutro sensible al pH. Las condiciones de reacción se han estandarizado para que el cambio de color sea evidente y no se produzca ningún problema en la determinación de los resultados, además se ha validado con grupos de muestras con infecciones microscópicas, submicroscópicas y muestras negativas a infección de malaria determinadas por PCR y microscopia. Seleccionados los blancos de amplificación para la detección de *P. vivax* y *P. falciparum*, se realizó la comparación del LAMP colorimétrico “*in house*” y el LAMP comercial empleándose las mismas muestras de pacientes febriles de colecta pasiva en la región amazónica peruana que fueron utilizadas para la evaluación de los kits comerciales Loopamp™ MALARIA Pan detection kit y Loopamp™ MALARIA Pv detection kit.

La segunda etapa del estudio evalúa el uso del LAMP colorimétrico “*in house*” para detectar infecciones de *P. vivax* y *P. falciparum* en muestras de sangre impregnadas en papel filtro que se colectaron en actividades de vigilancia activa y pasiva en la comunidad nativa de Nueva Jerusalén del distrito de Trompeteros de la región Loreto.

## 1.1 Antecedentes del Diagnóstico de Malaria

El método de diagnóstico de una infección e identificación de *Plasmodium* más empleado en el campo es la microscopia, examinando una lámina con frotis y gota gruesa preparada con una muestra de sangre capilar. Este examen permite visualizar diversos estadios del parásito en infecciones que por lo general tienen una densidad parasitaria superior a los 100 parásitos/ $\mu\text{L}$ , aunque los microscopistas expertos pueden tener la capacidad de detectar infecciones con densidad parasitaria entre 5 a 20 parásitos/ $\mu\text{L}$  [12]. Lamentablemente, muchos centros de salud carecen de microscopistas expertos provocando varios y diversos errores en los resultados al momento de la identificación de los estadios y la especie de parásitos, especialmente cuando las muestras tienen una densidad parasitaria baja, de alrededor y/o menor a 100 parásitos/ $\mu\text{L}$  [13,14].

Para el apoyo del diagnóstico por microscopia en los centros de salud se emplean las PDR que presentan una sensibilidad similar a la microscopia de 100 parásitos/ $\mu\text{L}$  y son recomendadas en lugares donde no existe una buena calidad del diagnóstico microscópico [9].

En el mercado existen diversos tipos de PDR de diversas marcas que pueden emplear diversos antígenos; entre los más importantes están: la Proteína rica en Histidina 2 (HRP-2), la cual es un antígeno altamente específico para *P. falciparum* y abundante en el citoplasma y membrana del eritrocito infectado. A pesar de ello, su uso en el Perú se ha descartado debido al reporte de un gran número de infecciones producidas por parásitos con mutaciones o pérdidas del gen *hrp-2* por lo cual los PDR basados en este antígeno no pueden diagnosticarlos [15 - 17]. La enzima lactato deshidrogenasa de *Plasmodium* (pLDH) es un antígeno que se ha

empleado tanto para el desarrollo de PDR de reconocimiento específico para *P. vivax*, *P. falciparum* y también PDR de uso genérico pan-específico para todas las especies de *Plasmodium*. Por último, en PDR pan genéricos también se emplea la aldolasa de *Plasmodium*, una enzima importante en la vía glicolítica que se encuentra abundante en el parásito.

A pesar de su fácil manipulación y simplicidad las PDR aún no son de uso generalizado debido a que su costo supera al de diagnóstico por microscopía, además los resultados de las PDR son igual o de menor sensibilidad que el diagnóstico por microscopía debido a que dependen de la cantidad del antígeno o la densidad parasitaria en la muestra que hace variar la intensidad de la banda y también porque las PDR son afectados por las condiciones locales de uso, como alta temperatura y humedad de las regiones tropicales que puede afectar el tiempo de vida útil de la prueba [18,19].

Actualmente la microscopía y las PDRs son la elección primaria para el diagnóstico de malaria en campo, pero estos métodos dejan de diagnosticar una gran mayoría de infecciones asintomáticas y subpatentes. Por ello, el uso de las Pruebas de Amplificación de Ácidos Nucleicos (PAANs) resultarían de gran importancia en los sistemas de vigilancia y monitoreo, debido a que estos pueden detectar infecciones de malaria con densidad parasitaria por debajo de 1 parásito/ $\mu$ L [20].

Diversos tipos de pruebas diagnósticas se han desarrollado basadas en técnicas con variación térmica como PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa) de tipo cualitativo (PCR convencional y PCR anidado) y de tipo cuantitativo o qPCR en tiempo real; otras están basadas en amplificaciones isotérmicas (Nucleic

Acid Sequence Based Amplification: NASBA y LAMP), todas teniendo mejores resultados empleando blancos de amplificación multicopia como el gen que codifica el ARN de la subunidad menor ribosomal 18S rARN y blancos de amplificación en secuencias mitocondriales [21 - 25].

Las limitaciones del PCR y PCR en tiempo real están relacionadas a las variaciones térmicas en tiempos cortos, empleando equipos termocicladores costosos que hacen difícil su implementación en puestos de salud. En este escenario el diagnóstico por LAMP resulta ser una alternativa muy ventajosa en la fase de control y eliminación de la malaria, porque tiene una mayor sensibilidad comparada con la microscopia o a una PDR, por su simplicidad y porque puede implementarse rápidamente en un centro de salud de atención primaria.

El diagnóstico por LAMP produce resultados en poco tiempo en condiciones isotérmicas mediante el uso de cuatro o seis cebadores diferentes para reconocer seis u ocho regiones distintas en el gen blanco de amplificación [26]. El resultado se puede interpretar por la presencia de turbidez, intensidad de fluorescencia (por ejemplo, cuando se emplea el fluoróforo verde SYBR Green) o tintes colorimétricos (por ejemplo, azul de hidroxinaftol, rojo neutro, rojo de fenol, verde de malaquita) [27].

El uso del diagnóstico empleando LAMP se ha extendido progresivamente porque es más fácil y económico, ya que requiere menos equipos de laboratorio [28]. Varios meta-análisis han confirmado que el método LAMP es una tecnología sólida para diagnosticar la malaria y se espera que sea de gran impacto para controlar la malaria [29 - 32].

Kits LAMPs basados en la detección del género *Plasmodium* y la detección específica de *P. falciparum* y *P. vivax* ahora están disponibles comercialmente, y se han realizado varias pruebas de detección de malaria en entornos reales en varios estudios desde el 2013. Estos hallazgos indican que LAMP es capaz de reducir drásticamente los falsos negativos en el diagnóstico de rutina para malaria [33]. Además de tener una alta sensibilidad pudiendo detectar entre 2 a 4 parásitos por  $\mu\text{L}$  dependiendo del blanco de amplificación y de la especie a detectar [34 - 37].

Uno de los blancos de amplificación más usados es el gen ribosomal 18S rARN, así como otros blancos de amplificación con mayor cantidad de copias, tales como los genes mitocondriales. Sin embargo, en los genomas reportados del género *Plasmodium* todavía quedan por analizar otros loci multicopia, que de acuerdo con su grado de conservación pueden ser empleados para la detección del género o la determinación de la especie.

El kit comercial Loopamp<sup>TM</sup> Pan/Pf MALARIA ha sido evaluado en la Amazonía peruana superando el límite de sensibilidad de microscopía con una sensibilidad diagnóstica de 91.8 % y una especificidad de 91.9 %. Sin embargo, un 3.9% de infecciones diagnosticadas por PCR como infecciones producidas por *P. vivax* fueron erróneamente diagnosticadas por el kit como infecciones producidas por *P. falciparum*. Además, durante el proceso se evidenció la necesidad de la reducción en el número de pasos para el procesamiento de la muestra y de que existen problemas en la determinación visual del resultado ya que en muestras de bajas densidad parasitaria la fluorescencia y/o turbidez resulta ambigua, así como también si en la muestra ha ocurrido hemólisis [33].

En el 2017, durante el desarrollo del proyecto Círculo de Investigación para la implementación de una plataforma molecular diferencial y TICs para la vigilancia de Zika, Dengue, Chikungunya y Malaria (Código SIDISI-UPCH 100176) se generaron diversos diseños de pruebas moleculares en formato de PCR en tiempo real y LAMP los cuales no pudieron evaluarse ni implementarse al término del proyecto. Entre ellos, en el Laboratorio de Malaria del Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt (IMTAvH) se diseñó un LAMP para malaria empleando los loci *Pvr47* y *Pfr364* determinados por Demas *et al.*, en el 2011 [38]. El diseño de LAMP fue publicado en una tesis de Rosales en el 2018 [39], quedando pendiente una evaluación comparativa para los cebadores empleados en el LAMP. El resultado de estos diseños de pruebas LAMP colorimétrico empleando como indicador el colorante rojo neutro, nos incentivó a continuar en la búsqueda de nuevos blancos de amplificación.

En este estudio se han evaluado otras regiones de secuencias multicopia en el ADN mitocondrial y en blancos de amplificación de las subunidades teloméricas, como los genes *var*, que codifican la proteína de membrana eritrocitaria 1 (EMP1) y que han sido aplicados con éxito en PCR [40 -43]. Además, se realizó una validación empleando muestras de sangre entera y muestras de sangre impregnadas en papel filtro.

## 1.2 Planteamiento del problema

En el Perú, la región Loreto que constituye el 28 % del territorio nacional mantiene una población de 1 039 372 habitantes, los cuales se encuentran en riesgo de contraer malaria; principalmente la tercera parte de los pobladores que, alejados de las zonas urbanas, viven en áreas rurales con servicios de salud limitados y en condiciones de mayor pobreza [4].

En esta región geográfica la hidrografía es abundante y las condiciones climáticas con lluvias intensas, altas temperaturas y humedad relativa, permiten la proliferación y persistencia del vector de la malaria provocando una transmisión continua de esta enfermedad.

Por otro lado, los establecimientos de salud en las áreas rurales que son el 80% del total de establecimientos de la región, se encuentran más expuestos al deterioro de equipos e infraestructura a consecuencia de las condiciones climáticas y a la lejanía que dificulta la incorporación de nuevos recursos o el reemplazo de los recursos materiales a los establecimientos de salud. El deterioro de los microscopios es mayor y se hace necesario el empleo de un método adicional que complemente el diagnóstico por gota gruesa para la detección de *Plasmodium*.

A pesar de los esfuerzos realizados por el “Plan Malaria Cero”, todavía un buen número de localidades específicamente rurales, se mantienen con un elevado Índice Parasitario Anual (IPA), por lo que el diagnóstico por microscopía y el diagnóstico mediante PDR han dejado de ser útiles para detectar infecciones de *Plasmodium* con baja densidad parasitaria, por lo que se hace necesaria la introducción de nuevas herramientas de diagnóstico que puedan detectar infecciones asintomáticas y subpatentes.

En este panorama, para continuar con los lineamientos del “Plan hacia la eliminación de la malaria en el Perú 2022-2030” [44], se requerirá el uso de técnicas de diagnóstico confiables para diagnosticar y tratar infecciones asintomáticas y subpatentes, siendo indispensable que se promueva e incentive el desarrollo de pruebas moleculares simples rápidas y sensibles que se adecuen, implementen y evalúen en puestos de salud de atención primaria de áreas rurales y remotas.

En este contexto, en el presente estudio de investigación descriptivo se tiene como objetivo medir la especificidad y sensibilidad para la identificación de infecciones producidas por *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum* utilizando un LAMP comercial y un LAMP colorimétrico desarrollado “*in house*” empleando muestras de la región Loreto.

### 1.3 Justificación

La región Loreto mantiene un índice de morbilidad muy elevado ocasionado por la malaria.

La población escolar pierde miles de horas de clase. El 40% de los casos anuales de malaria reportados en la región Loreto se presentan en niños en el rango de 0 a 11 años de edad, mientras el 16% de casos se reportan en adolescentes de 12 a 17 años de edad [2].

Dentro del rango de población económicamente activa, los jóvenes de 18 a 29 años son los más afectados debido a que se pierden miles de días por dejar de trabajar por los malestares producidos por la enfermedad [2].

En concordancia con la Estrategia Técnica Mundial contra la Malaria del 2016 al 2030, el Plan Malaria Cero reforzó el primer pilar de soporte de la estrategia al promover el acceso universal a la prevención, diagnóstico y tratamiento. A medida que el Perú se acerca a la fase de eliminación de la malaria se hace necesario el uso de nuevas herramientas que permitan diagnosticar malaria de manera más efectiva siendo capaces de identificar infecciones asintomáticos y subpatentes.

Con la finalidad de diagnosticar a los individuos con infecciones asintomáticas y subpatentes para ofrecer un tratamiento adecuado y oportuno, se hace necesario desarrollar nuevas herramientas de diagnóstico, las que deben ser validadas e implementadas en los puestos de atención primaria de comunidades con transmisión activa de malaria. Por ello este trabajo evalúa la sensibilidad y especificidad diagnóstica de la prueba LAMP de evaluación visual para la detección de *P. vivax* y *P. falciparum*.

## **II OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la prueba LAMP para el diagnóstico específico de *P. vivax* y *P. falciparum*.

### **2.1 Objetivos específicos**

- Desarrollar y evaluar una prueba de LAMP colorimétrico “*in house*” empleando blancos de amplificación multicopia para el diagnóstico diferencial molecular de *P. vivax* y *P. falciparum*.
- Comparar el LAMP colorimétrico “*in house*” con el LAMP comercial.
- Evaluar el diagnóstico de malaria empleando LAMP colorimétrico “*in house*” en muestras de colecta activa y pasiva de una localidad endémica.

### III METODOLOGÍA

#### 3.1 Población, muestra u objeto de estudio

En el presente estudio se emplearon grupos de muestras distintos para cada etapa de desarrollo:

##### 3.1.1 Descripción de muestras empleadas en el desarrollo y validación de un método LAMP colorimétrico “in house” para *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum*.

En los ensayos para el desarrollo y validación de las pruebas LAMP colorimétrico “in house”, se emplearon dos grupos de muestras:

##### a) Muestras referenciales.

Las muestras de referencia como controles positivos para evaluar el límite de detección de las pruebas empleadas fueron suministradas por el laboratorio de malaria de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH). Se emplearon muestras del cultivo de *P. falciparum* 3D7 y un pool de muestras de sangre infectadas con *P. vivax* (confirmadas por microscopía y PCR).

Las muestras referenciales para los análisis de especificidad se realizaron con controles de ADN de *P. falciparum* 3D7, *P. vivax* Sal-I y *P. malariae* proporcionados por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC de Atlanta – Estados Unidos).

Además, se utilizó una distribución de control externo de calidad 4260 del Servicio de Parasitología del Servicio Nacional

de Evaluación de la Calidad Externa del Reino Unido (UK-NEQAS) y de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para la validación del género y la especie. La distribución 4260 contiene cinco muestras que fueron resuspendidas para una densidad parasitaria de acuerdo con las instrucciones de UK-NEQAS: *Plasmodium ovale* 200 000 parásitos/mL código 4307, *Plasmodium vivax* 20 000 parásitos/mL código 4308, *P. falciparum* 20 000 parásitos/mL código 4309, ácido nucleico negativo a *Plasmodium* código 4310 y *Plasmodium knowlesi* 200 000 parásitos/mL código 4311.

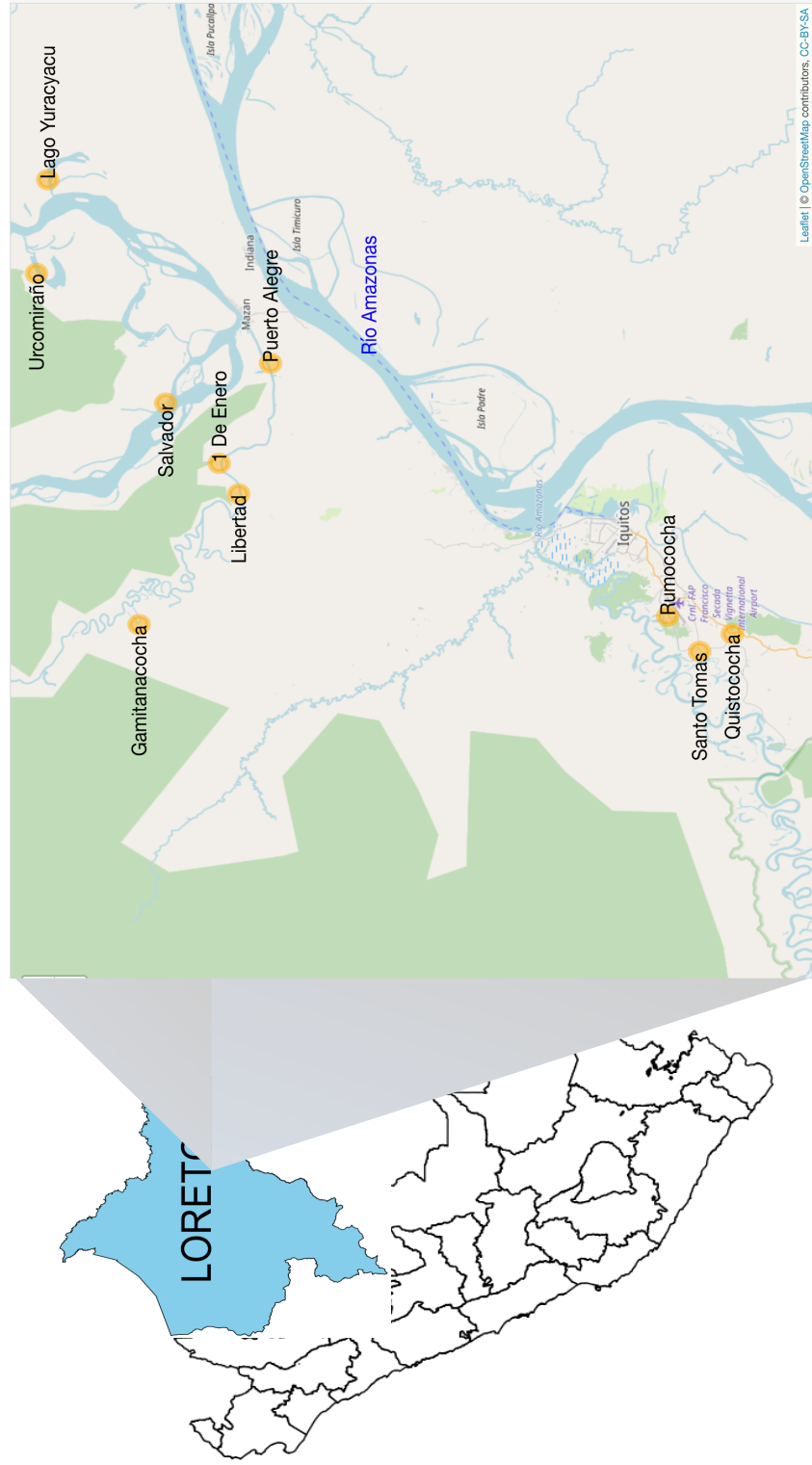
b) Muestras sanguíneas clasificadas en grupos de infecciones microscópicas, submicroscópicas y negativas empleadas para la selección de las pruebas LAMP colorimétricas “in house”.

Se emplearon 312 muestras de sangre del banco de muestras del Laboratorio de Malaria de la UPCH, para evaluar los loci multicopia *Pvr47* y *PvMit* región amino terminal del gen *CoxI* de la mitocondria para la detección de *P. vivax* y los loci *Pfr364* y sub-telomérica de la proteína de membrana eritrocitaria 1 (*PfEMPI*) para la detección de *P. falciparum*. Las muestras fueron colectadas de forma activa en el 2018 en 10 comunidades de la región Loreto (Quistococha, Rumococha, Santo Tomas, 1 de enero, Gamitanacocha, Lago Yuracyacu, Libertad, Salvador,

Puerto Alegre y Urcomiraño). La diversidad de las comunidades abarcó áreas periurbanas cerca de la ciudad de Iquitos y áreas rurales en el distrito de Mazán (Figura 1).

Las muestras sanguíneas se seleccionaron en base al volumen necesario para realizar los ensayos y se clasificaron en tres grupos: El primer grupo incluyó 28 muestras con infecciones detectadas por microscopía y PCR en tiempo real con 21 infecciones por *P. vivax* y 7 infecciones por *P. falciparum*, con parasitemia asexual mayor a 100 parásitos/ $\mu$ L cuantificados por microscopía, excepto tres infecciones por *P. vivax* que tenían <100 parásitos/ $\mu$ L. El segundo grupo incluyó 101 infecciones submicroscópicas (83 infecciones por *P. vivax* y 18 infecciones por *P. falciparum*) detectadas solo por PCR en tiempo real como lo describen Mangold *et al.*, [22]. El tercer grupo incluyó 183 muestras negativas tanto por microscopía como por PCR en tiempo real y fueron incluidas para evaluar la interferencia del ADN humano con los cebadores de LAMP.

Figura 1.  
Ubicación de las comunidades de procedencia de las 312 muestras clasificadas como microscópicas, submicroscópicas y negativas.



3.1.2. Descripción de las muestras empleadas en la comparación de LAMP comercial y LAMP colorimétrico diseñado para *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum*.

Los LAMP comerciales Loopamp™ Malaria Pv Detection Kit (Human, ref. 975000) y Loopamp™ Malaria Pan Detection Kit (Human, ref. 977000), se evaluaron para determinar su sensibilidad y especificidad empleando un total de 559 muestras de sangre venosa. Los resultados se han publicado en el artículo titulado: “Diagnosis of *Plasmodium vivax* by Loop-Mediated Isothermal Amplification in Febrile Patient Samples from Loreto, Perú” [49].

Estas mismas muestras se emplearon para realizar la comparación del LAMP comercial y el LAMP colorimétrico “*in house*”. Para ello se analizó una segunda alícuota por LAMP colorimétrico “*in house*” y se compararon los resultados con los obtenidos previamente por LAMP comercial.

Las muestras se encontraban almacenadas a -80 °C en el banco de muestras del laboratorio de Malaria de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, provenientes de la colecta continua entre los meses de marzo a junio del 2017 de pacientes febriles que acudieron a los puestos de salud de las comunidades de Lupuna, Quistococha, San Juan, y Santa Clara en el distrito de San Juan en la región Loreto (Figura 2). La colecta de las muestras se realizó durante el desarrollo del proyecto: “Evaluación clínica del Sistema de panel de Antígenos febriles ChembioDPP® para el diagnóstico de la malaria” que cuenta con código SIDISI N° 100068.



3.1.3 Descripción de muestras de colecta activa y pasiva empleadas en la evaluación del LAMP colorimétrico “in house” para la detección de *P. vivax* y de *P. falciparum*.

Las muestras de colecta activa y pasiva fueron muestras sanguíneas impregnadas en papel filtro colectadas en la comunidad nativa de Nueva Jerusalén en la cuenca del río Macusari, afluente del río Corrientes, distrito de Trompeteros, región Loreto, Perú (Figura 3). La vía principal de acceso es a través de una vía de trocha por 4 horas aproximadamente desde el distrito de Nuevo Andoas (Provincia de Datem del Marañón). La comunidad cuenta con una posta nivel I-1, con un técnico de laboratorio y enfermería, un médico obstetra y un médico para atender un aproximado de 452 habitantes. Los habitantes utilizan madera para la construcción de sus casas y viven en un clima tropical cálido y húmedo durante todo el año. En estas condiciones, la comunidad reporta una transmisión persistente de malaria con picos de distribución irregular a lo largo del año.

En total 1084 muestras de sangre impregnada en papel filtro se colectaron del 6 de noviembre al 13 de diciembre de 2019 mediante actividades de vigilancia pasiva y activa para el diagnóstico y tratamiento de casos de malaria, realizada por el personal de la posta de salud de Nueva Jerusalén en colaboración con actividades del programa del Plan malaria Cero y el proyecto Vigilancia molecular de la resistencia de *Plasmodium falciparum* a medicamentos antimaláricos en áreas fronterizas de la Amazonía Peruana, con código SIDISI: 102725.

De la actividad de colecta pasiva se registraron 477 muestras de sangre impregnada en papel filtro colectadas de pacientes febriles en el centro de salud en días consecutivos del 6 de noviembre al 13 de diciembre de 2019. Para el análisis se excluyeron 46 muestras por no contar con la cantidad suficiente para realizar la prueba LAMP, quedando 431 muestras de sangre impregnada en papel filtro, identificándose por microscopía 97 infecciones por *P. vivax* y 5 infecciones causadas por *P. falciparum*.

En las actividades de colecta activa se obtuvieron 607 muestras de sangre impregnadas en papel filtro de personas voluntarias que participaron en tres rondas de muestreo, con un intervalo de una semana de colección activa de muestras. La primera actividad fue del 16 al 17 de noviembre, la segunda fue del 23 al 24 de noviembre y la tercera fue del 30 de noviembre al 01 de diciembre. En el análisis, se excluyeron 33 muestras por no contar con la cantidad suficiente para realizar la prueba LAMP, quedando 574 muestras de sangre impregnada en papel filtro, identificándose por microscopía 66 infecciones por *P. vivax* y 6 infecciones causadas por *P. falciparum*.

Figura 3.  
Ubicación de la comunidad de Nueva Jerusalén, procedencia de muestras sanguíneas impregnadas en papel filtro de colecta activa y pasiva.)



## 3.2 Procedimientos y técnicas

Los procedimientos se han agrupado de acuerdo con cada etapa de desarrollo de este estudio.

### 3.2.1 Procedimientos y técnicas empleados en el desarrollo y validación del LAMP colorimétrico “in house”.

#### 3.2.1.1 Diseño de cebadores del LAMP colorimétrico “in house”.

Para el diseño de los nuevos cebadores de LAMP se emplearon secuencias de loci multicopia: Gen mitocondrial codificante de citocromo oxidasa I (*COXI*) y la secuencia no codificante *Pvr47* para la identificación de *P. vivax*, mientras que para la identificación de *P. falciparum* se usaron la secuencia subtelomérica de la proteína de la membrana de los eritrocitos 1 (*EMPI*) y la secuencia no codificante *Pfr364*.

Las secuencias se analizaron mediante alineamiento múltiple de secuencias reportadas en PlasmoDB (plasmoDB.org) y en la base de datos de secuencias genéticas GenBank del NIH (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Las 14 secuencias de *Pvr47* (cepa *P. vivax* *Sal-I*) y las 41 secuencias de *Pfr364* (subfamilias 1 y 2 de la cepa 3D7 de *P. falciparum*) se obtuvieron de Demas *et al.* [38]. Los análisis en línea con estas secuencias empleando BLAST no arrojaron secuencias similares en otras especies de *Plasmodium* en las secuencias reportadas en el GenBank debido a que estas secuencias no codantes son muy específicas de la especie.

Para el diseño a partir de los genes *COXI* y *EMPI*, se emplearon las secuencias completas de los loci reportadas en GenBank. Las secuencias de *EMPI* no mostraron similitud con secuencias de otras especies de *Plasmodium* reportadas en el GenBank. Sin embargo, para el gen *COXI* los análisis empleando BLAST permitieron establecer el alineamiento con secuencias similares del gen *COXI* de otras especies de *Plasmodium*.

Los cebadores LAMP se diseñaron utilizando el software en línea gratuito Primer Explorer V5 (<http://primerexplorer.jp/lampv5e/index.html>) a partir de una secuencia consenso conservada obtenida a partir de los alineamientos de las secuencias obtenidas. En el caso de los diseños de los cebadores para *COXI* se diseñaron a partir de la secuencia obtenida de la cepa *P. vivax* *Sal-I*, se evaluaron regiones del gen y se comprobaron mediante inspección de la secuencia las distancias que deben de mantener los cebadores de acuerdo con lo descrito en EIKEN GENOME SITE (<http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/primer.html> ). Para cada blanco de amplificación se empleó el formato básico de amplificación con cuatro cebadores y 6 regiones de reconocimiento para la síntesis de ADN. Los cebadores externos F3 y B3 reconocen solo una región en la secuencia, mientras que los cebadores internos FIP y BIP reconocen cada uno a dos regiones distintas en la secuencia (Anexo 2. Mapas de ubicación de los cebadores de síntesis de ADN).

Adicionalmente todos los cebadores fueron analizados para obtener la máxima y específica complementariedad en los seis nucleótidos del

extremo 3' terminal, eliminando de esta forma a los cebadores que hibridan en otras regiones del genoma.

3.2.1.1.1 Comprobación de la secuencia de los blancos de amplificación de los cebadores diseñados:

Las secuencias de los cebadores seleccionados se enviaron para ordenar su síntesis y purificación en la compañía Thermo Fisher - Invitrogen. Para determinar las condiciones de reacción para cada blanco de amplificación y para comprobar que el blanco de amplificación era el correcto se realizó el clonamiento de la región comprendida entre los cebadores de los extremos B3 y F3, empleando el sistema de clonamiento plasmídico "TOPO TA Cloning Kit for Sequencing, with One Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli*".

Finalmente, la secuencia del inserto de los plásmidos recombinantes fue obtenida por la compañía MACROGENE y se confirmó la secuencia de la región comprendida entre los cebadores B3 y F3 obtenida en el alineamiento de las secuencias (Anexo 2. Mapas de ubicación de los cebadores de síntesis de ADN).

### 3.2.1.2 Diagnóstico por LAMP colorimétrico “in house”.

El diagnóstico por LAMP colorimétrico comprende dos etapas: El procesamiento de la muestra y la reacción de LAMP propiamente dicha.

#### 3.2.1.2.1 Procesamiento de muestras:

Para los análisis realizados se emplearon dos tipos de procesamiento de las muestras, uno de ellos simple a partir de un hervido y centrifugación, que nos permite la extracción de la muestra de análisis que denominamos ADN BS (del inglés *Boil & Spin*); y el segundo procesamiento de mayor complejidad empleando un kit de extracción basado en mini columnas de filtro de sílice, que nos permite la obtención de una muestra purificada de ADN que denominamos ADN MCS (del inglés *Minicolumn & Spin*).

#### a) Procesamiento de la muestra por calentamiento y centrifugación para la obtención de ADN BS:

Se emplearon 40  $\mu$ L de muestra de sangre entera colocados en microtubos de 1.5 mL. A cada microtubo de 1.5 mL conteniendo la muestra se le añadió 40  $\mu$ L de buffer de lisis 2X pH 8.5 (8 mM Tris-Base pH 9.0, 0.08 M NaCl, SDS 0.08%). Luego de homogenizar por pipeteo la mezcla se colocó en un baño maría hirviendo por 7 minutos y luego fue centrifugada por 7 min a máxima velocidad, el sobrenadante fue recuperado y transferido a un tubo nuevo y almacenado en lugar fresco y/o en refrigeración a  $-20^{\circ}\text{C}$  como máximo una semana antes del análisis de LAMP colorimétrico. Repeticiones realizadas a la muestra en el lapso de una semana no mostraron ninguna variación de los resultados.

b) Procesamiento de la muestra por el kit de extracción para la obtención de ADN MCS:

Se emplearon 40  $\mu\text{L}$  de sangre entera colocados en un microtubo de 1.5 mL. El ADN se extrajo utilizando EZNA® Blood DNA (Omega Bio-tek, Norcross, GA, EE. UU.), siguiendo el protocolo del fabricante. En resumen, a los tubos con muestra se les añadió 250  $\mu\text{L}$  de tampón 2X TEN pH 8,0 (NaCl 0,2 M, Tris-HCl 0,02 M pH 8,0, EDTA 0,002 M pH 8,0), 180  $\mu\text{L}$  de agua destilada, 50  $\mu\text{L}$  de 10 % SDS; y 25  $\mu\text{L}$  de solución de proteasa OB. La mezcla se incubó a 65 °C durante 60 min y se centrifugó a 13 000 g durante 5 min; el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, agregando 250  $\mu\text{L}$  de tampón BL y 260  $\mu\text{L}$  de etanol al 100%. Luego, se transfirieron 500  $\mu\text{L}$  de este homogenizado a una mini-columna de ADN HiBind® insertada en un tubo colector de 2 mL y se centrifugó a 10 000 g durante 1 min. Se descartó el filtrado y se insertó la mini-columna en un nuevo tubo de recolección de 2 mL, se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de tampón HBC, se centrifugó a 10 000 g durante 1 min y se descartó el filtrado. Luego, se agregaron 700  $\mu\text{L}$  de tampón de lavado a la columna y se centrifugó a 10 000 g durante 1 min; este proceso se repitió una vez más. La mini-columna de ADN HiBind® vacía se centrifugó a máxima velocidad durante 2 min para secar la matriz de la columna. El ADN de la columna se eluyó en 60  $\mu\text{l}$  de tampón de elución precalentado a 65 °C. El ADN eluido se almacenó a - 20 °C antes del análisis de LAMP colorimétrico y/o PCR.

### 3.2.1.2.2 LAMP colorimétrico “in house”

El LAMP colorimétrico “in house” se evaluó con el ADN BS y ADN MCS obtenido de cada muestra, empleándose 5 µL para cada análisis.

Para el desarrollo y validación con sangre entera los ensayos LAMP colorimétricos se optimizaron para proporcionar una detección visual clara basada en la disminución del pH provocada por la síntesis del blanco de amplificación. La disminución del pH provoca el cambio de coloración del colorante rojo neutro, de amarillo a fucsia.

Las condiciones de amplificación se determinaron variando la concentración de magnesio y disminuyendo la fuerza iónica del buffer a 0.5X para obtener la amplificación evidenciada con el cambio de coloración del colorante rojo neutro. De esta manera, las mezclas de reacción se prepararon a un volumen final de 25 µL, conteniendo tampón de reacción de ADN polimerasa 0.5X Bst (Tris-HCl 10 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM, KCl 25 mM, MgSO<sub>4</sub> 1 mM, Tween 20 al 0,05 %, pH 8.8 New England Biolabs Inc., MA, EE. UU.), 0.2 µM de cada cebador externo F3 y B3, 2 µM de cada cebador interno FIP y BIP, 12U de Bst v2.0 ADN polimerasa (New England Biolabs Inc., MA, EE. UU.), 1.4 mM de cada dNTP, 0.003 % de colorante rojo neutro y 5 µL de una muestra de prueba. La mezcla de reacción para Pvr47-LAMP se ajustó a MgSO<sub>4</sub> 6 mM, PvCOX1-LAMP se ajustó a MgSO<sub>4</sub> 6 mM y betaína 0.4 M, Pfr364-LAMP se ajustó a MgSO<sub>4</sub> 8 mM y PfEMP1-LAMP se ajustó a 8 mM MgSO<sub>4</sub> y betaína 0.4 M.

La reacción LAMP se produce cuando la mezcla de reacción homogenizada con la muestra se incubaba a 60 °C por 65 min, la reacción se

realizó en un termociclador Bio-Rad T100 <sup>TM</sup> (Laboratorios Bio-Rad, CA, EE. UU.).

Las evaluaciones de las muestras se realizaron en tiras de tubos de PCR de 8 unidades evaluándose como máximo grupos de 96 reacciones. En cada grupo de análisis se incluyó una muestra positiva para *P. vivax*, una muestra positiva para *P. falciparum* y un blanco de reactivos que contenía agua para completar el volumen de reacción. La determinación de los resultados se realizó por inspección visual, evaluándose el cambio de coloración en las reacciones con los controles y determinándose una reacción positiva si la mezcla de reacción cambio de amarillo a fucsia después del periodo de incubación.

Los LOD de cada prueba LAMP se determinaron en dos formatos: (1) LOD en términos de número de copias por  $\mu\text{L}$ , para lo cual se usaron diluciones seriadas de cada plásmido recombinante de cada blanco de amplificación (Véase Confirmación de la secuencia de blancos de amplificación en Diseño de cebadores del LAMP colorimétrico “*in house*”) ; y (2) LOD en términos de número de parásitos por  $\mu\text{L}$ , para lo cual se usaron diluciones seriadas de una muestra cultivada de *P. falciparum*, cepa 3D7, y un pool de muestras combinadas de sangre completa de pacientes infectados con *P. vivax* (cuantificadas previamente por microscopía y qPCR). Las diluciones empleadas se analizaron en 15 repeticiones con cada LAMP colorimétrica para cada blanco de amplificación. El LOD se calculó utilizando la regresión Probit con el MedCalc Statistical Software versión

19.2.6 (MedCalc Software bv, Ostend, Bélgica; <https://www.medcalc.org>; 2020).

3.2.1.3 Diagnóstico molecular por PCR en tiempo real como método de clasificación de muestras submicroscópicas en la evaluación del LAMP colorimétrico “in house” empleando sangre entera.

En el desarrollo del LAMP colorimétrico “in house” y evaluación de los blancos de amplificación con genes multicopia empleando sangre entera el diagnóstico molecular de referencia que se empleó fue el PCR descrito por Mangold *et al.*, utilizando el gen 18S ARNr [22]. Las mezclas de reacción se prepararon a un volumen final de 25 µL con una concentración final de 1X de PerfeCTa SYBR® Green Fastmix y 0,3 µM de cada cebador PL1473F18 5'-TAACGAACGAGATCTTAA-3' y PL1679R18 5'-GTTCTCTAAGAAGCTTT-3'. Las condiciones de PCR consistieron en un paso de desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 min, seguido de 45 ciclos de 20 s 95° C, 20 s 50 °C y 20 s 68 °C, con adquisición de fluorescencia al final de cada paso de extensión. La amplificación fue seguida inmediatamente por un análisis de la curva de desnaturalización con el siguiente procedimiento: 2 min a 68 °C y un aumento gradual de la temperatura de 0,5 °C/s hasta 90 °C, y adquisición de fluorescencia en cada transición de temperatura. Todas las muestras con un ciclo de cuantificación (Cq) de menos de 36,2 se consideraron positivas de acuerdo con la determinación del LOD del PCR. El LOD se determinó utilizando una dilución en serie del primer estándar internacional de la OMS para técnicas

de amplificación de ácidos nucleicos de ADN de *P. falciparum* [47] (código NIBSC 04/176) disponible en el laboratorio de malaria. Los parámetros obtenidos para la cuantificación por PCR se asumieron los mismos para la especie *P. vivax*, considerando que el mismo locus es la misma diana de amplificación. El análisis de la curva de desnaturalización se utilizó para determinar la especie: la temperatura de  $73,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5$  se empleó para definir la infección por *P. falciparum* y la temperatura de  $77\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5$  para determinar la infección por *P. vivax*; aparición de curvas a otras temperaturas en este análisis son reconocidas como productos inespecíficos, o relacionadas a otras especies como *P. malariae* o *P. ovale*.

### 3.2.2 Procedimientos y técnicas empleados en la evaluación de la prueba comercial LAMP.

#### 3.2.2.1 Diagnóstico por microscopía

Los datos del diagnóstico por microscopía fueron obtenidos del reporte del proyecto: “Evaluación clínica del Sistema de panel de Antígenos febriles ChembioDPP® para el diagnóstico de la malaria”. La lectura de las láminas con frotis y gota gruesa de sangre teñidas con Giemsa se realizó utilizando la metodología descrita por el Ministerio de Salud para la cuantificación de las muestras [45]. El diagnóstico microscópico negativo se determinó al leer las láminas en los campos suficientes para no encontrar parásitos contando al menos 500 glóbulos blancos.

### 3.2.2.2 Diagnóstico por LAMP comercial.

Se emplearon los kits comerciales: Loopamp™ Malaria Pan Detection Kit para la detección del género *Plasmodium* y la prueba diagnóstica Loopamp™ Malaria Pv Detection Kit para la detección de *P. vivax* (ambos desarrollados por la compañía Eiken Chemical Co. Ltd., Tokyo, Japan); su uso se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante [46]. Brevemente, el ácido nucleico se extrae usando un método de ebullición y centrifugado, donde se emplean 60 µL de muestra de sangre completa en un tubo de 1.5 mL con 60 µL de tampón de extracción de ADN (NaCl 400 mM, Tris 40 mM pH 6.5 y SDS al 0.4%), se mezclan durante 5 minutos a 95 °C en un termobloque y se centrifugan a 10000 g durante 3 minutos. Recuperado el sobrenadante, 30 µL son transferidos a un nuevo tubo y mezclados con 345 µL de agua destilada. El ADN extraído y diluido (30 µL) se añadió a los tubos de reacción Pan-LAMP y Pv LAMP; la resuspensión de los reactivos se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras se incubaron durante 40 minutos a 65 °C en un termobloque, seguido de 5 minutos a 80 °C para detener la reacción. La amplificación de ADN se detectó por simple inspección visual, en función de la fluorescencia observada en la mezcla de reacción al exponerla a una lámpara de luz ultravioleta (UV). Cada reacción de LAMP se evaluó visualmente tres veces con distinto observador, y el informe final del resultado se obtuvo de al menos dos observaciones visuales iguales.

3.2.2.3 Diagnóstico molecular de referencia en la evaluación comparativa de la prueba comercial LAMP y el LAMP colorimétrico “in house”.

El resultado del diagnóstico molecular es el producto de una combinación de lo obtenido en dos Laboratorios, un diagnóstico de PCR en tiempo real realizado en el laboratorio Limbach (Heidelberg, Alemania) con una sonda específica de la especie y secuenciación unidireccional mediante el uso de la región no codificante entre los genes *cytb* y *cox1*; y un segundo análisis realizado en el laboratorio Microsynth (Balgach, Suiza) con un PCR anidado y secuenciación bidireccional empleando el gen *cytb* del ADN mitocondrial de *Plasmodium*.

3.2.3 Procedimientos y técnicas empleados en la validación del LAMP colorimétrico “in house” empleando muestras sanguíneas impregnadas en papel filtro de colecta activa y pasiva.

3.2.3.1. Diagnóstico por microscopía

Los resultados del diagnóstico por microscopía fueron obtenidos de los reportes del proyecto: “Vigilancia molecular de la resistencia de *Plasmodium falciparum* a medicamentos antimaláricos en áreas fronterizas de la Amazonía Peruana” con código SIDISI: 102725.

Láminas con frotis y gota gruesa de sangre teñidas con Giemsa fueron leídas según el procedimiento estándar del Ministerio de Salud para el cálculo semicuantitativo de las muestras [45].

3.2.3.2. Diagnóstico por LAMP colorimétrico “in house” de muestras sanguíneas impregnadas en papel filtro.

El diagnóstico por LAMP colorimétrico “in house” descrito en la sección 3.2.1.2 (Diagnóstico por LAMP colorimétrico “in house”) fue adaptado para las muestras sanguíneas impregnadas en papel filtro.

La muestra sanguínea para los procesos de obtención de ADN se reemplazó por dos discos de 6 mm de diámetro obtenidos por perforaciones del papel con la sangre impregnada. Solo en el caso de obtención de ADN BS, se modificó el volumen de buffer de lisis 2X empleado en vez de 40 µL de buffer se emplearon 80 µL de buffer; la obtención de ADN MCS se

obtuvo de la extracción a partir de los dos discos de sangre impregnada sin modificaciones en el procedimiento.

El LAMP colorimétrico “*in house*” se evaluó con el ADN BS y ADN MCS obtenido de cada muestra.

Las mezclas de reacción se prepararon manteniendo las concentraciones finales descritas en la sección 3.2.1.2 (Diagnóstico por LAMP colorimétrico “*in house*”). El volumen final empleado fue de 15  $\mu$ L, manteniendo el volumen de muestra en 5  $\mu$ L (ADN BS o ADN MCS).

Las evaluaciones de las muestras se realizaron en tiras de tubos de PCR de 8 unidades evaluando como máximo 96 reacciones por grupo. Cada grupo de análisis incluyó una muestra positiva para *P. vivax*, una muestra positiva para *P. falciparum* y un blanco de reactivos que contenía agua para completar el volumen de reacción. La determinación de los resultados se realizó por inspección visual, evaluándose el cambio de coloración en las reacciones con los controles y determinándose una reacción positiva si la mezcla de reacción cambiaba de amarillo a fucsia.

#### 3.2.3.3 Diagnóstico molecular de referencia para la evaluación de LAMP colorimétrico con muestras impregnadas con papel filtro.

Las pruebas moleculares se realizaron a las muestras sanguíneas impregnadas en papel filtro en Lima luego de dos años debido a la interrupción de actividades por la emergencia sanitaria ocasionada por Covid-19.

El diagnóstico molecular se realizó por qPCR con una doble determinación para el género *Plasmodium*. El primer método utilizado fue descrito por Pincelli *et al.*, [48] empleando los cebadores externos de la amplificación TaqMan descritos por Rougemont *et al.*, [24]; las mezclas de reacción se prepararon a un volumen final de 25 µL que contenían 5 µL de muestra de ADN de MCS, con una concentración final de 1 X PerfeCTa SYBR® Green FastMix (Quantabio, Beverly, Massachusetts) y 0.2 µM de cada cebador (Plasmo 1, 5'-GTT AAG GGA GTG AAG ACG ATC AGA-3' y Plasmo 2, 5'-AAC CCA AAG ACT TTG ATT TCT CAT AA-3'). La amplificación se llevó a cabo en un CFX96 Touch Sistema de detección de PCR en tiempo real (BioRad), la amplificación se realizó con una desnaturalización de 95°C durante 10 min, seguido de 40 ciclos de 15 s 95 °C y 1 min a 60 °C, con adquisición de fluorescencia al final de cada paso de extensión. La amplificación fue seguida inmediatamente por un análisis de desnaturalización de 3 min a 70 °C, y un aumento gradual de temperatura de 0.5 °C/s hasta 90 °C, con adquisición de fluorescencia en cada transición de temperatura.

El segundo método para la evaluación de *Plasmodium* en muestras impregnadas en papel filtro incluyó cebadores dirigidos al 3'UTR de COXIII desarrollados en el laboratorio de malaria. Las mezclas de reacción se prepararon a un volumen final de 25 µL, que contenían 5 µL de muestra, con una concentración final 1 X PerfeCTa SYBR® Green FastMix (Quantabio, Beverly, Massachusetts), y 0,2 µM de cada cebador (COXIIIF, 5'- CGGTAGATAGGGAACAAACT -3' y COXIIIR, 5'-

CTTTGCCTGGAGGTTACG -3'). La amplificación se llevó a cabo en un CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (BioRad), con un protocolo de amplificación de 95 °C durante 3 m, seguido de 45 ciclos de 15 s a 95 °C, 15 s a 60 °C y 15 s a 68°C, con adquisición de fluorescencia al final de cada paso de extensión. La amplificación fue seguida de un análisis de desnaturalización de 3 min a 70 °C, y un aumento gradual de temperatura de 0,5 °C/s hasta 90 °C, con adquisición de fluorescencia a cada temperatura transición.

Todas las muestras que mostraron amplificación con al menos una de las pruebas de detección para *Plasmodium* fueron evaluadas por TaqMan qPCR para la determinación específica de la especie descrito por Rougemont *et al.*, [24]. Las mezclas de reacción se prepararon en un volumen final de 20 µL que contenían 5 µL de ADN de muestra con un volumen final de concentración 1X de mezcla maestra TaqMan Universal Master Mix 2.0 (Applied Biosystems), 0.1 µM de cada cebador para la amplificación específica de género (Plasmo1 y Plasmo 2), 0.08 µM de cada oligonucleótido específico de especie o sonda marcada (*P. vivax*: 5' VIC [fluoróforo patentado de Applied Biosystems]-AGC AAT CTA AGA ATA AAC TCC GAA GAG AAA ATT CT-QSY [Quencher patentado de Applied Biosystems] 3'; *P. falciparum*: 5' FAM [6-carboxifluoresceína]-AGC AAT CTA AAA GTC ACC TCG AAA GAT GAC T-QSY [Quencher patentado de Applied Biosystems] 3'). La amplificación por reacción en cadena de la polimerasa se realizó a 95°C durante 10 min, seguido de 45 ciclos de 15 s a 95°C y 1 min a 60°C.

Para cada placa de reacción de PCR se emplearon controles negativos de amplificación (que contiene todos los reactivos para amplificación excepto ADN) y controles positivos (que contiene ADN para *P. falciparum* y *P. vivax* previamente cuantificado). Todas las muestras con un Cq inferior a 36,4 se consideraron positivas según el Límite de Cuantificación (LOQ del inglés *limit of quantification*) determinada mediante una dilución en serie del primer estándar internacional de la OMS para técnicas de amplificación de ácido nucleico de ADN de *Plasmodium falciparum* (código NIBSC 04/176) disponible en el laboratorio de Malaria y asumimos el mismo LOQ para *P. vivax*, considerando que la reacción se realiza con el mismo blanco de amplificación 18s rARN. Se reevaluaron las muestras con Cq entre 36.4 y 38.5 aumentando tres veces la cantidad de la muestra y la segunda amplificación confirmó la muestra positiva con baja densidad de parásitos.

Finalmente, solo se determinaron como positivas a las muestras que presentaron amplificación especie específica por el TaqMan qPCR descrito por Rougemont *et al.*, [24].

### 3.3 Aspectos éticos

El presente proyecto con registro Código SIDISI:201296 cuenta con aprobación del Comité Institucional de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (CIEI-UPCH), constancia E07-14-20, bajo la categoría de EXENTO con fecha de caducidad el 26 de mayo del 2025 (Anexo 1).

La aprobación abarca el uso de las muestras codificadas obtenidas durante el proyecto: “Evaluación clínica del Sistema de panel de Antígenos febriles ChembioDPP® para el diagnóstico de la malaria” que cuenta con código SIDISI N° 100068; muestras sanguíneas obtenidas de la colecta llevada a cabo por el proyecto: “Círculo de Investigación para la implementación de una plataforma molecular diferencial y TICs para la vigilancia de Zika, Dengue, Chikungunya y Malaria: Estudio Piloto (SIDISI: 101645), y finalmente el uso de las muestras obtenidas del proyecto Vigilancia molecular de la resistencia de *Plasmodium falciparum* a medicamentos antimaláricos en áreas fronterizas de la Amazonía Peruana, con código SIDISI: 102725, estas últimas añadidas en una enmienda aprobada por el CIEI-UPCH el 08 de julio del 2021.

En todo momento, las muestras empleadas se analizaron con codificación única y sin acceso a la información de los donantes.

### 3.4 Plan de análisis

El desarrollo de este estudio se realizó en dos etapas (Figura 4):

La primera etapa comprende las siguientes actividades:

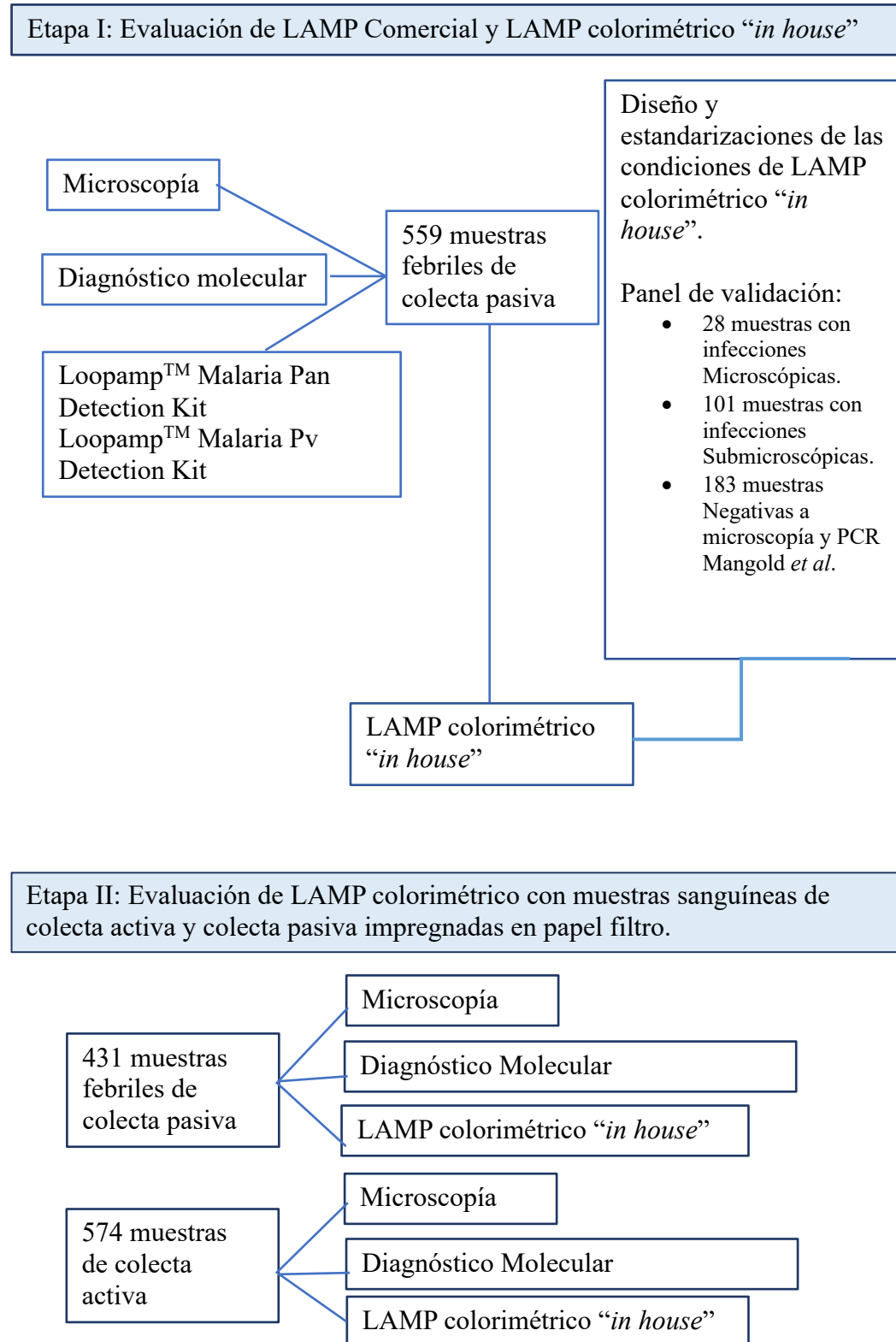
- Desarrollo de pruebas de LAMP colorimétrico “*in house*” con bancos de amplificación multicopia.
- Comparación de los resultados Loopamp™ Pan MALARIA y Loopamp™ Pv MALARIA con el LAMP colorimétrico de diseño *in house*, empleando muestras de la región amazónica.

En la segunda etapa del proyecto se estandarizó el nuevo LAMP colorimétrico empleando muestras impregnadas en papel filtro colectadas de forma activa y pasiva en la comunidad nativa de Nueva Jerusalén del distrito de Trompeteros en la región Loreto.

Los resultados de diagnóstico por las pruebas realizadas fueron registrados en una hoja Excel, procesados y analizados en el paquete estadístico R para determinar la distribución de las determinaciones diagnósticas por cada prueba diagnóstica en un diagrama de Venn, los intervalos de confianza (IC) al 95% de los valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo. Además, se evaluó el valor del índice Kappa para establecer las correlaciones entre el diagnóstico microscópico, qPCR en tiempo real y LAMP colorimétrico “*in house*”.

Figura 4.

Flujo de análisis de la Investigación



## IV RESULTADOS

### 4.1. Desarrollo y evaluación de una prueba de LAMP colorimétrico “in house” empleando blancos de amplificación multicopia para el diagnóstico diferencial molecular de *P. vivax* y *P. falciparum*.

Los cebadores LAMP seleccionados *in silico* a partir de las regiones homólogas de alineamiento de cada uno de los genes multicopia se seleccionaron en formato básico de amplificación de cuatro cebadores. Se seleccionaron todos los cebadores con nula o baja probabilidad de formación de la estructura secundaria con una energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) mayor a -3 kcal/mol o con homodímeros y/o heterodímeros con  $\Delta G$  mayor a -10 kcal/mol.

Finalmente, los cebadores seleccionados para cada blanco de amplificación se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1.

Secuencias de cebadores por cada blanco de amplificación para la detección de las especies *P. vivax* y *P. falciparum*.

Especie	LAMP	Blanco de amplificación		Secuencia (5' → 3')
<i>P. vivax</i>	PvCOX1-LAMP	<i>COX1</i>	F3	GAATAATTGCACAAGAAAAT GTTAAC
			B3	GCAACAGGAGATAAAGACAT AAGTGA
			FIP	CAAGTTCTGGAGAACCACAT AAAATTG- CCAGGATTATTTGGAGGATT CG
			BIP	GTCATTTTATCTACAGCAGCA GAATTT- TGGTGGATATAAAGTCCATC CAGT
	Pvr47-LAMP	<i>Pvr47</i>	F3	AACACCTCCCACCAATCA
			B3	GTGAATTATCGAAGGCATAA
			FIP	TACGCGGAAAATCAGAACAA TTCAT- GTGCCAATTTTTTTTTGCGG
			BIP	ATCTTTCGCTTATCCATTCAT CGA- TAGTGACAAAACATAAACAC AGC
<i>P. falciparum</i>	PfEMP1-LAMP	<i>EMP1</i>	F3	CCGACAAAACCTTTCACCCAA
			B3	CTGTTGTGTTGTTACCACTAG G
			FIP	GGTGTAACTACTATCAGTTCC ACTA- AGTGGTAAATACAGAGGCAA AC
			BIP	TCCGAAAGTGAGTATGAAGA ATTGG- ATGTTTTATATTTAGGACTAC CTGG
	Pfr364-LAMP	<i>Pfr364</i>	F3	CACTAGGTACGCCAACAT
			B3	ACCCACAATTTTGATTGAGAT G
			FIP	GTAGACACCATATGGTACCA CGTA- GGATGTGTCTATCATATAGTC CG
			BIP	TTGTACCCAATTTCCCTAG CA- GTGTGTGCAACATCATAATC ATCA

#### 4.1.1 Límite de detección de LAMPs diseñados

El Pfr364-LAMP para la detección de *P. falciparum*, mostró un LOD de 27.3 copias de plásmido/ $\mu$ L y un LOD de 3.7 parásitos/ $\mu$ L, mientras que PfEMP1-LAMP para la detección de *P. falciparum*, mostró un LOD de 28.9 copias de plásmido/ $\mu$ L y un LOD de 3.3 parásitos/ $\mu$ L (Tabla 2).

En los sistemas para la detección de *P. vivax*, PvCOX1-LAMP mostró un LOD de 23.9 copias de plásmido/ $\mu$ L y un LOD de 2.4 parásitos/ $\mu$ L, mientras que Pvr47-LAMP mostró un LOD de 15.6 copias de plásmido/ $\mu$ L y un LOD de 3 parásitos/ $\mu$ L (Tabla 2).

**Tabla 2 .**  
**Límite de Detección de los sistemas LAMP diseñados**

Empleando muestras sanguíneas		Empleando plásmido recombinante para cada blanco de amplificación	
PvCOX1-LAMP LOD 2.4 parásitos/ $\mu$ L 95%CI: 1.8-4.8		PvCOX1-LAMP LOD 23.9 copias/ $\mu$ L 95%CI: 16.1-65.8	
Parásitos/ $\mu$ L*:	Positivo/n <sup>o</sup> replicas	Plásmido (Copias/ $\mu$ L):	Positivo/n <sup>o</sup> replicas
214.1	15/15	1684.0	15/15
21.4	15/15	168.4	15/15
2.1	13/15	16.8	13/15
1.1	9/15	8.5	7/15
0.5	0/15	3.4	1/15
Pvr364-LAMP LOD 3.7 parásitos/ $\mu$ L 95%CI: 2.8-7.5		Pvr364-LAMP LOD 27.3 copias/ $\mu$ L 95%CI: 19.1-133.6	
3D7 cultivo (Parásitos/ $\mu$ L):	Positivo/n <sup>o</sup> replicas	Plásmido (Copias/ $\mu$ L):	Positivo/n <sup>o</sup> replicas
314.2	15/15	1865.5	15/15
31.4	15/15	186.6	15/15
3.1	13/15	18.7	12/15
1.6	6/15	9.3	4/15
0.8	0/15	1.9	0/15
Pvr47-LAMP LOD 3 parásitos/ $\mu$ L 95%CI: 2.1-6.8		Pvr47-LAMP LOD 15.6 copias/ $\mu$ L 95%CI: 11.9-30.5	
Parásitos/ $\mu$ L*:	Positivo/n <sup>o</sup> replicas	Plásmido (Copias/ $\mu$ L):	Positivo/n <sup>o</sup> replicas
214.1	15/15	1631.6	15/15
21.4	15/15	163.2	15/15
2.1	12/15	16.3	14/15
1.1	5/15	8.2	9/15
0.5	0/15	3.3	0/15
PfEMP1-LAMP LOD 3.3 parásitos/ $\mu$ L 95%CI: 2.4-6.7		PfEMP1-LAMP LOD 28.9 copias/ $\mu$ L 95%CI: 21.2-86.7	
3D7 cultivo (Parásitos/ $\mu$ L):	Positivo/n <sup>o</sup> replicas	Plásmido (Copias/ $\mu$ L):	Positivo/n <sup>o</sup> replicas
314.2	15/15	2076.0	15/15
31.4	15/15	207.6	15/15
3.1	14/15	20.8	12/15
1.6	8/15	10.4	3/15
0.8	1/15	2.1	0/15

\* Pool de muestras de sangre de pacientes infectados cuantificados en parásitos/  $\mu$ L por PCR en tiempo real.

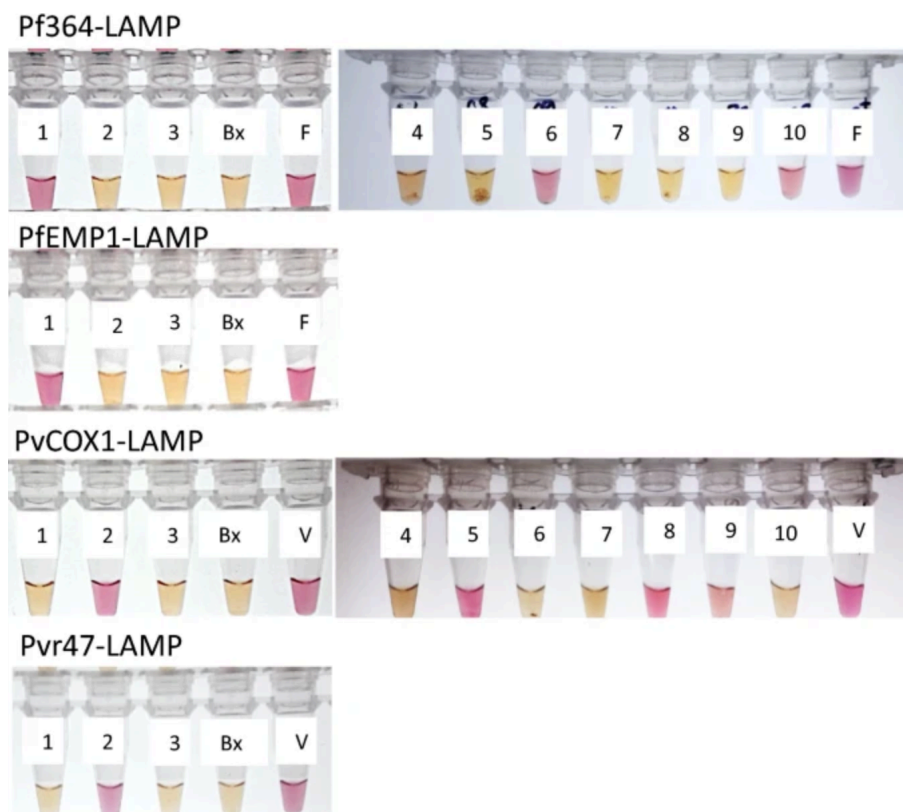
#### 4.1.2. Especificidad analítica de LAMPs diseñados

En general, los LAMP colorimétricos con blancos de amplificación *PfEMP1* y *Pfr364* mostraron una alta especificidad para detectar *P. falciparum* 3D7 y las muestras de referencia correspondientes a *P. falciparum* de la distribución de control externo de calidad 4260 del Servicio de Parasitología del Servicio Nacional de UK-NEQAS (Figura 5). Los LAMP colorimétricos diseñados para *P. vivax* con los blancos de amplificación *COXI* y *Pvr47* mostraron una reacción positiva con la cepa Sal-I de *P. vivax*; pero también mostraron una reacción positiva con *P. knowlesi*, probablemente debido a la alta similitud genómica.

En ninguno de los casos los LAMP colorimétricos diseñados mostraron reacción positiva a la muestra de ADN de *P. malariae* proporcionadas por el CDC de Atlanta-Estados Unidos o a la muestra de *P. ovale* del control externo de calidad de UK-NEQAS.

Figura 5.

Especificidad de los distintos LAMP colorimétricos.



(1) ADN de *P. falciparum* 3D7; (2) ADN de *P. vivax* Sal-I; (3) ADN de *P. malariae*; (4) *P. ovale* 200000 parásitos/mL, (5) *P. vivax* 20000 parásitos/mL, (6) *P. falciparum* 20000 parásitos/mL, (7) ADN negativo a *Plasmodium*, (8) *P. knowlesi* 200000 parásitos/mL, (9) *P. vivax* 10000 parásitos/mL, (10) *P. falciparum* 10000 parásitos/mL, (F) *P. falciparum* control positivo, (V) *P. vivax* control positivo, (BX) control en blanco

#### 4.1.3 Evaluación de los LAMPs diseñados con muestras sanguíneas de infecciones microscópicas, submicroscópicas y negativas a *Plasmodium*

Los LAMPs se evaluaron con ADN extraído mediante dos procedimientos, el kit de ADN MCS y el método ADN BS. Las muestras empleadas se clasificaron en tres grupos de muestras de sangre: 28 muestras de infecciones diagnosticadas por microscopía, 101 muestras de infecciones submicroscópicas de malaria detectadas solo por qPCR, y 183 muestras negativas a malaria por microscopía y PCR.

##### *4.1.3.1. Evaluación de los LAMPs diseñados para detectar *P. vivax**

A pesar de los auspiciosos resultados mostrados por Amaral en el 2019 [43], para la detección de *P. vivax* mediante un PCR empleando el locus *Pvr47*, nuestro diseño en este mismo locus resultó en una sensibilidad menor a la que reportamos empleando los cebadores de nuestro diseño para el locus mitocondrial en el PvCOX1-LAMP (Tabla 3 y Figura 6).

El PvCOX1-LAMP mostró la mayor sensibilidad para la detección de *P. vivax*. Usando ADN MCS, el PvCOX1-LAMP detectó el 100 % (21/21) de las muestras con infecciones microscópicas y el 86,7 % (72/83) de las muestras con infecciones submicroscópicas, mientras que el Pvr47-LAMP detectó solo el 71,4 % (15/21) y el 36,1% (30/83) de estas muestras, respectivamente (Tabla 3). Asimismo, utilizando ADN BS, el PvCOX1-LAMP detectó el 81% (17/21) de muestras microscópicas y el 36,1% (30/83) de muestras submicroscópicas, mientras que con el Pvr47-LAMP solo se detectó el 52,4% (11/21) y el 22,9% (19/83) de estas muestras, respectivamente.

En el grupo de infección microscópica, solo cuatro muestras de BS dieron resultados negativos en PvCOX1-LAMP; dos de estas muestras tuvieron una densidad parasitaria de 324 y 514 parásitos/ $\mu$ L cada una, mientras que en las otras la densidad parasitaria fue la más baja detectada por microscopía, ambas con 32 parásitos/ $\mu$ L.

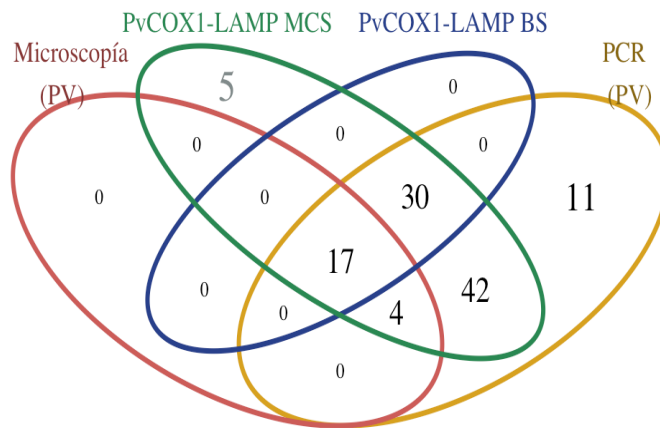
En el tercer grupo de muestras negativas a malaria por microscopía y PCR, se encontraron cinco muestras positivas a *P. vivax* por PvCOX1-LAMP, mediante el uso de ADN MCS (Figura 6). Luego de una evaluación adicional con PCR TaqMan, descrito por Rougemont *et al.* [24], se observó que estas muestras tenían niveles muy bajos de densidad parasitaria y que, por lo tanto, corresponden a muestras con un resultado estocástico o con resultados cambiantes en las réplicas de análisis.

<b>Tabla 3. Sensibilidad y especificidad de Pwr47 and COXI para la detección de P. vivax</b>					
	Muestra extraída con filtro (MCS)		Muestra Calentada y Centrifugada (BS)		
	Pwr47-LAMP	PvCOXI-LAMP	Pwr47-LAMP	PvCOXI-LAMP	
Infecciones de P. vivax detectadas por microscopía y PCR	71.4% 95 IC: 47.7%-87.8%	100.00% 95 IC: 80.8%-100%	52.4% 95 IC: 30.3%-73.6%	81.0% 95 IC: 57.42%-93.71%	
n=21	n=15	n=21	n=11	n=17	
Infecciones submicroscópicas de P. vivax detectadas solo por PCR	36.1% 95 IC: 26.1%-47.5%	86.8% 95 IC: 77.1%-92.9%	22.9% 95 IC: 14.7%-33.7%	36.1% 95 IC: 26.1%-47.5%	
n=83	n=30	n=72	n=19	n=30	
Negativos a microscopía y PCR	95.7% 95 IC: 91.7%-97.9%	97.6% 95 IC: 94.2%-99.1%	97.1% 95 IC: 93.5%-98.8%	100% 95 IC: 97.7%-100%	
n = 208	n=199	n=203	n=202	n=208	
Sensibilidad*	43.3% 95 IC: 33.7%-52.8%	89% 95 IC: 83.5%-95.3%	29% 95 IC: 20.1%-37.6%	45% 95 IC: 35.6%-54.8%	
Especificidad*	95.7% 95 IC: 92.9%-98.4%	98% 95 IC: 95.5%-99.7%	97% 95 IC: 94.8%-99.4%	100% 100%	
Concordancia Cohen's Kappa*	0.443 0.338 - 0.547	0.883 0.827 - 0.939	0.310 0.208 - 0.412	0.524 0.425 - 0.622	
*Método de Referencia: PCR en tiempo real					

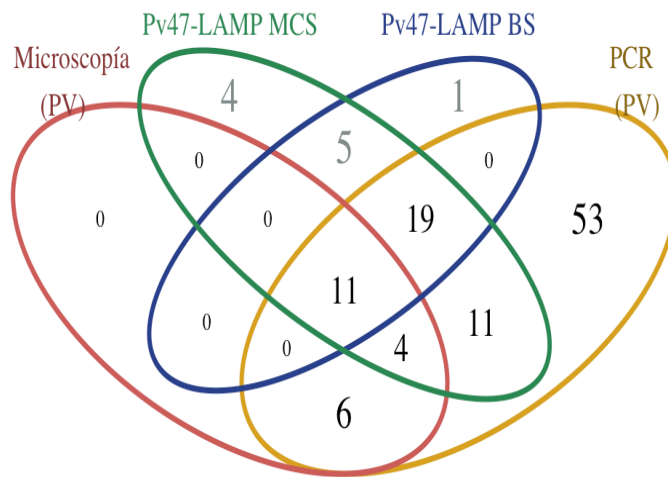
Figura 6.

Diagrama de Venn muestra la distribución de las muestras detectadas para *P. vivax* por PvCOX1-LAMP (panel A) y por Pv47-LAMP (panel B).

A



B



MCS: empleando ADN purificado por MCS (del inglés Mini Column Spin)

BS: empleando ADN extraído por BS (del inglés Boil & Spin)

PV: *Plasmodium vivax*

#### 4.1.3.2. Evaluación de los LAMPs diseñados para detectar *P. falciparum*

En términos de sensibilidad y especificidad, los LAMP para *P. falciparum* (Pfr364-LAMP y PfEMP1-LAMP) fueron muy similares y no mostraron una significancia estadística con la prueba de McNemar cuando se utilizó ADN BS (chi-cuadrado = 0.25, gl = 1, valor de p = 0,6171) y una concordancia moderada al ser comparados con PCR con índices Cohen's Kappa entre 0.64 y 0.57. Ambos LAMP incrementaron sus índices Cohen's Kappa entre 0.74 y 0.82 cuando se utilizó ADN MCS (Tabla 4).

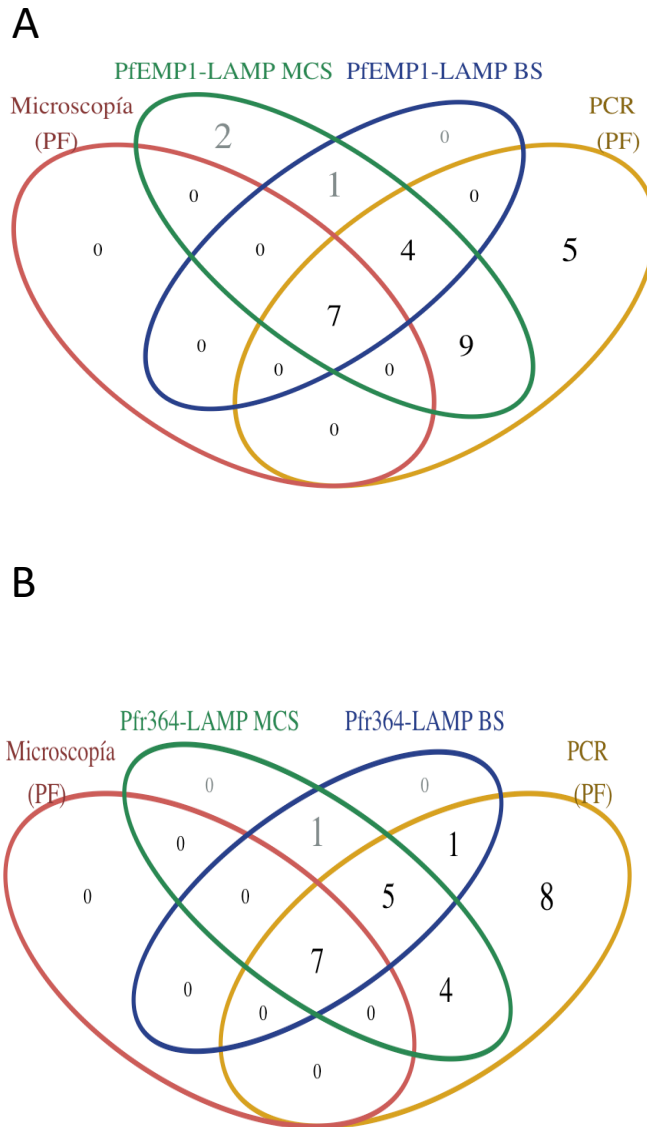
Tanto Pfr364-LAMP como PfEMP1-LAMP no presentaron problemas en detectar todas las infecciones de malaria del grupo de infecciones microscópicas (n = 7) usando ADN MCS y ADN BS. Sin embargo, ambos ensayos exhibieron dificultad para detectar infecciones submicroscópicas; PfEMP1-LAMP detectó mayor cantidad de muestras, pero acompañado con una pérdida de especificidad cuando se evaluó con ADN MCS (Tabla 4 y Figura 7). Por otro lado, empleando ADN BS, el Pfr364-LAMP detectó 6 de 18 muestras del grupo de infecciones submicroscópicas, mientras que PfEMP1-LAMP detectó solo cuatro muestras (Figura 7).

Adicionalmente una muestra clasificada como infección a *P. vivax* con una densidad parasitaria baja de 40 parásitos/ $\mu$ L por PCR, también dio reacción positiva a ambas pruebas Pfr364-LAMP y PfEMP1-LAMP como una infección por *P. falciparum*. Esta muestra también dio positivo para *P. vivax* en PvCOX1-LAMP usando ADN de MCS, y posteriormente mediante TaqMan qPCR descrito por Rougemont *et al.* [24] se determinó que correspondía a una infección mixta.

Tabla 4. Sensibilidad y especificidad de <i>Pvr364</i> and <i>EMPI</i> para la detección de <i>P. falciparum</i>					
	Muestra extraída con filtro (MCS)		Muestra Calentada y Centrifugada (BS)		
	Pf364-LAMP	PIEMP1-LAMP	Pf364-LAMP	PIEMP1-LAMP	
Infecciones de <i>P. falciparum</i> detectadas por microscopía y PCR	100.0% 95 IC: 56.1%-100%	100.0% 95 IC: 56.1%-100%	100.0% 95 IC: 56.1%-100%	100.0% 95 IC: 56.1%-100%	n=7
Infecciones submicroscópicas de <i>P. falciparum</i> detectadas solo por PCR	50.0% 95 IC: 29.0%-71%	72.2% 95 IC: 46.4%-89.3%	33.3% 95 IC: 14.4%-58.9%	22.2% 95 IC: 7.4%-48.1%	n=7
Negativos a microscopía y PCR	n=18 99.7% 95 IC: 97.8%-100%	n=13 99.0% 95 IC: 96.8%-99.7%	n=6 99.7% 95 IC: 97.8%-100%	n=4 99.7% 95 IC: 97.8%-100%	n=286
Sensibilidad*	64.0% 95 IC: 45.2%-82.8%	80.0% 95 IC: 64.3%-95.7%	52.0% 95 IC: 32.4%-71.6%	44.0% 95 IC: 24.5%-63.5%	n=286
Especificidad*	99.7% 95 IC: 99%-100%	99.0% 95 IC: 97.8%-100%	99.7% 95 IC: 99%-100%	99.7% 95 IC: 99%-100%	n=286
Concordancia Cohen's Kappa*	0.745 0.595 - 0.896	0.820 0.698 - 0.941	0.646 0.470 - 0.823	0.572 0.381 - 0.764	
*Metodo de Referencia: PCR en tiempo real					

Figura 7.

Diagrama de Venn muestra la distribución de las muestras detectadas para *P. falciparum*. En el panel A para PfEMP1-LAMP y en el panel B para Pfr364-LAMP.



MCS: empleando ADN purificado por MCS (del inglés Mini Column Spin)

BS: empleando ADN extraído por BS (del inglés Boil & Spin)

PF: *Plasmodium falciparum*

4.1.3.3. Evaluación de los LAMPs diseñados para la detección de *P. vivax* y *P. falciparum*

El diagnóstico de especie de *P. vivax* y *P. falciparum* con la combinación PvCOX1-LAMP y Pfr364-LAMP mostraron una sensibilidad del 84.5 % en comparación con el 87.6 % de sensibilidad de PvCOX1-LAMP y PfEMP1-LAMP, usando ADN MCS; mientras que empleando BS DNA, los valores fueron de 47,3% para la combinación PvCOX1-LAMP y Pfr364-LAMP y 45,7%, para la combinación PvCOX1-LAMP y PfEMP1-LAMP (Tabla 5).

El sistema combinado PvCOX1-LAMP y Pfr364-LAMP mostró una especificidad ligeramente mayor que la combinación PvCOX1-LAMP y PfEMP1-LAMP usando MCS DNA, en 97,3% y 96,7%, respectivamente (Tabla 5). Esta ligera diferencia indica que PfEMP1-LAMP puede disminuir la especificidad del sistema cuando los dos ensayos LAMP individuales se utilizan para la detección de *P. vivax* y *P. falciparum*.

Los LAMPs PvCOX1-LAMP y Pfr364-LAMP detectaron el 80,2% (81 muestras) de las infecciones submicroscópicas detectadas solo por PCR, utilizando ADN MCS, mientras que el 36,6% (37 muestras) se detectaron mediante ADN BS.

Los resultados se publicaron en el artículo titulado: “Multicopy targets for *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* detection by colorimetric LAMP” [50].

Tabla 5. Sensibilidad y especificidad para la detección de <i>P. falciparum</i> y <i>P. vivax</i>					
	Muestra extraída con filtro (MCS)		Muestra Calentada y Centrifugada (BS)		
	PvCOX1-LAMP & Pfr364-LAMP	PvCOX1-LAMP & PfEMP1-LAMP	PvCOX1-LAMP & Pfr364-LAMP	PvCOX1-LAMP & PfEMP1-LAMP	PvCOX1-LAMP & PfEMP1-LAMP
Infecciones de <i>P. falciparum</i> y <i>P. vivax</i> detectadas por microscopía y PCR	100.0% 95 IC: 85%-100%	100.0% 95 IC: 85%-100%	85.7% 95 IC: 66.4%-95.3%	85.7% 95 IC: 66.4%-95.3%	95 IC: 66.4%-95.3%
n=28	n=28	n=28	n=24	n=24	n=24
Infecciones submicroscópicas de <i>P. falciparum</i> y <i>P. vivax</i> detectadas solo por PCR	80.2% 95 IC: 70.8%-87.2%	84.2% 95 IC: 75.3%-90.4%	36.6% 95 IC: 27.4%-46.86%	34.7%	95 IC: 25.64%-44.9%
n=101	n=81	n=85	n=37	n=35	n=35
Negativos a microscopía y PCR	97.3% 95 IC: 93.4%-99%	96.7% 95 IC: 92.7%-98.7%	100.0% 95 IC: 97.4%-100%	100.0%	95 IC: 97.4%-100%
n=183	n=178	n=177	n=183	n=183	n=183
Sensibilidad*	84.5% 95 IC: 78.3%-90.7%	87.6% 95 IC: 81.9%-93.3%	47.3% 95 IC: 38.7%-55.9%	45.7%	95 IC: 37.1%-54.3%
Especificidad*	97.3% 95 IC: 94.9%-99.6%	96.7% 95 IC: 94.1%-99.3%	100.0% 95 IC: 100%-100%	100.0%	95 IC: 100%-100%
Concordancia Cohen's Kappa*	0.832 0.769 - 0.895	0.853 0.794 - 0.912	0.513 0.423 - 0.602	0.497	0.407 - 0.587
*Metodo de Referencia: PCR en tiempo real					

4.1.3.4. Distribución de la densidad parasitaria y su relación con la positividad de PvCOX1-LAMP y Pfr364-LAMP

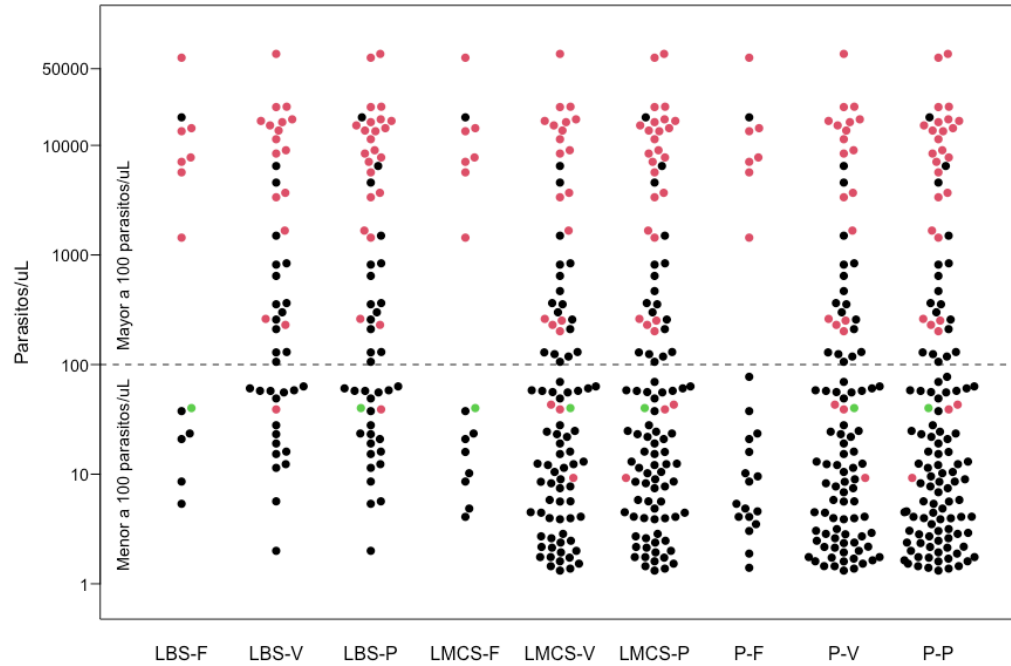
La distribución de densidad de parásitos por PCR utilizada en este estudio mostró que 43 de 129 (33,33%) muestras positivas tenían una densidad parasitaria superior a 100 parásitos/ $\mu$ L determinada por PCR (Figura 8). Estos incluyen 25 de las 28 muestras diagnosticadas por microscopía con densidad parasitaria mayor a 500 parásitos/ $\mu$ L y tres muestras correspondientes a infecciones por *P. vivax* con densidades parasitarias de 31, 32 y 36 parásitos/ $\mu$ L determinada por microscopía.

Considerando el escenario para la detección de *P. vivax* y *P. falciparum* con la combinación de los resultados individuales PvCOX1-LAMP y Pfr364-LAMP empleando ADN MCS, se detectaron 43 infecciones con densidades parasitarias mayor a 100 parásitos/ $\mu$ L y 66 infecciones con densidades parasitarias menor a 100 parásitos / $\mu$ L. Empleando ADN BS solo se detectaron 38 con densidades parasitarias superiores a 100 parásitos/ $\mu$ L y 23 con densidades parasitarias inferiores a 100 parásitos / $\mu$ L.

En la Figura 6, se puede apreciar que en las muestras evaluadas el mayor porcentaje lo conformaban muestras con una densidad menor a 100 parásitos/  $\mu$ L cuantificados por PCR. Los LAMP empleando ADN BS resultaron ser más afectados por la densidad parasitaria menor de 100 parásitos/ $\mu$ L comparándolos con el LAMP empleando ADN MCS.

Figura 8.

Muestras positivas por prueba diagnóstica en relación con la densidad parasitaria



Los puntos en rojo indican las muestras detectadas por microscopía, los puntos en negro indican las muestras detectadas por cada prueba diagnóstica. El punto en verde indica la muestra con infección mixta detectada por LAMP. Pruebas diagnósticas: LBS-F: LAMP con ADN BS para *P. falciparum*; LBS-V: LAMP con ADN BS para *P. vivax*; LBS-P: LAMP con ADN BS para *P. falciparum* y *P. vivax*; LMCS-F: LAMP con ADN MCS para *P. falciparum*; LMCS-V: LAMP con ADN MCS para *P. vivax*; LMCS-P: LAMP con ADN MCS para *P. falciparum* y *P. vivax*; P-F: PCR para *P. falciparum*; P-V: PCR para *P. vivax*; P-P: PCR para *P. falciparum* y *P. vivax*.

## 4.2 Evaluación de LAMP comercial y un nuevo diseño de LAMP colorimétrico “*in house*”.

La comparación se realizó para determinar la utilidad del uso combinado de las pruebas diagnósticas LAMPs comerciales Loopamp™ Malaria Pan Detection Kit con la prueba diagnóstica Loopamp™ Malaria Pv Detection Kit y el uso combinado de PvCOX1-LAMP & Pfr364-LAMP para la identificación de las especies de malaria en el contexto peruano donde solo se reportan casos de *P. falciparum* y *P. vivax*.

### 4.2.1 Comparación de la detección del género *Plasmodium* por Loopamp™ Malaria Pan Detection Kit y el resultado del LAMP colorimétrico “*in house*”

El Loopamp™ Malaria Pan Detection Kit reaccionó positivamente formando el precipitado y la emisión de fluorescencia a la luz ultravioleta en el análisis de 225 muestras de las 559 muestras evaluadas. Comparando este resultado y considerando el diagnóstico molecular por PCR como prueba de referencia, el Loopamp™ Malaria Pan Detection Kit mostró una sensibilidad de 87.7%, mayor a la sensibilidad para la detección de *Plasmodium* de 76.7%, obtenida de la aplicación de los LAMPs colorimétricos “*in house*” PvCOX1-LAMP y Pfr364-LAMP. Sin embargo, la especificidad mostrada por el Loopamp™ Malaria Pan Detection Kit de 94.4% fue menor a la obtenida por el LAMP colorimétrico “*in house*” que alcanzó el 99.7%) para detectar *Plasmodium* (Tabla 6).

El Loopamp™ Malaria Pan Detection Kit a diferencia de PCR detectó infecciones en 18 muestras adicionales que conforman los falsos positivos; de éstos,

15 fueron positivos a Loopamp™ Malaria Pv Detection Kit. Mientras que el combinado de LAMP colorimétrico solo detectó 1 falso positivo (Tabla 6).

Tabla 6.

Detección de *Plasmodium* por microscopía, Loopamp™ Malaria Pan Detection Kit y LAMP colorimétrico “in house”, empleando qPCR como método de referencia

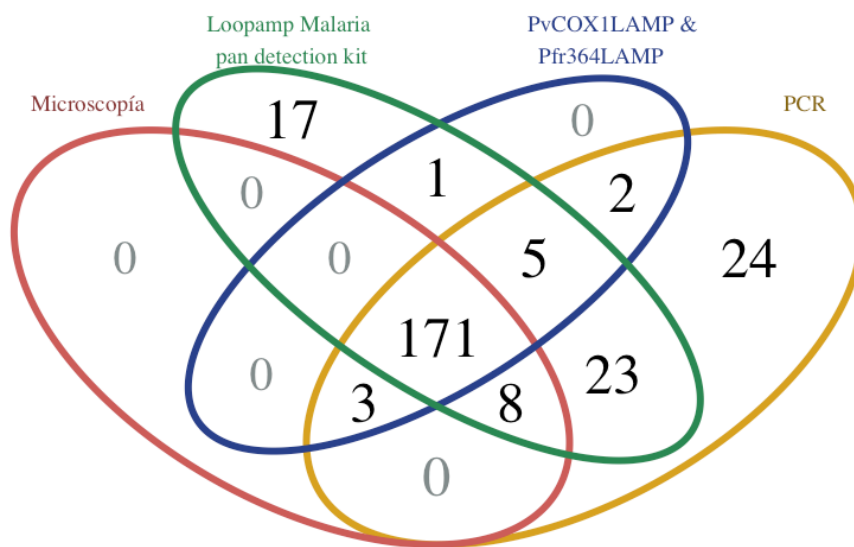
	Microscopía	Loopamp™ Malaria Pan LAMP	PvCOX1 & Pf364 LAMP
VN	323	305	322
VP	182	207	181
FP	0	18	1
FN	54	29	55
Sensibilidad [95% CI]	77.1 [71.8-82.5]	87.7 [83.5-91.9]	76.7 [71.3-82.1]
Especificidad [95% CI]	100	94.4 [91.9-96.9]	99.7 [99.1-100]
VPP [95% CI]	100	92 [88.5-95.5]	99.5 [98.4-100]
VPN [95% CI]	85.7 [82.1-89.2]	91.3 [88.3-94.3]	85.4 [81.8-89]
Cohen's Kappa	0.7957 [0.745 – 0.8464]	0.8266 [0.7792 – 0.874]	0.7881 [0.7366 – 0.8397]

VN Verdadero negativo, VP Verdadero Positivo, FP falso positivo, FN falso negativo, VPP Valor Predictivo Positivo, VPN Valor Predictivo Negativo.

El combinado colorimétrico LAMP “*in house*” no pudo detectar 8 muestras que fueron diagnosticadas por microscopía, 5 como infecciones por *P. falciparum* (con densidades parasitarias entre 2071 y 141 parásitos / $\mu$ L) y 3 como infecciones por *P. vivax* (con densidad parasitaria menor a 75 parásitos / $\mu$ L). Mientras que el kit Loopamp™ malaria pan detection kit, no pudo detectar 3 muestras diagnosticadas por microscopía (una con *P. falciparum* con densidad parasitaria de 2692 parásitos / $\mu$ L y otras dos con *P. vivax* con densidades parasitarias de 2370 y 28655 parásitos / $\mu$ L) (Figura 9).

Figura 9.

Diagrama de Venn muestra la distribución de las muestras detectadas para *Plasmodium* empleando microscopía, Loopamp™ Malaria Pan Detection Kit, LAMP colorimétrico “in house” y qPCR.



4.2.2 Comparación de la detección de la especie *P. vivax* por Loopamp™ Malaria Pv Detection Kit y el resultado del PvCOX1-LAMP colorimétrico “in house”

Para la determinación de la especie *P. vivax*, el Loopamp™ Malaria Pv Detection Kit reaccionó positivamente con 180 muestras alcanzando una sensibilidad de 84.4%, y especificidad de 92.4%. Mientras que los resultados obtenidos por PvCOX1-LAMP para la especie *P. vivax* alcanzaron una sensibilidad de 79.9% y especificidad de 99.7% (Tabla 7).

La identificación de 29 infecciones adicionales para *P. vivax*, en comparación al PCR, provocan que el VPP disminuya a 83.9%, mientras que PvCOX1-LAMP presenta un VPP de 99.3%. Las 28 muestras positivas a PCR y no detectadas por Loopamp™ Malaria Pv Detection Kit determinan que el VPN sea de 92.6%. Sin embargo, no es significativa la diferencia al compararlo con el VPN de 91.3 obtenido por PvCOX1-LAMP (Tabla 7).

Tabla 7.

Detección de *P. vivax* por microscopía, Loopamp™ Malaria Pv Detection Kit y PvCOX1-LAMP colorimétrico “*in house*”, empleando qPCR como método de referencia

	Microscopía	Loopamp™ Malaria Pv LAMP	PvCOX1 LAMP
VN	379	351	379
VP	139	151	143
FP	1	29	1
FN	40	28	36
Sensibilidad [95% CI]	77.7 [71.6-83.8]	84.4 [79.0-89.7]	79.9 [71.3-82.1]
Especificidad [95% CI]	99.7 [99.2-100]	92.4 [89.7-95.0]	99.7 [99.2-100]
VPP [95% CI]	99.3 [99.7-100]	83.9 [78.5-89.3]	99.3 [97.9-100]
VPN [95% CI]	90.5 [87.6-93.3]	92.6 [90.0-95.2]	91.3 [88.6-94]
Cohen's Kappa	0.8212 [0.7693 – 0.8731]	0.7661 [0.7088 – 0.8234]	0.7661 [0.7088 – 0.8234]

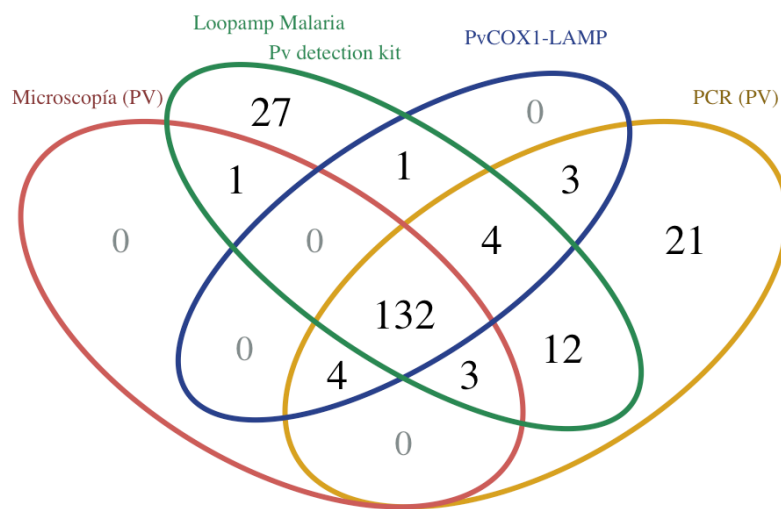
VN Verdadero negativo, VP Verdadero Positivo, FP falso positivo, FN falso negativo, VPP Valor Predictivo Positivo, VPN Valor Predictivo Negativo.

El Loopamp™ Malaria Pv Detection Kit a diferencia de PCR detectó infecciones en 28 muestras adicionales, 3 fueron positivos a *P. falciparum* por PCR, 10 fueron positivos a *P. falciparum* por microscopía y PCR y 1 como mixto por microscopía y *P. falciparum* por PCR. Mientras que el PvCOX1-LAMP solo detectó 1 muestra adicional que por LAMP colorimétrico fue mixta mientras que por microscopía y PCR el resultado fue *P. falciparum* (Figura 10).

El PvCOX1-LAMP no pudo detectar 3 muestras que fueron diagnosticadas por microscopía (con densidad parasitaria menor a 75 parásitos / $\mu$ L). Mientras que el kit Loopamp™ malaria Pv detection kit, no pudo detectar 4 muestras diagnosticadas por microscopía (con densidad parasitaria entre 2318 y 28655 parásitos / $\mu$ L) (Figura 10).

Figura 10.

Diagrama de Venn muestra la distribución de las muestras detectadas para *P. vivax* empleando microscopía, Loopamp™ Malaria Pv Detection Kit, PvCOX1-LAMP colorimétrico “*in house*” y qPCR.



#### 4.2.3 Evaluación del esquema combinado del Loopamp™ Malaria Pan Detection Kit y Loopamp™ Malaria Pv Detection Kit.

La prueba comercial Loopamp™ Malaria Pan Detection Kit en combinación con la prueba Loopamp™ Malaria Pv Detection Kit, mostraron una sensibilidad diagnóstica superior a la de microscopía, lo cual evidenciaría su potencial uso en áreas rurales donde el diagnóstico por microscopía no puede desarrollarse con buena calidad por el desgaste y deterioro de los microscopios o por la falta de personal de salud con capacitación continua en microscopía para la detección de malaria. A pesar de esta ventaja en sensibilidad, el diagnóstico de *P. vivax* por Loopamp™ Malaria Pv Detection Kit, mostró un porcentaje de 7.2% (13/180) de falsos positivos a *P. vivax*, diez de los cuales fueron diagnosticados como *P. falciparum* tanto por microscopía como por PCR mientras los otros 3 fueron diagnosticados como infecciones de *P. falciparum* solo por PCR.

Los resultados indican que el esquema combinado de ambas pruebas LAMP no podría ser aplicado para la diferenciación de *P. vivax* y *P. falciparum*. Con la finalidad de lograr una mejor diferenciación, se debería mejorar la especificidad de Loopamp™ Malaria Pv Detection Kit, pudiéndose agregar una prueba adicional que ayude a una mejor determinación de la especie de *P. falciparum*. Los datos se publicaron en el artículo titulado: “Diagnosis of *Plasmodium vivax* by Loop-Mediated Isothermal Amplification in Febrile Patient Samples from Loreto, Perú” [49].

### **4.3 Evaluación del diagnóstico de malaria empleando LAMP colorimétrico en muestras de sangre impregnada en papel filtro provenientes de colecta activa y pasiva.**

4.3.1 Detección de *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum* en muestras de colecta pasiva de la comunidad nativa de Nueva Jerusalén.

De las 431 muestras de sangre impregnada en papel filtro, se determinaron por microscopia 97 infecciones por *P. vivax* y 5 infecciones causadas por *P. falciparum*, el método de diagnóstico molecular empleando qPCR detectó 140 positivos (129 para *P. vivax*, 9 para *P. falciparum* y 2 mixtos), mientras el LAMP colorimétrico “*in house*” (Pfr364-LAMP y PvCOX1-LAMP) usando ADN BS detectó 109 positivos (100 para *P. vivax*, 7 para *P. falciparum* y 2 mixtos), y el LAMP colorimétrico “*in house*” usando ADN MCS detectó 116 positivos (109 para *P. vivax*, 5 para *P. falciparum* y 2 mixtos) (Tabla 8).

Tabla 8  
 Detección de especie de *Plasmodium* en muestras de colecta pasiva por prueba diagnóstica.

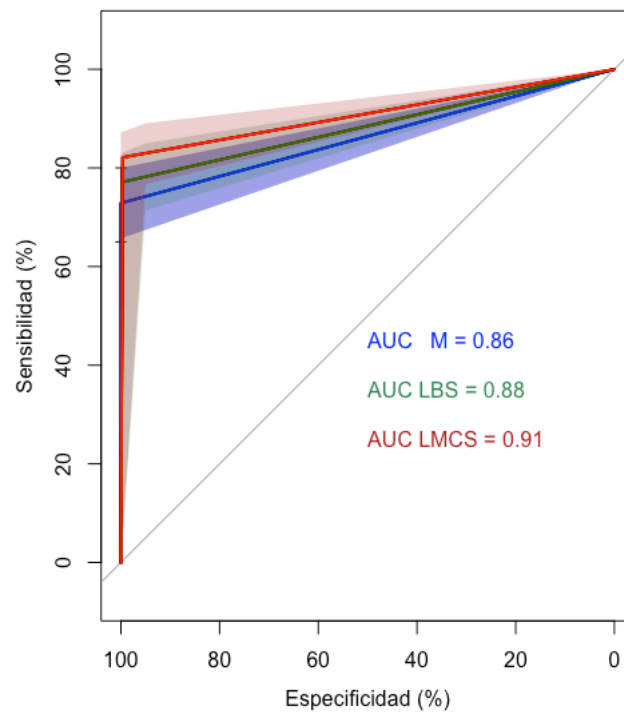
Prueba diagnóstica			
qPCR	Microscopía	LAMP empleando ADN BS	LAMP empleando ADN MCS
<i>P. vivax</i> (n=129)	<i>P. vivax</i> (n=97)	<i>P. vivax</i> (n=100)	<i>P. vivax</i> (n=109)
<i>P. falciparum</i> (n=9)	<i>P. falciparum</i> (n=5)	<i>P. falciparum</i> (n=7)	<i>P. falciparum</i> (n=5)
Mix ( <i>P. vivax</i> + <i>P. falciparum</i> , n= 2)	Mix ( <i>P. vivax</i> + <i>P. falciparum</i> , n= 0)	Mix ( <i>P. vivax</i> + <i>P. falciparum</i> , n= 2)	Mix ( <i>P. vivax</i> + <i>P. falciparum</i> , n= 2)
Negativos (n=291)	Negativos (n=329)	Negativos (n=322)	Negativos (n=315)
<i>Sensibilidad*</i>	72.90% 95 IC: 65.5%- 80.2%	77.10% 95 IC: 70.2%-84.1%	82.10% 95 IC: 75.8%- 88.5%
<i>Especificidad *</i>	100.00%	99.70% 95IC:99%-100%	99.70% 95IC:99%-100%
<i>AUC *</i>	0.86 0.82-0.90	0.88 0.85-0.92	0.91 0.87-0.94
<i>Concordancia Cohen's Kappa *</i>	0.78 0.72- 0.85	0.81 0.76 – 0.87	0.86 0.80 – 0.91

\*Método de referencia qPCR

Las diferencias estadísticas se mostraron con la prueba de McNemar entre LAMP colorimétrico usando ADN MCS y microscopía (chi-cuadrado = 6.5,  $df = 1$ , valor  $p = 0.01079$ ); pero no hubo diferencias estadísticas entre LAMP colorimétrico usando ADN BS y microscopía (chi-cuadrado = 1,8947,  $gl = 1$ , valor de  $p = 0,1687$ ). Además, el LAMP colorimétrico “*in house*” empleando ADN MCS mostró un valor de área bajo la curva ROC (AUC) de 0.91, seguido del LAMP colorimétrico “*in house*” empleando ADN BS (0.88) y finalmente el valor más bajo fue el obtenido por microscopía (0,86) (Figura 11).

Figura 11.

Gráfico comparativo del AUC entre Microscopía y LAMP colorimétrico “*in house*” empleando muestras de ADN de colecta pasiva.

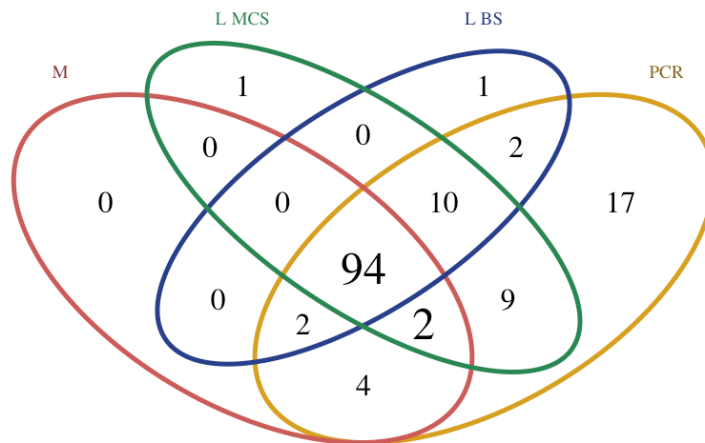


Microscopía (M), LAMP empleando ADN BS (LBS) y LAMP empleando ADN MCS (LMCS). Método de referencia qPCR.

En la distribución de muestras positivas ambos LAMP colorimétrico “*in house*” usando ADN MCS y ADN BS, identificaron cada uno una muestra positiva adicional para *P. vivax* en comparación a qPCR.

Por otro lado, cuatro muestras detectadas por microscopía y qPCR fueron negativas para LAMP colorimétrico “*in house*” usando ADN BS y ADN MCS. Todas estas muestras tuvieron baja densidad parasitaria a qPCR (menor a 10 parásitos/ $\mu$ L). Otras dos muestras detectadas por microscopía y qPCR, resultaron negativas por LAMP colorimétrico usando ADN BS con baja densidad parasitaria (una muestra menor a 10 parásitos/ $\mu$ L por qPCR y la otra de 85 parásitos/ $\mu$ L por qPCR). Otras dos diferentes muestras fueron negativas mediante LAMP colorimétrico utilizando ADN MCS con una densidad parasitaria inferior a 10 parásitos/ $\mu$ L cuantificado por qPCR (Figura 12).

Figura 12. Diagrama de Venn mostrando la distribución de muestras positivas por prueba diagnóstica en casos pasivos.



Microscopia (M), LAMP colorimétrico empleando ADN MCS (LMCS), LAMP colorimétrico empleando ADN BS (LBS), qPCR (PCR).

#### 4.3.2 Detección de *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum* en muestras de colecta activa de la comunidad nativa de Nueva Jerusalén.

Se analizaron un total de 574 muestras de colección activa, de las cuales la microscopia en campo identificó 72 positivos (66 para *P. vivax* y 6 para *P. falciparum*).

Empleando qPCR se obtuvieron 125 positivos (117 para *P. vivax* y 8 para *P. falciparum*), mientras que el LAMP colorimétrico “*in house*” (Pfr364-LAMP y PvCOX1-LAMP) con ADN BS detectó 79 positivos (72 para *P. vivax*, para 6 *P. falciparum* y 1 mixto), y el LAMP colorimétrico “*in house*” con ADN MCS detectó 104 positivos (97 para *P. vivax*, 7 para *P. falciparum*) (Tabla 9).

Tabla 9

Detección de especie de *Plasmodium* en muestras de colecta activa por prueba diagnóstica.

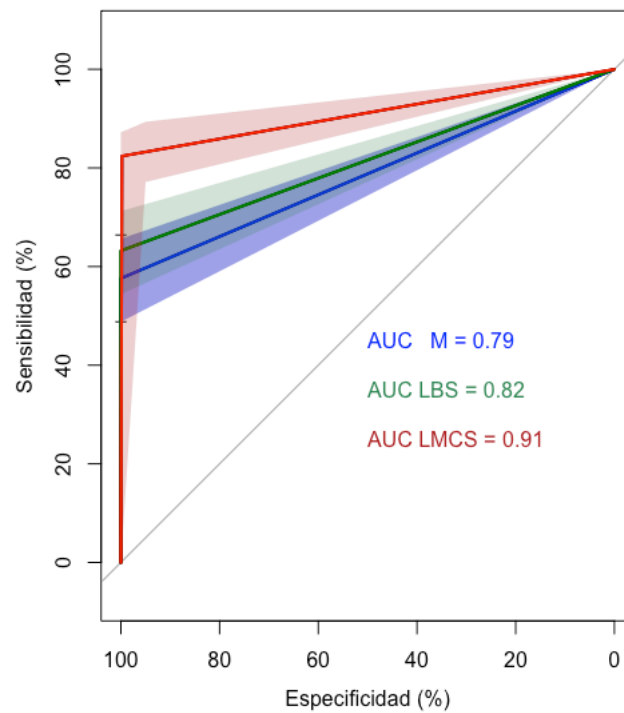
Prueba diagnóstica			
qPCR	Microscopia	LAMP empleando ADN BS	LAMP empleando ADN MCS
<i>P. vivax</i> (n=117)	<i>P. vivax</i> (n=66)	<i>P. vivax</i> (n=72)	<i>P. vivax</i> (n=97)
<i>P. falciparum</i> (n=8)	<i>P. falciparum</i> (n=6)	<i>P. falciparum</i> (n=6)	<i>P. falciparum</i> (n=7)
Mix ( <i>P. vivax</i> + <i>P. falciparum</i> , n= 0)	Mix ( <i>P. vivax</i> + <i>P. falciparum</i> , n= 0)	Mix ( <i>P. vivax</i> + <i>P. falciparum</i> , n= 1)	Mix ( <i>P. vivax</i> + <i>P. falciparum</i> , n= 0)
Negativos (n=449)	Negativos (n=502)	Negativos (n=495)	Negativos (n=470)
<i>Sensibilidad*</i>	57.60% 95 CI: 48.9%- 66.3%	63.20% 95 CI: 54.7%-71.7%	82.40% 95 CI: 75.7%- 89.1%
<i>Especificidad *</i>	100.00% 95 CI: 100%-100%	100.00% 95CI:100%-100%	99.80% 95 CI: 99.3%-100%
<i>AUC *</i>	0.79 0.75-0.83	0.82 0.77-0.86	0.91 0.88-0.95
<i>Concordancia Cohen's Kappa *</i>	0.68 0.60- 0.76	0.73 0.66 – 0.80	0.87 0.83- 0.92

\*Método de referencia qPCR

En la determinación de las especies de *P. vivax* y *P. falciparum*, la prueba McNemar muestra diferencias estadísticas entre LAMP colorimétrico utilizando ADN MCS y microscopía (chi-cuadrado = 24,025, df = 1, valor de  $p < 0.001$ ), pero no hubo diferencias estadísticas entre LAMP colorimétrico usando ADN BS y microscopía (chi-cuadrado = 1.7143, df = 1, valor  $p = 0.1902$ ). Además, el mayor valor del área bajo la curva ROC (AUC) se obtuvo con LAMP colorimétrico usando ADN MCS (0.91), seguido del LAMP colorimétrico usando ADN BS (0.82) y finalmente microscopía (0.79) (Figura 13).

Figura 13.

Gráfico comparativo del AUC entre Microscopía y LAMP colorimétrico “*in house*” empleando muestras de ADN obtenidos en colecta activa.

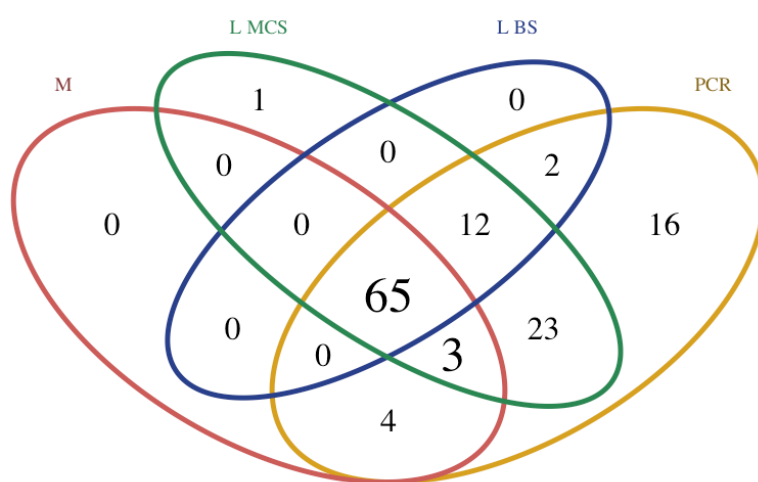


Microscopia (M), LAMP empleando ADN BS (LBS), LAMP empleando ADN MCS (LMCS). Método de referencia qPCR.

El LAMP colorimétrico usando ADN MCS identificó una muestra positiva adicional para *P. vivax* en comparación a qPCR. Ambos LAMPs utilizando ADN BS o ADN MCS no pudieron detectar cuatro muestras identificadas por microscopía y qPCR. Otras tres diferentes muestras resultaron negativas por LAMP colorimétrico utilizando ADN BS, todas con densidad parasitaria baja por qPCR (menor a 70 parásitos/ $\mu$ L) (Figura 14).

Figura 14.

Diagrama de Venn mostrando la distribución de muestras positivas por prueba diagnóstica en casos activos.



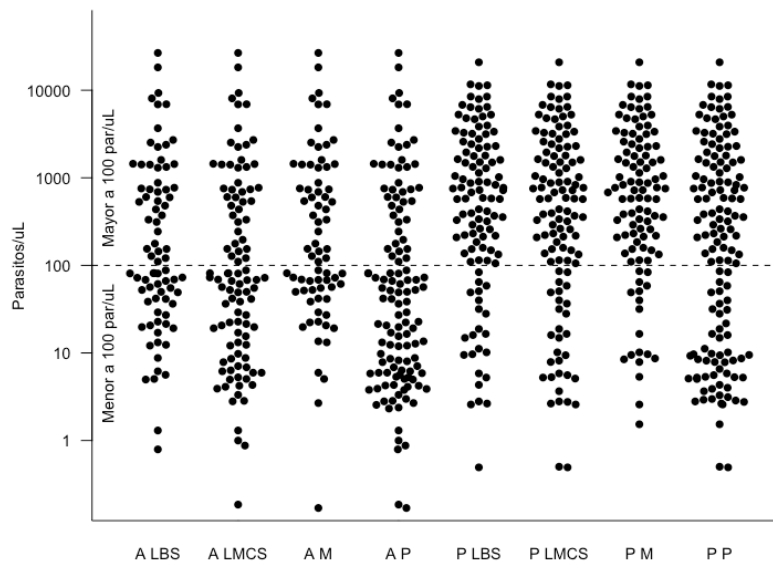
Microscopia (M), LAMP colorimétrico empleando ADN MCS (LMCS), LAMP colorimétrico empleando ADN BS (LBS), qPCR (PCR).

#### 4.3.3 Distribución de la densidad parasitaria y la positividad de LAMP colorimétrico en muestras de colecta activa y pasiva

La distribución de las muestras positivas por su densidad parasitaria tanto en muestras de colecta pasiva y colecta activa no muestran una diferencia significativa; pero sí podemos apreciar una ligera tendencia a que las muestras de colecta pasiva presenten mayoritariamente una densidad parasitaria mayor a 100 parásitos/ $\mu$ L. Mientras que en las muestras de colecta activa se observa que tienden a presentar una densidad parasitaria menor a 100 parásitos/ $\mu$ L (Figura 15).

Figura 15

Distribución de la positividad de muestras por prueba diagnóstica en relación a la densidad parasitaria



A LBS-F: LAMP con ADN BS de colecta activa; A LMCS: LAMP con ADN MCS de colecta activa; A M: Microscopía de colecta activa; A P: qPCR de colecta activa; P LBS-F: LAMP con ADN BS de colecta pasiva; P LMCS: LAMP con ADN MCS de colecta pasiva; P M: Microscopía de colecta pasiva; P P: qPCR de colecta pasiva.

## V DISCUSIÓN

En el Perú, el mayor número de casos de malaria se reportan en las regiones rurales donde todavía se utiliza el diagnóstico por microscopía. Desafortunadamente, es en estas mismas áreas rurales donde la calidad del diagnóstico por microscopía se ve afectada por la falta de técnicos expertos en microscopía y el mal mantenimiento de los microscopios.

En este estudio, se ha evaluado la efectividad del LAMP comercial y se han desarrollado nuevos ensayos LAMP colorimétricos “*in house*”, que fueron evaluados con muestras microscópicas y submicroscópicas previamente evaluadas por PCR en tiempo real.

Los métodos LAMP comercial de mayor difusión al inicio de esta tesis son los Loopamp™ Malaria Detection Kits (Eiken Chemical Co., Tokyo, Japan) y el Illumigene® (actualmente Alethia®) malaria LAMP (Meridian Bioscience Inc., Cincinnati, OH, USA), ninguno de ellos requiere cadena fría y son estables a temperatura ambiente de condiciones de laboratorio [31]. El último de los kits disponibles comercialmente para el diagnóstico de infecciones por *P. vivax* (Loopamp™ Malaria Pv Detection Kit) se evaluó en esta tesis con la finalidad de aplicarlo solo en combinación con Loopamp™ Malaria Pan Detection Kit. Sin embargo, el 7.2% de falsos positivos nos indica la necesidad de una evaluación adicional para diferenciar entre *P. vivax* y *P. falciparum* con la finalidad de proporcionar el tratamiento adecuado según la especie. El uso de Loopamp™ Pf Malaria kit podría mejorar el diagnóstico a pesar de que, en el estudio de Serra *et al.* [33], 3.9% de infecciones detectadas por reacción con este kit no fueron

comparables con la determinación de la especie por PCR. Así mismo, evaluando los costos de la evaluación, para la determinación de la especie en una muestra se requerirían de tres pruebas en total, lo que incrementa el costo a aproximadamente \$ 16.8 USD (\$ 5.6 costo de reactivo por cada prueba). La opción para contrarrestar este alto costo estaría en el desarrollo de pruebas propias que debieran ser estandarizadas e implementadas en las mismas áreas endémicas, luego de una evaluación de efectividad y factibilidad.

Por otro lado, la determinación visual de los resultados de los kits de Loopamp basados en turbidez o fluorescencia con luz ultravioleta también pudo ser responsable del porcentaje de error en los falsos positivos. Asimismo, en condiciones en que las infecciones tienen una baja densidad parasitaria la determinación visual no sería muy notoria causando error en el operario.

De los diferentes formatos colorimétricos disponibles para la visualización de los resultados de LAMP, el cambio de color de la reacción utilizando el indicador de pH rojo neutro, ha sido ventajoso en comparación a colorantes como el verde de malaquita, que solo varían en la intensidad del color y pueden sesgar la visualización produciendo resultados insatisfactorios [51].

Con estas consideraciones se desarrolló el LAMP en un formato colorimétrico basado en el cambio de color de amarillo a fucsia del indicador de pH rojo neutro cuando se produce la disminución del pH producto de la reacción de síntesis de ADN.

En condiciones de laboratorio, los LAMP colorimétricos “*in house*” desarrollados mostraron un LOD entre 2.4 y 3.7 parásitos/ $\mu$ L, un nivel de detección comparable con otros estudios LAMP para el diagnóstico de malaria, en los que la

sensibilidad de detección varió según el blanco de amplificación empleado. Varios estudios han informado un LOD de 10-125 parásitos/ $\mu$ L utilizando pruebas específicas de género y especie-específicas con blancos de amplificación como 18S rARN, alfa-tubulina y secuencias repetidas de r64 [52, 53, 54]. Mientras que los reportes de LOD más bajos (entre 1,4 y 5 parásitos/ $\mu$ L) se han alcanzado empleando una sonda específica de especie para *P. vivax* y *P. falciparum* empleando un blanco de amplificación mitocondrial [34, 55, 56].

Los resultados obtenidos nos indican que próximos al nivel del LOD el número de falsos negativos se incrementa, más aún cuando se emplea la preparación de la muestra por el método de calentamiento y centrifugación. De hecho, los falsos negativos empleando calentamiento y centrifugación pueden explicarse debido a la baja calidad del ADN por la presencia de inhibidores enzimáticos.

Los ensayos LAMP diseñados en el presente estudio han demostrado ser muy específicos utilizando muestras de diferentes especies de *Plasmodium*. Solo el blanco de amplificación de *COXI* mostró reactividad para *P. vivax* y *P. knowlesi*, muy probablemente porque las dos especies están relacionadas genéticamente. Sin embargo, esta desventaja sólo representa un problema en los países asiáticos donde *P. knowlesi* suele causar brotes de infección [57].

El locus Pvr47 ha sido evaluado en diseños de PCR en tiempo real y recientemente en un LAMP colorimétrico mostrando una alta especificidad y sensibilidad en la detección de *P. vivax* [43,58]. Sin embargo, en nuestro diseño contrariamente no alcanzamos una alta sensibilidad en la detección de infecciones por *P. vivax*, resultando ser menos sensible que nuestro diseño con el PvCOX1-LAMP. Esta diferencia debe ser analizada debido a que podría estar relacionada a

una baja complementariedad de nuestro cebador con el blanco de amplificación en algunas muestras, puesto que empleando el plásmido específico en la determinación del LOD por copias/ $\mu$ L el valor obtenido es similar al obtenido por PvCOX1-LAMP.

Comparando los métodos de preparación de muestras, el uso del método de calentamiento y centrifugación para el ADN BS fue simple, rápido y no requirió mucha experiencia. En contraste, el kit de mini columna comercial y centrifugado para el ADN MCS requirió algo de experiencia en el manejo de equipos y materiales de laboratorio, y condiciones especiales de almacenamiento ya que pueden ser afectados por el clima tropical de ser trasladados a campo. Además, el costo por preparación de la muestra por reacción para ADN BS y centrifugación resultó ser más económico (\$ 0.03 USD por extracción para ADN BS y \$ 2.70 USD por extracción para ADN MCS).

En general, los resultados con el grupo de infecciones microscópicas de malaria indican que se pueden utilizar los ensayos LAMP colorimétricos “*in house*” con ADN BS sin alterar la eficiencia del diagnóstico por microscopía, es decir, aplicable en condiciones cuando el diagnóstico por microscopía no pueda realizarse. Solo 4 de 21 muestras dieron resultado negativo para *P. vivax* en los ensayos empleando sangre entera, así como también 6 de 102 muestras en el caso de colecta pasiva y 7 de 72 muestras en el caso de colecta activa y todas las muestras con infecciones de densidad parasitaria menor a 100 parásitos/ $\mu$ L. No obstante, se necesita un estudio futuro en campo para medir la eficiencia real del diagnóstico.

Los LAMPs colorimétricos “*in house*” para *P. falciparum* (Pfr364-LAMP como PfEMP1-LAMP) detectaron todas las infecciones microscópicas por *P.*

*falciparum* con ambos tipos de ADN extraídos. Sin embargo, ambos mostraron las mismas dificultades para detectar infecciones submicroscópicas por debajo de 10 parásitos/ $\mu$ L. Lamentablemente, el número de muestras evaluadas para *P. falciparum* fue muy pequeño, lo que impidió definir la mejor prueba para una adecuada evaluación rutinaria de esta especie; pero según los resultados de la identificación de especies, el ensayo más específico para detectar *P. falciparum* fue Pfr364-LAMP.

Al comparar el LAMP comercial *versus* el LAMP colorimétrico “*in house*”, el LAMP comercial muestra ligeramente una mayor sensibilidad que el LAMP colorimétrico “*in house*”. Sin embargo, el LAMP comercial mostró una significativa menor especificidad que el LAMP colorimétrico “*in house*”. Este resultado nos indica que el uso del LAMP colorimétrico “*in house*” sería una herramienta de diagnóstico mucho más precisa al diferenciar las especies en una infección, además de ser más económica que el LAMP comercial.

Otro aspecto importante es que a pesar de que las muestras de sangre impregnada en papel filtro estuvieron almacenadas por el lapso de dos años, los resultados obtenidos por LAMP colorimétrico “*in house*” (PvCOX1 y Pfr364-LAMP) son comparables a los de microscopía. Ello apoya la idea de que este LAMP colorimétrico “*in house*” pueda convertirse en una herramienta que complemente la microscopía sobre todo en lugares donde los microscopios no tienen un buen mantenimiento y el acceso a capacitaciones del personal encargado de la microscopía son espaciadas en el tiempo y no son constantes. El AUC para la microscopía fue siempre el más bajo (0.79-0.86), y el desempeño de la microscopía fue más impactado en el diagnóstico de malaria de muestras con una densidad

parasitaria inferior a 100 parásitos/uL, mientras el AUC para el LAMP colorimétrico “*in house*” máximo fue de 0.91 empleando ADN MCS y de 0.82 y 0.88 empleando ADN BS en casos activos y pasivos respectivamente.

También se ha hecho evidente al emplear qPCR que, en las condiciones endémicas actuales, la carga parasitaria ha disminuido y es en el rango de densidades parasitarias menores a 100 parásitos/ $\mu$ L donde la microscopia ya no puede detectar al parásito y el LAMP colorimétrico “*in house*” todavía puede diagnosticar a un gran número de infecciones submicroscópicas. Los datos de las densidades parasitarias en la comunidad nativa de Nueva Jerusalén, con niveles de transmisión constante de malaria, nos muestran que las personas con síntomas que concurren a una vigilancia pasiva muestran ligeramente una mayor densidad parasitaria que muestras de personas que son captadas en una vigilancia activa. Sin embargo, estos datos deben de ser analizados incluyendo el tiempo de aparición de los síntomas para poder establecer la relación de que una mayor evolución de los síntomas está asociada con una mayor cantidad de parásitos. También se hace más evidente la búsqueda de estándares universales para poder tener una mejor comparación de las densidades parasitarias y un control más estricto de las muestras para poder cuantificarlas. Afortunadamente el laboratorio de malaria está inscrito a las evaluaciones externas que realiza el Programa Global de malaria de la Organización Mundial de la Salud, y a través de UK NEQAS puede obtener un control estándar con el fin de asegurar la calidad en el diagnóstico y mantener un análisis comparativo de las pruebas de diagnóstico entre diversos laboratorios.

En el contexto del diagnóstico de malaria en campo, el Plan Malaria Cero ha promovido la formación de microscopistas para lograr un diagnóstico rápido y

de calidad para dar un tratamiento específico y oportuno. El principal desafío para el plan hacia la eliminación de la malaria en el Perú 2022-2030 es lograr la mejora del sistema de diagnóstico complementando el diagnóstico microscópico con otras pruebas diagnósticas que brinden un diagnóstico específico de especies de *Plasmodium* causantes de infecciones submicroscópicas. Es allí donde las técnicas LAMP complementarían enormemente el diagnóstico de microscopía al detectar un grupo esencial de infecciones submicroscópicas con alta especificidad, como demuestran los resultados de este estudio. Además, estos ensayos LAMP colorimétricos “*in house*” tienen ventajas significativas, debido a una interpretación sencilla de los resultados basada en la inspección visual a simple vista, que en los casos de colecta activa podría reducir el diagnóstico erróneo en casos de fatiga visual de microscopistas sabiendo que en las vigilancias activas hay un incremento de pruebas diagnósticas por día a evaluar a comparación de las vigilancias pasivas. Una combinación del LAMP colorimétrico “*in house*” y la colecta de muestras impregnadas en papel filtro también resultaría beneficioso reduciendo costos de transporte cuando se trata de llegar a lugares rurales y muy remotos donde también se encuentre una distribución muy dispersa de las casas de los pobladores.

En este contexto se requieren nuevos estudios para determinar la logística de implementación en el campo y los requisitos de capacitación para los trabajadores de la salud.

## VI CONCLUSIONES

El uso simultáneo de los blancos de amplificación multicopia *COXI* y *Pfr364* en LAMP colorimétrico “*in house*” para la detección de *P. vivax* y *P. falciparum* mejoró el diagnóstico de infecciones submicroscópicas al detectar 37 (36,63%) y 81 (80,20%) infecciones submicroscópicas empleando un método simple de preparación de muestras (hervido y centrifugado) y método de purificación de ADN (kit de mini columna y centrifugado) respectivamente.

La aplicación combinada del kit comercial Loopamp™ Malaria Pan detection kit y el Loopamp™ Malaria Pv detection kit muestran una sensibilidad mayor a la microscopía y al LAMP colorimétrico *in house*, pero con una baja especificidad diagnóstica.

El uso simultáneo de los blancos de amplificación multicopia *COXI* y *Pfr364* en LAMP colorimétrico “*in house*” empleando un método simple de preparación de muestras es tan confiable como la microscopía en análisis de muestra impregnadas en papel filtro de colecta activa y pasiva.

El uso simultáneo de los blancos de amplificación multicopia *COXI* y *Pfr364* en LAMP colorimétrico “*in house*” empleando un método de purificación de ADN mejora la capacidad diagnóstica al detectar un alto número de infecciones

submicroscópicas, obteniéndose un valor máximo de AUC de 0.91 al analizarse muestras impregnadas en papel filtro de colecta activa y pasiva.

## **VII RECOMENDACIONES**

Evaluar la viabilidad operativa y la rentabilidad de la implementación de LAMP en un centro de salud rural de atención primaria.

Evaluar el LAMP colorimétrico en campo en escenarios de apoyo de vigilancia activa y pasiva.

## VIII LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Las principales limitaciones del estudio están relacionadas a las muestras:

La reducción de los casos de malaria en los últimos años ha ocasionado que se requieran colectas de mayor extensión en tiempo para poder encontrar un mayor número de muestras con infecciones por *P. falciparum*. El *n* muestral empleado con Pfr364-LAMP y PfEMP1-LAMP no ha permitido una clara y significativa evaluación de ambas pruebas LAMP para detectar *P. falciparum*.

El estado de emergencia sanitaria ocasionada por Covid-19 interrumpió el proceso para la colecta de muestras frescas y evaluaciones *in situ*, que hubieran podido evidenciar mejor el empleo de LAMP, por lo que el trabajo se limitó al empleo de muestras almacenadas en el laboratorio de Malaria – UPCH, con un diagnóstico por microscopía y molecular dependiente del proyecto que cedió las muestras.

El uso de muestras almacenadas correspondientes a diferentes proyectos estuvo principalmente limitado a la cantidad de cada muestra disponible por lo que encontramos limitaciones para repetir o incorporar nuevos análisis.

Además, el almacenamiento de las muestras ocasiona deterioro que puede afectar las muestras de baja densidad parasitaria. La disponibilidad de las muestras pudo influir al no realizarse las pruebas diagnósticas de forma simultánea, como en el caso de la comparación del LAMP comercial y el LAMP colorimétrico de diseño *in house*; la diferencia del tiempo de evaluación de aproximadamente 1 año puede

haber causado la disminución de la sensibilidad del LAMP colorimétrico de diseño *in house* en muestras de baja densidad parasitaria.

Tomando en consideración el diagnóstico por qPCR en el laboratorio de Malaria – UPCH, se debe indicar también que a pesar de que los sistemas de qPCR descritos por Mangold y Rougement son sometidos a evaluaciones de calidad con estándares externos para *P. falciparum*, el diagnóstico molecular puede presentar variaciones por efecto estocástico en muestras por debajo y alrededor de 5 parásitos/uL.

## IX REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. World Health Organization. World malaria report 2021. Switzerland: World Health Organization; 2021.
2. Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades. Sala virtual de la situación de salud.  
[https://www.dge.gob.pe/salasituacional/sala/index/salasisit\\_dash/143](https://www.dge.gob.pe/salasituacional/sala/index/salasisit_dash/143) Accessed 17 Mar 2022.
3. Branch, O., Casapia, W. M., Gamboa, D. V., Hernandez, J. N., Alava, F. F., Roncal, N., Alvarez, E., Perez, E. J., & Gotuzzo, E. (2005). Clustered local transmission and asymptomatic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria infections in a recently emerged, hypoendemic Peruvian Amazon community. *Malaria journal*, 4, 27.
4. Bautista, C. T., Chan, A. S., Ryan, J. R., Calampa, C., Roper, M. H., Hightower, A. W., & Magill, A. J. (2006). Epidemiology and spatial analysis of malaria in the Northern Peruvian Amazon. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 75(6), 1216–1222.
5. Roshanravan, B., Kari, E., Gilman, R. H., Cabrera, L., Lee, E., Metcalfe, J., Calderon, M., Lescano, A. G., Montenegro, S. H., Calampa, C., & Vinetz, J. M. (2003). Endemic malaria in the Peruvian Amazon region of Iquitos. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 69(1), 45–52.

6. Clark, E. H., Silva, C. J., Weiss, G. E., Li, S., Padilla, C., Crompton, P. D., Hernandez, J. N., & Branch, O. H. (2012). *Plasmodium falciparum* malaria in the Peruvian Amazon, a region of low transmission, is associated with immunologic memory. *Infection and immunity*, 80(4), 1583–1592. <https://doi.org/10.1128/IAI.05961-11>
7. Lin, J. T., Saunders, D. L., & Meshnick, S. R. (2014). The role of submicroscopic parasitemia in malaria transmission: what is the evidence? *Trends in parasitology*, 30(4), 183–190. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.02.004>
8. Carrasco-Escobar, G., Manrique, E., Tello-Lizarraga, K., & Miranda, J. J. (2020). Travel Time to Health Facilities as a Marker of Geographical Accessibility Across Heterogeneous Land Coverage in Peru. *Frontiers in public health*, 8, 498. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.00498>.
9. Mukkala, A. N., Kwan, J., Lau, R., Harris, D., Kain, D., & Boggild, A. K. (2018). An Update on Malaria Rapid Diagnostic Tests. *Current infectious disease reports*, 20(12), 49. <https://doi.org/10.1007/s11908-018-0655-4>
10. Ministerio de Salud, Resolucion Ministerial 244-2017 MINSA: Plan Malaria Cero Período 2017–2021. Lima, Perú. Disponible en: [https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/190350/189846\\_RM\\_244-2017-MINSA.PDF20180823-24725-1yk3i0y.PDF](https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/190350/189846_RM_244-2017-MINSA.PDF20180823-24725-1yk3i0y.PDF)

11. Haanshuus, C. G., Mørch, K., Blomberg, B., Strom, G., Langeland, N., Hanevik, K., & Mohn, S. C. (2019). Assessment of malaria real-time PCR methods and application with focus on low-level parasitaemia. *PloS one*, *14*(7), e0218982. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218982>
12. Hänscheid T. (1999). Diagnosis of malaria: a review of alternatives to conventional microscopy. *Clinical and laboratory haematology*, *21*(4), 235–245. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2257.1999.00220.x>
13. Kilian, A. H., Metzger, W. G., Mutschelknauss, E. J., Kabagambe, G., Langi, P., Korte, R., & von Sonnenburg, F. (2000). Reliability of malaria microscopy in epidemiological studies: results of quality control. *Tropical medicine & international health: TM & IH*, *5*(1), 3–8. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.2000.00509.x>
14. Okell, L. C., Ghani, A. C., Lyons, E., & Drakeley, C. J. (2009). Submicroscopic infection in *Plasmodium falciparum*-endemic populations: a systematic review and meta-analysis. *The Journal of infectious diseases*, *200*(10), 1509–1517. <https://doi.org/10.1086/644781>
15. Gamboa, D., Ho, M. F., Bendezu, J., Torres, K., Chiodini, P. L., Barnwell, J. W., Incardona, S., Perkins, M., Bell, D., McCarthy, J., & Cheng, Q. (2010). A large proportion of *P. falciparum* isolates in the Amazon region of Peru lack *pfhrp2* and

*pfhrp3*: implications for malaria rapid diagnostic tests. *PloS one*, 5(1), e8091.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008091>

16. Pati, P., Dhangadamajhi, G., Bal, M., & Ranjit, M. (2018). High proportions of *pfhrp2* gene deletion and performance of HRP2-based rapid diagnostic test in *Plasmodium falciparum* field isolates of Odisha. *Malaria journal*, 17(1), 394.  
<https://doi.org/10.1186/s12936-018-2502-3>

17. Gendrot, M., Fawaz, R., Dormoi, J., Madamet, M., & Pradines, B. (2019). Genetic diversity and deletion of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 and 3: a threat to diagnosis of *P. falciparum* malaria. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 25(5), 580–585.  
<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.09.009>

18. Berzosa, P., de Lucio, A., Romay-Barja, M., Herrador, Z., González, V., García, L., Fernández-Martínez, A., Santana-Morales, M., Ncogo, P., Valladares, B., Riloha, M., & Benito, A. (2018). Comparison of three diagnostic methods (microscopy, RDT, and PCR) for the detection of malaria parasites in representative samples from Equatorial Guinea. *Malaria journal*, 17(1), 333.  
<https://doi.org/10.1186/s12936-018-2481-4>

19. Endeshaw, T., Gebre, T., Ngondi, J., Graves, P. M., Shargie, E. B., Ejigsemahu, Y., Ayele, B., Yohannes, G., Teferi, T., Messele, A., Zerihun, M., Genet, A.,

Mosher, A. W., Emerson, P. M., & Richards, F. O. (2008). Evaluation of light microscopy and rapid diagnostic test for the detection of malaria under operational field conditions: a household survey in Ethiopia. *Malaria journal*, 7, 118. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-7-118>

20. Britton, S., Cheng, Q., & McCarthy, J. S. (2016). Novel molecular diagnostic tools for malaria elimination: a review of options from the point of view of high-throughput and applicability in resource limited settings. *Malaria journal*, 15, 88. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1158-0>

21. Snounou, G., Viriyakosol, S., Jarra, W., Thaithong, S., & Brown, K. N. (1993). Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Molecular and biochemical parasitology*, 58(2), 283–292. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(93\)90050-8](https://doi.org/10.1016/0166-6851(93)90050-8)

22. Mangold, K. A., Manson, R. U., Koay, E. S., Stephens, L., Regner, M., Thomson, R. B., Jr, Peterson, L. R., & Kaul, K. L. (2005). Real-time PCR for detection and identification of *Plasmodium spp.* *Journal of clinical microbiology*, 43(5), 2435–2440. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.5.2435-2440.2005>

23. Rubio, J. M., Benito, A., Berzosa, P. J., Roche, J., Puente, S., Subirats, M., López-Vélez, R., García, L., & Alvar, J. (1999). Usefulness of seminested multiplex

PCR in surveillance of imported malaria in Spain. *Journal of clinical microbiology*, 37(10), 3260–3264. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.10.3260-3264.1999>

24. Rougemont, M., Van Saanen, M., Sahli, R., Hinrikson, H. P., Bille, J., & Jaton, K. (2004). Detection of four *Plasmodium species* in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays. *Journal of clinical microbiology*, 42(12), 5636–5643. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.12.5636-5643.2004>

25. Gruenberg, M., Moniz, C. A., Hofmann, N. E., Wampfler, R., Koepfli, C., Mueller, I., Monteiro, W. M., Lacerda, M., de Melo, G. C., Kuehn, A., Siqueira, A. M., & Felger, I. (2018). *Plasmodium vivax* molecular diagnostics in community surveys: pitfalls and solutions. *Malaria journal*, 17(1), 55. <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2201-0>

26. Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic acids research*, 28(12), E63. <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>

27. Tanner, N. A., Zhang, Y., & Evans, T. C., Jr (2015). Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes. *BioTechniques*, 58(2), 59–68. <https://doi.org/10.2144/000114253>

28. Lucchi, N. W., Ndiaye, D., Britton, S., & Udhayakumar, V. (2018). Expanding the malaria molecular diagnostic options: opportunities and challenges for loop-mediated isothermal amplification tests for malaria control and elimination. *Expert review of molecular diagnostics*, *18*(2), 195–203. <https://doi.org/10.1080/14737159.2018.1431529>
29. Picot, S., Cucherat, M., & Bienvenu, A. L. (2020). Systematic review and meta-analysis of diagnostic accuracy of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) methods compared with microscopy, polymerase chain reaction and rapid diagnostic tests for malaria diagnosis. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*, *98*, 408–419. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.07.009>
30. Selvarajah, D., Naing, C., Htet, N. H., & Mak, J. W. (2020). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) test for diagnosis of uncomplicated malaria in endemic areas: a meta-analysis of diagnostic test accuracy. *Malaria journal*, *19*(1), 211. <https://doi.org/10.1186/s12936-020-03283-9>
31. Morris, U., & Aydin-Schmidt, B. (2021). Performance and Application of Commercially Available Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Kits in Malaria Endemic and Non-Endemic Settings. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, *11*(2), 336. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11020336>

32. Feleke, D. G., Alemu, Y., & Yemanebirhane, N. (2021). Performance of rapid diagnostic tests, microscopy, loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and PCR for malaria diagnosis in Ethiopia: a systematic review and meta-analysis. *Malaria journal*, 20(1), 384. <https://doi.org/10.1186/s12936-021-03923-8>
33. Serra-Casas, E., Manrique, P., Ding, X. C., Carrasco-Escobar, G., Alava, F., Gave, A., Rodriguez, H., Contreras-Mancilla, J., Rosas-Aguirre, A., Speybroeck, N., González, I. J., Rosanas-Urgell, A., & Gamboa, D. (2017). Loop-mediated isothermal DNA amplification for asymptomatic malaria detection in challenging field settings: Technical performance and pilot implementation in the Peruvian Amazon. *PloS one*, 12(10), e0185742. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185742>
34. Hopkins, H., González, I. J., Polley, S. D., Angutoko, P., Ategeka, J., Asiimwe, C., Agaba, B., Kyabayinze, D. J., Sutherland, C. J., Perkins, M. D., & Bell, D. (2013). Highly sensitive detection of malaria parasitemia in a malaria-endemic setting: performance of a new loop-mediated isothermal amplification kit in a remote clinic in Uganda. *The Journal of infectious diseases*, 208(4), 645–652. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit184>
- 35 Polley, S. D., González, I. J., Mohamed, D., Daly, R., Bowers, K., Watson, J., Mewse, E., Armstrong, M., Gray, C., Perkins, M. D., Bell, D., Kanda, H., Tomita, N., Kubota, Y., Mori, Y., Chiodini, P. L., & Sutherland, C. J. (2013). Clinical evaluation of a loop-mediated amplification kit for diagnosis of imported malaria.

*The Journal of infectious diseases*, 208(4), 637–644.  
<https://doi.org/10.1093/infdis/jit183>

36 Polley, S. D., Mori, Y., Watson, J., Perkins, M. D., González, I. J., Notomi, T., Chiodini, P. L., & Sutherland, C. J. (2010). Mitochondrial DNA targets increase sensitivity of malaria detection using loop-mediated isothermal amplification. *Journal of clinical microbiology*, 48(8), 2866–2871.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.00355-10>

37. Lucchi, N. W., Gaye, M., Diallo, M. A., Goldman, I. F., Ljolje, D., Deme, A. B., Badiane, A., Ndiaye, Y. D., Barnwell, J. W., Udhayakumar, V., & Ndiaye, D. (2016). Evaluation of the Illumigene Malaria LAMP: A Robust Molecular Diagnostic Tool for Malaria Parasites. *Scientific reports*, 6, 36808.  
<https://doi.org/10.1038/srep36808>

38. Demas, A., Oberstaller, J., DeBarry, J., Lucchi, N. W., Srinivasamoorthy, G., Sumari, D., Kabanywany, A. M., Villegas, L., Escalante, A. A., Kachur, S. P., Barnwell, J. W., Peterson, D. S., Udhayakumar, V., & Kissinger, J. C. (2011). Applied genomics: data mining reveals species-specific malaria diagnostic targets more sensitive than 18S rRNA. *Journal of clinical microbiology*, 49(7), 2411–2418.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.02603-10>

39. Rosales, A. (2018). *Diseño de una técnica de amplificación isotérmica mediada por horquillas (LAMP) in-house para la detección de Plasmodium falciparum y*

*Plasmodium vivax*. [Tesis de licenciatura] UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA-repositorio.unp.edu.pe.

<https://repositorio.unp.edu.pe/bitstream/handle/UNP/2108/BIO-ROS-ROS-2018.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

40. Haanshuus, C. G., Mohn, S. C., Mørch, K., Langeland, N., Blomberg, B., & Hanevik, K. (2013). A novel, single-amplification PCR targeting mitochondrial genome highly sensitive and specific in diagnosing malaria among returned travellers in Bergen, Norway. *Malaria journal*, 12, 26. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-12-26>

41. Perkins, S. L., & Schall, J. J. (2002). A molecular phylogeny of malarial parasites recovered from cytochrome b gene sequences. *The Journal of parasitology*, 88(5), 972–978. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2002\)088\[0972:AMPOMP\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2002)088[0972:AMPOMP]2.0.CO;2)

42. Grabias, B., Essuman, E., Quakyi, I. A., & Kumar, S. (2019). Sensitive real-time PCR detection of *Plasmodium falciparum* parasites in whole blood by erythrocyte membrane protein 1 gene amplification. *Malaria journal*, 18(1), 116. <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2743-9>

43. Amaral, L. C., Robortella, D. R., Guimarães, L., Limongi, J. E., Fontes, C., Pereira, D. B., de Brito, C., Kano, F. S., de Sousa, T. N., & Carvalho, L. H. (2019). Ribosomal and non-ribosomal PCR targets for the detection of low-

density and mixed malaria infections. *Malaria journal*, 18(1), 154.

<https://doi.org/10.1186/s12936-019-2781-3>

44. Ministerio de Salud, Peru. Documento técnico: Plan hacia la eliminación de la malaria en el Perú 2022-2030.

[https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/2793755/Norma\\_compressed.pdf](https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/2793755/Norma_compressed.pdf). Accessed 17 Mar 2022

45. Ministerio de Salud. Instituto Nacional de Salud. Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de malaria. Lima: MINSA; 100 p.

46. Foundation for Innovate New Diagnostic, 2012. *Manual of standard operating procedures for malaria LAMP*. Available at: <https://www.finddx.org/wp-content/uploads/2016/04/SOP-LAMP-Malaria-Aug2012.pdf>. Accessed March 20, 2020.

47 Padley, D. J., Heath, A. B., Sutherland, C., Chiodini, P. L., Baylis, S. A., & Collaborative Study Group (2008). Establishment of the 1st World Health Organization International Standard for *Plasmodium falciparum* DNA for nucleic acid amplification technique (NAT)-based assays. *Malaria journal*, 7, 139. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-7-139>

48. Pincelli, A., Neves, P., Lourenço, B. H., Corder, R. M., Malta, M. B., Sampaio-Silva, J., de Souza, R. M., Cardoso, M. A., Castro, M. C., Ferreira, M. U., & For

The Mina Brazil Working Group (2018). The Hidden Burden of *Plasmodium vivax* Malaria in Pregnancy in the Amazon: An Observational Study in Northwestern Brazil. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 99(1), 73–83. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0135>

49. Nolasco, O., Infante, B., Contreras-Mancilla, J., Incardona, S., Ding, X. C., Gamboa, D., & Torres, K. (2020). Diagnosis of *Plasmodium vivax* by Loop-Mediated Isothermal Amplification in Febrile Patient Samples from Loreto, Perú, *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 103(4), 1549-1552. Retrieved Dec 20, 2021, from <https://www.ajtmh.org/view/journals/tpmd/103/4/article-p1549.xml>

50. Nolasco, O., Montoya, J., Rosales Rosas, A. L., Barrientos, S., Rosanas-Urgell, A., & Gamboa, D. (2021). Multicopy targets for *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* detection by colorimetric LAMP. *Malaria journal*, 20(1), 225. <https://doi.org/10.1186/s12936-021-03753-8>

51. Choopara, I., Arunrut, N., Kiatpathomchai, W., Dean, D., & Somboonna, N. (2017). Rapid and visual Chlamydia trachomatis detection using loop-mediated isothermal amplification and hydroxynaphthol blue. *Letters in applied microbiology*, 64(1), 51–56. <https://doi.org/10.1111/lam.12675>

52 Han, E. T., Watanabe, R., Sattabongkot, J., Khuntirat, B., Sirichaisinthop, J., Iriko, H., Jin, L., Takeo, S., & Tsuboi, T. (2007). Detection of four *Plasmodium*

species by genus- and species-specific loop-mediated isothermal amplification for clinical diagnosis. *Journal of clinical microbiology*, 45(8), 2521–2528. <https://doi.org/10.1128/JCM.02117-06>

53 Patel, J. C., Oberstaller, J., Xayavong, M., Narayanan, J., DeBarry, J. D., Srinivasamoorthy, G., Villegas, L., Escalante, A. A., DaSilva, A., Peterson, D. S., Barnwell, J. W., Kissinger, J. C., Udhayakumar, V., & Lucchi, N. W. (2013). Real-time loop-mediated isothermal amplification (RealAmp) for the species-specific identification of *Plasmodium vivax*. *PloS one*, 8(1), e54986. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054986>

54 Dinzouna-Boutamba, S. D., Yang, H. W., Joo, S. Y., Jeong, S., Na, B. K., Inoue, N., Lee, W. K., Kong, H. H., Chung, D. I., Goo, Y. K., & Hong, Y. (2014). The development of loop-mediated isothermal amplification targeting alpha-tubulin DNA for the rapid detection of *Plasmodium vivax*. *Malaria journal*, 13, 248. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-248>

55 Aydin-Schmidt, B., Xu, W., González, I. J., Polley, S. D., Bell, D., Shakely, D., Msellem, M. I., Björkman, A., & Mårtensson, A. (2014). Loop mediated isothermal amplification (LAMP) accurately detects malaria DNA from filter paper blood samples of low density parasitaemias. *PloS one*, 9(8), e103905. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103905>

56. Britton, S., Cheng, Q., Grigg, M. J., Poole, C. B., Pasay, C., William, T., Fornace, K., Anstey, N. M., Sutherland, C. J., Drakeley, C., & McCarthy, J. S. (2016). Sensitive Detection of *Plasmodium vivax* Using a High-Throughput, Colourimetric Loop Mediated Isothermal Amplification (HtLAMP) Platform: A Potential Novel Tool for Malaria Elimination. *PLoS neglected tropical diseases*, *10*(2), e0004443. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004443>

57 Moyes, C. L., Henry, A. J., Golding, N., Huang, Z., Singh, B., Baird, J. K., Newton, P. N., Huffman, M., Duda, K. A., Drakeley, C. J., Elyazar, I. R., Anstey, N. M., Chen, Q., Zommers, Z., Bhatt, S., Gething, P. W., & Hay, S. I. (2014). Defining the geographical range of the *Plasmodium knowlesi* reservoir. *PLoS neglected tropical diseases*, *8*(3), e2780. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002780>

58 Azam, M., Upmanyu, K., Gupta, R., Sruthy, K. S., Matlani, M., Savargaonkar, D., & Singh, R. (2021). Development of Two-Tube Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Differential Diagnosis of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* and Its Comparison with Loopamp™ Malaria. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, *11*(9), 1689. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11091689>

## X ANEXOS.

### ANEXO 1: Constancia y enmienda aprobadas por el CIEI-UPCH.



UNIVERSIDAD PERUANA  
CAYETANO HEREDIA

Dirección Universitaria de  
INVESTIGACIÓN, CIENCIA Y  
TECNOLOGÍA (DUICT)

#### CONSTANCIA E070 - 14 - 20

El Presidente del Comité Institucional de Ética en Investigación (CIEI) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia hace constar que el proyecto de investigación señalado a continuación fue **APROBADO** por el Comité Institucional de Ética en Investigación, bajo la categoría de revisión **EXENTO**. La aprobación será informada en la sesión más próxima del comité.

Título del Proyecto : "Desarrollo y validación de la amplificación isotérmica mediada por bucle para el diagnóstico de malaria y su aplicación en puesto de salud de atención primaria".

Código de inscripción : 201296

Investigador principal : Nolasco Cárdenas, Oscar Patricio

La aprobación incluyó los documentos finales descritos a continuación:

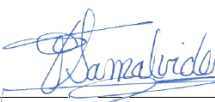

#### 1. Protocolo de investigación, versión recibida en fecha 27 de mayo del 2020

La **APROBACIÓN** considera el cumplimiento de los estándares de la Universidad, los lineamientos Científicos y éticos, el balance riesgo/beneficio, la calificación del equipo investigador y la Confidencialidad de los datos, entre otros.

Cualquier enmienda, desviaciones, eventualidad deberá ser reportada de acuerdo a los plazos y normas establecidas. La categoría de **EXENTO** es otorgado al proyecto por un periodo de cinco años en tanto la categoría se mantenga y no existan cambios o desviaciones al protocolo original. El investigador esta exonerado de presentar un reporte del progreso del estudio por el periodo arriba descrito y solo alcanzará un informe final al término de éste. La aprobación tiene vigencia desde la emisión del presente documento hasta el **26 de mayo del 2025**.

Si aplica, los trámites para su renovación deberán iniciarse por lo menos 30 días previos a su vencimiento.

Lima, 27 de mayo del 2020.

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

/s/

Av. Honorio Delgado 430, SMP 15102   
Apartado postal 4314  
(511) 319-0000 anexo 201352   
duict@oficinas-upch.pe   
www.cayetano.edu.pe 



**CONSTANCIA**

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

Título del Proyecto : “Desarrollo y validación de la amplificación isotérmica mediada por bucle para el diagnóstico de malaria y su aplicación en puesto de salud de atención primaria”.

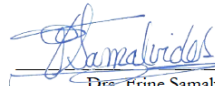
Código de inscripción : 201296


Investigador principal : Nolasco Cardenas, Oscar Patricio.

La enmienda/modificación corresponde a los siguientes documentos:

1. Protocolo de investigación, versión recibida en fecha 08 de julio del 2021.

Lima, 03 de agosto del 2021.

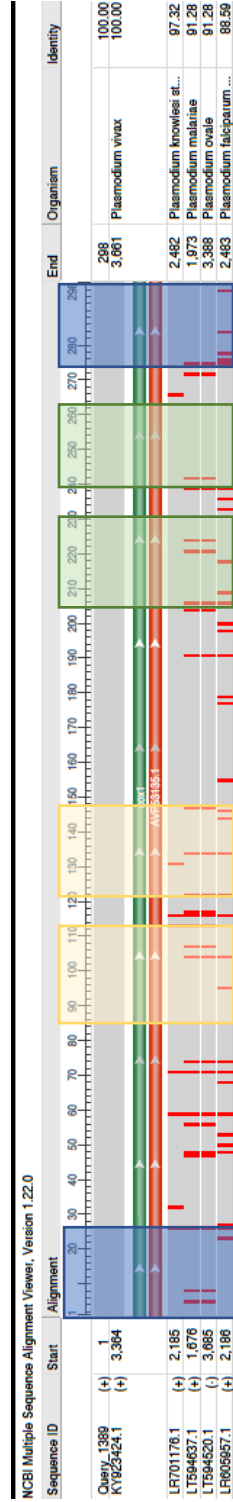
  
Dra. Frine Samalvides Cuba  
Presidenta  
Comité Institucional de Ética en Investigación



/cht

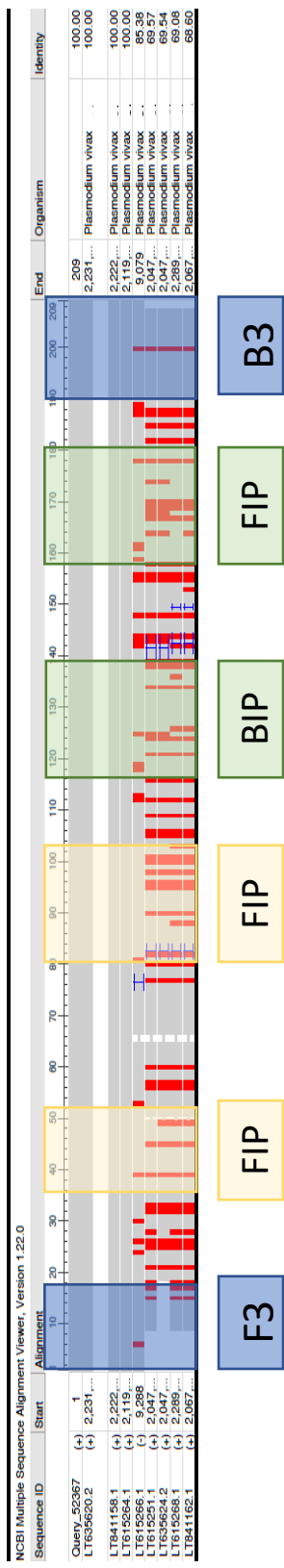
ANEXO 2: Mapas de ubicación de los cebadores de síntesis de ADN.

Alineamiento de secuencias *COXI* de *Plasmodium vivax*, mostrando las regiones de reconocimiento de los cebadores y las variaciones con mayor frecuencia encontradas en las secuencias



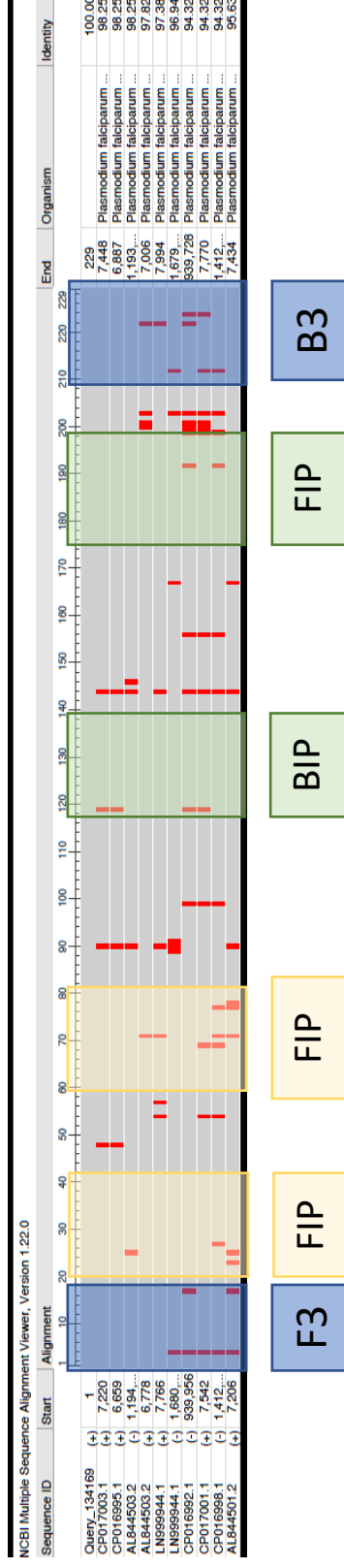
>*Plasmodium vivax mitochondrion*  
 GAATAATTGCACAAGAAAATGTTAACTTATAATAATGATATTTACATTACATGGAATTATTGATATTCTTTAA  
 TATAATGCCAGGATTAATTTGGAGGATTCGGTAATTACTTCCFACCAATTTTATGTGGTTCTCCAGAACTTGCATAT  
 CCAAGAATTAAGTATATCTTTTATTATTACAACCAATAGCTTTTATTATTAGTTCATTTTATTATCAGCAGCAGAAT  
 TTGGAGGAGGTACTGGATGGACTTTTATATCCACCAATTAAGTACATCACTTATGTCITTTATCTCCCTGTTC

Alineamiento de secuencias *Pvr47* de *Plasmodium vivax*, mostrando las regiones de reconocimiento de los cebadores y las variaciones con mayor frecuencia en las secuencias



> *Plasmodium vivax Pvr47*  
AACACCTCCACCAATCATATAACAATGTTAGCGTGTGCCAAATTTTTTTGCGGTACTATATATAATTTCCACATT  
GTAATGAAATGTTCTGATTTTCCGCGTAACAATGTAGAATATCTTTCGCTTATCCATTCATCGAAACATTTGTGCG  
TGCCAGCTGTGTTTATGTTTGTGTCACATATATACTATTTATGCCCTTCGATAATTAC

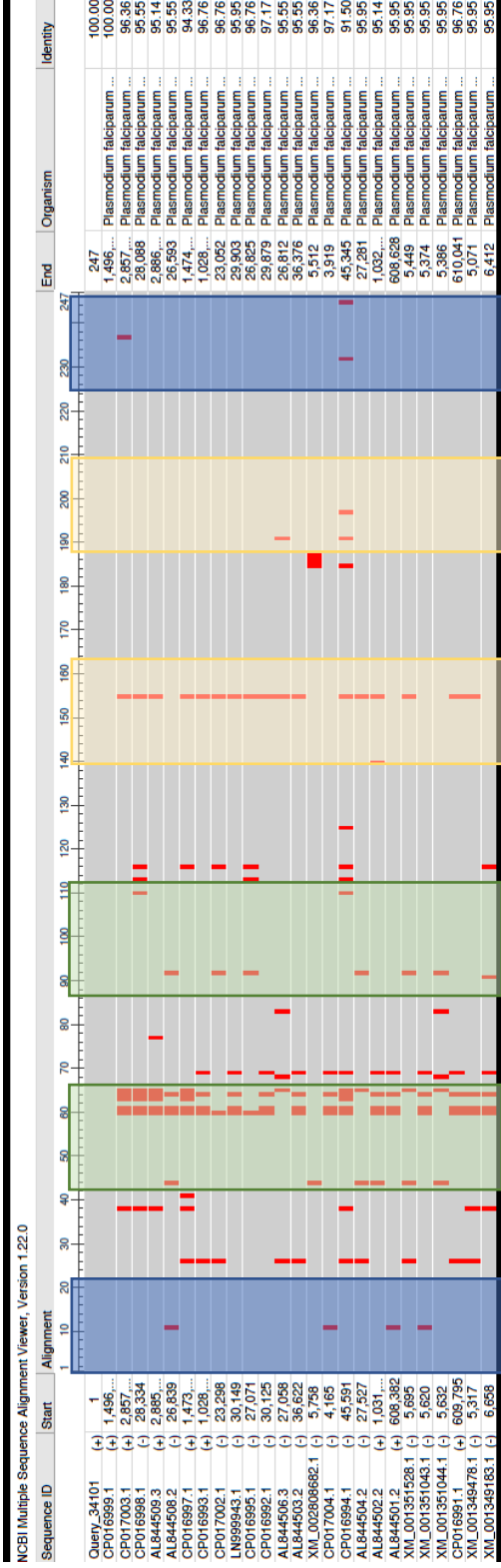
Alineamiento de secuencias *Pfr364* de *Plasmodium falciparum*, mostrando las regiones de reconocimiento de los cebadores y las variaciones con mayor frecuencia encontradas en las secuencias



> *Plasmodium falciparum Pfr364*

CACTAGGTACGCCAACATGGATGTGTCATATCAATAATAGTCCGTGATCAACTATACATACTACGTGGTACCATAATGGTGTCTACAT  
CACACACGTGGTGTAAATCACCAATTTTTCATTTGTACCCCAATTTCCCTAGCACCTTTGGTGCACAAATTCACATGCACTTCA  
AAGCATTGATGATGATGATGTTGCACACACGATGTTAAACATCTCAATCAAAAATTGTGGGT

## Alineamiento de secuencias *EMPI* de *Plasmodium falciparum*, mostrando las regiones de reconocimiento de los cebadores y las variaciones con mayor frecuencia encontradas en las secuencias



> *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1

CTGTTGGTGGTTACCACCTAGGTTCTAGTACTACTTCTATCAATGTTTATATTTAGGACTACCTGGTACATATATCATTAATCAATCCAAATTCCTCATACTC  
 ACTTTCGGAAGATGAAGTAATCACTATAATGATCGGTTGTAACCACCTATCTGCCACTATCTCCTCAAGGTAATGTACCGTTTGCCCTCTGTATTAC  
 CACTAGTATAAGGTATATCTATTGGGTGAAAGTTTGTCTGG

