



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

**DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Plasmodium* spp. EN
LA AMAZONIA ECUATORIANA POR LA TÉCNICA DE SEMI-NESTED
MULTIPLEX PCR**

AUTOR

Alberto Esteban Toapanta Aráuz

AÑO

2019



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Plasmodium* spp. EN LA
AMAZONIA ECUATORIANA POR LA TÉCNICA DE SEMI-NESTED
MULTIPLEX PCR

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingeniero en Biotecnología.

Profesor guía

Ph.D. Segundo Manuel Calvopiña Hinojosa

Autor

Alberto Esteban Toapanta Aráuz

Año

2019

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido el trabajo, Detección e identificación molecular de *Plasmodium* spp. en la Amazonia ecuatoriana por la técnica de semi-nested multiplex PCR a través de reuniones periódicas con el estudiante, Alberto Esteban Toapanta Aráuz, en el semestre 201910, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

Segundo Manuel Calvopiña Hinojosa

Doctor en Enfermedades Infecciosas

CC: 0501308415

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, Detección e identificación molecular de *Plasmodium* spp. en la Amazonia ecuatoriana por la técnica de semi-nested multiplex PCR , del estudiante Alberto Esteban Toapanta Aráuz, en el semestre 201910, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

Carlos Andrés Bastidas Cáldes

Master en Microbiología

CC: 0201619806

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

Alberto Esteban Toapanta Aráuz

CC: 1719924597

AGRADECIMIENTOS

Primero, le doy gracias a Dios, porque no sería nada sin Él, sin su luz, sin su compañía, sin su ayuda, sin su amor.

Le doy gracias a mi Tutor y Director Científico el Doctor Manuel Calvopiña, por su tiempo, su guía y su inmenso apoyo, sin él esto no sería posible. A la MSc Irina Villacres, por enseñarme, ayudarme y aconsejarme en el desarrollo de toda la fase experimental. A la Dirección General de Investigación de la Universidad de las Américas, por el acceso a sus laboratorios para desarrollar este proyecto. Al MSc Carlos Bastidas y al Dr. Fabián Sáenz, por su colaboración con esta investigación. A mis queridos amigos David Fonseca y Mishell Monsalve por su ayuda con este trabajo.

DEDICATORIA

Le dedicó este trabajo a mi madre, porque nunca ha dudado de mí, porque es mi luz de esperanza, porque es mi pilar de fortaleza y porque siempre me levanta de cualquier caída.

A mi padre, por darme la valentía para enfrentar cualquier problema, por motivarme para dar lo mejor de mí siempre, porque me ayuda a perseverar sin importar la situación y porque sin su ayuda no estaría aquí.

A mi hermano, por su enorme generosidad y caridad. Porque me ha brindado su ayuda en todo momento, porque es mi ejemplo a seguir y porque me enseña a ver la luz de Dios en todas las cosas.

RESUMEN

La malaria es causada por protozoarios del genero *Plasmodium* spp. con 5 especies infectantes al hombre. En Ecuador, es endémica en regiones tropicales de la Amazonia y Costa. Las especies circulantes en el país son *Plasmodium falciparum* y *P. vivax*. Es importante diagnosticar tempranamente y determinar la especie de Plasmodios, por el riesgo de desarrollar malaria complicada que podría ser fatal. El método de diagnóstico recomendado es la microscopía en frotis de sangre coloreadas con Giemsa, pero tiene baja sensibilidad, especificidad y poca certeza en la identificación de la especie. Por ende, la búsqueda de otros métodos de diagnóstico inmunológicos y moleculares es continúa. En el presente estudio se estandarizó una semi-nested multiplex PCR (SnM-PCR) con el objetivo de detectar y discriminar entre *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae* y *P. ovale* a partir de ADN extraído de placas de vidrio con frotis de sangre de pacientes sospechosos de malaria de la Amazonia.

La extracción del ADN se realizó con Chelex-100. Se estandarizó la SnM-PCR. Método que se basa en la amplificación de las secuencias del gen 18S ribosomal (ssrARN). Este gen presenta varias copias y dominios para los 4 parásitos humanos de malaria. En la primera reacción de SnM-PCR utilizamos un cebador universal (UNR) y un directo (PLF) específico para *Plasmodium*. En la segunda reacción utilizamos el cebador directo y 4 cebadores inversos (VIR, FAR, MAR, OVR) específicos para *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae* y *P. ovale*; los amplicones esperados son 495pb, 395pb, 269pb y 436pb, respectivamente; con la finalidad de diferenciar entre especies. Estandarizada la técnica aplicamos en 649 frotis de sangre, 333 positivos y 316 negativos por microscopía. Los frotis fueron tomados de personas sospechosas de tener malaria, durante los años 2015 y 2016, en 5 provincias amazónicas del Ecuador. Al comparar con la microscopía, la SnM-PCR obtuvo 96 positivos de 333 microscopio-positivos y 19 positivos de 316 microscopio-negativos, demostrando sensibilidad del 28.8% (Intervalo de confianza [IC] del 95%, 24.0%; 33.7%) y una especificidad del 94.0% (IC 95%, 91.4%; 96,6%). Concerniente a la identificación de especies, 64/96 (67%) se identificaron como *P. vivax* y 32/96 (33%) como *P. falciparum*. Con la SnM-PCR se encontró que 12/52 (23.07%) de los casos

identificados como *P. vivax* correspondían a *P. falciparum* y 5/8 (62.5%) identificados como *P. falciparum* eran *P. vivax*. Con nuestra técnica se encontró positividad en 36 frotis que carecían de identificación, con 19/36 (53%) correspondientes a *P. vivax* y 17/36 (47%) a *P. falciparum*. La técnica estandarizada en este estudio permitió la diferenciación entre *P. vivax* y *P. falciparum*, presentes en la Amazonia ecuatoriana. Además, fue posible la amplificación de ADN desde frotis de sangre coloreados y guardados por 12 y 24 meses, implicando la posibilidad de realizar estudios epidemiológicos retrospectivos. La extracción de ADN por Chelex y la mala calidad de la muestra en las placas mal almacenadas pudieron haber causado una baja sensibilidad en comparación con la microscopia. En el futuro se debería probar este método con otro protocolo de extracción de ADN y muestras frescas.

ABSTRACT

Malaria is caused by protozoa of the genus *Plasmodium* spp. with 5 infectious species to humans. In Ecuador, it is endemic in tropical regions of the Amazon and the Coast. The circulating species in the country are *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. An early diagnostic and the determination of the *Plasmodium* species are important, due to the risk of developing complicated malaria that could be fatal. The recommended diagnostic method is microscopy in blood smears stained with Giemsa, but it has a low sensitivity, specificity and little certainty in the identification of the species. Therefore, the search for other immunological and molecular diagnostic methods are permanent. In the present study, a semi-nested multiplex PCR (SnM-PCR) was standardized with the aim of detecting and discriminating between *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*, and *P. ovale* from DNA extracted from blood smears. DNA extraction was performed with Chelex-100. The SnM-PCR was standardized; this method is based on the amplification of the ribosomal 18S gene sequences (*ssrDNA*). This gene has several copies and domains for the 4 human malaria parasites. In the first SnM-PCR reaction we used a universal primer (UNR) and a forward primer (PLF) specific for *Plasmodium*. In the second reaction we used the forward primer and 4 inverse primers (VIR, FAR, MAR, OVR) specific for *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*, and *P. ovale*; the expected sizes of the PCR products are 495pb, 395pb, 269pb, and 436bp; with the purpose of differentiating each species. A total of 649 blood smears were analyzed, 333 positive and 316 negatives by microscopy. The smears were taken from individuals suspected of having malaria, during the years 2015 and 2016, in 5 Amazonian provinces of Ecuador. When compared to microscopy, the SnM-PCR obtained 96 positive samples of 333 microscope-positive smears and 19 positives of 316 microscope-negatives smears. This produces a sensitivity of 28,8% (95% confidence interval [CI], 24,0%; 33,7%) and a specificity of 94.0% (95% CI, 91,4%; 96,6%). Concerning the identification of species, 64/96 (67%) were identified as *P. vivax* and 32/96 (33%) as *P. falciparum*. With the SnM-PCR it was found that 12/52 (23,07%) of the cases identified as *P. vivax* were *P. falciparum*, 5/8 (62,5%) identified as *P. falciparum* were *P. vivax* and 36 smears that lacked identification produced

positive results, with 19/36 (53%) corresponding to *P. vivax* and 17/36 (47%) to *P. falciparum*. The standardized technique in this study allowed the differentiation between the two species *P. vivax* and *P. falciparum*, present in the Ecuadorian Amazon. In addition, it was possible to amplify DNA from stained blood smears that were stored for 12 and 24 months, implying the possibility of performing retrospective epidemiological studies. The low sensitivity that was obtained compared with microscopy, is possibly due to the extraction of DNA by Chelex and the poor quality of the sample in badly stored plates. In the future, this method should be tested with another DNA extraction protocol and fresh samples.

ÍNDICE

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Planteamiento del problema	4
1.4 Objetivos específicos	7
1.5 Justificación de la investigación.....	7
2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	10
2.1 Origen de la malaria humana.....	10
2.1.1 Taxonomía de <i>Plasmodium</i>	10
2.1.2 Orígenes de los parásitos humanos <i>P. falciparum</i> y <i>P. vivax</i>	11
2.1.3 Primeros estudios sobre infecciones de <i>Plasmodium</i> en simios	12
2.1.4 Origen de <i>P. falciparum</i> en gorilas occidentales	14
2.1.5 Aparición de <i>P. falciparum</i> en humanos.....	15
2.1.6 Origen africano de <i>P. vivax</i> humano	16
2.2 Biología y enfermedad de malaria	17
2.2.1 Introducción	17
2.2.2 Biología del <i>Plasmodium</i> spp. y ciclo de vida.....	17
2.2.3 Infección del Hígado	18
2.2.4 Invasión al eritrocito	20
2.2.5 Transición a transmisión	21
2.2.6 Remodelación de la célula huésped y evasión de la respuesta inmune	22
2.2.7 Vector del <i>Plasmodium</i> spp.	23
2.2.8 Características clínicas de la enfermedad y patogénesis.....	24

2.2.9 Malaria complicada por <i>P. falciparum</i>	25
2.2.10 Antimaláricos, resistencia y nuevos objetivos para el desarrollo de drogas	25
2.2.11 Mecanismo de acción de la artemisinina y resistencia	26
2.3 Malaria en el Ecuador	27
2.3.1 Áreas de riesgo y distribución de especies	27
2.3.2 Epidemiología	29
2.3.3 Control y eliminación de la malaria en el Ecuador	30
2.4 Técnicas para diagnóstico e identificación de especies de <i>Plasmodium</i>	31
2.4.1 Microscopía	31
2.4.2 Test de diagnóstico rápido (RDT)	33
2.4.3 Diagnóstico molecular	34
3. CAPÍTULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL ..	37
4. CAPÍTULO IV. PROCEDIMIENTOS	39
4.1 Obtención de las muestras	39
4.1.1 Cepa estándar de <i>P. falciparum</i> y cepa de <i>P. vivax</i>	40
4.2 Recolección de material biológico a partir de frotis de sangre en placas de vidrio teñidos con Giemsa	41
4.3 Extracción de ADN a partir de frotis de sangre en placas de vidrio teñidos con Giemsa utilizando Chelex-100	41
4.4 Cuantificación de ADN	42
4.5 Determinación molecular por Semi-nested multiplex PCR	42
4.5.1 Primera reacción semi-nested multiplex PCR	43
4.5.2 Segunda reacción semi-nested multiplex PCR	44

4.6 Confirmación molecular de <i>Plasmodium</i> spp. por repetición de muestras positivas con SnM-PCR	45
4.7 Secuenciación	45
4.8 Análisis estadístico.....	46
5. CAPÍTULO V. RESULTADOS	46
5.1 Número de muestras obtenidas y analizadas por cantones y provincia.....	46
5.2 Muestras positivas, negativas y especies de <i>Plasmodium</i> por microscopía	47
5.3 Cuantificación de ADN.....	47
5.4 Experimento 1. Detección de <i>Plasmodium</i> por SnM-PCR.....	48
5.5 Experimento 2. Diluciones del extracto de ADN	49
5.6 Experimento 3. Diluciones de los productos SnM-PCR de la primera reacción para la segunda reacción	50
5.7 Experimento 4. Especificidad de los cebadores VIR y FAR ...	52
5.8 Experimento 5. Optimización de la concentración de cebadores en la segunda reacción	53
5.9 Experimento 6. SnM-PCR optimizada.....	54
5.10 Alineamiento de secuencias	55
5.11 Comparación de las muestras positivas y negativas por microscopía vs la SnM-PCR	56
5.12 Identificación de especies de <i>Plasmodium</i> por microscopía y SnM-PCR.....	57

5.13 Determinación de sensibilidad y especificidad de la SnM-PCR	58
6. CAPÍTULO VI. DISCUSIÓN	58
6.1 Extracción y pureza del ADN extraído con Chelex-100	58
6.2 Primera reacción SnM-PCR.....	59
6.3 Disminución de inhibidores por dilución	61
6.4 Eliminación de bandas inespecíficas en la segunda reacción SnM-PCR.....	65
6.5 SnM-PCR optimizada.....	67
6.6 Identificación de especies	69
6.7 Sensibilidad y especificidad de la SnM-PCR	71
7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	75
7.1 Conclusiones	75
7.2 Recomendaciones.....	77
REFERENCIAS	79
ANEXOS	100

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

La malaria es una enfermedad transmitida por mosquitos del género *Anopheles* spp. que ponen en riesgo de infección a 3,3 billones de personas en 97 países en los 5 continentes. Se estima que en el año 2016 esta enfermedad ocasionó 445.000 muertes de las cuales 407.000 ocurrieron en el continente Africano (WHO, 2017). La malaria es causada por los parásitos patógenos apicomplejos (endoparásitos protistas) del género *Plasmodium*; cinco especies de este género, incluyendo *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. knowlesi* son infectantes y presentan un gran riesgo de salud para los humanos; *P. falciparum* provoca el mayor número de muertes con una predominancia en África mientras que *P. vivax* es el principal causante de malaria crónica y recidivante en varias partes del mundo (Naing, Whittaker, Nyunt Wai, y Mak, 2014). La infección por *Plasmodium* spp. resulta en enfermedad febril, con episodios intermitentes de fiebre y escalofrío durante los picos de parasitemia. En casos de infección con *P. falciparum* y *P. knowlesi* se complica a malaria cerebral, anemia aguda, falla renal, etc. cuando no se diagnostica a tiempo y no se trata con fármacos oportunamente, pudiendo ocasionar la muerte del paciente. Las especies *P. vivax* y *P. malariae* dan formas benignas, pero conllevando a la cronicidad y complicaciones posteriores. Los niños son particularmente susceptibles a la malaria complicada en regiones endémicas de África, donde se estima que cerca de un cuarto de muertes de infantes se debe a esta enfermedad (Miller, Ackerman, Su, y Wellems, 2013).

En el Ecuador, según datos oficiales del Ministerio de Salud Pública (MSP) en el 2010 se reportaron ~1900 casos de malaria y para el 2016 este número se redujo a 1200. De todos los casos reportados, ninguno fue causa de muerte. Sin embargo, a pesar de la tendencia general de disminución de pacientes con malaria, en el 2015 se reportaron 600 casos, este valor se duplicó para el 2016

y en el 2017 se reportaron 1279 casos. Por otra parte, el número estimado de personas en riesgo por malaria fue de 285.880 en el 2010 y de 313.643 en el 2016. El control de malaria en Ecuador ha ido mejorando desde el año 2010 hasta el 2016, de hecho, se espera que para el año 2020 se elimine esta enfermedad en el país (MSP, 2017).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el Ecuador la proporción estimada de las especies circulantes de *Plasmodium* es del 15% para *P. falciparum* y 85% para *P. vivax* (WHO, 2017). A nivel nacional, las provincias con mayor tasa de incidencia de malaria por 1000 habitantes, son Orellana (1,4 personas), Pastaza (1,4) y Morona Santiago (0,9) (Granda, 2018).

El diagnóstico de malaria basado únicamente en los síntomas clínicos no es suficiente, ya que esta enfermedad presenta una amplia gama de síntomas no específicos que se pueden confundir con otras diferentes enfermedades causantes de fiebre y malestar general. Por lo tanto, en regiones no endémicas, la malaria continúa siendo un desafío de diagnóstico y manejo (Cowman, Healer, Marapana, y Marsh, 2016).

El *gold standard* para el diagnóstico parasitológico de malaria es la microscopía de luz (WHO, 2017). Se realizan extendidos de sangre gruesa y fina en placas de vidrio coloreadas con Giemsa y de esta forma se observa los parásitos con el microscopio. Aunque este método es rápido y fácil de aplicar, presenta baja sensibilidad y especificidad, además depende de muchos factores para determinar su eficacia. Factores como la hora de toma de la muestra, la parasitemia, la especie de *Plasmodium*, el colorante usado, la resolución y mantenimiento del microscopio, además requiere un alto nivel de experticia por parte del observador, que no siempre se encuentra para la observación del parásito microscópico y más aún la discriminación de la especie (Tangpukdee, Duangdee, Wilairatana, y Krudsood, 2009). Los Test de Diagnóstico Rápido

(RDT por sus siglas en inglés) para la detección de antígenos han tenido un incremento de uso, especialmente en áreas donde se limita el acceso de un buen servicio de microscopía. De todos modos, este método presenta limitaciones de sensibilidad y especificidad. La observación de falsos positivos es común, en especial luego del tratamiento, dado que los antígenos detectados del parásito pueden permanecer en el sistema circulatorio después de su eliminación (Capelli et al., 2017).

En el Ecuador, el Ministerio de Salud Pública (MSP) recomienda el método microscópico para el diagnóstico parasitológico y confirmación de malaria. En el 2010 se examinaron 481.030 casos por este método, de los cuales se confirmaron 1888. En este mismo año se utilizó RDT y se examinaron 7800 casos, pero ninguno se confirmó. Posteriormente se dejó de utilizar este método y se continuó utilizando la microscopía hasta la actualidad (WHO, 2017).

Los métodos moleculares incrementan la sensibilidad, especificidad y pueden discriminar entre especies de *Plasmodium*. Los genes (ADNr) del ácido ribonucleico ribosomal (ARN) tienen una gran utilidad en el campo molecular, gracias a que contienen una mezcla de regiones que evolucionan a diferentes tasas. Por lo tanto se los puede utilizar en diferentes niveles taxonómicos (Rubio et al., 2002). En este sentido, el método de la semi-nested multiplex PCR (SnM-PCR) se basa en la amplificación de la secuencia del gen 18S de la subunidad pequeña ribosomal (ssrARN) para identificar cuatro especies de malaria humana. Este método involucra la amplificación a través de un multiplex PCR (reacción en cadena de la polimerasa). En la primera reacción se amplifica el ssrARN de *Plasmodium* de las muestras de sangre infectadas con malaria e incluye un control positivo que indica si la reacción funciona correctamente. La segunda reacción utiliza el producto de la primera y se producen bandas de diferentes tamaños dependiendo la especie de *Plasmodium* (Rubio et al., 1999; Rubio et al., 1999).

La PCR detecta el ADN parasitario, superando el límite de detección de la microscopía y RDTs (Hopkins et al., 2013). Más aun, las herramientas moleculares proveen información valiosa sobre el potencial origen de los parásitos de malaria en estudios de brotes de epidemias (Obaldia et al., 2015). Otras técnicas como la PCR en tiempo real (qPCR), *nested*-PCR, qPCR con transcriptasa inversa (RT qPCR) son más sensibles (Hopkins et al., 2013; Zheng y Cheng, 2017) y más apropiadas cuando el nivel de transmisión se aproxima a cero. Por lo tanto, para lograr una eliminación exitosa, la detección de todos los portadores de parásitos luego del tratamiento de todas las infecciones, es importante para interrumpir la transmisión de malaria en áreas endémicas (Vallejo et al., 2015). La identificación y manejo de portadores sub-microscópicos se ha convertido en un objetivo nuevo y de bastante importancia para los programas de control de malaria (Lindblade, Steinhardt, Samuels, Kachur, y Slutsker, 2013).

En esta investigación y por lo anteriormente expuesto en relación a las dificultades presentadas en el diagnóstico de malaria, así como la identificación del agente causante, estandarizamos una semi-nested multiplex PCR con cebadores que permiten el diagnóstico y la diferenciación de las especies *P. falciparum* y *P. vivax*. Además, aplicamos la técnica en frotis sanguíneos obtenidas de pacientes sospechosos de malaria de la Amazonia, con el propósito de mejorar el diagnóstico y la diferenciación de las especies causantes de ésta enfermedad. En el futuro, la aplicación de esta técnica podría facilitar el control de malaria en zonas endémicas del país y al mismo tiempo esto tendría un impacto positivo en la eliminación de la enfermedad.

1.2 Planteamiento del problema

La malaria en el Ecuador es considerada un problema de salud pública por el MSP. Esta enfermedad es endémica en las regiones tropicales tanto de la

Amazonia como de la Costa ecuatoriana. Hasta el momento solo se ha reportado la transmisión de las especies *Plasmodium falciparum* y *P. vivax* en el país. El riesgo de no diagnosticar de forma temprana y específica la especie de *Plasmodium* en los infectados, aumenta el riesgo de desarrollar malaria complicada la cual podría ser fatal. Adicionalmente, los síntomas y pronóstico de la enfermedad dependen de la especie del parásito. En caso de realizar un diagnóstico incorrecto a un paciente o no detectar una infección mixta, esto puede provocar el desarrollo de una malaria complicada o crónica (Miller et al., 2013). Otra razón importante de confirmar la especie es que el tratamiento farmacológico es específico para cada especie. En adición, la demora o falla en el diagnóstico resulta en un paciente como fuente de infección para otros individuos dentro de la familia y la comunidad (Polley et al., 2013).

El único método de diagnóstico parasitológico de malaria utilizado en Ecuador, es la observación de los parásitos *Plasmodium* spp. por microscopia de luz en frotis de sangre periférica, obtenidos de pacientes febriles por punción en el pulpejo del dedo. Sin embargo, este método presenta limitaciones de sensibilidad y especificidad, además de que requiere una alta experticia (Capelli et al., 2017). La examinación de placas por esta técnica bajo condiciones óptimas y por un microscopista competente, permite detectar parasitemias de 0,001% (10-40 parásitos por μ L de sangre). Este método de diagnóstico consume tiempo en la búsqueda de los parásitos microscópicos y más especialmente en infecciones con escasa parasitemia (Barber, William, Grigg, Yeo, y Anstey, 2013; Wang et al., 2014).

Además de esto, la diferenciación de las especies de *Plasmodium* necesita de amplia experiencia. Existen casos de infecciones mixtas que no han sido diagnosticadas con precisión por microscopia (Rubio et al., 1999; Snounou et al., 1993). Por cuanto, se han desarrollado otras alternativas de diagnóstico que permiten reducir el consumo de tiempo y posibiliten que una persona sin tanta experticia genere resultados iguales. Algunos ejemplos son la microscopia por

fluorescencia, técnicas de concentración como *quantitative buffy coat* (QBC) y métodos inmunológicos como RDT. Estos métodos han mejorado de cierta forma la velocidad y exactitud del diagnóstico individual, pero se incrementa la dependencia a equipos sofisticados y el costo es elevado (Rubio et al., 2002).

En el Ecuador, en el año 2016 se examinaron 311.920 posibles casos por microscopia de luz, de los cuales solamente 1191 fueron confirmados. Desde el año 2008-2010 se utilizaba el método RDT para detectar la presencia de *Plasmodium*, y en el 2010 se examinaron 7800 casos, pero de los cuales ninguno se confirmó (WHO, 2017), generando dudas de su eficacia.

Se ha reportado en países vecinos como Brasil, Perú y Colombia, que aislados genéticos de *P. falciparum* han presentado la delección del gen *HRP-2* que detecta esta pruebas RDT. Pruebas de RDTs basadas en la presencia de este gen son de poca utilidad (PAHO, 2014) y esto puede explicar porque se ha dejado de aplicar este método desde el año 2010 (WHO, 2017) o posiblemente no se han reportado casos por errores de diagnóstico. Ambos métodos de diagnóstico, son inferiores en sensibilidad y especificidad comparada con las técnicas moleculares basadas en la detección de ADN como es la PCR (Hopkins et al., 2013).

Estudios comparando la microscopia con la PCR reportaron que en infecciones ausentes de *P. falciparum*, se pierde un 11% y 22% de casos (Abba et al., 2014) o hasta un 57% cuando solo se analiza para *P. ovale* o *P. malariae* (Cuadros et al., 2007). Por lo tanto, puede existir un valor considerable de falsos positivos y negativos generados por el método de microscopia de luz (Miguel-Oteo et al., 2017). Las mayores diferencias en sensibilidad entre la microscopía y la PCR son la detección de infecciones mixtas y la observación de placas con bajos niveles de parasitemia. La escasez de parásitos ocasiona que el diagnóstico y la posterior identificación de especies por microscopio sean de baja sensibilidad y

especificidad. Por ejemplo, un diagnóstico realizado por un laboratorio de referencia en Ontario, Canadá resultó en un grave error de tratamiento por el caso de una infección mixta, se interpretó la infección como *P. vivax* únicamente, cuando realmente la infección era provocada por *P. vivax* y *P. falciparum* (Kain, Harrington, Tennyson, y Keystone, 1998). Por cuanto, es de suma importancia el desarrollo de técnicas que permitan un diagnóstico seguro, rápido y además, la discriminación de especies de *Plasmodium*. Las técnicas moleculares como la PCR desarrolladas al momento si lo permiten (Hopkins et al., 2013; Imwong et al., 2014; Kassaza et al., 2018).

1.3 Objetivo general

- Estandarizar y aplicar en laboratorio una semi-nested multiplex PCR para detectar e identificar diferentes especies de *Plasmodium* desde frotis de muestras de sangre humana.

1.4 Objetivos específicos

- Optimizar la técnica de la semi-nested multiplex PCR
- Determinar y comparar la sensibilidad y especificidad de la técnica molecular con la microscopía de luz como método de diagnóstico para malaria.

1.5 Justificación de la investigación

Siendo el Ecuador un país localizado en la zona tórrida del planeta con ecosistemas propicios para el desarrollo de los mosquitos transmisores del *Plasmodium*, y además siendo la malaria considerada endémica en las regiones tropicales de la Costa y Amazonia, es de alta importancia el desarrollo y estandarización de métodos diagnósticos sensitivos, específicos y reproducibles, además de discriminativos entre especies del parásito (Sáenz et al., 2017).

Según datos del MSP las infecciones por *Plasmodium* está incrementándose en el país, en el año 2017 llegó a 1279 casos (PAHO, 2018). Además, la distribución de las especies está cambiando, tradicionalmente *P. falciparum* estaba casi ausente en la Amazonia, mientras predominaba *P. vivax*. Pero, los últimos datos (MSP, 2018) indican que infecciones por *P. falciparum* está incrementándose en la región Amazónica, necesitando de técnicas veraces que identifiquen la o las especies en una muestra. Cotidianamente y hasta el momento el Servicio de Erradicación de la Malaria (SNEM) del MSP y en entidades de salud de todos los niveles solo se realiza el diagnóstico por microscopía con las desventajas descritas arriba. Se empleó los RDT pero fueron abandonados por el cambio antigénico de los *Plasmodium* (Sáenz et al., 2015).

En el Ecuador aún no se ha empleado técnicas moleculares en el diagnóstico de malaria. Estas técnicas moleculares presentan ventajas significativas de sensibilidad y especificidad. Al momento, se han desarrollado varias técnicas basadas en la detección del ADN de *Plasmodium*, incluyendo sondas de ADN, la PCR y una combinación de ambas (Stoffels, Leeuwen, y Post, 1995). Estas técnicas de ADN tienen un enorme potencial para aplicaciones epidemiológicas, ya que no sólo tienen la capacidad de detectar los parásitos, sino que también se pueden identificar características específicas del origen de *Plasmodium*. De esta forma se puede examinar la asociación entre los genes de resistencia de *Plasmodium* (*Pfmdr*) y la cloroquina (Rubio et al., 2002).

Los diagnósticos moleculares basados en la PCR exhiben varias ventajas sobre la microscopía y los RDT, ya que tienen mayor sensibilidad y especificidad. Con la PCR se puede detectar hasta 5 parásitos por microlitro (μL) de sangre. También, pueden diferenciar entre las 5 especies infectantes al humano, lo que es ideal para el manejo del paciente y revela la presencia de infecciones mixtas, inadvertidas por los métodos convencionales (Capelli et al., 2017). Asimismo, estas técnicas son empleadas en la detección e identificación del parásito en su vector (Hill y Crampton, 1994).

La multiplex PCR es una variante de la técnica tradicional, en la que se amplifica simultáneamente n secuencias blanco en una PCR que contiene n parejas de cebadores ($n > 1$). Gracias a esta característica, esta variante presenta las ventajas de reducir el consumo de recursos y tiempo, además tiene la capacidad de mejorar la capacidad diagnóstica de la PCR para enfermedades infecciosas (Elnifro, Ashshi, Cooper, y Klapper, 2000; Henegariu, Heerema, Dlouhy, Vance, y Vogt, 1997).

Existen varios estudios que utilizan la PCR en el diagnóstico de malaria, para las diferentes especies de *Plasmodium* que infectan humanos. Un ejemplo de esto, es el desarrollo de una nested-PCR con cuatro reacciones individuales para cada especie humana de *Plasmodium*, las cuales se identifican en la segunda reacción (Snounou, Viriyakosol, Jarra, Thaithong, y Brown, 1993). Así, este método requiere de 5 reacciones PCR para identificar las especies de *Plasmodium*. Por otro lado, el método de la SnM-PCR utiliza una primera reacción para la detección del género *Plasmodium* y una segunda reacción que utiliza una mezcla de cuatro cebadores específicos para cada especie. De esta forma se puede detectar y diferenciar las cuatro especies de *Plasmodium* con tan solo dos reacciones PCR, en muestras de sangre (Rubio et al., 1999).

Por las razones antes expuestas, en el presente trabajo se estandarizó una Semi-nested Multiplex PCR en laboratorio y posteriormente se aplicó la técnica en muestras obtenidas del SNEM-MSP de placas-frotis provenientes de pacientes sospechosos de malaria de la Amazonia.

2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1 Origen de la malaria humana

2.1.1 Taxonomía de *Plasmodium*

Una total comprensión de las enfermedades humanas causadas por patógenos, depende de análisis filogenéticos robustos que permitan determinar los orígenes evolutivos de los organismos parasíticos (Gao et al., 1999; Suzuki y Gojobori, 1997) . Una reconstrucción precisa de caracteres evolutivos, y en el caso de parásitos, un vasto muestreo de taxones, es crítico para reconstruir la historia de las transiciones entre diferentes grupos de huéspedes que provocan el origen de la enfermedad (Krief et al., 2010; Weimin Liu et al., 2011).

Tabla 1.

Clasificación de protozoo humano del genero Plasmodium.

Domain	Eukaryota
Kingdom	Chromalveolata
Superphylum	Alveolata
Phylum	Apicomplexa
Class	Aconoidasida
Order	Haemosporida
Sub-order	Haemosporidiidea
Family	<i>Plasmodiidae</i>
Genus	<i>Plasmodia</i>
Sub-genus	<i>Plasmodium; Laverania</i>
Species	<i>P.falciparum</i> <i>P.malariae</i> <i>P.ovale</i> <i>P.vivax</i> <i>P.knowlesi</i> *

Adaptado de (Antinori, Galimberti, Milazzo, y Corbellino, 2012)

Los parásitos causantes de la enfermedad malaria en el hombre pertenecen al orden Haemosporida (Tabla 1). Son 5 las especies conocidas que infectan a los humanos. Este orden contiene aproximadamente 500 especies descritas, pertenecientes a 15 géneros que infectan mamíferos, aves, quelonios y reptiles escamosos alrededor del mundo y se transmiten por varios dípteros que consumen sangre (Garnham, 1966). El género *Plasmodia* pertenece al filo Apicomplexa, y este género se subdivide en el subgénero *Plasmodium* y *Laverania* dentro del suborden Haemosporidiidea. *Plasmodium* posee 3 genomas: 1) un genoma nuclear compuesto de 14 cromosomas lineares, 2) un genoma linear mitocondrial, 3) un genoma cloroplástico circular de 35kb originario de un alga roja, que se encuentra en el apicoplasto (Antinori et al., 2012).

2.1.2 Orígenes de los parásitos humanos *P. falciparum* y *P. vivax*

De las especies conocidas de *Plasmodium* que infectan humanos, *P. falciparum* y *P. vivax* provocan el mayor número de infecciones y muertes de malaria, y son los blancos específicos para la prevención y erradicación de esta enfermedad (Loy et al., 2017). *P. falciparum* es altamente prevalente en la región africana del sub-Sahara y *P. vivax* es endémico en varias partes de Asia, Oceanía, Centro y Sur América (WHO, 2017). Dado los efectos devastadores de la malaria, los orígenes de los parásitos de *Plasmodium* que infectan humanos han sido un gran interés de estudio durante bastante tiempo.

Descripciones de enfermedades parecidas a la malaria pueden ser encontradas en textos antiguos de China, India, el Medio Oriente, África y Europa; lo que indica que los humanos han combatido las infecciones de *Plasmodium* durante una gran parte de nuestra historia (Carter y Mendis, 2002). De hecho, variantes en el genoma humano asociados a la resistencia a la infección de *Plasmodium* y a la malaria, se estima que tienen miles de años (Hedrick, 2011). Una de estas

variantes es el rasgo de las células falciformes, común en las poblaciones Africanas la cual protege contra la malaria fatal de *P. falciparum* (Taylor, Parobek, y Fairhurst, 2012). Otro ejemplo, es la mutación que elimina la expresión del receptor de antígeno Duffy de las quimiocinas en la superficie de los glóbulos rojos, en África Central y Occidental. Esto genera una protección casi absoluta a la parasitemia de *P. vivax*. (Howes et al., 2011).

Una hipótesis comúnmente aceptada, sugiere que los humanos y los chimpancés heredaron cada uno, una infección similar a la de *P. falciparum* de su ancestro común y estos parásitos co-evolucionaron con su respectivo huésped por millones de años (Escalante y Ayala, 1994). Por otra parte, se cree que *P. vivax* surgió hace miles de años, a partir de un parásito en un macaco por una transmisión entre especies en Asia suroriental (Neafsey et al., 2012). Sin embargo, ambas teorías han sido rechazadas luego de la caracterización de varios parásitos adicionales de *Plasmodium* de primates Africanos. Ahora se conoce que la infección de *P. falciparum* es relativamente nueva para humanos y apareció después de la adquisición de un parásito proveniente de un gorila, probablemente hace 10.000 años (Sundararaman et al., 2013). Igualmente, *P. vivax* no se originó en Asia, sino que representa un linaje de cuello de botella que escapó de África, antes del esparcimiento de la mutación de Duffy que genera una resistencia a su infección (Liu et al., 2016).

2.1.3 Primeros estudios sobre infecciones de *Plasmodium* en simios

El primer indicio de que los simios Africanos portan infecciones de *Plasmodium*, fue el descubrimiento de parásitos con tres formas morfológicamente diferentes, en la sangre de chimpancés silvestres (*Pan troglodytes*) y gorilas occidentales (*Gorilla gorilla*) en Camerún (Loy et al., 2017). Una caracterización microscópica identificó los parásitos de los simios y estos presentaban semejanzas con *P. falciparum*, *P. malariae* y *P. ovale* o *P. vivax* en humanos. Esto sugiere la existencia de diferentes especies de *Plasmodium* las cuales se clasificaron como *P. reichenowi*, *P. rhodaini* y *P. schwetzi* (Brumpt, 1939). Adicionalmente, *P.*

falciparum y *P. reichenowi* difieren significativamente de otras especies de *Plasmodium* en su ciclo de vida y la morfología de sus gametocitos, por lo que se les colocó en otro subgénero denominado *Laverania* (Collins, Coatney, Warren, y Contacos, 2003). Comparando secuencias de genes de la subunidad pequeña del ARNr, se reveló que *P. falciparum* y *P. reichenowi* son los parientes más cercanos para cada uno, y que ambos son los parientes lejanos de *Plasmodium* spp. Asumiendo que las secuencias de genes del ARNr en *Plasmodium* spp. evolucionaron al mismo ritmo que en bacterias, se sugiere que *P. falciparum* y *P. reichenowi* divergieron hace 10 millones de años aproximadamente, cerca del tiempo del ancestro común de hombre-chimpancé. Por lo tanto, los parásitos que infectan humanos y chimpancés co-evolucionaron con sus respectivos huéspedes (Escalante y Ayala, 1994).

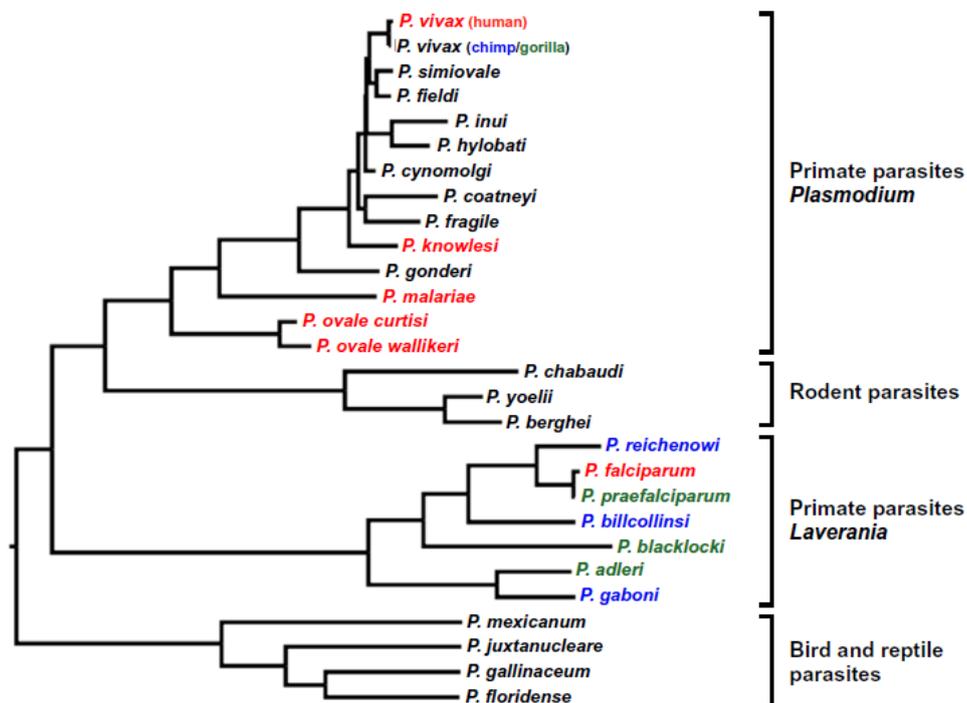


Figura 1. Relaciones evolutivas de *Plasmodium* spp.

Adaptado de (Loy et al., 2017).

Los colores indican las especies de *Plasmodium* que infectan humanos (rojo), gorilas (verde) y chimpancés (azul).

El consenso de varios estudios es que los simios en estado salvaje portan una diversidad de parásitos de *Laverania* mucho mayor a lo reconocido previamente. De todos modos, existe un desacuerdo con el número de *Laverania* spp. en simios y el origen de *P. falciparum* (Loy et al., 2017). Algunos investigadores (Duval et al., 2010; Rich, Licht, Hudson, y Ayala, 1998) implican a los chimpancés y otros a los bonobos (Krief et al., 2010) como la fuente original de parásitos que ahora infectan humanos.

2.1.4 Origen de *P. falciparum* en gorilas occidentales

La caracterización de varias especies de *Laverania* en simios, revela un linaje en gorilas occidentales que se compone de parásitos prácticamente idénticos a *P. falciparum* (Weimin Liu et al., 2011). Análisis de secuencias de ADN mitocondriales y nucleares, indica que *P. falciparum* humano resulta de la transmisión de un parásito entre especies, que anteriormente se diversificó en gorilas. El linaje de este parásito en gorila se denomina *P. praefalciparum* para indicar su rol en el origen de *P. falciparum*. A partir de un árbol filogenético con secuencias mitocondriales de *P. reichenowi* y *P. praefalciparum*, se determinó la frecuencia que *P. praefalciparum* cruza la barrera entre especies de gorilas a humanos. Los resultados mostraron un solo evento de transmisión (Loy et al., 2017). Estos hallazgos son consistentes con resultados de inspecciones epidemiológicas en Camerún y Gabón, que demuestran que humanos viviendo en la cercanía de chimpancés y gorilas silvestres, no albergan parásitos de simios (*Laverania* spp.) (Délicat-Loembet et al., 2015; Sundararaman et al., 2013). Sin embargo, los parásitos de *P. praefalciparum* parecen incapaces de infectar humanos, lo que sugiere que la cepa parasitaria de gorila que logró cruzar la barrera de especies debe haber poseído mutaciones bastante inusuales, confiriendo la habilidad para colonizar humanos (Loy et al., 2017).

2.1.5 Aparición de *P. falciparum* en humanos

Se ha sospechado por bastante tiempo que *P. falciparum* exhibe bajos niveles de diversidad genética (Rich et al., 1998). Recientes comparaciones genómicas de los parásitos de chimpancé *P. gaboni* y *P. reichenowi*, muestran que su diversidad genética es aproximadamente 10 veces superior a la de *P. falciparum* (Sundararaman et al., 2016). De todos modos, la diversidad genética extremadamente baja de las cepas existentes de *P. falciparum* no es una característica general de los parásitos de *Laverania*. Recientes selecciones de mutaciones con resistencia a drogas, han disminuido los niveles de polimorfismo en *P. falciparum*. Aun así, dado que las cepas resistentes y sensibles continúan recombinándose dentro de los mosquitos, la diversidad solo se ha reducido en la proximidad del *loci* seleccionado (Nair et al., 2003; Volkman et al., 2007). En cambio, la gran reducción de diversidad genética en todo el genoma de *P. falciparum*, probablemente resultó de un efecto de deriva génica, el cual se explica con mayor facilidad por el evento de transmisión entre especies de gorila a humano (Loy et al., 2017).

Dado la baja probabilidad de mantener infecciones endémicas de *P. falciparum* en poblaciones humanas cazadoras-recolectoras (Livingstone, 1958), en conjunto, con estimaciones de la edad de las mutaciones con resistencia de *P. falciparum* en África (Hedrick, 2011), la aparición de su ancestro común parece ser mucho más reciente (Carter y Mendis, 2002). Comparando 12 cepas de diferentes países de África y Asia, la diversidad promedio de *P. falciparum* en 4 sitios degenerados, se estima de 8×10^{-4} mutaciones por sitio (Sundararaman et al., 2016). Las tasas de mutación publicadas de *P. falciparum*, se encuentran en un rango de $1 - 10 \times 10^{-9}$ mutaciones por sitio, por ciclo de replicación (Bopp et al., 2013; Lynch, 2010). Por conocimiento del ciclo de vida de *P. falciparum*, se deduce que los parásitos realizan 200 ciclos de replicación por año. Por lo tanto, el nivel observado de diversidad genética de *P. falciparum* puede haberse acumulado drásticamente en los últimos 10.000 años (Loy et al., 2017).

2.1.6 Origen africano de *P. vivax* humano

El *P. cynomolgi* que infecta macacos en Asia, es el pariente conocido más cercano de *P. vivax* (Tachibana et al., 2012). En arboles filogenéticos, *P. cynomolgi* y *P. vivax* se encuentran en un clado que tiene por lo menos otras 8 especies de *Plasmodium*, infectando primates del sureste asiático (Loy et al., 2017). El consenso general es que *P. vivax* apareció del sudeste asiático, a partir de una transmisión entre especies de un parásito de macaco (Escalante et al., 2005). Sin embargo, esta hipótesis es cuestionable por dos observaciones (Loy et al., 2017). Primero, la alta prevalencia del fenotipo Duffy-negativo en desiertos del Sub-Sahara, revela que esta mutación surgió como respuesta a una prolongada presión selectiva de *P. vivax* y no por otro patógeno sin identificar (Carter, 2003). Segundo, los humanos modernos no llegaron a Asia hasta hace 60.000 años aproximadamente y *P. vivax* seguramente divergió de parásitos de macacos mucho antes que esto (Escalante et al., 2005; Neafsey et al., 2012).

Las relaciones filogenéticas a partir de secuencias genéticas nucleares y de orgánulos, indican que todas las cepas existentes de *P. vivax* humano forman un clado filogenético (Loy et al., 2017). Es bastante probable que *P. vivax* humano representa un linaje que sobrevivió luego de propagarse fuera de África. Este escenario explicaría la baja diversidad de los parásitos humanos, provocada por un efecto de cuello de botella por la salida de África, como se ve en *P. falciparum* (Conway et al., 2000) y en humanos (Ramachandran et al., 2005).

Aunque se pueda argumentar que el *P. vivax* primate fue introducido en África por humanos que migraron de Asia (Prugnolle et al., 2010), esta teoría se refuta por secuencias genéticas que muestran la existencia de un *Plasmodium* sp. emparentado, pero distante, que también infecta primates Africanos (Loy et al., 2017). Este *Plasmodium* sp. se ha encontrado en chimpancés en dos sitios diferentes de Camerún y representa el pariente conocido más cercano de *P. vivax*. La interpretación más certera de este hallazgo, es que el ancestro común

de estas dos especies estaba en África, indicando que el linaje existía ahí mucho tiempo antes de que *P. vivax* surgiera como otra especie (Loy et al., 2017).

2.2 Biología y enfermedad de malaria

2.2.1 Introducción

Históricamente, es probable que *P. falciparum* ha ejercido una gran presión selectiva en la evolución humana más que cualquier otro patógeno. *P. falciparum* se lo considera normalmente el más importante en términos de muertes en África (Cowman et al., 2016), mientras que *P. vivax* es el principal causante de la enfermedad en varias partes del mundo y el número de muertes por este parásito se han subestimado (Naing et al., 2014). *P. ovale* y *P. malariae* no provocan una enfermedad significativa como las otras especies y están restringidas a ciertas regiones del África. Recientemente, el parásito de simio *P. knowlesi*, apareció como un quinto *Plasmodium* causante de la enfermedad al hombre (incluyendo la malaria complicada) en Malasia y otras partes del sudeste asiático, donde existe predominantemente como zoonosis, sin evidencia definitiva de una transmisión de humano a humano (Ahmed y Cox-Singh, 2015).

2.2.2 Biología del *Plasmodium* spp. y ciclo de vida

Plasmodium spp. son patógenos protozoarios globales con un complejo ciclo de vida alternando entre huéspedes hembras de mosquito *Anopheles* y vertebrados, que requieren la generación de formas únicas de zoitos para infectar diferentes tipos de células en diferentes etapas (Miller et al., 2013). Cuando los esporozoítos ingresan al huésped, infectan a los hepatocitos, seguido por el ciclo asexual en la sangre. Las formas sexuales que se desarrollan en la etapa sanguínea, son ingeridas por un mosquito alimentándose, completando así el ciclo (Fig.2) (Cowman et al., 2016).

traversal (atravesar). Esto involucra cruzar la barrera sinusoidal compuesta por células endoteliales fenestradas y células Kupffer (Fig.2A) (Tavares et al., 2013). Las proteínas necesarias para el *traversal* son SPECT (*sporozoite microneme protein essential for traversal*) (Ishino, Yano, Chinzei, y Yuda, 2004), SPECT2 (también conocida como *perforin-like protein 1*, PLP1) (Risco-Castillo et al., 2015), CeITOS (*cell traversal protein for ookinetes and sporozoites*), fosfolipasa (PL) (Bhanot, Schauer, Coppens, y Nussenzweig, 2005) y GEST (*gamete egress and sporozoite traversal protein*) (Cowman et al., 2016). Se desconoce el funcionamiento de estas proteínas para atravesar la célula, aunque se sugiere que SPECT2 provoca perforaciones en la membrana. Los esporozoítos atraviesan las células por el ingreso a una vacuola temporal, el egreso desde esta estructura depende de SPECT2 y la detección de pH. De esta forma escapan de la degradación por los lisosomas de la célula huésped (Risco-Castillo et al., 2015).

Se ha sugerido que el proceso de atravesar la célula por la barrera sinusoidal es importante para la infectividad, al preparar al esporozoíto para la invasión a los hepatocitos, las células en las que se desarrollan los esporozoítos. De todos modos, el rol principal de los esporozoítos es cruzar la barrera sinusoidal (Tavares et al., 2013). Los esporozoítos inyectados en la dermis están en modo migratorio, el momento en que interactúan con los hepatocitos cambian a modo invasivo (Cowman et al., 2016). Una señal para este cambio, es el reconocimiento de los hepatocitos por la unión de HSPGs (*higher sulfated forms of heparin sulfate proteoglycans*) activando CDPK6 (*calcium-dependent protein kinase 6*) (Coppi et al., 2007). Las proteínas de superficie de hepatocitos CD81 (*tetraspanin*) y SR-B1 (*scavenger receptor B1*) se requieren para la invasión y formación de una vacuola parasitófora por los esporozoítos de *P. falciparum* (Rodrigues et al., 2008). Por otra parte, el receptor de hepatocito EphA2 no se necesita para la invasión del hepatocito sino para modificar esta célula, por el establecimiento de la vacuola parasitófora por interacción con las proteínas parasíticas p52 y p36 (Kaushansky et al., 2015).

Una densa capa cubre al esporozoíto y una proteína esencial es CSP (*circumsporozoite protein*), consiste de una región altamente repetitiva y TSR (*thrombospondin repeat*) tipo 1. La invasión a los hepatocitos requiere la unión de CSP a HSPGs, activando CSP y removiendo el terminal-N, desenmascarando el dominio TSR (Herrera et al., 2015).

Una vez establecida la infección al hepatocito, el esporozoíto se transforma en los siguientes 2-10 días a una etapa LS (*liver stage*) o EEF (*exo-erythrocytic form*). El desarrollo culmina en la liberación de 40.000 merozoítos por hepatocito al flujo sanguíneo, por la expulsión de vesículas llenas de parásitos llamadas merosomas (Sturm et al., 2006).

2.2.4 Invasión al eritrocito

Una vez liberados en la circulación hepática, los merozoítos invaden los eritrocitos en un proceso rápido, dinámico y de varias etapas incluyendo pre-invasión, invasión activa y equinocitosis (Fig.2B) (Weiss et al., 2015). La pre-invasión es la interacción inicial con los eritrocitos y se tiene poca información sobre los detalles moleculares de esta etapa (Cowman et al., 2016). MSP1 (*merozoite surface protein 1*) es la proteína principal de superficie del merozoíto (Holder, 1994), actúa como plataforma en su superficie para por lo menos 3 grandes complejos con diferentes proteínas extrínsecas que se unen a los eritrocitos (Lin et al., 2016). Los merozoítos que carecen de MSP1 pueden invadir los eritrocitos, lo que sugiere que no es indispensable para la invasión (Das et al., 2015). Es probable que MSP1 se involucre en el despliegue de proteínas implicadas en evadir respuestas del huésped y no directamente en la invasión (Cowman et al., 2016).

En la pre-invasión se produce una interacción fuerte entre el eritrocito y el merozoíto, produciendo una deformación de la célula huésped por un motor parasitario alimentado por actomiosina (Weiss et al., 2015). Después de la deformación del eritrocito, el merozoíto parece reorientarse para que su polo apical se apoye sobre la membrana del eritrocito. Se produce una unión irreversible del merozoíto al eritrocito por la formación de un fuerte enlace, mediado por proteínas parasitarias (Besteiro, Dubremetz, y Lebrun, 2011). Contenidos ricos en lípidos del *rho*try (orgánulo secretor) forman la membrana de la vacuola parasitófora mientras el merozoíto se propulsa hacia el eritrocito gracias al motor de actomiosina (Riglar et al., 2011) y así finaliza la invasión activa. Luego se produce una fusión de membranas en el límite posterior del merozoíto para sellar al parásito dentro de la vacuola parasitófora, en el eritrocito. Inmediatamente después se produce la equinocitosis y esto causa que el eritrocito se contraiga y se forman protuberancias espinosas (Weiss et al., 2015).

Una vez establecida la infección al eritrocito, en las siguientes 48 horas se produce la división celular (esquizogonía) que genera 16-32 merozoítos, que salen una vez finalizado su desarrollo. Esto resulta en la destrucción de la membrana del eritrocito y una explosiva liberación de los parásitos que buscaran nuevas células para su invasión (Cowman et al., 2016).

2.2.5 Transmisión

Durante las rondas de esquizogonía en el torrente sanguíneo, una proporción de parásitos experimentan un cambio en su desarrollo que los dirige a formar gametocitos masculinos y femeninos. La transmisión de malaria de humanos a mosquitos, depende del desarrollo de las etapas sexuales (Fig.2C). Esto se ha identificado como un potencial punto de intervención, ya sea por drogas que bloqueen la transmisión o por vacunas. A pesar de que los eventos moleculares para este interruptor biológico permanecen desconocidos, la sincronización para esta transición ocurre en algún momento del ciclo de esquizogonía anterior. Las células hijas (merozoítos) de una célula infectada (esquizonte) están dirigidas a

ser gametocitos o esquizontes asexuales (Cowman et al., 2016). El estímulo ambiental como una alta parasitemia o exposición a drogas como la cloroquina, están asociadas con un aumento en la conversión para generar gametocitos, lo que indica que el parásito puede percibir su ambiente. Vesículas extracelulares conteniendo proteínas, ADN y ARN transitan entre los parásitos *in-vitro* lo que permite una comunicación entre células que incrementa la producción de gametocitos (Mantel et al., 2013). La regulación epigenética es crucial para el control de la diferenciación sexual, y el factor de transcripción AP2-G es un regulador esencial de gametocito-génesis (Kafsack et al., 2014). La maduración de los gametocitos en *P. falciparum* es un proceso extenso en comparación con otras especies. Una vez iniciado el cambio hacia un desarrollo sexual, los gametocitos infecciosos para mosquitos tardan 11 días en madurar. Durante este tiempo permanecen ocultos en la medula ósea (Joice et al., 2014) hasta que emergen en la circulación periférica por un tiempo indefinido hasta que son absorbidos por un mosquito en alimentación. (Cowman et al., 2016).

2.2.6 Remodelación de la célula huésped y evasión de la respuesta inmune

Siguiendo la invasión, el parásito activa un proceso de renovación, convirtiendo una célula terminalmente diferenciada (eritrocito), carente de la mayoría de orgánulos, en una en que el parásito intracelular pueda crecer y ocultarse de las respuestas inmunes del huésped (Boddey y Cowman, 2013). Esto lo consigue por la exportación de cientos de proteínas afuera del parásito y de la membrana de la vacuola parasitófora, hacia múltiples sitios dentro del eritrocito infectado. Para la clasificación y transferencia de proteínas exportadas a lugares específicos sub-celulares, se necesita la construcción de una red de transporte en células huéspedes infectadas (Boddey y Cowman, 2013).

La familia PfEMP1 (*P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1) son de las proteínas más extensamente caracterizadas, dentro de la categoría de proteínas exportadas a la superficie del eritrocito infectado por *P. falciparum*. Su despliegue en la superficie del eritrocito resulta en la exposición a los anticuerpos del

huésped, lo que permite al parásito alternar la expresión de isoformas antigénicas diferentes, un proceso para evadir la destrucción inmune. La habilidad de *P. falciparum* para mantener una infección crónica se debe en gran medida, a la diversificación extrema y a la estricta regulación, de la expresión de proteínas PfEMP1 (Cowman et al., 2016). Las diferentes proteínas PfEMP1 tienen distinta selectividad para los receptores de unión, y el secuestro de eritrocitos infectados por *P. falciparum* en la vasculatura de diferentes órganos, incluyendo el cerebro y la placenta, contribuye a la severidad de la enfermedad y el resultado final (Nunes-Silva et al., 2015).

2.2.7 Vector del *Plasmodium* spp.

La malaria humana se transmite por el mosquito del género *Anopheles* siendo *Anopheles gambiae* el vector principal de *P. falciparum* en África, y es uno de los vectores de malaria más eficientes del mundo (Holt et al., 2002). Este género consiste de 465 especies formalmente reconocidas y más de 50 miembros sin nombrar (Harbach, 2013). Alrededor de 70 especies tienen la capacidad de transmitir *Plasmodium* spp. (Okorie, McKenzie, Ademowo, Bockarie, y Kelly-Hope, 2011), de estos 41 especies se consideran complejos DVS (*dominant vector species/species*) capaces de transmitir el parásito a un nivel de alto riesgo para la salud pública (Hay et al., 2010). Sus ingestas de sangre son casi exclusivamente de humanos, sus larvas se desarrollan en cuerpos de agua temporales, producto de actividades humanas (irrigación de sembríos o huellas de animales domésticos) y los adultos descansan principalmente en viviendas humanas (Holt et al., 2002).

Para que *Plasmodium* pueda infectar a su siguiente huésped, los parásitos deben atravesar un complejo ciclo de desarrollo en el mosquito. Dentro del intestino medio del insecto, los gametocitos de *Plasmodium* se activan rápidamente para formar gametos. La fertilización conduce a la formación de cigotos, los cuales en 16-20 horas, se transforman en oocinetos móviles. Aproximadamente después de 24 horas de una comida sanguínea infecciosa,

los oocinetos invaden y cruzan el epitelio del intestino medio, alcanzando el lado basal del intestino medio, donde forman capsulas protectoras llamados ooquistes. En los siguientes 10 días, dentro del ooquiste, un ciclo meiótico y múltiples rondas de mitosis generan miles de esporozoítos haploides. Después de la maduración (14-16 días pasada la comida sanguínea infecciosa), los esporozoítos se liberan en el hemocoel del mosquito y migran hacia las glándulas salivales. El ciclo del parásito en el mosquito se completa, cuando el vector inyecta los esporozoítos infecciosos en un nuevo huésped vertebrado, durante una subsecuente ingesta sanguínea (Blandin et al., 2004) (Fig. 2C).

2.2.8 Características clínicas de la enfermedad y patogénesis

La infección de malaria en un individuo casi siempre produce una enfermedad febril. Los síntomas que acompañan son inespecíficos y normalmente incluyen fiebre, escalofrío, sudoración, cefalea, náusea y dolores musculares. Si solo se administra fármacos anti-febriles durante esta etapa, los síntomas reaparecen en días dependiendo de la especie de *Plasmodium*. En el caso de *P. falciparum*, el tratamiento supresivo elimina la infección, el retorno de cualquier síntoma refleja un tratamiento incompleto, resistencia a las drogas utilizadas o una nueva infección. En el caso de *P. vivax* y *P. ovale*, los fármacos deben ser esquizonticidas tisulares que eliminen los hipnozoitos o formas latentes del hígado, de lo contrario los síntomas pueden reaparecer en intervalos, por la reactivación del estado latente de hipnozoito en el hígado (Collins y Jeffery, 1999; Cowman et al., 2016). En el caso de infecciones por *P. falciparum*, si no es diagnosticada y tratada pronto, con los fármacos correctos y además dependiendo de la respuesta inmune del paciente, puede evolucionar a malaria complicada que puede ser fatal. En cambio infecciones por *P. vivax* si no es tratada adecuadamente con las drogas específicas puede reactivar y producir nuevos síntomas y llevar a la cronicidad con anemias severas (Cowman et al., 2016).

2.2.9 Malaria complicada por *P. falciparum*

En pacientes con tratamiento incompleto o sin tratamiento, la infección inicial no se controla y avanza a la malaria complicada o severa, la cual puede causar la muerte. El perfil de malaria complicada varía con la edad y el nivel de transmisión, lo que indica el estado de inmunidad de las poblaciones (Cowman et al., 2016). En África, la mayoría de muertes por malaria ocurre en niños y se provoca principalmente por 3 síndromes que pueden ocurrir por separado o en conjunto: anemia severa, malaria cerebral y dificultad respiratoria (Marsh et al., 1995). La malaria cerebral se define funcionalmente como el estado de coma causado por *P. falciparum* (Taylor y Molyneux, 2015). La dificultad respiratoria en niños inducida por la malaria complicada, se presenta con una acidosis metabólica que refleja claramente la hipoxia de tejidos. Aunque la malaria aguda se relaciona con la destrucción de glóbulos rojos infectados y no infectados, la anemia por malaria complicada en niños, refleja la finalización de una anemia crónica (Cowman et al., 2016).

En áreas endémicas estables de África, la malaria complicada en niños de mayor edad y adultos es bastante rara, gracias a la inmunidad natural adquirida. En Asia, a pesar de que la malaria cerebral, hipoglicemia, y anemia forman parte del mismo perfil de la enfermedad, la malaria complicada es más frecuentemente un desorden multi- sistemático, normalmente con una marcada disfunción renal y hepática. La dificultad respiratoria se debe normalmente por un edema pulmonar, que ocurre en raras ocasiones en niños pero tiene una alta mortalidad en adultos (Cowman et al., 2016).

2.2.10 Antimaláricos, resistencia y nuevos objetivos para el desarrollo de drogas

Los fármacos antimaláricos han sido el punto principal de control contra la malaria desde el primer uso de quinina, del árbol de *Cinchona*. Se han desarrollado múltiples drogas contra la malaria en el siglo 20, siendo las más importantes la cloroquina y la artemisinina. Sin embargo, la habilidad particular

de *P. falciparum* en generar resistencia contra estos tratamientos, ha disminuido su eficacia y ha demostrado la importancia de usar combinaciones, de producir nuevos fármacos y plantear nuevos objetivos.

En respuesta a la propagación de resistencia del parásito, por la cloroquina y otros antimaláricos como pirimetamina y sulfadoxina, se ha recomendado el uso de ACTs (*artemisinin-based therapies*) para el tratamiento de la malaria no complicada. Su uso ha tenido un impacto crucial en la disminución de malaria globalmente (Cowman et al., 2016). De todos modos, ha habido reportes en Camboya de una reducción de sensibilidad de *P. falciparum* a derivados de artemisinina, donde los pacientes tenían significativamente más tiempo de despeje después de la monoterapia (Dondorp et al., 2009). Esto se ha convertido en un riesgo potencial a la eficacia continua de los ACTs, por lo que se han generado diferentes programas para intentar eliminar la resistencia a la artemisinina (Cowman et al., 2016).

2.2.11 Mecanismo de acción de la artemisinina y resistencia

Aunque no se sabe cómo la artemisinina mata al parásito de malaria, una apertura del anillo endoperóxido en su estructura, mediado por un grupo hemo (causado por la degradación de la hemoglobina), es esencial para su actividad. Esto provoca un aumento del estrés oxidativo causando la muerte del parásito (Cowman et al., 2016).

El secuenciamiento genómico de parásitos a partir de pacientes tratados con ACT, los cuales presentaban una reducción en las tasas de eliminación parasitaria, identificó mutaciones en un gen que codifica la proteína propulsora K13. Esto sugiere que esta proteína es un factor importante en la resistencia a la artemisinina (Ariey et al., 2014). La inserción de estas mutaciones en el locus de K13 confiere un aumento de resistencia en líneas de parásito específicas, no solo demostrando que este gen está involucrado en el fenotipo con resistencia,

pero también sugiere que este fenotipo es complejo y hay otros genes involucrados (Straimer et al., 2015). Pfk13 es un excelente marcador para la resistencia a artemisinina en *P. falciparum*, aun así, se han identificado varios polimorfismos en este gen y no está claro cuál de estos tiene una función directa en la resistencia (Mbengue et al., 2015).

Un análisis transcripcional de parásitos de pacientes con malaria aguda, muestra que la resistencia a la artemisinina está asociada a un aumento de proteínas desplegadas y a una fase de desarrollo tardío al inicio de la etapa de sangre en su ciclo de vida, lo que mitiga el daño causado por la artemisinina (Mok et al., 2015). Esto es consistente con otros estudios, ya que la artemisinina induce una respuesta al estrés celular lo que resulta en un incremento de proteínas ubiquitinadas y un aumento en la actividad del proteasoma. Los parásitos resistentes tienen una mejor respuesta al estrés celular, lo que resulta en niveles más bajos de proteínas ubiquitinadas y un retraso al inicio de la muerte celular (Mbengue et al., 2015).

2.3 Malaria en el Ecuador

2.3.1 Áreas de riesgo y distribución de especies

El Ecuador es un país megadiverso con múltiples ecosistemas que poseen áreas subtropicales y tropicales tanto en la Costa del pacífico y la Amazonia. Sesenta y cuatro (64%) por ciento de su territorio continental es tropical y subtropical, generando nichos ecológicos adecuados para la reproducción de múltiples insectos vectores como son los mosquitos. Casos humanos de malaria se han reportado en las 2 regiones tropicales. Las 4 provincias incluyendo Esmeraldas, Orellana, Pastaza y Morona Santiago presentan el mayor número de casos confirmados de malaria hasta el año 2018 (MSP, 2018).

En relación a las especies diagnosticadas, de los 1279 casos confirmados de malaria en el año 2017, 72% corresponden a infección por *P. vivax* y 28% a *P. falciparum* (PAHO, 2018). De acuerdo al MSP, (2018) y a la World Health Organization, (2017) la especie predominante es *P. vivax*, excepto en la provincia de Esmeraldas que es *P. falciparum*. Los vectores principales de malaria en el área amazónica son *Anopheles albimanus* y *A. neivai*, en la región de la costa son *A. albimanus*, *A. pseudopunctipennis* y *A. puntimacula* (PAHO, 2014).

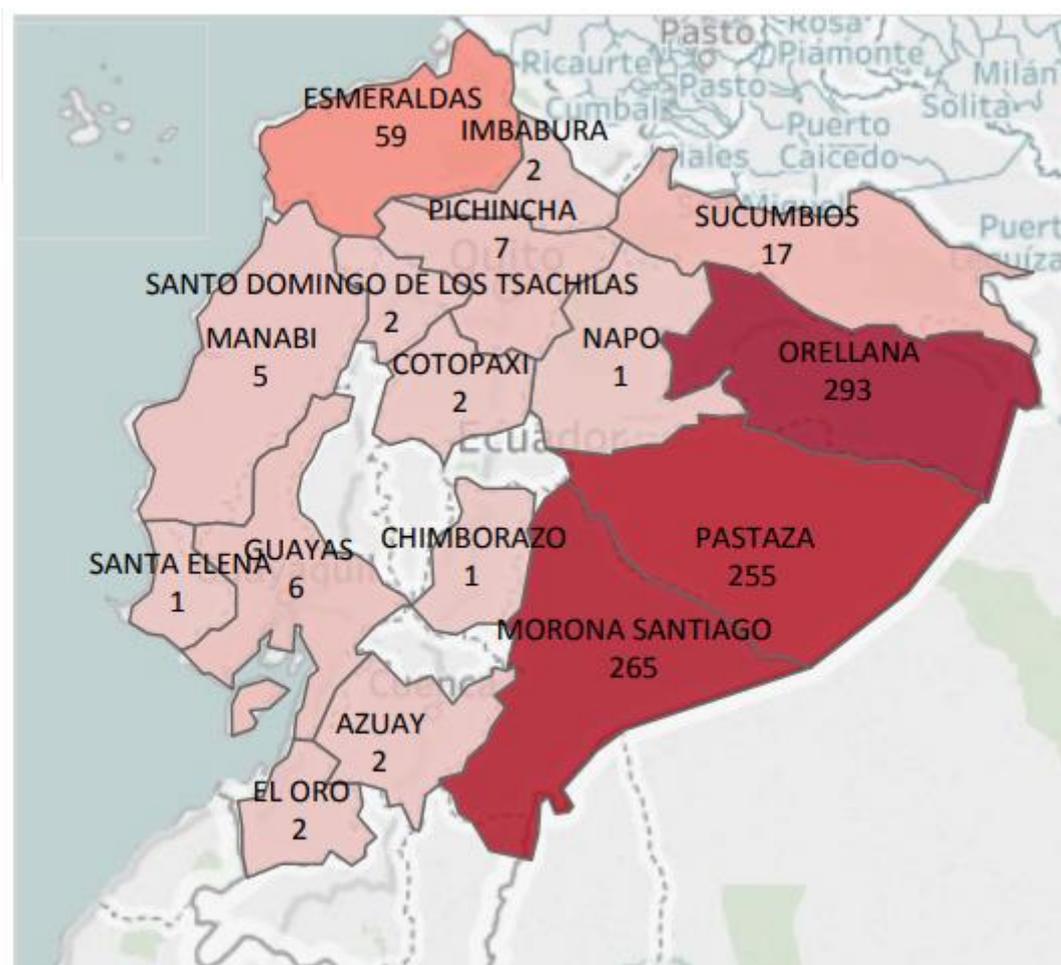


Figura 3. Casos confirmados de Malaria por provincia en Ecuador, semana epidemiológica 31, 2018.

Tomado de (MSP, 2018).

2.3.2 Epidemiología

Desde el año 2001 hasta el 2012, la malaria en el Ecuador ha disminuido en un 99%. En el 2001 se confirmaron 37.269 casos, mientras que en el 2012 se presentaron 80 casos y con cero mortalidad en los años 2009-2013 (MSP, 2013). De hecho, el Ecuador se encuentra entre los países con posibilidad de eliminar la malaria para el año 2020 (WHO, 2016).

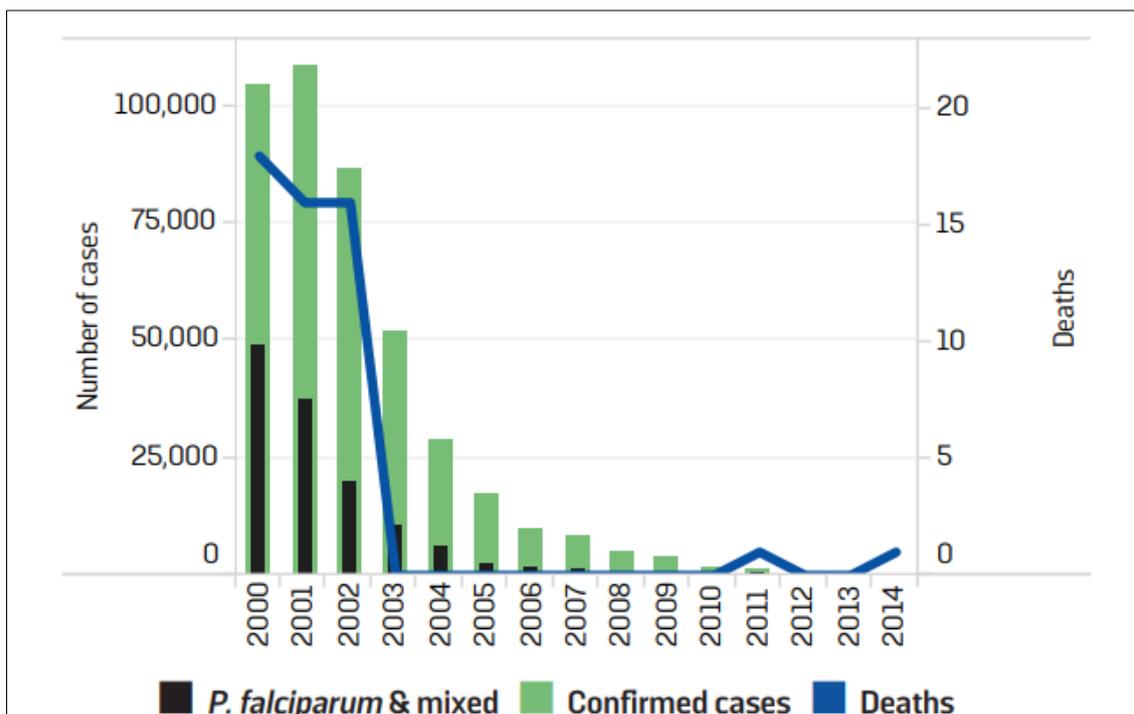


Figura 4. Número de casos y muertes por malaria en Ecuador, 2000-2014.

Adaptado de (PAHO, 2014).

Sin embargo, se ha producido un aumento de casos desde el año 2015 (600 casos) hasta la actualidad. En el año 2014 se reportaron 240 casos (WHO, 2017) y en el año 2017 se confirmó 1279 casos. Hasta el mes de agosto del año 2018 se han reportado 920 casos (MSP, 2018). Este aumento de casos en el Ecuador, está relacionado con un incremento de la actividad migratoria en áreas fronterizas con los países limitantes como son Perú: (55.084 casos) y Colombia

(82.366 casos) (MSP, 2016). Un aumento en los niveles de precipitación, también influye en el incremento de número de casos, dado que su vector se desarrolla en cuerpos de agua temporales (Robles, Riofrío, Guerrero, y Cely, 2018). Adicionalmente, debido a condiciones de pobreza y vulnerabilidad, de comunidades que habita en zonas donde existe el vector y hay transmisión de la enfermedad, contribuye a un mayor número de pacientes infectados. Actividades laborales como minería, agricultura y extracción de productos naturales, amplifican el riesgo de exposición a los vectores, al igual que la invasión de territorios rurales. Estos factores contribuyen a la reincidencia de la enfermedad (PAHO, 2018).

2.3.3 Control y eliminación de la malaria en el Ecuador

A pesar de un bajo nivel de transmisión, Ecuador tiene varios retos por delante para alcanzar la meta de la eliminación de malaria. Los retos más grandes son realizar una estimación exacta de la prevalencia de la malaria, especialmente debido al número de casos asintomáticos, con el potencial de portar bajos niveles de parasitemia no detectables por la microscopía y regularizar las actividades de control de malaria (Sáenz et al., 2017). Como en varias regiones, la examinación microscópica de frotis gruesos es el *gold standard* para el diagnóstico de malaria, gracias a su buen desempeño para confirmar infecciones sintomáticas. De todos modos, muchas infecciones han demostrado ser sub-microscópicas y asintomáticas (Vallejo et al., 2015), provocando una subestimación del número de individuos infectados en comunidades endémicas. Los casos de infección en las comunidades, permanecen como reservorios de parásitos para la infección de mosquitos y requieren una búsqueda activa al igual que métodos de diagnóstico más sensibles (Sáenz et al., 2017).

La PCR detecta el ADN parasitario, superando el límite de detección de la microscopía y RDTs y se la considera generalmente como el *gold standard* para detectar la infección de malaria (Hopkins et al., 2013). Más aun, las herramientas moleculares proveen información valiosa sobre el potencial origen de los

parásitos de malaria en estudios de brotes de epidemias (Obaldia et al., 2015). Otras técnicas como la PCR en tiempo real (qPCR) son más sensibles (Hopkins et al., 2013) y más apropiadas cuando el nivel de transmisión se aproxima al cero. Por lo tanto, para lograr una eliminación exitosa, la detección de todos los portadores de parásitos y el tratamiento de todas las infecciones se deben considerar para interrumpir la transmisión de malaria en áreas endémicas (Vallejo et al., 2015). La identificación y manejo de portadores submicroscópicos, se ha convertido en un objetivo nuevo y de bastante importancia para los programas de control de malaria (Lindblade et al., 2013).

2.4 Técnicas para diagnóstico e identificación de especies de *Plasmodium*

2.4.1 Microscopía

El diagnóstico microscópico con frotis de sangre tiene un papel importante en el diagnóstico de malaria, gracias a su habilidad para diagnosticar y diferenciar cada especie de malaria, así que se lo utiliza como el *gold standard* para cualquier técnica o herramienta nueva de detección (Wongsrichanalai, Barcus, Muth, Sutamihardja, y Wernsdorfer, 2007a).

Sin embargo, este método tiene desventajas, como requerir de un microscopio visual o de luz con un aumento de x1000 y la experticia de un microscopista bien entrenado. El diagnóstico por microscopía se basa en la identificación morfológica, dado que especies de *Plasmodium* con formas y características estrechamente similares como *P. knowlesi* y *P. malariae*, tienden a provocar un diagnóstico erróneo incluso por un experto (Kasetsirikul, Buranapong, Srituravanich, Kaewthamasorn, y Pimpin, 2016).

Recientemente, algunos investigadores introdujeron una técnica de procesamiento de imágenes para microscopía, con el propósito de evitar el error humano. De todos modos, la baja densidad parasitaria que es la causa principal de error no se resolvió (D. K. Das, Maiti, y Chakraborty, 2015). Esto se debe a que el límite de detección promedio de parásitos en glóbulos rojos infectados, es 10 parásitos por microlitro en condiciones óptimas (McNamara et al., 2006) y de 50-100 parásitos por microlitro en condiciones de campo (Payne, 1988), e incluso menos sensible bajo condiciones limitadas (Kasetsirikul et al., 2016). Las fluctuaciones de la densidad parasitaria contribuyen al límite de detección del diagnóstico microscópico y cualquier otra detección directa (Hawkins, Burton, y Labarre, 2014).

En consecuencia, la detección directa en cualquier instante, seguramente resulta en una subestimación de las tasas de infección parasitarias, especialmente en casos con una baja parasitemia y malaria asintomática durante las etapas de infección iniciales y crónicas (Okell et al., 2012). La microscopía no solo es laboriosa e inadecuada para su uso masivo, además que en zonas rurales apartadas, como clínicas periféricas sin electricidad y recursos de salud, la microscopía y los microscopistas normalmente no están disponibles (Kasetsirikul et al., 2016). Afortunadamente, existen hoy en día opciones baratas como la invención de un microscopio en base a papel origami el cual puede resolver la falta de microscopios y facilitar el control de malaria en países pobres (Cybulski, Clements, y Prakash, 2014).

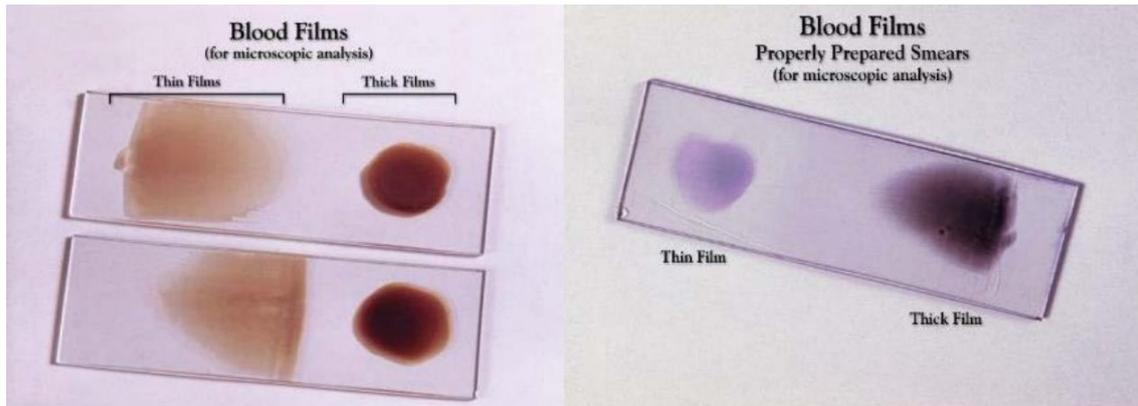


Figura 5. Frotis de sangre gruesos y finos en placas de vidrio.

Adaptado de (Kloub, 2015).

La correcta realización de los frotis y la tinción son factores que influyen en la sensibilidad y diferenciación de especies de Plasmodium.

2.4.2 Test de diagnóstico rápido (RDT)

Otra técnica, el RDT, detecta diferentes antígenos de malaria como lactato deshidrogenasa (LDH), *histidine-rich protein-2* (HRP-2) en una pequeña cantidad de sangre (5-15 microlitros) por un principio similar a las pruebas de embarazo. La detección se desarrolla por un ensayo de inmunocromatografía con anticuerpos monoclonales dirigidos contra los antígenos del parásito que se impregnan en un papel de prueba (Kasetsirikul et al., 2016).

Este método de diagnóstico se ha implementado en condiciones de campo, y ha incrementado la proporción de pacientes infectados con malaria en comparación con la microscopía, lo que resulta en una mayor exactitud y tratamientos clínicos puntuales, al igual que una reducción de costos (Boyce et al., 2015). Algunos RDTs pueden detectar una sola especie (*P. falciparum* o *P. vivax*) mientras que otros detectan varias especies (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*). Sin embargo, no existe un RDT específico para *P. knowlesi*. A pesar de que esta técnica es rápida y fácil de usar, es relativamente cara y hay una tendencia a resultados de falsos positivos. Esto ocurre debido a la

persistencia de los antígenos de malaria en la sangre, hasta 2 semanas después de que el parásito se ha despejado de la circulación del paciente (Kasetsirikul et al., 2016). Adicionalmente, los límites de detección de los RDTs dependen de la cantidad de antígenos, equivalente a 200 glóbulos rojos infectados por microlitro o 2.000-5.000 parásitos por microlitro de sangre (WHO, 2015).



Figura 6. Prueba de test de diagnóstico rápido (RDT).

Adaptado de (CDC, 2018).

2.4.3 Diagnóstico molecular

2.4.3.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica de diagnóstico que produce la mejor eficiencia se basa en la PCR, aumentando la sensibilidad y especificidad en la identificación y diferenciación de las especies de *Plasmodium* (Kasetsirikul et al., 2016). Estas han mejorado el límite de detección (LOD) para la infección de malaria, detectando hasta 0,02 parásitos por microlitro (Imwong et al., 2014). Los métodos de PCR se pueden

subdividir en *nested* PCR, *semi-nested* PCR, *multiplex* PCR y PCR en tiempo real o cuantitativa (Ongagna-Yhombi et al., 2013). Entre estas, la más simple y menos demandante técnicamente, es el ensayo LAMP (*loop-mediated isothermal amplification*) (Cook et al., 2015). En general, la PCR puede detectar parásitos con una baja densidad, típicamente por debajo de los 5 parásitos por microlitro para las 5 especies de *Plasmodium* humanas (Moody, 2002). Aunque el diagnóstico basado en la PCR presenta una alta sensibilidad y buena especificidad, depende de las secuencias de nucleótidos complementarias entre el primer (secuencia conocida) y su contraparte de ADN (secuencia desconocida).

Por lo tanto, parásitos con secuencias genéticamente diversas en la región blanco del primer, tienden a provocar errores de detección o disminuir la eficiencia de amplificación lo que reducirá la sensibilidad de la prueba (Kasetsirikul et al., 2016). También se debe mencionar que la sensibilidad de esta técnica, se afecta enormemente por el número de copias del gen blanco o la disponibilidad de la secuencia de ADN en el genoma de *Plasmodium*. El gen mayormente usado es el 18S ADNr, el cual es altamente conservado en todas las especies de *Plasmodium* y posee un número moderado de copias, de 4 a 8 copias por parásito. El ADN mitocondrial es otro blanco prometedor gracias a una abundancia superior con el ADN nuclear (entre 30 y 100 copias por parásito) (Kasetsirikul et al., 2016).

2.4.3.2 Nested PCR

En 1993, la PCR se introdujo por primera vez para la identificación de especies de malaria (Snounou, Viriyakosol, Jarra, et al., 1993), donde parejas de cebadores específicos para cada especie, fueron diseñados para producir una amplificación específica. Esta prueba demostró ser más sensible y exacta que la microscopía, y su versión mejorada, *nested* PCR (Snounou et al., 1993), se considera el *gold standard* en múltiples lugares y se usa para la confirmación de casos positivos en programas de vigilancia (Zheng y Cheng, 2017).

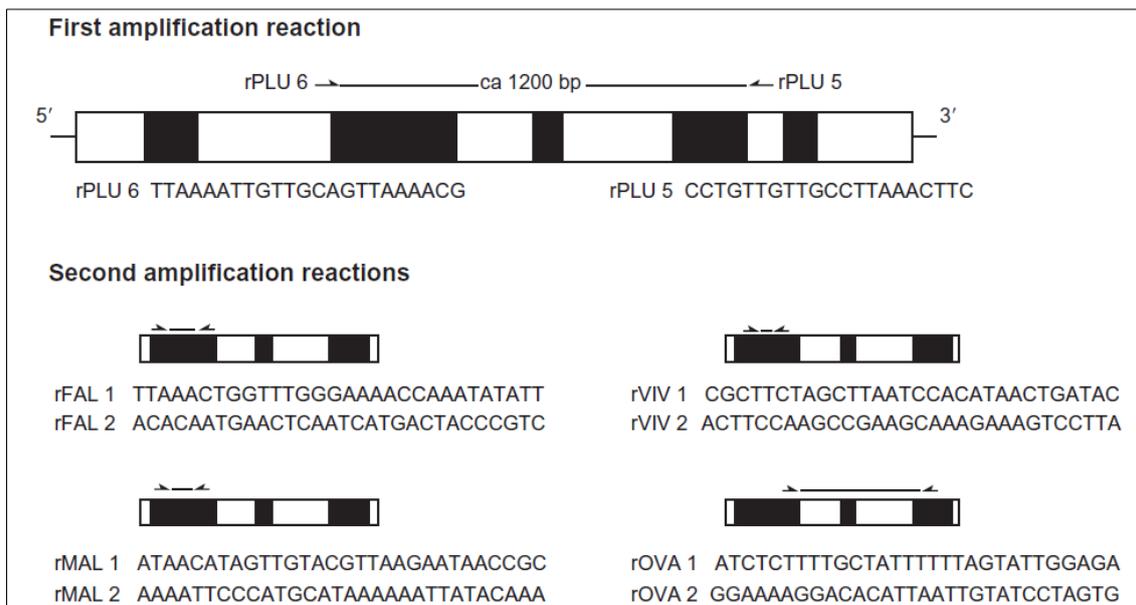


Figura 7. Representación esquemática de los genes ssARN de *Plasmodium* y el protocolo de *nested* PCR.

Adaptado de (Snounou et al., 1993).

Los *cebadores* específicos para cada especie, se diseñaron para hibridarse a uno solo de los dos tipos de genes de ssARN presentes en el genoma de *Plasmodium*.

2.4.3.3 PCR en tiempo real

Para evitar la manipulación después de la amplificación y observar el proceso de amplificación en tiempo real, se desarrolló la PCR en tiempo real (qPCR). Este método utiliza fluoróforos para monitorear constantemente la formación del amplicón durante toda la reacción. La intensidad de la fluorescencia está directamente relacionada con la cantidad de los productos de amplificación. La qPCR presenta novedosas ventajas como la cuantificación de patógenos, menor riesgo de contaminación y disponibilidad de resultados en 3 horas (Zheng y Cheng, 2017)

Se introdujo una multiplex qPCR para el diagnóstico de malaria (Rougemont et al., 2004), en el que se diseñó un grupo de cebadores, que amplifican una región altamente conservada del gen 18S ARNr del género *Plasmodium*. Los cebadores eran suficientemente diferentes, que se diseñaron 4 sondas específicas con fluoróforos para cada especie de *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale* (Zheng y Cheng, 2017). Dado que los parásitos de *Plasmodium* tienen 4-8 copias de los genes 18S ARNr por parásito (Mercereau-Puijalon, Barale, y Bischoff, 2002), este ensayo podría detectar infecciones con una parasitemia de 0,05-0,025 parásito por microlitro (Zheng y Cheng, 2017).

2.4.3.4 Técnicas de amplificación isotérmicas

A pesar del avance significativo de la PCR en los últimos años, es difícil aplicar esta tecnología para diagnósticos afuera del laboratorio, principalmente por su dependencia a equipos costosos, a una fuente de poder para un mejor desempeño, y a su tiempo relativamente largo para generar resultados. Las técnicas de amplificación isotérmicas, tienen el potencial de emplearse en el campo para el diagnóstico de malaria (Zheng y Cheng, 2017). Eliminan la necesidad de un termociclador costoso y dependiente de energía, y producen resultados en 30 minutos a 1 hora (Lau, Lai, Fong, Jelip, y Mahmud, 2016). Estas tecnologías incluyen LAMP (*loop-mediated isothermal amplification*) y NASBA (*nucleic acid sequence-based amplification*) (Zheng y Cheng, 2017).

3. CAPÍTULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL

El desarrollo de esta tesis consistió en 7 pasos (Fig. 8) que permiten alcanzar los objetivos propuestos de este proyecto. La obtención de los frotis gruesos y delgados de sangre periférica en placas de vidrio se realizó por el personal de salud del Programa de Control de la Malaria en el Ecuador.

Estas placas son tomadas rutinariamente en los puestos de malaria, ubicados en las comunidades rurales de las provincias amazónicas, a personas que acuden voluntariamente con sintomatología sospechosa de ser malaria. La provincia de Zamora Chinchipe no se incluyó por cuanto no se tuvo acceso a esas placas, probablemente porque no se tomaron o se perdieron. El microscopista de malaria observa la placa y reporta el resultado al MSP. Estas placas luego son enviadas a los distritos provinciales para verificación. Luego son guardadas y acumuladas en una bodega.

Por gestiones del personal del Instituto Nacional de Salud e Investigaciones “Leopoldo Izquieta Perez” (INSPI) se obtuvo las mencionadas placas. Estas fueron donadas al INSPI y en colaboración con investigadores de la UDLA fueron utilizadas para la presente investigación. Las placas de vidrio fueron clasificadas en positivas y negativas, las positivas fueron separadas por especies de *Plasmodium* de acuerdo a la escritura en el borde de la placa y además especificadas por cantones y provincias.

En los laboratorios de la UDLA y con la finalidad de obtener material biológico se realizó un raspado de los frotis de sangre con etanol al 70%. Esta solución se utilizó para la extracción de ADN con la resina Chelex-100. Una vez finalizada la extracción de ADN de todas las muestras, se procedió a realizar la SnM-PCR. Esta técnica molecular consiste de 2 reacciones PCR; la primera reacción detecta los parásitos de *Plasmodium* y la segunda reacción los identifica. La amplificación de las muestras se visualizó por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 2%. Los productos de amplificación generan bandas de diferentes pesos moleculares los cuales permiten identificar las diferentes especies de malaria humana.

Las muestras positivas de *Plasmodium. spp* se confirmaron realizando otra SnM-PCR. En caso de que las muestras positivas cambien a negativas durante

la repetición, se realizó otra repetición y se estableció el resultado por mayoría. Al final se cuantificó el total de muestras positivas y negativas, y se determinó los valores de sensibilidad y especificidad de la SnM-PCR.

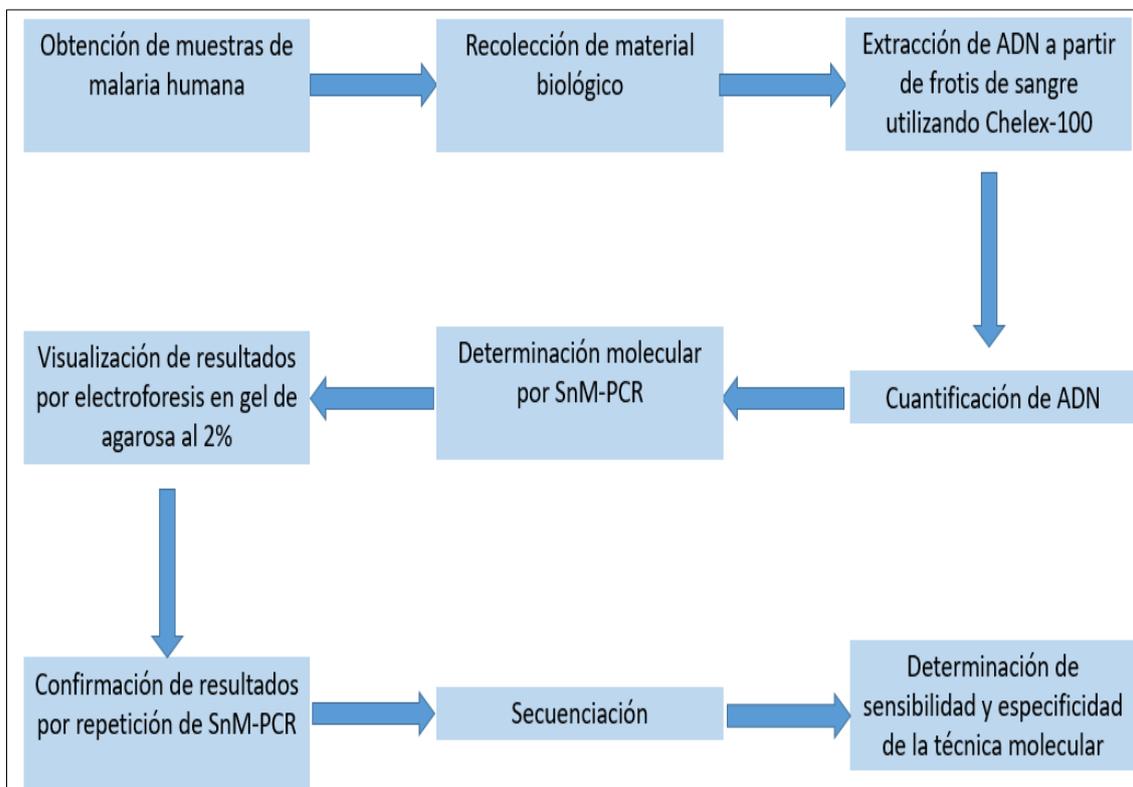


Figura 8. Diagrama de flujo del diseño experimental.

4. CAPÍTULO IV. PROCEDIMIENTOS

4.1 Obtención de las muestras

Los frotis de sangre realizados en placas de vidrio y coloreadas con Giemsa se adquirieron gracias a una donación del Instituto Nacional de Investigación y Salud Pública “Izquieta Perez” (INSPI)-Tena a través del Dr. Carlos Chiluiza, del Ministerio de Salud del Ecuador y cuentan con la aprobación del comité de bioética del INSPI (Cód. Ref.: CEISH-INSPI-013). Estas muestras fueron obtenidas de sangre periférica con lanceta del pulpejo de un dedo de personas

que acudieron a los puestos de diagnóstico de malaria pertenecientes al programa de Control de la Malaria del MSP. Las personas acudían libre y voluntariamente para diagnóstico microscópico con síntomas de fiebre y fue aprobado por el comité de bioética del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública Izquieta Pérez. Este estudio analizó 649 placas las cuales fueron recolectadas entre los años 2015 y 2016, en las provincias amazónicas de Napo, Sucumbíos, Morona Santiago, Orellana y Pastaza.

La selección de estas placas se realizó en base a su estado de conservación e información disponible. Había placas rotas, con hongos, mal teñidas o sin ninguna información acerca del frotis de sangre. Debido a una variación significativa en la información sobre las placas revisadas por microscopía, se decidió agregar únicamente el código de la placa, si es positiva/negativa y la identificación de especie cuando estaba disponible. No se pudo analizar el mismo número de placas positivas y negativas por cada provincia, por las razones descritas. La mayoría de placas son de Pastaza y Orellana dado que cumplen estos criterios. No se obtuvo placas positivas de Morona Santiago y Sucumbíos, sin embargo, se analizó placas negativas dado que se encontraban en buen estado.

El cálculo del tamaño de muestra para determinar la sensibilidad y especificidad de la SnM-PCR se hizo en base a la prevalencia de la enfermedad, la sensibilidad y especificidad de la microscopía y el intervalo de confianza (95%). Para esto se aplicó el programa WinEpi 2.0® (Thrusfield, Ortega, Blas, Noordhuizen, y Frankena, 2001).

4.1.1 Cepa estándar de *P. falciparum* y cepa de *P. vivax*

Se usó la cepa estándar de *P. falciparum* C2B y la cepa Pv91 de *P. vivax* como controles experimentales. La cepa C2B es originaria del sudeste asiático (Tailandia/ Camboya) y es resistente a cloroquina (CQ), sulfadoxina y

pirimetamina (SP), mefloquina (MQ) y atovacuona-proguanil. La cepa Pv91 proviene del cantón de Gonzalo Pizarro de la provincia de Sucumbíos. Ambas cepas fueron donadas por el Dr. Fabián Sáenz, del Centro de Investigación para la Salud en América Latina, profesor de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Pichincha, Quito.

4.2 Recolección de material biológico a partir de frotis de sangre en placas de vidrio teñidos con Giemsa

Previo a realizar la extracción de ADN, se procedió a raspar todo el contenido de los frotis de sangre en placas de vidrio teñidos con Giemsa y se lo colocó en tubos Eppendorf de 1,5mL. El procedimiento es el siguiente:

1. Se esterilizó cajas Petri que funcionan como recolectores del material que se va a raspar.
2. Se añadió 1mL de etanol al 70% sobre la superficie de la placa que contiene el material biológico y se esperó cerca de 30 segundos permitiendo que el alcohol diluya el contenido de la muestra.
3. Se utilizó una hoja de bisturí para raspar el frotis y se depositó el contenido en la caja Petri. Una vez raspado todo el contenido de la placa (frotis grueso y fino), se absorbió el material biológico con una micropipeta y se lo colocó en los tubos Eppendorf.
4. Se agregó 100uL adicionales de etanol limpiando cualquier zona con residuos en la caja Petri y se absorbió posteriormente. Se obtuvo cerca de 1,2mL de muestra en cada tubo.
5. Se procedió a centrifugar los tubos a 10,000rpm por 30 segundos y después se los almacenó a 4°C.

4.3 Extracción de ADN a partir de frotis de sangre en placas de vidrio teñidos con Giemsa utilizando Chelex-100

El Chelex-100 es una resina de intercambio iónico y actúa como agente quelante con los iones de metales de transición. El método de extracción de ADN se

realiza por el protocolo de Chelex con pequeñas modificaciones (Rubio, Benito, Roche, et al., 1999):

1. Se añadió 100uL de Chelex-100 en forma sódica (Sigma-Aldrich Co., St.Louis, Mo.) al 10% y 5uL de Proteinasa K (Promega Corp., Madison, Wis.) a los tubos Eppendorf de 1,5mL.
2. Se colocó los tubos en un vórtex por 2 minutos y luego se los centrifugó a 10.000rpm por 30 segundos (Eppendorf, Alemania).
3. Inmediatamente después se los calentó en un baño maría a 56°C por 1 hora (Mettler, Alemania) y se los centrifugó nuevamente con las condiciones anteriores.
4. Posteriormente se los calentó por 30 minutos a 95°C en un termobloque (Eppendorf, Alemania) y se procedió a centrifugar una vez más.
5. Se extrajo el sobrenadante y se lo adicionó a nuevos tubos Eppendorf de 1,5mL.
6. Se almacenó el extracto de ADN en una congeladora (Eppendorf, Alemania) a -20°C. la cuantificación de ADN en un equipo de lector de placas (Bio Tek Instruments, Inc., USA) con el software Gen5™. Los datos obtenidos se almacenaron en Excel.

4.4 Cuantificación de ADN

Antes de realizar la cuantificación de ADN se preparó las muestras de interés. Esto consistió en descongelar las muestras a temperatura ambiente y después se las centrifugó en una microcentrífuga (Eppendorf, Alemania) a 10.000rpm por 30 segundos. Una vez listas las muestras, se usó el equipo de lector de placas (Bio Tek Instruments, Inc., USA) con el software Gen5™ para realizar la cuantificación. El protocolo utilizado es el proporcionado por el fabricante. Los datos obtenidos se almacenan en un archivo de Excel.

4.5 Determinación molecular por Semi-nested multiplex PCR

4.5.1 Primera reacción semi-nested multiplex PCR

La detección e identificación de las especies de malaria se realizó simultáneamente mediante dos multiplex (semi-nested) PCRs y se utilizaron 7 cebadores (Tabla 2) (Rubio et al., 2002).

Tabla 2.

Lista de cebadores empleados para la SnM-PCR incluyendo la secuencia nucleotídica, especificidad y el tamaño esperado del producto PCR.

Primer	Sequence (5'-3')	Specificity	Product size (basepairs [bp])
First reaction			
Reverse primer			
UNR	GACGGTATCTGATCGTCTTC	Universal	—*
Forward primer			
PLF	AGTGTGTATCCAATCGAGTTTC	<i>Plasmodium</i>	783–821†
HUF	GAGCCGCTGGATACCGC	Mammals	231‡
Second reaction			
Forward primer			
PLF	AGTGTGTATCCAATCGAGTTTC	<i>Plasmodium</i>	
Reverse primer			
OVR	GCATAAGGAATGCAAAGAACAG	<i>P. ovale</i>	436
FAR	AGTTCCCTAGAATAGTTACA	<i>P. falciparum</i>	395
MAR	GCCCTCCAATGCCTTCTG	<i>P. malariae</i>	269
VIR	AGGACTTCCAAGCCGAAGC	<i>P. vivax</i>	499

Adaptado de (Rubio et al., 2002).

La primera reacción aplica los cebadores UNR, PLF y HUF que generan dos productos: una banda de 231pb (pares de bases) correspondiente a los cebadores HUF-UNR. Funciona como control positivo de la reacción de PCR y se origina por la amplificación de *ssrARN* humano. El segundo producto de 783 a 821pb (dependiendo de la especie de *Plasmodium*) resulta de PLF-UNR y se genera por la amplificación del *ssrARN* de *Plasmodium*. Este fragmento es visible si la parasitemia es superior al 3%. Por esta razón la detección de *Plasmodium* requiere la segunda reacción (Rubio et al., 1999). Se usa una concentración final de 0.5µM con los cebadores UNR y PLF, que producen una banda visible con los controles experimentales por su una alto contenido de *ssrARN*. El primer HUF

no se utiliza porque compite con el primer UNR y se afecta la detección e identificación de *Plasmodium* en la segunda reacción.

La mezcla PCR para la primera reacción consistió de 2 μ L (1X) GC-Buffer (Thermo Fisher Scientific, Inc., USA), 0,2 μ L (0.2mM) de desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs) (Thermo Fisher Scientific, Inc., USA), 0,3 μ L (20 μ M) de cada primer, 0,1 μ L de Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (1 Unidad/ 50 μ L de volumen de reacción) (Thermo Fisher Scientific, Inc., USA) y 3 μ L de ADN, con un volumen final de 11 μ L que se completó con agua grado PCR. El termociclador utilizado para ambas reacciones fue Eppendorf Mastercycler® pro (Eppendorf AG, Alemania) y el perfil térmico de esta reacción constó de una denaturación inicial a 98°C por 3 minutos, seguido por 40 ciclos: 98°C de denaturación por 10 segundos, 62°C por 45 segundos de anillamiento y 72°C por 30 segundos de extensión. Después del último ciclo se continuó con una extensión final a 72°C por 10 minutos.

4.5.2 Segunda reacción semi-nested multiplex PCR

La segunda reacción permite identificar las especies de *Plasmodium*. Se incorporó los productos de la primera reacción en conjunto con los cebadores PLF, MAR, FAR, VIR, y OVR. La infección de diferentes especies de *Plasmodium* produce bandas con diversos tamaños. Una banda con 269bp de PLF y MAR indica una infección con *P. malarie*, una banda con 395bp de PLF y FAR corresponde a *P. falciparum*, la banda de 436bp de PLF y OVR revela la presencia de *P. ovale* y la banda de 499bp de PLF y VIR es una infección de *P. vivax*. Las infecciones mixtas deberían indicar varias bandas con los tamaños correspondientes (Rubio et al., 1999).

Para la segunda reacción (10 μ L), se usó 1 μ L del producto PCR de la primera reacción, con una dilución 1/100 en agua. La mezcla PCR consistió de 2 μ L (1X) GC-Buffer (Thermo Fisher Scientific, Inc., USA), 0,2 μ L (0.2mM) de dNTPs

(Thermo Fisher Scientific, Inc., USA), 0,5 μ L (20 μ M) del cebador PLF; 0,4 μ L (20 μ M) del cebador VIR; 0,3 μ L (20 μ M) del cebador FAR y 0,1 μ L (20 μ M) de los cebadores OVR y MAR, y 0,2 μ L de Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (2 Unidades/ 50 μ L de volumen de reacción) y el volumen restante se completó con agua grado PCR. Para esta reacción se utilizó un perfil térmico con una denaturación inicial a 98°C por 3 minutos, con 35 ciclos de: 98°C de denaturación por 10 segundos, 64°C por 20 segundos de anillamiento y 72°C por 30 segundos de extensión. Nuevamente, al finalizar el último ciclo se realizó una extensión final a 72°C por 10 minutos.

La detección e identificación de las especies de malaria se realizó en simultáneo. El tamaño de los productos PCR se observó mediante una electroforesis (cámaras electroforéticas Labnet International, USA) en gel de agarosa (Ultrapure TM Agarose, Invitrogen) al 2% teñido con SYBR Safe (Thermo Fisher Scientific, Inc., USA). Se reveló los geles de agarosa en un fotodocumentador (Biorad, USA).

4.6 Confirmación molecular de *Plasmodium* spp. por repetición de muestras positivas con SnM-PCR

Todas las muestras positivas que se obtuvieron una vez finalizada la parte experimental, fueron confirmadas por una repetición con la SnM-PCR. Se hizo una repetición adicional a las muestras positivas que cambiaron a negativas. En base a una mayoría de resultados, se clasificaba las muestras en negativas o positivas. Se realizó el procedimiento anterior para la identificación de especies.

4.7 Secuenciación

Como método adicional para confirmar que la SnM-PCR había sido estandarizada, se procedió a secuenciar 2 fragmentos PCR (un fragmento de *P.vivax* y otro de *P.falciparum*) en un analizador de secuencias Sanger 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). Después se analizó los fragmentos

secuenciados en los programas bioinformáticos NCBI-BLAST y Geneious (versión 9.1.5; Biomatters Ltd.) para verificar la identidad de la especie y del fragmento PCR.

4.8 Análisis estadístico

Se aplicó el programa WinEpi 2.0® para determinar los valores de sensibilidad y especificidad (Thrusfield et al., 2001)

5. CAPÍTULO V. RESULTADOS

5.1 Número de muestras obtenidas y analizadas por cantones y provincia

Se analizó un total de 649 muestras (Tabla 3) distribuidas entre las provincias de Pastaza, Orellana, Napo, Morona Santiago y Sucumbíos. El mayor número de muestras provienen de Pastaza seguido por la provincia de Orellana, y la provincia con menos número de muestras es Sucumbíos. Las placas en las provincias de Morona Santiago y Sucumbíos, no presentaban información del catón donde se realizó el frotis, por lo tanto, no hay información del cantón para estas muestras. No se recolectaron muestras de la provincia de Zamora Chinchipe por cuanto no existe el programa de control de malaria por el MSP.

Tabla 3.

Número total de muestras analizadas por provincia y cantón.

Provincia	Cantón	Número de muestras
Napo	Tena	53

Pastaza	Pastaza	294
Orellana	Aguarico	225
Morona Santiago	-	50
Sucumbíos	-	27
		Total: 649

5.2 Muestras positivas, negativas y especies de *Plasmodium* por microscopía

Se procesó 333 muestras positivas y 316 muestras negativas (Anexo 1 y 2) según estaba rotulado en el vidrio y realizado por el método de microscopía por el personal del Programa de control de la malaria por el MSP. Algunas placas positivas no identificaban la especie de *Plasmodium*. Según el diagnóstico microscópico, la especie predominante es *P. vivax* seguido por *P. falciparum*. No habían placas que identifiquen co-infecciones.

5.3 Cuantificación de ADN

Se cuantificó el ADN de las 649 muestras para determinar la concentración de material genético y la pureza de cada muestra (Tabla 4). La concentración promedio de ADN es 90,942 ng/ μ L y los valores promedio de las proporciones 260/280, 260/230 son de 0,919 y 0,460.

Tabla 4.

Cuantificación de ADN en el equipo de lector de placas con valores promedio de concentración de ADN y proporciones 260/280, 260/230 para todas las muestras.

Cuantificación de ADN		
Concentración promedio de ADN (ng/ μ L)	Valor promedio de 260/280	Valor promedio de 260/230
90,942	0,919	0,460

5.4 Experimento 1. Detección de *Plasmodium* por SnM-PCR

Para la detección de ADN de *Plasmodium* de las muestras previamente identificadas como positivas por microscopia, realizamos la primera reacción SnM-PCR. Utilizamos los cebadores PLF, UNR y HUF tanto con los controles positivos y con las muestras para generar 2 productos PCR. Los controles positivos mostraron un amplicón de ~800pb que corresponde al ssrARN de *Plasmodium* y no se presenta el producto de 231pb. Todas las muestras positivas al microscopio tienen el fragmento de 231pb, pero no se visualiza la banda de *Plasmodium*. No hay ninguna amplificación en el control negativo y esto indica que no hay presencia de contaminantes en esta prueba (Fig. 9).

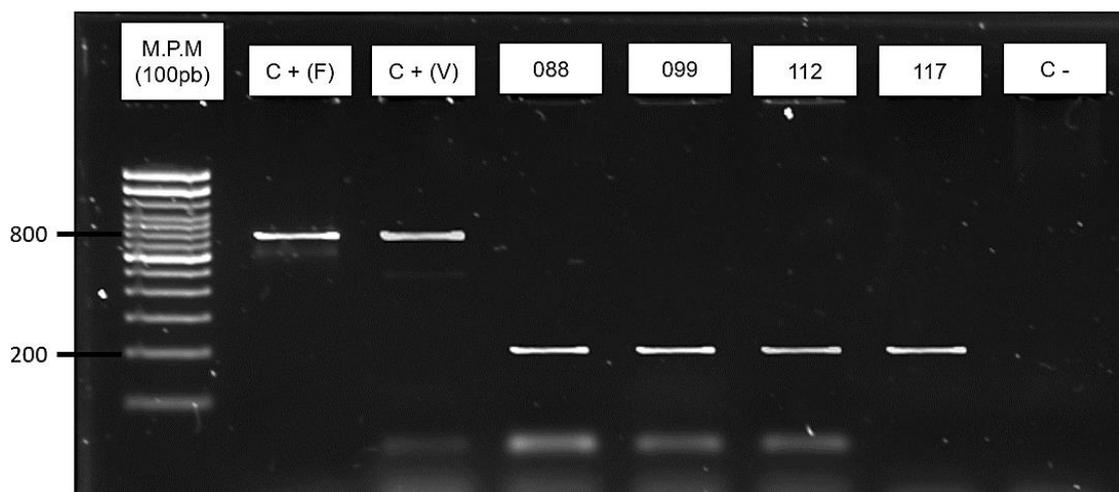


Figura 9. Primera reacción de SnM-PCR para la detección de *Plasmodium*.

Los controles positivos de *P. falciparum* (C+(F)) y *P. vivax* (C+(V)) presentan una banda de 800pb aproximadamente que corresponde a la amplificación del *ssrARN* de *Plasmodium*, por los cebadores PLF-UNR. Las muestras positivas por microscopía: 088, 099, 112 y 117 tienen una banda de ~230pb que se genera por la amplificación del *ssrARN* humano, con los cebadores PLF-HUF. Este producto PCR funciona como control positivo de la reacción. M.P.M es el marcador de peso molecular y C- es el control negativo.

5.5 Experimento 2. Diluciones del extracto de ADN

Las primeras pruebas con las dos reacciones de la SnM-PCR no generaban ninguna amplificación (Fig.10) como se ve en las muestras no diluidas (ND) 4, 26 y 34. Se diluyó el extracto de ADN de estas muestras (D; 4, 26 34) a 10ng/ μ L y se comparó los resultados. Las muestras diluidas produjeron una amplificación y se detectaban productos PCR de aproximadamente 800pb, 395pb y 495pb. El producto de ~800pb indica el género *Plasmodium*, la banda de 395pb corresponde a *P. falciparum* y la banda de 495pb es de *P. vivax*. También hay productos inespecíficos menores a 400pb (D; 4, 34) y superiores a 800pb (D; 26). En general, el desempeño de la SnM-PCR mejoró significativamente después de diluir las muestras utilizadas en esta prueba a pesar de la presencia de productos PCR inespecíficos. En base a estos datos, se diluyó todas las muestras para las pruebas posteriores.

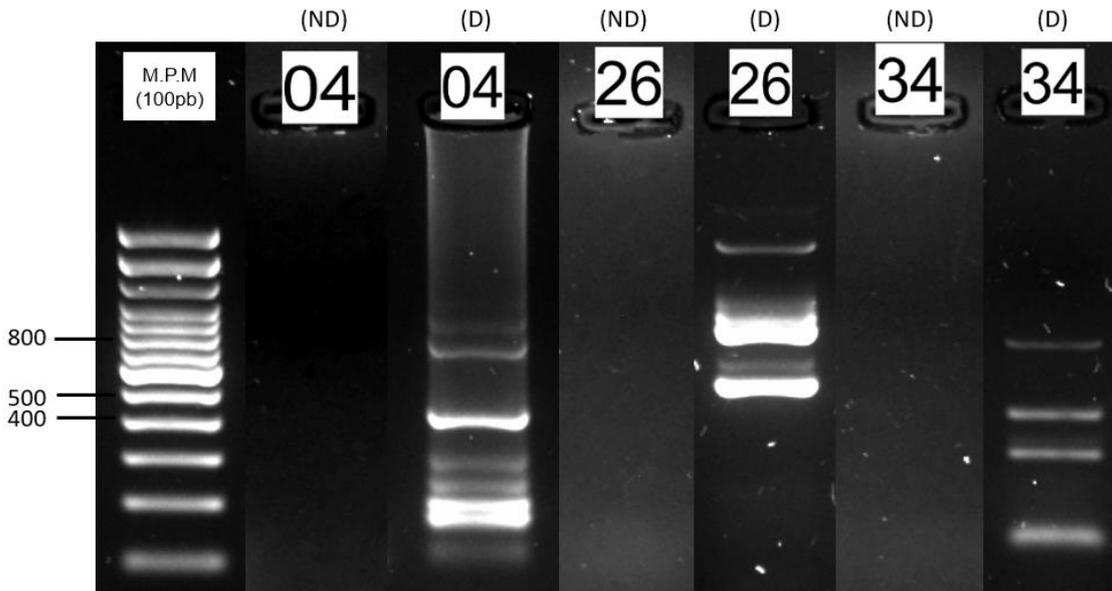


Figura 10. Imagen comparativa de muestras diluidas (D; 4, 26, 34) a 10 ng/ μ L y no diluidas (ND; 4, 26, 34) después de la segunda reacción de la SnM-PCR.

Se repitió 3 veces obteniendo resultados similares en cada prueba. Las muestras no diluidas provienen de una misma electroforesis en gel de agarosa y las muestras diluidas de otra. Las muestras no diluidas no amplificaron mientras que las muestras diluidas presentan diferentes productos PCR. La muestra 4 (1.2) y 34 (3.2) indican la presencia de *P. falciparum* por la banda de 395pb. La muestra 26 (2.2) corresponde a *P. vivax* (495pb). Las bandas de ~800pb indican el género *Plasmodium* y las bandas menores a 400pb son inespecíficas.

5.6 Experimento 3. Diluciones de los productos SnM-PCR de la primera reacción para la segunda reacción

La presencia de inhibidores o contaminantes durante la primera reacción SnM-PCR se evidencian con la segunda reacción (Fig. 11). El control positivo de *P. falciparum* (C+(f)) debería generar un producto PCR de 395pb. Sin embargo, se observa una banda de ~800pb. Esta banda corresponde al producto de la primera reacción y funciona para detectar a *Plasmodium*. No se observa la banda que identifica a la especie esperada con la segunda reacción con los cebadores PLF-FAR. El control positivo de *P. vivax* (C+(v)) si demuestra una banda de 495bp que corresponde a la especie, aunque presenta una intensidad muy baja.

Para esta prueba, para ambos controles positivos utilizamos 2 μ L del producto de la primera SnM-PCR sin diluir, como molde para la segunda SnM-PCR. De igual forma, las muestras Fal (0,5 μ L), Fal (1,0 μ L), Viv (0,5 μ L) y Viv (1,0 μ L) usan el producto PCR sin diluir. Se evidencia claramente con las muestras de *P. vivax*, que al disminuir el volumen del producto PCR, se incrementa la intensidad de la banda esperada (495pb). Las muestras de *P. falciparum* presentan los mismos resultados, pero no se puede distinguir tan fácilmente. Al utilizar 2 μ L de producto PCR, nuevamente no se genera la banda de 395pb que corresponde a la especie. Al disminuir este volumen hasta 0,5 μ L se obtiene el producto esperado pero tiene un rendimiento muy bajo.

En conclusión, las muestras diluidas generan mejores resultados. Se puede observar una relación directa entre el aumento del factor de dilución y la intensidad de las bandas deseadas (395pb y 495pb). Por ejemplo, las muestras Fal (D 1/10) y Viv (D 1/10) tienen un producto PCR con un rendimiento similar. Cuando se aumenta progresivamente el factor de dilución hasta 1:100, se produce un resultado óptimo con la mayor intensidad para esas bandas, como se ve en las muestras Fal (D 1/100) y Viv (D 1/100).

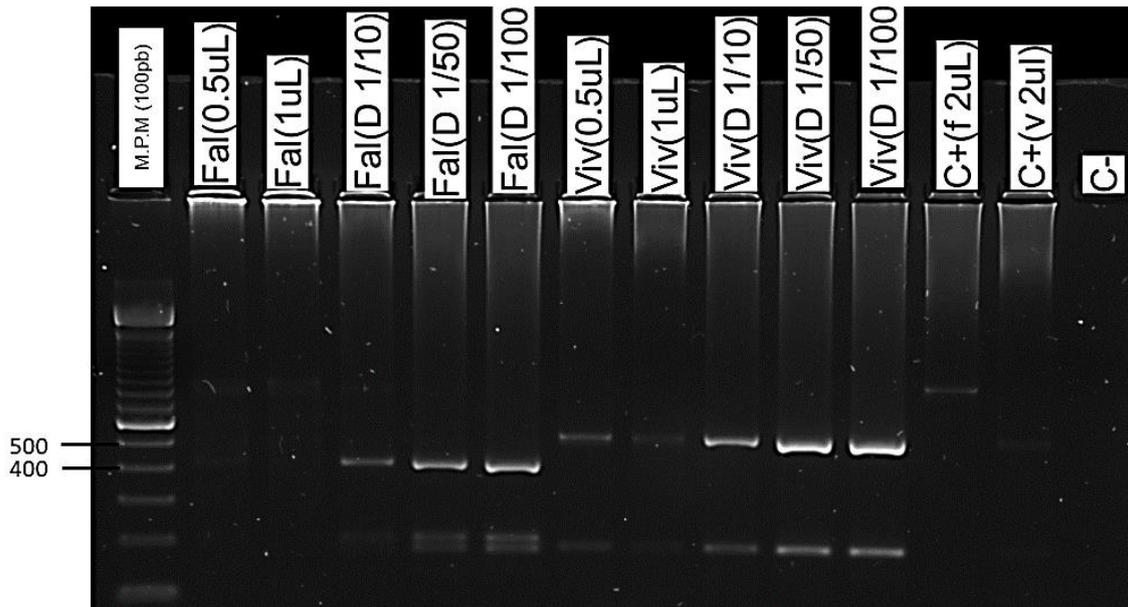


Figura 11. Segunda reacción SnM-PCR.

Efecto de los residuos de SnM-PCR después de la primera reacción en los productos de la segunda reacción. Fal y Viv corresponden a las especies *P. falciparum* (395pb) y *P. vivax* (495pb). C+(f) y C+(v) son los controles positivos de *P. falciparum* y *P. vivax*, C- es el control negativo y M.P.M es el marcador de peso molecular. Todas las muestras en esta prueba se realizaron con los controles positivos. Los carriles con Fal (0,5 μ L), Fal (1,0 μ L), Viv (0,5 μ L), Viv (1,0 μ L), C+(f 2 μ L) y C+(v 2 μ L), no se diluyeron y se agregó un volumen de producto PCR descrito por su etiqueta a la segunda reacción. Los carriles restantes presentan diluciones 1:10, 1:50 y 1:100 del producto PCR y luego se adicionó 1 μ L de esa dilución a la segunda reacción. Amplicones menores a 400pb son amplificaciones inespecíficas.

5.7 Experimento 4. Especificidad de los cebadores VIR y FAR

Para determinar la especificidad de los cebadores VIR y FAR de la segunda reacción (Fig.12), se realizó una singleplex PCR con muestras de *P. vivax* y *P. falciparum*, y se comparó esos resultados con los controles positivos que poseen todos los cebadores para esta reacción. Se observa fácilmente la banda de 495pb que identifica a *P. vivax*, en las muestras V1 SIN, V2 SIN y C+(V). Las muestras F1 SIN, F2 SIN y C+(F) muestran los mismos resultados y se observa una banda de 395pb que corresponde a la especie de *P. falciparum*. También se observa una banda de ~200pb que esta presenta en todas las muestras y los

controles positivos. Esta banda no es producto de contaminación, ya que no se observa en el control negativo (C-).

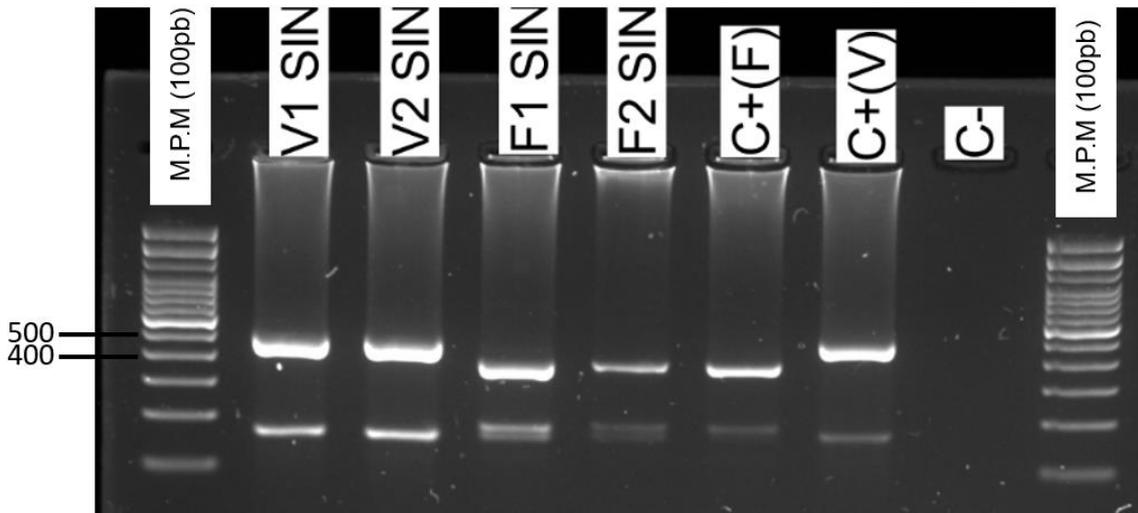


Figura 12. Prueba de especificidad de los cebadores FAR y VIR en la segunda reacción PCR.

Las muestras V1 SIN y V2 SIN corresponden a *P. vivax* con los cebadores PLF-VIR, que produce el amplicón esperado de 495pb. F1 SIN y F2 SIN son muestras de *P. falciparum* y con los cebadores PLF-FAR, que generan una banda de 395pb. Los controles positivos de *P. falciparum* (C+(F)) y *P. vivax* (C+(V)) poseen todos los cebadores de cada especie (VIR, FAR, MAR, OVR) y producen bandas para su especie. Se observan bandas inespecíficas de 200pb en todas las muestras, excepto en el control negativo (C-).

5.8 Experimento 5. Optimización de la concentración de cebadores en la segunda reacción

Mediante una reducción en la concentración de cebadores PLF (1,5 μ M a 1,0 μ M), VIR (1,4 μ M a 0,8 μ M) y FAR (1,2 μ M a 0,6 μ M), se aumentó la especificidad de la segunda reacción (Fig.13). La concentración de los cebadores OVR y MAR se mantuvo en 0,2 μ M. Con esta concentración de cebadores se generan los productos PCR de 395pb y 495pb, correspondientes a *P. falciparum* y *P. vivax*, sin ningún amplicón inespecífico. Se observa un *smear* de alto peso molecular

en todas las muestras y los controles positivos, no hay la presencia de ningún contaminante en el control negativo.

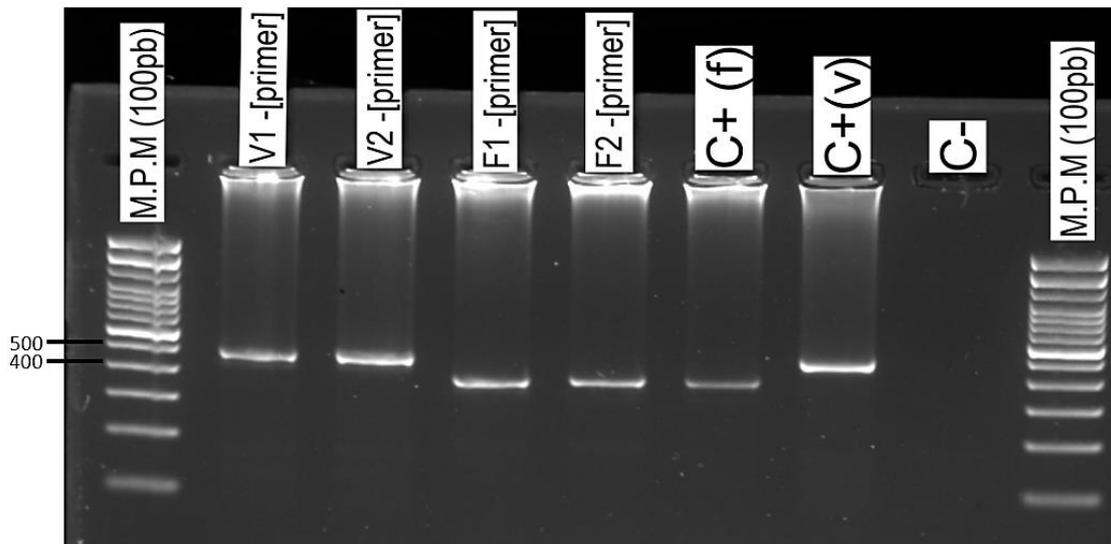


Figura 13. Aumento de especificidad reduciendo la concentración de cebadores.

Se observa una sola banda en cada muestra (V1, V2, F1, F2) y en cada control positivo (C+(f) y C+(v)). Las muestras V1, V2 y C+(v) presentan una banda de 495bp que corresponde a *P. vivax*. Las muestras F1, F2 y C+(f) tienen una banda de 395bp y corresponde a *P. falciparum*. No hay amplificación en el C- (control negativo).

5.9 Experimento 6. SnM-PCR optimizada

Para la optimización final de la SnM-PCR (Fig.14), se utilizó 4 muestras de *P. vivax*, 4 muestras de *P. falciparum* y 2 posibles co-infecciones (ambas especies). Todas estas muestras habían dado resultados positivos en 3 experimentos, con excepción de las co-infecciones que solo tenían un resultado como muestras positivas con doble infección. Se observa que todas las muestras de *P. vivax* y *P. falciparum* generaron el amplicón esperado para su especie y se visualiza las dos bandas en las muestras 378 y 572, indicando la co-infección. Los controles positivos de *P. falciparum* y *P. vivax* también amplificaron correctamente y no hay amplificación en el control negativo, lo que indica que no hubo contaminación

en este ensayo. Este experimento con los cambios realizados nos demuestra la especificidad de los cebadores diferenciando cada especie.

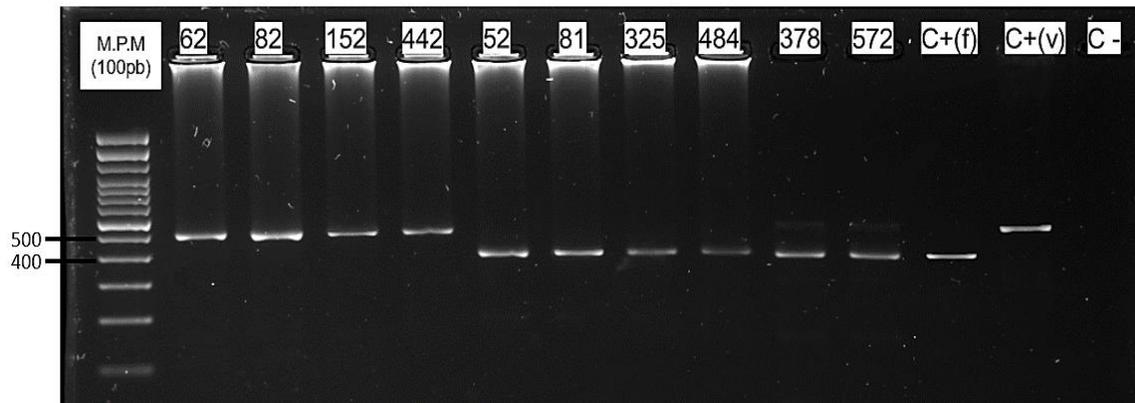


Figura 14. Imagen de la SnM-PCR optimizada.

Las muestras 62, 82, 152 y 442 corresponden a *P. vivax* (amplicón de 495pb) y las muestras 52, 81, 325 y 484 son *P. falciparum* (amplicón de 395pb). Las muestras 378 y 572 presentan una posible co-infección con *P. vivax* (banda tenue) y *P. falciparum*. C+(f) (*P. falciparum*) y C+(v) (*P. vivax*) son los controles positivos y C- es el control negativo.

5.10 Alineamiento de secuencias

Un alineamiento global (Anexo 3 y 4) de las secuencias 18S ARNr (muestras 442 y 325) con el gen 18S ARN del cromosoma 7, muestra una identidad del 82% y 87%. Esto indica que la SnM-PCR amplifica el gen 18S ARN de *Plasmodium* y no otra secuencia que puede poseer cierta similitud con este gen. Los productos PCR reales de estas muestras poseen un tamaño de 408pb (442) y 391pb (325) mientras que los esperados son de 495pb y 395pb. Esta variación entre el tamaño final y teórico de los amplicones explica porque la identidad no es el del 100%. El alineamiento BLAST (Anexo 5 y 6) revela que el amplicón de la muestra 442, tiene un 99% de identidad con la especie *P. vivax* y el amplicón de la muestra 325 tiene un 97% de identidad con la especie *P. falciparum*. Esto confirma los resultados obtenidos por la SnM-PCR (Fig.13).

5.11 Comparación de las muestras positivas y negativas por microscopía vs la SnM-PCR

De las 649 placas de vidrio procesadas, se separaron 115 muestras positivas y 534 muestras negativas, demostradas por la técnica SnM-PCR (Tabla 5). De acuerdo a los resultados previos por microscopía se identificaron que 333 placas eran positivas y 316 eran negativas. Observándose que en todas las provincias hay mayor número de muestras negativas por SnM-PCR que por microscopía. En las provincias de Morona Santiago y Sucumbíos no había placas positivas por microscopía, pero analizamos 50 y 27 placas negativas. Obteniéndose 3 y 2 muestras positivas por SnM-PCR, respectivamente.

Tabla 5.

Comparación del número total de muestras positivas y negativas por microscopía vs SnM-PCR, distribuidas por provincia y catones.

Provincia	Cantón	Número de muestras	Microscopía		SnM-PCR	
			Positivas	Negativas	Positivas	Negativas
Napo	Tena	53	26	27	3	50
Pastaza	Pastaza	294	184	110	51	243
Orellana	Aguarico	225	123	102	56	169
Morona Santiago	-	50	0	50	3	47
Sucumbíos	-	27	0	27	2	25

Total	649	333	316	115	534
-------	-----	-----	-----	-----	-----

5.12 Identificación de especies de *Plasmodium* por microscopía y SnM-PCR

Al comparar la microscopía y SnM-PCR en la identificación de especies de *Plasmodium* (Tabla 6), con la SnM-PCR se identificó que 64/96 (67%) de las infecciones son causadas por *P. vivax* y 32/96 (33%) por *P. falciparum*. Se demuestra un resultado diferente en 12/52 (23,07%) de los casos identificados como *P. vivax* y 5/8 (62,5%) de los casos identificados como *P. falciparum*. No se detectó infecciones mixtas en las placas positivas. Además, analizando las muestras positivas por microscopía pero sin la identificación de especie, encontramos que el 53% (19/36) de casos se identificaron como *P. vivax* y el otro 47% (17/36) como *P. falciparum*. Es importante mencionar que a partir de estas muestras no identificadas se obtuvo el mayor número de infecciones por *P. falciparum*.

Tabla 6.

Comparación en la identificación de especies de malaria (muestras positivas con ambos métodos) por microscopía y SnM-PCR.

		Microscopía			Total
		<i>P. vivax</i>	<i>P. falciparum</i>	Sin especie	
SnM-PCR	<i>P. vivax</i>	40	5	19	64
	<i>P. falciparum</i>	12	3	17	32
	Total	52	8	36	96

5.13 Determinación de sensibilidad y especificidad de la SnM-PCR

Se comparó los resultados de la microscopía con la SnM-PCR (Tabla 7) para determinar la sensibilidad y especificidad de la técnica molecular. Por SnM-PCR de las 333 muestras positivas por microscopía, se obtuvo 96 positivas (verdaderos positivos) y 237 negativos (falsos positivos). De las 316 muestras negativas por microscopía, 11 resultaron positivas (falsos negativos) y 297 negativos (verdaderos negativos). Esto genera una sensibilidad de 28,8% y una especificidad de 94,0% para la SnM-PCR.

Tabla 7.

Resultados de microscopía contra SnM-PCR para el diagnóstico de especies de malaria en 649 muestras.

		Microscopía			Sensibilidad (95% IC) (%)	Especificidad (95% IC) (%)
		Positivas	Negativas	Total		
SnM-PCR	Positivas	96	19	115	28,8% (24,0%; 33,7%)	94,0% (91,4%; 96,6%)
	Negativas	237	297	534		
	Total	333	316			

6. CAPÍTULO VI. DISCUSIÓN

6.1 Extracción y pureza del ADN extraído con Chelex-100

El método con Chelex-100 nos permitió la rápida extracción de ADN a partir de los frotis sanguíneos que son muestras con pequeñas cantidades de material biológico pero que generó amplias cantidades de material genético para las reacciones de PCR, demostrado en la cuantificación del ADN. Adicionalmente, la resina de Chelex se une a los iones de magnesio, los cuales son utilizados

como cofactores para las desoxirribonucleasas (DNAsas) y facilitan su activación. De esta forma se previene la degradación del ADN (Singh, Kumari, y Iyengar, 2018). Fue muy eficaz en la extracción del gran número de muestras que analizamos (649). Sin embargo, un gran problema de la extracción de ADN con Chelex, es la pureza del ADN, dado que se necesitan pasos adicionales para eliminar proteínas remanentes, desechos celulares y purificar el ADN (Singh et al., 2018). Nosotros creemos que este fue el motivo principal encontrado en la baja sensibilidad encontrada en comparación con la microscopia. En adición, muchas de las placas positivas para *Plasmodium* estaban en mal estado de conservación.

En relación a la cuantificación del ADN (Tabla 4) obtuvimos concentraciones relativamente altas (promedio de 90,942 ng/ μ L). Sin embargo, estuvieron contaminadas en base a los valores de las proporciones 260/280 (0,919) y 260/230 (0,460). La proporción 260/280 indica la pureza de ADN, y un valor entre 1,8-2,0 corresponde a una muestra pura. Valores significativamente diferentes a los de esta proporción, se deben a la presencia de proteínas, fenol, u otros contaminantes (Desjardins y Conklin, 2011). Se conoce que muestras de tejido o sangre como las empleadas en esta investigación, poseen una cantidad de proteínas que supera abismalmente a los ácidos nucleicos (BioTek, 2001). La segunda medida de pureza es la proporción 260/230. Valores esperados para esta proporción se encuentran en el intervalo de 2,0-2,2. Si el valor obtenido es mucho menor, esto indica la presencia de contaminantes como sales de guanidina, fenol, carbohidratos y otros compuestos (Thermo Scientific, 2009). Además, se podía visualizar impurezas y pigmentos en el extracto de ADN, causado por los desechos celulares y la tinción Giemsa.

6.2 Primera reacción SnM-PCR

Los resultados obtenidos con la primera reacción de la SnM-PCR, demostró positivamente la detección del ADN del genero *Plasmodium* por el amplicon de

los cebadores PLF-UNR y que la reacción PCR funciona por el amplicon de los cebadores HUF-UNR. Se observa el control positivo de la reacción en todas las muestras pero no se observa la banda de *Plasmodium* (783pb-821pb). Por otra parte, los controles positivos de *P. falciparum* y *P. vivax* si presentan el amplicón de ~800pb y no poseen el producto PCR de 231pb. Este resultado es congruente, ya que no debería existir ADN humano en los controles positivos pero si ADN de *Plasmodium*.

La explicación más probable para que las muestras positivas al microscopio resulten negativas a la PCR en esta primera reacción es que dado que no se amplificó esta banda de ~800pb, puede ser que el ADN se ha degradado considerablemente debido a las malas condiciones de almacenaje de las placas en la Amazonia y también debido al tiempo transcurrido desde la extracción de ADN con Chelex-100 hasta la reacción de PCR que fue de aproximadamente 2 meses (Singh et al., 2018). Esto explicaría porque no se detecta el ssrARN de *Plasmodium* a pesar de la gran carga parasitaria. Las muestras positivas utilizadas en esta prueba tienen una gran carga parasitaria, en base a la información de las placas que provienen. Con una gran carga parasitaria se debería detectar el ssrARN de *Plasmodium* en estas muestras. Dado que no se amplifica esta banda de ~800pb, una razón para esto puede ser que el ADN se ha degradado considerablemente, debido a las malas condiciones de almacenaje de las placas en la Amazonia y a la extracción de ADN con Chelex (Singh et al., 2018). Esto explicaría porque no se detecta el ssrARN de *Plasmodium* a pesar de la gran carga parasitaria. Dado que la cantidad de ADN de *Plasmodium* es mucho menor a lo esperado, un bajo nivel de parasitemia también afecta la amplificación de este producto. De hecho, si el nivel de parasitemia no es superior al 3%, este fragmento no es visible (Rubio et al., 1999). Adicionalmente, el primer HUF compite parcialmente con PLF, y como existe una cantidad de ssrARN humano mucho mayor al de *Plasmodium*, cuando se utiliza una concentración alta de HUF, solo el producto de 231pb de HUF-UNR se puede visualizar (Rubio et al., 2002; Rubio et al., 1999). Esto se puede observar como dímeros de cebadores (Fig.9).

Para resolver esta situación y en base a estos resultados, en siguientes experimentos disminuimos significativamente la concentración del primer HUF (0,5 μ M a 0,05 μ M) para evitar esta competencia con el primer PLF. De todos modos, incluso con esta concentración tan baja el primer HUF seguía afectando al primer PLF, por este motivo se descartó su uso.

Por los motivos expuestos anteriormente, las muestras positivas-microscopio utilizadas no son necesariamente negativas, pero tienen una cantidad ínfima de ADN de *Plasmodium*, que supera al límite de detección de la primera reacción SnM-PCR. Por lo tanto, se realizó las dos reacciones SnM-PCR para aumentar el límite de detección con todas las muestras, ya que ni las muestras con mayor carga parasitaria generaron el amplicón deseado.

6.3 Disminución de inhibidores por dilución

Con la primera experiencia de la primera reacción de la SnM-PCR (Fig. 9) que no amplificó la banda de 800pb esperada del género *Plasmodium* y creyendo que es debido a un potencial límite de sensibilidad (Rubio et al., 2002; Rubio et al., 1999). La contaminación de las muestras finalizada la extracción de ADN es evidente (Tabla 4). Por lo tanto, la amplificación de este producto PCR no garantiza la ausencia de inhibidores en las muestras. Dado la gran cantidad de ssrARN humano en las muestras, se facilita la generación de este producto PCR. Adicionalmente, la polimerasa Phusion High-Fidelity tiene una mayor resistencia a inhibidores que otras polimerasas y un mejor rendimiento (Böhlke et al., 2000; Špibida, Krawczyk, Olszewski, y Kur, 2017). Sin embargo, no se consideró que el control positivo de la reacción actué como un falso positivo, y se procedió a realizar las dos reacciones de la SnM-PCR, sin purificar las muestras. Al parecer problema con la primera reacción, era el límite de detección de la prueba y no otros problemas.

Posteriormente, se realizó las dos reacciones SnM-PCR para detectar e identificar las especies de *Plasmodium* al mismo tiempo. Los experimentos iniciales no produjeron ninguna amplificación. Se analizó los efectos de los contaminantes en las muestras para la SnM-PCR, los cuales pueden inhibir la reacción, y se realizó varios ensayos (Fig.10) con muestras diluidas a 10 ng/ μ L y comparando con muestras sin diluir. Está demostrado que por diluciones se remueve posibles inhibidores de la PCR (Schrader, Schielke, Ellerbroek, y Johne, 2012).

En general, las muestras no diluidas no producían ningún producto PCR o se generaban bandas de una intensidad muy baja. Pero cuando se empleaba las mismas muestras pero diluidas, obteníamos una amplificación y/o aumentaba la intensidad de las bandas tenues. Por ejemplo, las muestras 4, 26 y 34 consideradas positivas por microscopia eran muestras negativas al finalizar las 2 reacciones de la SnM-PCR. Esto indicaba que las muestras utilizadas posiblemente tenían inhibidores para la PCR y esto explicaría porque no se produce una amplificación o porque el rendimiento de los productos PCR para otras muestras es tan bajo. En efecto, los desechos celulares en forma de proteínas, como la hemoglobina en la sangre y otros compuestos como la lactoferrina, inmunoglobulina G (IgG) y la mioglobina se caracterizan por inhibir la actividad de la polimerasa durante la PCR (Radström y Al-soud, 2001).

Adicionalmente, un vez finalizada la extracción de ADN, las muestras se guardaron por 2 meses aproximadamente a 4°C antes de realizar las pruebas moleculares y el almacenamiento por largo tiempo de muestras de ADN impuro, facilita la unión de estos compuestos a la doble hélice del ADN y así también se inhibe la PCR (Singh et al., 2018). Como se mencionó previamente, este problema se resolvió significativamente al diluir las muestras. No se consideró otras opciones para remover los inhibidores de las muestras, como pasos adicionales de purificación del ADN, ya que se debería realizar otra extracción de ADN y la dilución de las muestras era una solución sencilla y rápida. Por

ejemplo, mediante etapas adicionales al protocolo existente de Chelex (Singh et al., 2018), como eliminación de proteínas, precipitación, lavado y re-suspensión del ADN, incrementó 6 veces más el valor 260/230 (0,375 a 2,35) y la concentración aumentó 20 veces más (13,2 ng/ μ L a 275,25 ng/ μ L). Pero estas modificaciones implican un aumento de 5 horas aproximadamente al protocolo estándar de Chelex además de que se debe emplear otro tipo de reactivos y el costo incrementa significativamente.

Posterior a las diluciones el rendimiento de la SnM-PCR mejoró considerablemente (Fig.10), dado que se disminuyó el efecto negativo de los inhibidores. Aun así, había muestras que no amplificaban incluso después de diluirlas. Los frotis de sangre gruesos y finos usados en este estudio, fueron recolectados en los años 2015-2016 y se almacenaron a temperatura ambiente por 1-2 años, sin considerar su uso para realizar una extracción de ADN. La acumulación de polvo y una temperatura ambiental alta, pueden afectar la calidad del ADN (Ng et al., 2018). Además, no es común fijar los frotis gruesos antes de realizar la tinción, pero este paso puede ser esencial para la preservación del ADN. También se ha descrito que las propiedades químicas de la tinción Giemsa pueden actuar como posibles inhibidores en la extracción de ADN y la PCR (Kassaza et al., 2018). Por esta razón, creemos que estas muestras tenían el ADN muy degradado y con varios inhibidores presentes, por cuanto estas muestras no produjeron ninguna amplificación.

Un gran inconveniente encontrado en este estudio para optimizar la SnM-PCR fue la reproducibilidad. A pesar de que las muestras diluidas ya amplificaban y el desempeño de la técnica molecular había mejorado, cuando se repetía una muestra positiva para confirmar el resultado, esta cambiaba a negativa. Este problema se presentaba en las muestras numeradas 4,26 y 34 (Fig.10) que habían dado un resultado positivo por lo menos en 3 ocasiones y también con los controles positivos en ciertas ocasiones (Fig.11). La reproducibilidad de la SnM-PCR puede verse afectada por problemas de contaminación cruzada y

residuos de la misma reacción. Esto es una gran desventaja en la nested PCR (Da Silva, Pedrosa Soares, Medeiros, Medeiros, y de Melo, 2013), en la cual se requiere la apertura de los tubos de la 1ra reacción para utilizar esos amplicones como molde para la 2da reacción, como es el caso de nuestra SnM-PCR. En nuestro caso y a pesar de todas las precauciones tomadas, no se puede descartar esta contaminación. Una vez más, este inconveniente se solucionó diluyendo los productos PCR de la primera reacción. Estudios anteriores han descrito resultados similares al realizar una *nested* PCR con ciertas modificaciones (Montenegro et al., 2004; Picken, Picken, Han, Cheng, y Strle, 1996), en los que inhibidores de la polimerasa se reducen significativamente, al diluir el producto PCR antes de usarlo como molde para la reacción posterior. De esta forma, las diluciones funcionan como un paso de purificación del producto PCR para reducir la presencia de cualquier contaminante.

Determinamos que el factor de dilución 1:100 genera un producto PCR con el mayor rendimiento en comparación con 1:10 y 1:50 (Fig.11). En este ensayo, mientras más se diluía el amplicón mejor era la intensidad de la banda deseada. Esto es lógico ya que la concentración de inhibidores para la PCR se reducen. No se probó factores de dilución superiores, porque ya se obtuvo un resultado adecuado. Esta prueba es crucial para la optimización de la SnM-PCR. Como se observa en el control positivo de *P. falciparum* (Fig.11) y en pruebas anteriores, no se amplificaba la banda de especie y solo se observaba el producto de la primera PCR (~800pb), la banda del genero *Plasmodium*. En este caso, es probable que la polimerasa se inhibió significativamente y no se consumió el producto de PLF-UNR. También ocurría que se producían múltiples amplificaciones inespecíficas. Esto indicaba que el desempeño de la polimerasa se veía afectado y no se generaban resultados reproducibles, ni si quiera con los controles positivos que no tienen inhibidores, por lo menos antes de realizar la segunda reacción. Este problema era más notorio con las muestras, ya que poseen una mayor cantidad de inhibidores antes de realizar la SnM-PCR. De hecho, ya que el magnesio es un cofactor indispensable para la actividad de la

polimerasa, cualquier residuo de Chelex en las muestras puede captar estos iones de magnesio, inhibiendo la actividad de la enzima (Bessetti, 2007).

A pesar de que se obtuvo el producto PCR con un rendimiento adecuado y se redujo las amplificaciones inespecíficas, aun se observan bandas inespecíficas de 200pb en la mayoría de muestras. Desafortunadamente, estas bandas también aumentan su intensidad mientras se incrementaba el factor de dilución en las muestras. La aparición de estas bandas inespecíficas puede ocurrir principalmente, por un exceso en la concentración de cebadores, de polimerasa, de magnesio o una temperatura baja de anillamiento (Thermo Scientific, 2018). Otra razón para esto, es que existen fragmentos de ADN invisibles en la primera reacción, como ADN genómico, amplicones incompletos y dímeros de cebadores. Estos fragmentos pueden resultar en bandas inespecíficas o bandas difusas (*smear*) debido a una segunda ronda de amplificación (Montenegro et al., 2004).

6.4 Eliminación de bandas inespecíficas en la segunda reacción SnM-PCR

Ante esta situación y con el objetivo de eliminar estas bandas inespecíficas diseñamos y realizamos una singleplex-PCR (Fig.12), para obtener únicamente la banda de la especie de *Plasmodium* y eliminar cualquier banda inespecífica. La banda de 200pb podría generarse porque los cebadores no son suficientemente específicos (Thermo Scientific, 2018). De esta forma se descartaba la opción, de que la concentración de cebadores produce esta banda indeseada. Como no se obtuvo este resultado, se asume que una reducción en la concentración de cebadores puede eliminar esta banda.

Al comparar la banda inespecífica de los controles positivos con las muestras, se puede ver que es más tenue con C+(F) y C+(V). Este resultado revela que el uso del multiplex PCR no es el problema y de hecho parece aumentar la

especificidad de la SnM-PCR. Una razón para esto, es que los cebadores compiten entre sí mismos por el mismo molde (Henegariu et al., 1997). En este caso, los cebadores VIR, FAR, MAR y OVR compiten por el producto de PLF-UNR. Por otro lado, las muestras que poseen los cebadores PLF-VIR y PLF-FAR, no tienen una competencia con otros cebadores por el mismo producto. Como estos cebadores pueden encontrar y adherirse al amplicón de PLF-UNR con mayor facilidad que en una multiplex PCR, es posible que este producto PCR se consume completamente y cualquier exceso de los cebadores FAR y VIR se adhieren inespecíficamente a regiones similares de PLF-UNR (Rubio et al., 2002). Esto explicaría el aumento de intensidad de este amplicón inespecífico de 200pb en las muestras con singleplex PCR. En cambio cuando existe una mayor competencia por el molde de la primera reacción, el exceso de cebadores tiene un menor efecto en la generación de bandas inespecíficas, ya que el producto PLF-UNR posiblemente no se consume en su totalidad y se reduce la opción de que los cebadores se adhieran a otras regiones.

La formación de bandas inespecíficas puede ocurrir en ciertas ocasiones, al emplear cebadores degenerados en ensayos de nested PCR, en especial cuando se extraen ácidos nucleicos de tejidos y otros especímenes de alta complejidad (Allan Nix, Oberste, y Pallansch, 2006). Aunque en este estudio no se utilizó cebadores degenerados, la extracción de ADN se realizó a partir de frotis de sangre, un tejido de alta complejidad, por lo que se facilita las amplificaciones inespecíficas. La proporción del ADN deseado (*Plasmodium*) y no deseado (humano) también es importante, y en muestras donde el ADN no deseado es extremadamente abundante, la generación de bandas dobles se observa frecuentemente, provocado por productos PCR no específicos del ADN no deseado (Naqib et al., 2018). Por lo tanto, las muestras de frotis sangre de esta investigación, donde el ADN humano supera enormemente al ADN de *Plasmodium*, tienen las condiciones para que la aparición de bandas inespecíficas se favorezca. Esto empeora cuando se usa un exceso en la concentración de cebadores (Śpibida et al., 2017).

Un subsiguiente experimento reduciendo la concentración de cebadores PLF, FAR y VIR (Fig.13) produjo los mejores resultados y eliminó la banda inespecífica de ~200pb. No se redujo la concentración de los cebadores OVR y MAR (0,2 μ M), ya que estaban en el límite inferior de lo recomendado (0,2 μ M-1,0 μ M) utilizando la polimerasa Phusion High-Fidelity (Thermo Scientific, 2018). Por otra parte, inicialmente se usaban los cebadores PLF (1,5 μ M), VIR (1,4 μ M) y FAR (1,2 μ M) en exceso para aumentar el rendimiento de la SnM-PCR dado que se producían fragmentos PCR con una intensidad muy baja o no se producía ninguna amplificación (Fig.9). Pero como ya se mencionó, el problema de rendimiento de la técnica molecular se debía a la presencia de inhibidores y no a la concentración de cebadores.

Encontramos que la mejor concentración de cebadores, con la que se amplifica los moldes de *P. falciparum* y *P. vivax* sin ninguna banda inespecífica, son: 1,0 μ M para PLF, 0,8 μ M para VIR, 0,6 μ M para FAR y 0,2 μ M para OVR y MAR. A pesar de estos resultados, se observa un *smear* de alto peso molecular en todas las muestras y los controles positivos. Este *smear* no aparecía en pruebas anteriores, por lo que se asume que este problema se debe a una contaminación cruzada.

6.5 SnM-PCR optimizada

Con el experimento observado en la Fig. 14, se había optimizado la SnM-PCR. Ya que amplificaron los productos PCR deseados para cada muestra con un alto rendimiento, no se observa bandas inespecíficas, no hay contaminación en el control negativo, amplificaron los controles positivos y se reprodujo los mismos resultados positivos con las muestras utilizados, de ensayos anteriores.

Observamos dos muestras (378 y 572) que presentan una posible co-infección de *P. falciparum* y *P. vivax*. El fragmento PCR de 495pb, que corresponde a *P. vivax* tiene una baja intensidad, mientras que el otro fragmento de 395pb de *P. falciparum*, presenta una alta intensidad. Por esta variación en la intensidad de estas bandas no se puede confirmar que es una co-infección de estas especies, dado que en estudios anteriores (Rubio et al., 2002; Rubio et al., 1999) la presencia de una doble o triple infección, debe presentar la banda de cada especie con la misma intensidad. Además de esto, se ha obtenido este resultado por segunda vez, así que falta un mayor número de repeticiones para confirmarlo. Sin embargo, esta banda de 495pb (*P. vivax*) no se había observado en ninguna de las muestras, cuando estaba presente la otra banda de *P. falciparum* (395pb), solo se detectaba una especie u otra. En este contexto, no se la considera una banda inespecífica, dado que ninguna de las pruebas anteriores (Fig.10, 11, 12) con amplificaciones inespecíficas ha generado este resultado. Las bandas inespecíficas se observan como productos de 200pb, 300pb y 1000pb. Tampoco se observa ningún amplicón inespecífico en las otras muestras, en los controles positivos o en el control negativo. Adicionalmente, las muestras 378 y 572 son negativas por microscopía, y una de las grandes desventajas de este método, es la identificación de co-infecciones (Rubio et al., 1999; Snounou et al., 1993), así que estos resultados pueden ser falsos negativos. Por lo tanto, las muestras 378 y 572 son potenciales co-infecciones, que si se han demostrado en otros países y en el Ecuador (Sáenz et al., 2017).

Finalmente, como método adicional para verificar la identificación de especies determinado por la SnM-PCR, secuenciamos los fragmentos PCR de las muestras 442 (*P. vivax*) y 325 (*P. falciparum*). Los resultados del alineamiento global (Anexo 3, 4) indican que estas muestras generan productos PCR que corresponden a la amplificación del gen 18S ARN. Mediante un alineamiento BLAST (Anexo 5, 6) se observa que la secuencia de la muestra 442, tiene un 99% de identidad con *P. vivax* y la secuencia de la muestra 325, presenta un 97% de identidad con *P. falciparum*. Esto indica que los amplicones de estas muestras corresponden verdaderamente a estas especies, y este resultado es el

mismo que el de la SnM-PCR. Con los resultados del alineamiento de estas secuencias, se comprueba que la SnM-PCR detecta y las distingue entre las especies *Plasmodium*, así esta técnica está estandarizada.

6.6 Identificación de especies

En Ecuador, *P. vivax* y *P. falciparum* son las especies predominantes y en las regiones endémicas ambas especies coexisten (MSP, 2018). Se reportó que el 67% de infecciones son provocadas por *P. vivax* y el 33% por *P. falciparum* (Tabla 6). De acuerdo a nuestros resultados y comparaciones hubo diferencias en la identificación de especies entre ambos métodos. Más aun, se obtiene el mayor número de muestras identificadas como *P. falciparum* (17) por la SnM-PCR a partir de las placas sin identificación de especie.

Existe la posibilidad de que la información de especie en las placas positivas, se haya perdido o dañado durante su conservación. El problema de conservación de las placas es un gran limitante para este estudio, ya que no hay la misma información para todas las muestras o las placas se encuentran en muy mal estado.

Otra posible explicación de la ausencia de datos sobre la identificación de especie en algunas placas positivas, es porque no se realizó un diagnóstico de especie, por la dificultad de identificar especies por microscopía (Di Santi et al., 2004). Además, las placas positivas sin especie normalmente no indicaban una carga parasitaria, comprobando que no se completó el diagnóstico (Nankabirwa et al., 2009). También había casos en los que solo se detectaba la infección y se agregaba la carga parasitaria, o se identificaba la especie y no se indicaba la carga parasitaria. La razón para no identificar la especie de malaria, se debe a las condiciones del laboratorio donde se revisan las placas, de la disponibilidad de un microscopista competente o la calidad del frotis de sangre (Edson, Glick, y Massey, 2010). Como se observa en estos resultados (Tabla 6), hay un 33,33%

de placas positivas sin identificar (32/96). Adicionalmente, de todas las placas positivas por microscopía (Anexo 1), el 39,34% (131/333) no tiene un diagnóstico completo. Esto indica que es probable que el 39,34% de laboratorios no poseen instalaciones necesarias para identificar especies de malaria. Las placas que solo han sido detectadas con *Plasmodium*, deben ser enviadas a un laboratorio de referencia para identificar la especie (SNEM, 2008). Esto es un problema porque los laboratorios de referencia se encuentran fuera de zonas rurales, alejados de los centros de salud donde se realiza el diagnóstico inicial (SNEM, 2013). Más aun, esto también revela que en ~40% de los diagnósticos de malaria por microscopía, en base a las placas analizadas de este estudio, existe la posibilidad de que no haya el personal adecuado para realizar estos diagnósticos.

Todos estos factores tienen una influencia significativa en la sensibilidad y especificidad de la microscopía, dado que el personal sin suficiente experiencia genera un mayor número de falsos positivos y negativos (Diallo et al., 2018; Mekonnen, Aseffa, Medhin, Berhe, y Velavan, 2014; Nankabirwa et al., 2009; Yitbarek, Nega, Tasew, Taye, y Desta, 2016).

Otros estudios también han demostrado errores de identificación entre diferentes especies de *Plasmodium* por microscopía. Un estudio en Etiopia (Mekonnen et al., 2014) comparó la microscopía y la nested PCR; de los casos examinados por microscopía, con la nested PCR se determinó que el 24,4% de casos identificados como *P. falciparum* correspondían a *P. vivax* y de los casos identificados como *P. vivax*, el 10,7% se confirmaron como *P. falciparum*. Esto resultó en un error de tratamiento para estos pacientes, lo que pudo afectar su calidad de vida considerablemente y aumenta el riesgo de mortalidad. Otro estudio en Malasia (Barber et al., 2013) comparó la precisión de los diagnósticos por microscopía, entre laboratorios de referencia y de rutina. Se determinó que el 30% y 7,5% de casos identificados como *P. vivax*, se diagnosticaron posteriormente como *P. malariae* y *P. knowlesi*. Al no identificar correctamente

las especies de *Plasmodium*, estos portadores funcionan como reservorios de infección, para mosquitos que recién han eclosionado (Laishram et al., 2012). El error en la identificación de especies por microscopía es común en infecciones asintomáticas debido a su baja parasitemia y causada principalmente por *P. falciparum*. En países donde la malaria es endémica, una gran proporción de infecciones son asintomáticas (Wang et al., 2014). Esto concuerda con los resultados de nuestro estudio, ya que *P. falciparum* es la especie que más errores de identificación produce con la microscopía. En general, el desempeño es menor en la identificación que en la detección, de los participantes que realizan los diagnósticos de malaria por microscopía (Edson et al., 2010; Mekonnen et al., 2014; Nankabirwa et al., 2009; Yitbarek et al., 2016). Así se sustenta la explicación de porqué hay un 40% de placas sin la identificación de especie y de los errores de diagnóstico por microscopía.

Una de las grandes ventajas de la SnM-PCR sobre la microscopía que se evidencia con estos resultados, es que se puede generar un diagnóstico más eficiente, especialmente para la identificación de especies con bajos niveles de parasitemia y esto tiene un impacto significativo en el tratamiento del paciente. Además, con el 33,33% de placas positivas sin la identificación de especie, las cuales si se identificaron con la SnM-PCR, se puede realizar un diagnóstico completo en 5 horas aproximadamente. Esto mejoraría considerablemente el tiempo de respuesta para los pacientes, ya que no se debe enviar los resultados a un laboratorio de referencia.

6.7 Sensibilidad y especificidad de la SnM-PCR

La sensibilidad y especificidad de la SnM-PCR son 28,8% y 94,4% con un intervalo de confianza al 95% (Tabla 7). Primero, este valor tan bajo de sensibilidad puede explicarse por la extracción de ADN con Chelex-100. Nuevamente, a pesar de que este método de extracción es rápido, económico y produce una elevada cantidad de material genético (Tabla 4) (Singh et al., 2018),

las impurezas, contaminantes e inhibidores de la PCR/polimerasa presentes en el extracto de ADN reducen considerablemente el desempeño de la SnM-PCR. Este problema ya se discutió previamente, y una vez más, incluso después de optimizar esta técnica (Fig.13), había muestras que no generaban ninguna amplificación. En efecto, 96 de 333 muestras positivas amplificaron y el resto (237) dieron un resultado negativo.

En un estudio (Cnops, Van Esrobeck, Bottieau, y Jacobs, 2010) que evaluó el uso de frotis de sangre como fuente de ADN de *Plasmodium* para una qPCR, se ha descrito que el método de Chelex no produce ADN detectable de parásito o humano. Para la qPCR, es necesario el uso de un ADN altamente purificado. Otro estudio (Scopel, Fontes, Nunes, Horta, y Braga, 2004) también explicó la importancia de obtener un ADN de alta calidad, al realizar una nested PCR para la detección *Plasmodium*. De hecho, este estudio también obtuvo una baja sensibilidad (65%) debido a este problema. La pureza y calidad del ADN de *Plasmodium* obtiene una importancia mucho mayor en una PCR, cuando el nivel de parasitemia es bajo (Di Santi et al., 2004; Edoh, Steiger, Genton, y Beck, 1997; Kimura, Kaneko, Inoue, Ishii, y Tanabe, 1995; Scopel et al., 2004). Esto tiene sentido, ya que existe una cantidad muy baja de ADN del parásito y cualquier pérdida de este material genético influye enormemente en el límite de sensibilidad de la técnica. En este contexto, las placas obtenidas en este proyecto son de los años 2015-2016, por lo que poseen una baja parasitemia (MSP, 2016). Estas son unas de las razones que explican el resultado de sensibilidad de la SnM-PCR.

El uso de frotis de sangre gruesa y fina en placas de vidrio, como fuente de ADN de *Plasmodium*, es un elemento innovador de este proyecto. Una de las ventajas en utilizar los frotis de sangre, es que se pueden realizar diagnósticos microscópicos y moleculares (Alger, Acosta, Lozano, Velasquez, y Labrada, 1996). El almacenaje por largo tiempo de estos frotis, también es otra ventaja, dado que se pueden realizar estudios retrospectivos. Por ejemplo, los frotis

archivados permiten determinar cambios en la infección por nuevas especies o la progresión de resistencia a las drogas (Kassaza et al., 2018). De todos modos, esta fuente de ADN de *Plasmodium* puede tener efectos negativos y positivos. Cuando la calidad del frotis y la cantidad de sangre son bajas, esto afecta la amplificación de la PCR (Cnops et al., 2010; Di Santi et al., 2004; Scopel et al., 2004). En este caso, la mayoría de frotis usados en este estudio presentaban de 20-40 μ L de sangre, por lo que había una cantidad relativamente alta de sangre en las placas. Por otra parte, la calidad de los frotis de sangre era baja. Esto pudo ocurrir por su mala conservación y no necesariamente por cómo se los realizó. Sin embargo, había placas en las que el frotis grueso y fino se mezclaba, se observaba una coloración Giemsa excesiva, había frotis finos fijados y no fijados. Esto afecta directamente a la sensibilidad de la SnM-PCR. Por el contrario, los efectos negativos de un frotis de baja calidad o con poca sangre, son reducidos al purificar el ADN (Cnops et al., 2010; Kassaza et al., 2018). El proceso de raspado de los frotis también influencia en la PCR, dado que se puede perder cierta cantidad de ADN del parásito en este procedimiento (Scopel et al., 2004). Este factor no es significativo para este estudio, ya que el proceso de raspado se lo realizó asegurándose de adquirir todo el material biológico en la placa.

Todo esto indica que al utilizar frotis de sangre con un nivel bajo de parasitemia, la clave está en el método de extracción de ADN. Se puede aumentar el número de muestras amplificadas por la SnM-PCR utilizando otro método de extracción diferente al Chelex, uno que involucre un paso de purificación de ADN para aumentar su integridad. Ahora, a pesar de que la extracción de ADN tuvo un impacto significativo en la sensibilidad de la SnM-PCR, este resultado también indica que se pueden generar un gran número de falsos positivos por microscopía. Como se mencionó anteriormente, aproximadamente un 40% de laboratorios carece de instalaciones apropiadas y no se tiene personal con alta experticia. Adicionalmente, la generación de falsos positivos por la microscopía es común con bajos niveles de parasitemia y frotis de sangre de baja calidad, como es el caso de nuestro estudio (Makuuchi, Jere, Hasejima, Chigeda, y

Gausi, 2017; Wongsrichanalai, Barcus, Muth, Sutamihardja, y Wernsdorfer, 2007). Este tipo de problemas generados por el diagnóstico microscópico ya se ha presentado en otras investigaciones (Barber et al., 2013; Diallo et al., 2018; Rodulfo, De Donato, Mora, González, y Contreras, 2007; Yitbarek et al., 2016).

La SnM-PCR tiene una buena especificidad (94,0%) al contrario de su sensibilidad. Este valor se obtiene por la detección de 19 muestras positivas (falsos negativos), entre las muestras negativas por microscopía. Este resultado es similar a otro estudio en Uganda en el que también utilizó ADN de *Plasmodium* a partir de frotis de sangre y obtuvo una especificidad del 96,7% y sensibilidad del 93% con una qPCR; los frotis de sangre de este estudio se originan de pacientes asintomáticos con niveles bajos de parasitemia y la capacidad de detectar ADN de *Plasmodium* en las muestras negativas por microscopía, se debe a una mejor sensibilidad de la PCR (Kassaza et al., 2018). Los frotis analizados por la SnM-PCR también presentan escasos parásitos y por esto se pudo detectar falsos negativos. La diferencia de sensibilidad (28,8% y 93%) se debe a que aplicaron un protocolo de purificación de ADN en base a columnas y así se mejoró su integridad.

Una vez más, esto refleja la importancia del método de extracción de ADN. En otro estudio en Venezuela en el que se compara la microscopía, la PCR y RDT, se obtiene una especificidad del 100% para la PCR. De 295 muestras examinadas, el único método que produjo falsos negativos (6) fue la microscopía (Rodulfo et al., 2007). Esto es consistente con los resultados obtenidos por la SnM-PCR. Adicionalmente, en este estudio también se explica que la presencia de los falsos negativos por la microscopía, se debe al nivel de entrenamiento de los microscopistas, especialmente cuando se analizan placas con una baja parasitemia. Esto concuerda con nuestras observaciones y también explica los falsos negativos obtenidos.

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1 Conclusiones

El objetivo general de esta investigación de -Estandarizar y aplicar una semi-nested multiplex PCR (SnM-PCR) para detectar e identificar diferentes especies de *Plasmodium* desde frotis de muestras de sangre humana- se cumplió en toda su extensión. Esto fue posible gracias al apoyo de las autoridades centrales y de la dirección general de investigaciones de la UDLA. Además, del personal técnico y la disponibilidad del material y reactivos que ameritó el desarrollo de esta técnica en éstos laboratorios de investigación. Es importante mencionar que la estandarización de la SnM-PCR en *Plasmodium*-Malaria es la primera en realizarse en estos laboratorios y en el Ecuador.

Posteriormente, la aplicación del método SnM-PCR desarrollado se realizó en muestras de sangre tomadas en personas sospechosas de presentar malaria desde la Amazonia, gracias a la colaboración con las instituciones del estado como es el INSPI ubicado en el Tena-Napo. Además, gracias a la participación del Ministerio de salud (MSP) que a través de sus trabajadores de malaria tomaron las muestras de sangre, cumpliendo así el objetivo específico de - Determinar y comparar la sensibilidad y especificidad de la técnica molecular con la microscopía de luz como método de diagnóstico para malaria-.

Para el cumplimiento del objetivo específico de -Optimizar la técnica de la semi-nested multiplex PCR- El desarrollo y estandarización del método de SnM-PCR para la detección de *Plasmodium* causantes de la malaria fue posible por la certeza en la selección de los cebadores adecuados y de los varios experimentos desarrollados hasta la consecución de las mejores condiciones para el método en la obtención de los amplicones para el género *Plasmodium* y para las especies de *P. vivax* y *P. falciparum*.

Con el desarrollo y la estandarización del método SnM-PCR se logró la diferenciación claramente entre las 2 especies de Plasmodios presentes en el Ecuador con bandas muy bien diferenciadas. Este logro se podría aplicar en el futuro en estudios epidemiológicos retrospectivos y prospectivos de diagnóstico e identificación de la (s) especies infectantes. Además, este método podría aplicarse en muestras de mosquitos para la incriminación como vectores de *Plasmodium* y sus especies. Así como de la distribución de especies de *Plasmodium* en las diferentes regiones geográficas del país, creando un mapa epidemiológico.

Con los datos obtenidos de diagnóstico e identificación de especies por SnM-PCR concluimos que la infección por *Plasmodium* está presente en la región amazónica estudiada y que las especies son *P. vivax* y *P. falciparum* y su distribución es superpuesta de las 2 especies en toda la Amazonia.

En relación a la sensibilidad y especificidad, se obtuvo una baja sensibilidad y buena especificidad para la SnM-PCR con ADN de frotis de sangre. Existen limitaciones en este estudio como la falta de información en las placas, la variación en la calidad de los frotis de sangre, su estado de conservación y el método de extracción de ADN por Chelex. Estos problemas en conjunto ocasionan gran número de falsos negativos con la técnica molecular en relación a la microscopia. Sin embargo, la SnM-PCR detecto varias muestras positivas en negativos a la microscopia.

Entre otras conclusiones, se demostró que fue posible utilizar frotis de sangre como fuente de ADN para la PCR. Esto es importante, ya que se puede realizar estudios retrospectivos en base a muestras archivadas. Se puede reducir la subjetividad de la microscopía aplicando esta técnica molecular en conjunto, y de esta forma se puede mejorar la eficiencia del diagnóstico para malaria. En especial para identificar o diferenciar especies de malaria, ya que con bajos

niveles de parasitemia existe una mayor probabilidad de error con la microscopía. Se puede verificar o descartar los resultados de la microscopía, en especial con muestras negativas, ya que como se ha demostrado se producen falsos negativos.

Fue posible analizar 96 muestras (96 pocillos en el termociclador) en unas 5 horas aproximadamente, lo que es potencialmente más rápido que los diagnósticos microscópicos. Además, con la SnM-PCR se realiza un diagnóstico completo y no es necesario enviar los resultados a un laboratorio de referencia. De esta forma se aumenta la velocidad del diagnóstico, se mejora la calidad de vida de los pacientes y se mejora el control de esta enfermedad, al detectar pacientes asintomáticos que pueden ser reservorios de infección para los mosquitos. Esto permitiría que la técnica molecular tenga usos potenciales para el diagnóstico de malaria en Ecuador.

7.2 Recomendaciones

La pureza e integridad del ADN son esenciales para la SnM-PCR. Estos factores cobran mayor importancia, cuando se obtiene el ADN de *Plasmodium* a partir de frotis de sangre en placas de vidrio, con bajos niveles de parasitemia. Se recomienda aplicar un método de extracción de ADN el cual involucre un protocolo de purificación. De esta forma se obtiene un ADN de alta calidad, el cual mejora significativamente el desempeño de la PCR. Si esto no es posible, se debe conservar el frotis fino o una fracción del frotis grueso de la placa, ya que se puede perder esta muestra después de realizar la extracción de ADN. Es crucial realizar un protocolo de purificación posteriormente, en caso de que se utilice un método de extracción como el Chelex. También es importante considerar el tiempo de almacenaje de las muestras después de su extracción, ya que las muestras impuras se degradan con mayor rapidez. Finalmente, usar una polimerasa como Phusion High-Fidelity es aconsejable, ya que los frotis de sangre poseen inhibidores intrínsecos y este tipo de polimerasa posee una

mayor resistencia a los inhibidores, lo que facilita el proceso de optimización de la PCR.

REFERENCIAS

- Abba, K., Kirkham, A. J., Olliaro, P. L., Deeks, J. J., Donegan, S., Garner, P., y Takwoingi, Y. (2014). *Rapid diagnostic tests for diagnosing uncomplicated non- falciparum or Plasmodium vivax malaria in endemic countries*. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (12), CD011431. Doi: 10.1002/14651858.CD011431.
- Ahmed, M. A., y Cox-Singh, J. (2015). *Plasmodium knowlesi - an emerging pathogen*. *ISBT Science Series*, 10(S1), 134–140. Doi: 10.1111/voxs.12115
- Alger, J., Acosta, M. C., Lozano, C., Velasquez, C., y Labrada, L. A. (1996). *Stained smears as a source of DNA*. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 91(5), 589–591. Doi: 10.1590/S0074-02761996000500009
- Allan Nix, W., Oberste, M. S., y Pallansch, M. A. (2006). *Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens*. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(8), 2698–2704. Doi: 10.1128/JCM.00542-06
- Antinori, S., Galimberti, L., Milazzo, L., y Corbellino, M. (2012). *Biology of human malaria plasmodia including Plasmodium knowlesi*. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 4(1). Doi: 10.4084/MJHID.2012.013
- Ariey, F., Witkowski, B., Amaratunga, C., Beghain, J., Langlois, A.-C., y Khim, N. (2014). *A molecular marker of artemisinin- resistant Plasmodium falciparum malaria*. *Nature*, 000(0), 1–18. Doi: 10.1111/j.1461-0248.2004.00684.x
- Barber, B. E., William, T., Grigg, M. J., Yeo, T. W., y Anstey, N. M. (2013). *Limitations of microscopy to differentiate Plasmodium species in a region co-endemic for Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax and Plasmodium knowlesi*. *Malaria Journal*, 12(1), 1. Doi: 10.1186/1475-2875-12-8

- Besetti, J. (2007). *An Introduction to PCR Inhibitors*. *Promega Notes*, 9–10. Doi: 10.1161/STROKEAHA.109.559013
- Besteiro, S., Dubremetz, J. F., y Lebrun, M. (2011). *The moving junction of apicomplexan parasites: A key structure for invasion*. *Cellular Microbiology*, 13(6), 797–805. Doi: 10.1111/j.1462-5822.2011.01597.x
- Bhanot, P., Schauer, K., Coppens, I., y Nussenzweig, V. (2005). *A surface phospholipase is involved in the migration of Plasmodium sporozoites through cells*. *Journal of Biological Chemistry*, 280(8), 6752–6760. Doi: 10.1074/jbc.M411465200
- BioTek. (2001). *Nucleic Acid Purity Assessment using A260/A280 Ratios*. Doi: 10.1016/j.resuscitation.2007.06.020
- Blandin, S., Shiao, S.-H., Moita, L. F., Janse, C. J., Waters, A. P., Kafatos, F. C., y Levashina, E. A. (2004). *Complement-Like Protein TEP1 Is a Determinant of Vectorial Capacity in the Malaria Vector Anopheles gambiae*. *Cell*, 116, 661–670. Doi: 10.1109/22.392908
- Boddey, J. A., y Cowman, A. F. (2013). *Plasmodium Nesting: Remaking the Erythrocyte from the Inside Out*. *Annual Review of Microbiology*, 67(1), 243–269. Doi: 10.1146/annurev-micro-092412-155730
- Böhlke, K., Pisani, F. M., Vorgias, C. E., Frey, B., Sobek, H., Rossi, M., y Antranikian, G. (2000). *PCR performance of the B-type DNA polymerase from the thermophilic euryarchaeon Thermococcus aggregans improved by mutations in the Y-GG/A motif*. *Nucleic Acids Research*, 28(20), 3910–3917. Doi: 10.1093/nar/28.20.3910
- Bopp, S. E. R., Manary, M. J., Bright, A. T., Johnston, G. L., Dharia, N. V., Luna, F. L., y Winzeler, E. A. (2013). *Mitotic Evolution of Plasmodium falciparum Shows a Stable Core Genome but Recombination in Antigen Families*. *PLoS Genetics*, 9(2), 1–15. Doi: 10.1371/journal.pgen.1003293
- Boyce, R. M., Muiru, A., Reyes, R., Ntaro, M., Mulogo, E., Matte, M., y Siedner, M. J. (2015). *Impact of rapid diagnostic tests for the diagnosis and treatment of malaria at a peripheral health facility in Western Uganda: An*

- interrupted time series analysis. Malaria Journal*, 14(1), 1–7. Doi: 10.1186/s12936-015-0725-0
- Brumpt, E. (1939). *Plasmodium rodhaini. Primate Malariae*, 1939–1940. Recuperado el 23 de Agosto del 2018 de http://mcdinternational.org/trainings/malaria/english/dpdx5/HTML/PDF_Files/PrimateMalariaeChapters/chap_21.pdf
- Capelli, A., Damiani, C., Valzanno, M., Mancini, M. V., Rossi, P., Ricci, I., Chiodera, A., y Favia, G. (2017). *Molecular Diagnosis of Malaria Infection: A Survey in a Hospital in Central Italy. Advances in Biotechnology and Microbiology*, 5(4), 001–004. Doi: 10.19080/AIBM.2017.05.555670
- Carter, R. (2003). *Speculations on the origins of Plasmodium vivax malaria. Trends in Parasitology*, 19(5), 214–219. Doi: 10.1016/S1471-4922(03)00070-9
- Carter, R., y Mendis, K. (2002). *Evolutionary and Historical Aspects of the Burden of Malaria. Yi Qi Yi Biao Xue Bao/Chinese Journal of Scientific Instrument*, 28(9), 564–594. Doi: 10.1128/CMR.15.4.564
- CDC. (2018). *Laboratory diagnosis of malaria Plasmodium spp. DPDx Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern*, 1–4. Doi: 10.1128/AAC.01924-13
- Cnops, L., Van Esrobeck, M., Bottieau, E., y Jacobs, J. (2010). *Giemsa-stained thick blood films as a source of DNA for Plasmodium species-specific real-time PCR. Malaria Journal*, 9(1), 1–7. Doi: 10.1186/1475-2875-9-370
- Collins, W. E., Coatney, G. R., Warren, M., y Contacos, P. (2003). *The Primate malariae*. Doi: 10.1126/science.177.4043.50
- Collins, W. E., y Jeffery, G. M. (1999). *A retrospective examination of sporozoite and trophozoite induced infections with Plasmodium falciparum: Development of parasitologic and clinical immunity during primary infection. Am.J.Trop.Med.Hyg*, 61(1), 4–19. Recuperado el 2 de

Septiembre del 2018 de
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10432041>

- Conway, D. J., Fanello, C., Lloyd, J. M., Al-Joubori, B. M. A. S., Baloch, A. H., Somanath, S. D., y Thomas, A. W. (2000). *Origin of Plasmodium falciparum malaria is traced by mitochondrial DNA. Molecular and Biochemical Parasitology*, 111(1), 163–171. Doi: 10.1016/S0166-6851(00)00313-3
- Cook, J., Aydin-Schmidt, B., González, I. J., Bell, D., Edlund, E., Nassor, M. H., Msellem, M., Ali, A., Martenson, A., y Björkman, A. (2015). *Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for point-of-care detection of asymptomatic low-density malaria parasite carriers in Zanzibar. Malaria Journal*, 14(1), 1–6. Doi: 10.1186/s12936-015-0573-y
- Coppi, A., Tewari, R., Bishop, J. R., Bennett, B. L., Lawrence, R., Esko, J. D., Billker, O., y Sinnis, P. (2007). *Heparan Sulfate Proteoglycans Provide a Signal to Plasmodium Sporozoites to Stop Migrating and Productively Invade Host Cells. Cell Host and Microbe*, 2(5), 316–327. Doi: 10.1016/j.chom.2007.10.002
- Cowman, A. F., Healer, J., Marapana, D., y Marsh, K. (2016). *Malaria: Biology and Disease. Cell*, 167(3), 610–624. Doi: 10.1016/j.cell.2016.07.055
- Cuadros, J., Martín-Rabadán, P., Merino, F. J., Delgado-Iribarren, A., Garcia-Bujalance, S., y Rubio, J. M. (2007). *Malaria diagnosis by NOW ICT and expert microscopy in comparison with multiplex polymerase chain reaction in febrile returned travellers. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 26(9), 671–673. Doi: 10.1007/s10096-007-0337-x
- Cybulski, J. S., Clements, J., y Prakash, M. (2014). *Foldscope: Origami-based paper microscope. PLoS ONE*, 9(6). Doi: 10.1371/journal.pone.0098781
- Da Silva, M. A. L., Pedrosa Soares, C. R., Medeiros, R. A., Medeiros, Z., y de Melo, F. L. (2013). *Optimization of single-tube nested PCR for the diagnosis of visceral leishmaniasis. Experimental Parasitology*, 134(2),

206–210. Doi: 10.1016/j.exppara.2013.03.003

- Das, D. K., Maiti, A. K., y Chakraborty, C. (2015). *Automated system for characterization and classification of malaria-infected stages using light microscopic images of thin blood smears. Journal of Microscopy, 257(3), 238–252.* Doi: 10.1111/jmi.12206
- Das, S., Hertrich, N., Perrin, A. J., Withers-Martinez, C., Collins, C. R., Jones, M. L., Watermeyer, J. M., Fobes, E. T., Martin, S. R., Sabil, H. R., Gavin, W. J., Treeck, M., Epp, C., y Blackman, M. J. (2015). *Processing of Plasmodium falciparum Merozoite Surface Protein MSP1 Activates a Spectrin-Binding Function Enabling Parasite Egress from RBCs. Cell Host and Microbe, 18(4), 433–444.* Doi: 10.1016/j.chom.2015.09.007
- Délicat-Loembet, L., Rougeron, V., Ollomo, B., Arnathau, C., Roche, B., Elguero, E., Moukodoum, N. D., Okugha, A. P., Ondo, B. M., Boundenga, L., Houzé, S., Galan, M., Nkoghé, D., Leroy, E. M., Durand, P., Paupy, C., Renaud, F., y Prugnolle, F. (2015). *No evidence for ape Plasmodium infections in humans in Gabon. PLoS ONE, 10(6), 1–15.* Doi: 10.1371/journal.pone.0126933
- Desjardins, P. R., y Conklin, D. S. (2011). *Microvolume quantitation of nucleic acids. Current Protocols in Molecular Biology, (SUPPL.93), 1–4.* Doi: 10.1002/0471142727.mba03js93
- Di Santi, S. M., Kirchgatter, K., Brunialti, K. C. S. A., Oliveira, A. M., Ferreira, S. R. S., y Boulos, M. (2004). *PCR - Based diagnosis to evaluate the performance of malaria reference centers. Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo, 46(4), 183–187.* Doi: 10.1590/S0036-46652004000400002
- Diallo, M. A., Diongue, K., Seck, M. C., Ndiaye, M., Diallo, I., Diedhiou, Y., Ndiaye, T., Ndiaye, Y. D., Badiane, A. S., y Ndiaye, D. (2018). *Quality control of malaria microscopy reveals misdiagnosed non-falciparum species and other microscopically detectable pathogens in Senegal. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 17(1), 1–8.* Doi: 10.1186/s12941-018-0261-1

- Dondorp, A. M., Nosten, F., Yi, P., Das, D., Phyo, A. P., Tarning, J., y White, N. J. (2009). *Artemisinin Resistance in Plasmodium falciparum Malaria*. *New England Journal of Medicine*, 361(5), 455–467. Doi: 10.1086/657120
- Duval, L., Fourment, M., Nerrienet, E., Rousset, D., Sadeuh, S. A., Goodman, S. M., y Arie, F. (2010). *African apes as reservoirs of Plasmodium falciparum and the origin and diversification of the Laverania subgenus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(23), 10561–10566. Doi: 10.1073/pnas.1005435107
- Edoh, D., Steiger, S., Genton, B., y Beck, H. P. (1997). *PCR amplification of DNA from malaria parasites on fixed and stained thick and thin blood films*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 91(3), 361–363. Doi: 10.1016/S0035-9203(97)90109-7
- Edson, D. C., Glick, T., y Massey, L. D. (2010). *Detection and Identification of Malaria Parasites: A Review of Proficiency Test Results and Laboratory Practices*. *Laboratory Medicine*, 41(12), 719–723. Doi: 10.1309/LM0KC4BEYHGDSZCU
- Elnifro, E. M., Ashshi, A. M., Cooper, R. J., y Klapper, P. E. (2000). *Multiplex PCR: Optimization and application in diagnostic virology*. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(4), 559–570. Doi: 10.1128/CMR.13.4.559-570.2000
- Escalante, A. A., y Ayala, F. J. (1994). *Phylogeny of the malarial genus Plasmodium, derived from rRNA gene sequences*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(24), 11373–11377. Doi: 10.1073/pnas.91.24.11373
- Escalante, A. A., Cornejo, O. E., Freeland, D. E., Poe, A. C., Durrego, E., Collins, W. E., y Lal, A. A. (2005). *A monkey's tale: The origin of Plasmodium vivax as a human malaria parasite*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(6), 1980–1985. Doi: 10.1073/pnas.0409652102
- Gao, F., Balles, E., Robertson, D. L., Chen, Y., Rodenburg, C. M., Michael, S. F.,

- y Hahn, B. H. (1999). *Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes*. *Nature*, 397(6718), 436–441. Doi: 10.1038/17130
- Garnham, P. C. (1966). *Malaria Parasites and Other Haemosporidia*, 1966. Recuperado el 12 de Septiembre del 2018 de <http://science.sciencemag.org/content/157/3792/1029.2>
- Harbach, R. E. (2013). *The Phylogeny and Classification of Anopheles. Anopheles Mosquitoes - New Insights into Malaria Vectors*, 3–55. Doi: 10.5772/54695
- Hawkins, K., Burton, R., y Labarre, P. (2014). *Diagnostics to support malaria elimination: Choosing an appropriate biomarker to target the subclinical Plasmodium falciparum transmission reservoir. Proceedings of the 4th IEEE Global Humanitarian Technology Conference, GHTC 2014*, 561–568. Doi: 10.1109/GHTC.2014.6970339
- Hay, S. I., Sinka, M. E., Okara, R. M., Kabaria, C. W., Mbithi, P. M., Tago, C. C., y Godfray, H. C. J. (2010). *Developing global maps of the dominant anopheles vectors of human malaria. PLoS Medicine*, 7(2), 1–6. Doi: 10.1371/journal.pmed.1000209
- Hedrick, P. W. (2011). *Population genetics of malaria resistance in humans. Heredity*, 107(4), 283–304. Doi: 10.1038/hdy.2011.16
- Henegariu, O., Heerema, N. A., Dlouhy, S. R., Vance, G. H., y Vogt, P. H. (1997). *Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step protocol. BioTechniques*, 23(3), 504–511. Doi: 10.1007/BF00928712
- Herrera, R., Anderson, C., Kumar, K., Molina-Cruz, A., Nguyen, V., Burkhardt, M., y Naruma, D. L. (2015). *Reversible conformational change in the plasmodium falciparum circumsporozoite protein masks its adhesion domains. Infection and Immunity*, 83(10), 3771–3780. Doi: 10.1128/IAI.02676-14
- Hill, S. M., y Crampton, J. M. (1994). *DNA-based methods for the identification of insect vectors. Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 88(3), 227–250. Doi: 10.1080/00034983.1994.11812864

- Holder, A. A. (1994). *Proteins on the surface of the malaria parasite and cell invasion*. *Parasitology*, 108(S1), S5–S18. Doi: 10.1017/S0031182000075673
- Holt, R. A., Holt, R. A., Subramanian, G. M., Halpern, A., Sutton, G. G., Charlab, R., y Brey, P. T. (2002). *The Genome Sequence of the Malaria Mosquito Anopheles gambiae*, 298. Doi: 10.1126/science.1076181
- Hopkins, H., González, I. J., Polley, S. D., Angutoko, P., Ategeka, J., Asiimwe, C., y 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*. *Journal of Infectious Diseases*, 208(4), 645–652. Doi: 10.1093/infdis/jit184
- Howes, R. E., Patil, A. P., Piel, F. B., Nyangiri, O. A., Kabaria, C. W., Gething, P. W., y Hay, S. I. (2011). *The global distribution of the Duffy blood group*. *Nature Communications*, 2(1). Doi: 10.1038/ncomms1265
- Imwong, M., Hanchana, S., Malleret, B., Rénia, L., Day, N. P. J., Dondorp, A., y White, N. J. (2014). *High-throughput ultrasensitive molecular techniques for quantifying low-density malaria parasitemias*. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(9), 3303–3309. Doi: 10.1128/JCM.01057-14
- Ishino, T., Yano, K., Chinzei, Y., y Yuda, M. (2004). *Cell-passage activity is required for the malarial parasite to cross the liver sinusoidal cell layer*. *PLoS Biology*, 2(1), 77–84. Doi: 10.1371/journal.pbio.0020004
- Joice, R., Nilsson, S. K., Montgomery, J., Dankwa, S., Egan, E., Morahan, B., y Marti, M. (2014). *Plasmodium falciparum transmission stages accumulate in the human bone marrow*. *Science Translational Medicine*, 6(244). Doi: 10.1126/scitranslmed.3008882
- Kafsack, B. F. C., Rovira-Graells, N., Clark, T. G., Bancells, C., Crowley, V. M., Campino, S. G., y Llinás, M. (2014). *A transcriptional switch underlies commitment to sexual development in malaria parasites*. *Nature*, 507(7491), 248–252. Doi: 10.1038/nature12920
- Kain, K. C., Harrington, M. A., Tennyson, S., y Keystone, J. S. (1998). *Imported*

- Malaria: Prospective Analysis of Problems in Diagnosis and Management. Clinical Infectious Diseases*, 27(1), 142–149. Doi: 10.1086/514616
- Kasetsirikul, S., Buranapong, J., Srituravanich, W., Kaewthamasorn, M., y Pimpin, A. (2016). *The development of malaria diagnostic techniques: A review of the approaches with focus on dielectrophoretic and magnetophoretic methods. Malaria Journal*, 15(1). Doi: 10.1186/s12936-016-1400-9
- Kassaza, K., Operario, D. J., Nyehangane, D., Coffey, K. C., Namugosa, M., Turkheimer, L., y Boum, Y. (2018). *Detection of plasmodium species by high-resolution melt analysis of DNA from blood smears acquired in Southwestern Uganda. Journal of Clinical Microbiology*, 56(1), 1–9. Doi: 10.1128/JCM.01060-17
- Kaushansky, A., Douglass, A., Arang, N., Vigdorovich, V., Dambrauskas, N., Kain, H., y Kappe, S. (2015). *Malaria parasites target the hepatocyte receptor EphA2 for successful host infection. Science*, 350, 1089–1092. Recuperado el 23 de Septiembre del 2018 de <http://science.sciencemag.org/content/350/6264/1089.long>
- Kimura, M., Kaneko, O., Inoue, A., Ishii, A., y Tanabe, K. (1995). *Amplification by polymerase chain reaction of Plasmodium falciparum DNA from Giemsa-stained thin blood smears. Molecular and Biochemical Parasitology*, 70(1–2), 193–197. Doi: 10.1016/0166-6851(95)00006-M
- Kloub, A. (2015). *Malaria Case (Early Detection). Journal of Tropical Diseases*, 3(3). Doi: 10.4172/2329891X.1000169
- Krief, S., Escalante, A. A., Pacheco, M. A., Mugisha, L., André, C., Halbwx, M., y Snounou, G. (2010). *On the diversity of malaria parasites in African apes and the origin of Plasmodium falciparum from bonobos. PLoS Pathogens*, 6(2). Doi: 10.1371/journal.ppat.1000765
- Laishram, D. D., Sutton, P. L., Nanda, N., Sharma, V. L., Sobti, R. C., Carlton, J. M., y Joshi, H. (2012). *The complexities of malaria disease*

- manifestations with a focus on asymptomatic malaria. Malaria Journal, 11, 1–15. Doi: 10.1186/1475-2875-11-29*
- Lau, Y. L., Lai, M. Y., Fong, M. Y., Jelip, J., y Mahmud, R. (2016). *Loop-mediated isothermal amplification assay for identification of five human plasmodium species in Malaysia. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 94(2), 336–339. Doi: 10.4269/ajtmh.15-0569*
- Lin, C. S., Uboldi, A. D., Epp, C., Bujard, H., Tsuboi, T., Czabotar, P. E., y Cowman, X. A. F. (2016). *Multiple plasmodium falciparum merozoite surface protein 1 complexes mediate merozoite binding to human erythrocytes. Journal of Biological Chemistry, 291(14), 7703–7715. Doi: 10.1074/jbc.M115.698282*
- Lindblade, K. A., Steinhardt, L., Samuels, A., Kachur, S. P., y Slutsker, L. (2013). *The silent threat: Asymptomatic parasitemia and malaria transmission. Expert Review of Anti-Infective Therapy, 11(6), 623–639. Doi: 10.1586/eri.13.45*
- Liu, W., Li, Y., Learn, G. H., Rudicell, R. S., Robertson, J. D., Keele, B. F., y Beatrice, H. (2011). *Origin of the human malaria parasite Plasmodium falciparum in gorillas, 467(7314), 420–425. Doi: 10.1038/nature09442.Origin*
- Liu, W., Li, Y., Shaw, K., Learn, G., Plenderleith, L., Malenke, J., y Sundararaman, S. (2016). *African origin of the malaria parasite P. vivax, 165(2), 255–269. Doi: 10.1016/j.trsl.2014.08.005.The*
- Livingstone, F. B. (1958). *Anthropological Implications of Sickle Cell Gene Distribution in West Africa. American Anthropologist, 60(3), 533–562. Doi: 10.1525/aa.1958.60.3.02a00110*
- Loy, D. E., Liu, W., Li, Y., Learn, G. H., Plenderleith, L. J., Sundararaman, S. A., y Hahn, B. H. (2017). *Out of Africa: origins and evolution of the human malaria parasites Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax. International Journal for Parasitology, 47(2–3), 87–97. Doi: 10.1016/j.ijpara.2016.05.008*

- Lynch, M. (2010). *Evolution of the mutation rate- Supplementary Material. Trends in Genetics*, 26(8), 345–352. Doi: 10.1016/j.tig.2010.05.003
- Makuuchi, R., Jere, S., Hasejima, N., Chigeda, T., y Gausi, J. (2017). *The correlation between malaria RDT (Paracheck pf.®) faint test bands and microscopy in the diagnosis of malaria in Malawi. BMC Infectious Diseases*, 17(1), 1–9. Doi: 10.1186/s12879-017-2413-x
- Mantel, P. Y., Hoang, A. N., Goldowitz, I., Potashnikova, D., Hamza, B., Vorobjev, I., y Marti, M. (2013). *Malaria-infected erythrocyte-derived microvesicles mediate cellular communication within the parasite population and with the host immune system. Cell Host and Microbe*, 13(5), 521–534. Doi: 10.1016/j.chom.2013.04.009
- Marsh, K., Forster, D., Waruiru, C., Mwangi, I., Winstanley, M., Marsh, V., y Snow, R. (1995). *Indicators of Life-Threatening Malaria in African Children. New England Journal of Medicine*, 332(21), 1399–1404. Doi: 10.1056/NEJM199505253322102
- Mbengue, A., Bhattacharjee, S., Pandharkar, T., Liu, H., Estiu, G., Stahelin, R. V., y Haldar, K. (2015). *A molecular mechanism of artemisinin resistance in Plasmodium falciparum malaria. Nature*, 520(7549), 683–687. Doi: 10.1038/nature14412
- McNamara, D. T., Kasehagen, L. J., Grimberg, B. T., Cole-Tobian, J., Collins, W. E., y Zimmerman, P. A. (2006). *Diagnosing infection levels of four human malaria parasite species by a polymerase chain reaction/ligase detection reaction fluorescent microsphere-based assay. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 74(3), 413–421. Doi: 74/3/413 [pii]
- Mekonnen, S. K., Aseffa, A., Medhin, G., Berhe, N., y Velavan, T. P. (2014). *Re-evaluation of microscopy confirmed Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax malaria by nested PCR detection in southern Ethiopia. Malaria Journal*, 13(1), 1–8. Doi: 10.1186/1475-2875-13-48
- Mercereau-Puijalon, O., Barale, J. C., y Bischoff, E. (2002). *Three multigene families in Plasmodium parasites: Facts and questions. International*

Journal for Parasitology, 32(11), 1323–1344. Doi: 10.1016/S0020-7519(02)00111-X

- Miguel-Oteo, M., Jiram, A. I., Ta-Tang, T. H., Lanza, M., Hisam, S., y Rubio, J. M. (2017). *Nested multiplex PCR for identification and detection of human Plasmodium species including Plasmodium knowlesi*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10(3), 299–304. Doi: 10.1016/j.apjtm.2017.03.014
- Miller, L. H., Ackerman, H. C., Su, X., y Wellems, T. E. (2013). *Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments*. *Nature Medicine*, 19(2), 156–167. Doi: 10.1038/nm.3073
- Mok, S., Ashley, E. A., Ferreira, P. E., Zhu, L., Lin, Z., Yeo, T., y Chotivanich, K. (2015). *Population transcriptomics of human malaria parasites reveals the mechanism of artemisinin resistance Sachel*. *Science*, 347(6220), 431–435. Doi: doi:10.1126/science.1260403
- Montenegro, L. M. L., Montenegro, R. A., Lima, A. S., Carvalho, A. B., Schindler, H. C., y Abath, F. G. C. (2004). *Development of a single tube hemi-nested PCR for genus-specific detection of Plasmodium in oligoparasitemic patients*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 98(10), 619–625. Doi: 10.5194/adgeo-29-95-2011
- Moody, A. (2002). *Rapid Diagnostic Tests for Malaria Parasites*. *Clinical Microbiology*, 15(1), 66–78. Doi: 10.1128/CMR.15.1.66
- MSP. (2013). *Situación de la malaria en el Ecuador*, 1–18. Recuperado el 3 de Octubre del 2018 de https://www.paho.org/ecu/index.php?option=com_content&view=article&id=98:la-malaria-sigue-siendo-un-desafio-paises-region&Itemid=360
- MSP. (2016). *Malaria*. Recuperado el 5 de Octubre del 2018 de <https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2016/09/GACETA-MALARIA-SE-34.pdf>
- MSP. (2017). *Informe Malaria (SE) 52*. Recuperado el 7 de Octubre del 2018 de <https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2016/09/MALARIA-SE->

4.pdf

- MSP. (2018). Informe Malaria (SE) 31. Recuperado el 15 de Octubre del 2018 de https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2016/09/Malaria-SE-31_2018-1.pdf
- Naing, C., Whittaker, M. A., Nyunt Wai, V., y Mak, J. W. (2014). *Is Plasmodium vivax Malaria a Severe Malaria?: A Systematic Review and Meta-Analysis*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(8). Doi: 10.1371/journal.pntd.0003071
- Nair, S., Williams, J. T., Brockman, A., Paiphun, L., Mayxay, M., Newton, P. N., y Anderson, T. J. C. (2003). *A selective sweep driven by pyrimethamine treatment in Southeast Asian malaria parasites*. *Molecular Biology and Evolution*, 20(9), 1526–1536. Doi: 10.1093/molbev/msg162
- Nankabirwa, J., Zurovac, D., Njogu, J. N., Rwakimari, J. B., Counihan, H., Snow, R. W., y Tibenderana, J. K. (2009). *Malaria misdiagnosis in Uganda implications for policy change*. *Malaria Journal*, 8(1), 1–9. Doi: 10.1186/1475-2875-8-66
- Naqbib, A., Poggi, S., Wang, W., Hyde, M., Kunstman, K., y Green, S. J. (2018). *Making and Sequencing Heavily Multiplexed, High-Throughput 16S Ribosomal RNA Gene Amplicon Libraries Using a Flexible, Two-Stage PCR Protocol*. *Gene Expression Analysis: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* (pp. 143–169). Hertfordshire: Humana Press. Doi: 10.1007/978-1-4939-7834-2
- Neafsey, D. E., Galinsky, K., Jiang, R. H. Y., Young, L., Sykes, S. M., Saif, S., ... Carlton, J. M. (2012). *The malaria parasite Plasmodium vivax exhibits greater genetic diversity than Plasmodium falciparum*, 44(9), 1046–1050. Doi: 10.1038/ng.2373.The
- Ng, H. H., Ang, H. C., Hoe, S. Y., Lim, M. L., Tai, H. E., Soh, R. C. H., y Syn, C. K. C. (2018). *Simple DNA extraction of urine samples: Effects of storage temperature and storage time*. *Forensic Science International*, 287, 36–39. Doi: 10.1016/j.forsciint.2018.03.035

- Nunes-Silva, S., Dechavanne, S., Moussiliou, A., Pstrag, N., Semblat, J. P., Gangnard, S., y Gamain, B. (2015). *Beninese children with cerebral malaria do not develop humoral immunity against the IT4-VAR19-DC8 PfEMP1 variant linked to EPCR and brain endothelial binding*. *Malaria Journal*, 14(1), 1–15. Doi: 10.1186/s12936-015-1008-5
- Obaldia, N., Baro, N. K., Calzada, J. E., Santamaria, A. M., Daniels, R., Wong, W., y Volkman, S. K. (2015). *Clonal outbreak of plasmodium falciparum infection in eastern panama*. *Journal of Infectious Diseases*, 211(7), 1087–1096. Doi: 10.1093/infdis/jiu575
- Okell, L. C., Bousema, T., Griffin, J. T., Ouédraogo, A. L., Ghani, A. C., y Drakeley, C. J. (2012). *Factors determining the occurrence of submicroscopic malaria infections and their relevance for control*. *Nature Communications*, 3, 1–9. Doi: 10.1038/ncomms2241
- Okorie, P. N., McKenzie, F. E., Ademowo, O. G., Bockarie, M., y Kelly-Hope, L. (2011). *Nigeria Anopheles vector database: An overview of 100 years' research*. *PLoS ONE*, 6(12), 6–7. Doi: 10.1371/journal.pone.0028347
- Ongagna-Yhombi, S. Y., Corstjens, P., Geva, E., Abrams, W. R., Barber, C. A., Malamud, D., y Mharakurwa, S. (2013). *Improved assay to detect Plasmodium falciparum using an uninterrupted, semi-nested PCR and quantitative lateral flow analysis*. *Malaria Journal*, 12(1), 1. Doi: 10.1186/1475-2875-12-74
- PAHO. (2014). *Report on the situation of Malaria in the Americas*, 59–61. Doi: 1-4244-1484-9/08/\$25.00
- PAHO. (2018). Actualización Epidemiológica. Aumento de malaria en las Américas, 5. Recuperado el 2 de Noviembre del 2018 de https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docmanytask=doc_view&Itemid=270&gid=43437&lang=es%0Ahttp://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docmanytask=doc_view&Itemid=270&gid=43437&lang=es
- Payne, D. (1988). *Use and limitations of light microscopy for diagnosing malaria*

at the primary health care level. *Bull World Health Organ*, 66(5), 621–626. Recuperado el 23 de Octubre del 2018 de <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2491188ytool=pmcentrezrendertype=abstract>

- Picken, M. M., Picken, R. N., Han, D., Cheng, Y., y Strle, F. (1996). *Single-tube nested polymerase chain reaction assay based on flagellin gene sequences for detection of *Borrelia burgdorferi sensu lato**. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 15(6), 489–498. Doi: 10.1007/BF01691317
- Polley, S. D., González, I. J., Mohamed, D., Daly, R., Bowers, K., Watson, J., y Sutherland, C. J. (2013). *Clinical evaluation of a loop-mediated amplification kit for diagnosis of imported malaria*. *Journal of Infectious Diseases*, 208(4), 637–644. Doi: 10.1093/infdis/jit183
- Prugnolle, F., Durand, P., Neel, C., Ollomo, B., Ayala, F. J., Arnathau, C., y Renaud, F. (2010). *African great apes are natural hosts of multiple related malaria species, including *Plasmodium falciparum**. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(4), 1458–1463. Doi: 10.1073/pnas.0914440107
- Radström, P., y Al-soud, W. A. (2001). *Purification and Characterization of PCR-Inhibitory Components in Blood Cells*. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(2), 485–493. Doi: 10.1128/JCM.39.2.485
- Ramachandran, S., Deshpande, O., Roseman, C. C., Rosenberg, N. A., Feldman, M. W., y Cavalli-Sforza, L. L. (2005). *Support from the relationship of genetic and geographic distance in human populations for a serial founder effect originating in Africa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(44), 15942–15947. Doi: 10.1073/pnas.0507611102
- Rich, S., Licht, M., Hudson, R., y Ayala, F. J. (1998). *Malaria's Eve: Evidence of a recent population bottleneck throughout the world populations of *Plasmodium falciparum**. *Phys. Rev. B*, 59(2), 4425–4430. Recuperado el 2 de Noviembre del 2018 de <https://www.pnas.org/content/95/8/4425>

- Riglar, D. T., Richard, D., Wilson, D. W., Boyle, M. J., Dekiwadia, C., Turnbull, L., y Baum, J. (2011). *Super-resolution dissection of coordinated events during malaria parasite invasion of the human erythrocyte*. *Cell Host and Microbe*, 9(1), 9–20. Doi: 10.1016/j.chom.2010.12.003
- Risco-Castillo, V., Topçu, S., Marinach, C., Manzoni, G., Bigorgne, A. E., Briquet, S., y Silvie, O. (2015). *Malaria sporozoites traverse host cells within transient vacuoles*. *Cell Host and Microbe*, 18(5), 593–603. Doi: 10.1016/j.chom.2015.10.006
- Robles, M., Riofrío, C., Guerrero, J., y Cely, E. (2018). Factores incidentes en el aumento de casos de malaria, (3). Recuperado el 4 de Noviembre del 2018 de <http://www.revistaespirales.com/index.php/es/article/view/374/276>
- Rodrigues, C. D., Hannus, M., Prudêncio, M., Martin, C., Gonçalves, L. A., Portugal, S., y Mota, M. M. (2008). *Host Scavenger Receptor SR-BI Plays a Dual Role in the Establishment of Malaria Parasite Liver Infection*. *Cell Host and Microbe*, 4(3), 271–282. Doi: 10.1016/j.chom.2008.07.012
- Rodulfo, H., De Donato, M., Mora, R., González, L., y Contreras, C. . (2007). *Comparison of the diagnosis of malaria by microscopy, immunochromatography and PCR in endemic areas of Venezuela*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 40(4), 535–543. Recuperado el 10 de Noviembre del 2018 de http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecordyfrom=exportyid=L46605027%0Ahttp://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttextyid=S0100-879X2007000400012yInq=enynrm=isoytInq=en
- Rougemont, M., Saanen, M. Van, Sahli, R., Hinrikson, H. P., Bille, J., y Jatou, K. (2004). *Detection of Four Plasmodium Species in Blood from Humans by 18S rRNA Gene Subunit-Based and Species-Specific Real-Time PCR Assays*, 42(12), 5636–5643. Doi: 10.1128/JCM.42.12.5636
- Rubio, J. M., Benito, A., Berzosa, P. J., Roche, J., Puente, S., Subirats, M., López-Vélez, R., García, L., y Alvar, J. (1999). *Usefulness of seminested multiplex PCR in surveillance of imported malaria in Spain*. *Journal of*

- Clinical Microbiology*, 37(10), 3260–3264. Recuperado el 4 de Agosto del 2018 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC85544/pdf/jm003260.pdf>
- Rubio, J. M., Benito, A., Roche, J., Berzosa, P. J., García, M. L., Micó, M., Edú M., y Alvar, J. (1999). *Semi-nested, multiplex polymerase chain reaction for detection of human malaria parasites and evidence of Plasmodium vivax infection in Equatorial Guinea. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 60(2), 183–187. Recuperado el 10 de Agosto del 2018 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10072133>
- Rubio, J. M., Post, R. J., Docters van Leeuwen, W. M., Henry, M., Lindergard, G., y Hommel, M. (2002). *Diagnosis Alternative polymerase chain reaction method to identify Plasmodium species in human blood samples: the semi-nested multiplex malaria PCR (SnM-PCR). Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene*, 96(S1), 199–204. Doi: 10.1016/S0035-9203(02)90077-5
- Sáenz, F. E., Arévalo-Cortés, A., Valenzuela, G., Vallejo, A. F., Castellanos, A., Poveda-Loayza, A. C., y Herrera, S. (2017). *Malaria epidemiology in low-endemicity areas of the northern coast of Ecuador: High prevalence of asymptomatic infections. Malaria Journal*, 16(1), 1–10. Doi: 10.1186/s12936-017-1947-0
- Sáenz, F. E., Morton, L. C., Okoth, S. A., Valenzuela, G., Vera-Arias, C. A., Vélez-Álvarez, E., y Udhayakumar, V. (2015). *Clonal population expansion in an outbreak of Plasmodium falciparum on the northwest coast of Ecuador. Malaria Journal*, 14(1), 1–10. Doi: 10.1186/s12936-015-1019-2
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., y Johne, R. (2012). *PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. Journal of Applied Microbiology*, 113(5), 1014–1026. Doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x
- Scopel, K., Fontes, C., Nunes, A., Horta, M., y Braga, E. (2004). *Low sensitivity of nested PCR using Plasmodium DNA extracted from stained thick blood smears: An epidemiological retrospective study among subjects with low*

- parasitaemia in an endemic area of the Brazilian Amazon region. Malaria Journal*, 3, 1–6. Doi: 10.1186/1475-2875-3-1
- Singh, U. A., Kumari, M., y Iyengar, S. (2018). *Method for improving the quality of genomic DNA obtained from minute quantities of tissue and blood samples using Chelex 100 resin. Biological Procedures Online*, 20(1), 1–8. Doi: 10.1186/s12575-018-0077-6
- SNEM. (2008). Manual operativo estandar para la gestion del diagnostico microscopico de *Plasmodium*. Recuperado el 25 de Octubre del 2018 de <http://www.orasconhu.org/documentos/ECU%20Anexo%2017I%20PAM AFRO.pdf>
- SNEM. (2013). Proyecto de vigilancia y control de vectores para la prevencion de la transmision de enfermedades metaxenicas en el ecuador. 2013-2017. Recuperado el 12 de Septiembre de <http://www.gp.se/nyheter/göteborg/klart-för-omstritt-livmodersprojekt-1.721564>
- Snounou, G., Viriyakosol, S., Jarra, W., Thaithong, S., y 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. Doi: 10.1016/0166-6851(93)90050-8
- Snounou, G., Viriyakosol, S., Zhu, X. P., Jarra, W., Pinheiro, L., Do rosario, V., y Brown, N. (1993). *High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. Molecular and Biochemical Parasitology*, 61(November), 315–320. Doi: 10.1016/0166-6851(93)90077-B
- Śpibida, M., Krawczyk, B., Olszewski, M., y Kur, J. (2017). *Modified DNA polymerases for PCR troubleshooting. Journal of Applied Genetics*, 58(1), 133–142. Doi: 10.1007/s13353-016-0371-4
- Stoffels, J. A. W., Leeuwen, W. M. D. Van, y Post, R. J. (1995). *Detection of Plasmodium sporozoites in mosquitoes by polymerase chain reaction*

and oligonucleotide rDNA probe, without dissection of the salivary glands. Medical and Veterinary Entomology, 9(4), 433–437. Doi: 10.1111/j.1365-2915.1995.tb00020.x

Straimer, J., Gnädig, N. F., Witkowski, B., Amaratunga, C., Duru, V., Ramadani, A. P., y Fidock, D. A. (2015). *K13-propeller mutations confer artemisinin resistance in Plasmodium falciparum clinical isolates. Science, 347(6220), 428–431. Doi: 10.1126/science.1260867*

Sturm, A., Amino, R., Van De Sand, C., Regen, T., Retzlaff, S., Rennenberg, A., y Heussler, V. T. (2006). *Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. Science, 313(5791), 1287–1290. Doi: 10.1126/science.1129720*

Sundararaman, S. A., Liu, W., Keele, B. F., Learn, G. H., Bittinger, K., Mouacha, F., y Hahn, B. H. (2013). *Plasmodium falciparum-like parasites infecting wild apes in southern Cameroon do not represent a recurrent source of human malaria. Proceedings of the National Academy of Sciences, 110(17), 7020–7025. Doi: 10.1073/pnas.1305201110*

Sundararaman, S. A., Plenderleith, L. J., Liu, W., Loy, D. E., Learn, G. H., Li, Y., y Hahn, B. H. (2016). *Genomes of cryptic chimpanzee Plasmodium species reveal key evolutionary events leading to human malaria. Nature Communications, 7, 1–14. Doi: 10.1038/ncomms11078*

Suzuki, Y., y Gojobori, T. (1997). *The origin and evolution of Ebola and Marburg viruses. Molecular Biology and Evolution, 14(8), 800–806. Recuperado el 17 de Noviembre de <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JSyPAGE=referenceyD=emed4yNEWS=NyAN=1997236026>*

Tachibana, S., Sullivan, S. A., Kawai, S., Nakamura, S., Hyunjae, R., Goto, N., y Tanabe, K. (2012). *Plasmodium cynomolgi genome sequences provide insight into Plasmodium vivax and the monkey malaria clade, 44(9), 1051–1055. Doi: 10.1038/ng.2375.Plasmodium*

Tangpukdee, N., Duangdee, C., Wilairatana, P., y Krudsood, S. (2009). *Malaria*

- diagnosis: A brief review. Korean Journal of Parasitology*, 47(2), 93–102.
Doi: 10.3347/kjp.2009.47.2.93
- Tavares, J., Formaglio, P., Thiberge, S., Mordelet, E., Van Rooijen, N., Medvinsky, A., y Amino, R. (2013). *Role of host cell traversal by the malaria sporozoite during liver infection. The Journal of Experimental Medicine*, 210(5), 905–915. Doi: 10.1084/jem.20121130
- Taylor, S., Parobek, C., y Fairhurst, R. (2012). *Impact of haemoglobinopathies on the clinical epidemiology of malaria: a systematic review and meta-analysis*, 12(6), 457–468. Doi: 10.1016/S1473-3099(12)70055-5. Impact
- Taylor, T. E., y Molyneux, M. E. (2015). *The pathogenesis of pediatric cerebral malaria: Eye exams, autopsies, and neuroimaging. Annals of the New York Academy of Sciences*, 1342(1), 44–52. Doi: 10.1111/nyas.12690
- Thermo Scientific. (2009). *260/280 and 260/230 Ratios*. Doi: 10.1002/jobm.19770170116
- Thermo Scientific. (2018). *Thermo Scientific Phusion High-Fidelity DNA Polymerase*, 1–2. Recuperado el 13 de Diciembre del 2018 de www.thermofisher.com
- Thrusfield, M., Ortega, C., Blas, D. E., Noordhuizen, J. P., y Frankena, K. (2001). *WIN EPISCOPE 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine*, 567–573.
- Vallejo, A. F., Chaparro, P. E., Benavides, Y., Álvarez, Á., Quintero, J. P., Padilla, J., y Herrera, S. (2015). *High prevalence of sub-microscopic infections in Colombia. Malaria Journal*, 14(1), 1–7. Doi: 10.1186/s12936-015-0711-6
- Volkman, S. K., Sabeti, P. C., Decaprio, D., Neafsey, D. E., Schaffner, S. F., Milner, D. A., y Wirth, D. F. (2007). *A genome-wide map of diversity in Plasmodium falciparum. Nature Genetics*, 39(1), 113–119. Doi: 10.1038/ng1930
- Wang, B., Han, S. S., Cho, C., Han, J. H., Cheng, Y., Lee, S. K., ... Han, E. T. (2014). *Comparison of microscopy, Nested-PCR, and real-time-PCR assays using high-throughput screening of pooled samples for diagnosis*

- of malaria in asymptomatic carriers from areas of endemicity in myanmar. Journal of Clinical Microbiology*, 52(6), 1838–1845. Doi: 10.1128/JCM.03615-13
- Weiss, G. E., Gilson, P. R., Taechalertpaisarn, T., Tham, W. H., de Jong, N. W. M., Harvey, K. L., y Crabb, B. S. (2015). *Revealing the Sequence and Resulting Cellular Morphology of Receptor-Ligand Interactions during Plasmodium falciparum Invasion of Erythrocytes. PLoS Pathogens*, 11(2), 1–25. Doi: 10.1371/journal.ppat.1004670
- WHO. (2015). *Malaria Rapid Diagnostic Test Performance. PLoS Med*, 12(10), e1001891. Doi: 10.1371/journal.pmed.1001891
- WHO. (2016). *Eliminating Malaria*. Recuperado el 20 de Noviembre del 2018 de https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/205565/WHO_HTM_GMP_2016.3_eng.pdf?sequence=1
- WHO. (2017). *World Malaria Report 2017*. Doi: 10.1071/EC12504
- Wongsrichanalai, C., Barcus, M. J., Muth, S., Sutamihardja, A., y Wernsdorfer, W. H. (2007a). *A Review of Malaria Diagnostic Tools: Microscopy and Rapid Diagnostic Test (RDT). The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 77(6 Suppl), 119–127. Recuperado el 20 de Octubre del 2018 de http://www.ajtmh.org/content/77/6_Suppl/119
- Wongsrichanalai, C., Barcus, M. J., Muth, S., Sutamihardja, A., y Wernsdorfer, W. H. (2007b). *A Review of Malaria Diagnostic Tools: Microscopy and Rapid Diagnostic Test (RDT). American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 77, 119–127. Doi: 10.1109/ICITACEE.2017.8257668
- Yitbarek, T., Nega, D., Tasew, G., Taye, B., y Desta, K. (2016). *Performance evaluation of malaria microscopists at defense health facilities in Addis Ababa and its surrounding areas, Ethiopia. PLoS ONE*, 11(11), 1–11. Doi: 10.1371/journal.pone.0166170
- Zheng, Z., y Cheng, Z. (2017). *Advances in Molecular Diagnosis of Malaria. Advances in Clinical Chemistry* (1st ed., Vol. 80). Elsevier Inc. Doi: 10.1016/bs.acc.2016.11.006

ANEXOS

Anexo 1. Muestras positivas y especies de *Plasmodium* verificadas por microscopía, con el código de la muestra, el código de la placa y la especie correspondiente.

Muestras Positivas		
Código UDLA	Código de placa	Especie
UDLA-PL-001	963	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-002	175	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-003	1070	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-004	891	
UDLA-PL-005	168	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-006	599	
UDLA-PL-007	195	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-008	72	<i>P.falciparum</i>
UDLA-PL-009	828	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-010	837	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-011	217	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-012	193	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-013	191	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-014	964	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-015	965	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-016	216	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-017	865	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-018	871	<i>P.falciparum</i>

UDLA-PL-019	864	
UDLA-PL-020	868	
UDLA-PL-021	863	
UDLA-PL-022	866	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-023	1094	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-024	1097	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-025	1099	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-026	1100	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-027	1067	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-028	1069	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-029	1071	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-030	1073	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-031	1077	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-032	798	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-033	233	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-034	796	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-035	797	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-036	800	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-037	1088	
UDLA-PL-038	1093	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-039	1092	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-040	1091	

UDLA-PL-041	1082	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-042	99	<i>P.falciparum</i>
UDLA-PL-043	594	
UDLA-PL-044	593	
UDLA-PL-045	585	<i>P.falciparum</i>
UDLA-PL-046	1106	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-047	1066	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-048	1064	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-049	1062	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-050	544	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-051	158	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-052	160	<i>P.falciparum</i>
UDLA-PL-053	155	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-054	156	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-055	157	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-056	159	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-057	1 Brigada	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-058	572	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-059	1023	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-060	1024	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-061	1025	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-062	1028	

UDLA-PL-063	1060	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-064	1061	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-065	307	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-066	543	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-067	1139	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-068	1157	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-069	558	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-070	556	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-071	614	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-072	607	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-073	613	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-074	606	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-075	1129	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-076	1123	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-077	1126	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-078	1127	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-079	1128	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-080	665	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-081	657	<i>P.falciparum</i>
UDLA-PL-082	556	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-083	678	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-084	658	<i>P.falciparum</i>

UDLA-PL-085	207	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-086	490	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-087	10 Vivax	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-088	513	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-089	98	<i>P.falciparum</i>
UDLA-PL-090	992	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-091	324	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-092	996	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-093	995	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-094	993	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-095	991	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-096	557	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-097	76	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-098	1119	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-099	33 Shell	
UDLA-PL-100	474	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-101	468.24.II.156	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-102	170L	<i>P.falciparum</i>
UDLA-PL-103	522.24.II.1.56	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-104	530.24.II.1.56	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-105	539.24.II.1.56	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-106	520.24.II.1.56	<i>P.vivax</i>

UDLA-PL-107	1012	
UDLA-PL-108	1016	
UDLA-PL-109	1011	
UDLA-PL-110	1015	
UDLA-PL-111	985.III.16DOI	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-112	990.III.16DOI	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-113		
UDLA-PL-114	654.24.II.1.56	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-115	555	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-116	962	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-117	5	
UDLA-PL-118	813.24.II.156	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-119	354	
UDLA-PL-120	704	<i>P.falciparum</i>
UDLA-PL-121	1TL	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-122	679.24.II.1.56	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-123	491	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-124	79	
UDLA-PL-125	1322	
UDLA-PL-126	1032	
UDLA-PL-127	1496	
UDLA-PL-128	875	

UDLA-PL-129	328 MS	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-130	1546 L	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-131	329 MS	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-132	74 EM	
UDLA-PL-133	72 EM	
UDLA-PL-134	1324	
UDLA-PL-135	331 MB	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-136	376	
UDLA-PL-137	1443 L	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-138	1434 L	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-139	883	
UDLA-PL-140	271	
UDLA-PL-141	957 L	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-142	1321 L	
UDLA-PL-143	1040 L	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-144	78	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-145	649.24.II.1.56	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-146	820.24.II.156	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-147	824.24.II.156	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-148	216	<i>P.falciparum</i>
UDLA-PL-149	9	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-150	20	<i>P.falciparum</i>

UDLA-PL-151	51	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-152	52	
UDLA-PL-153	37	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-154	11	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-155	61	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-156	2A	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-157	712	
UDLA-PL-158	654.24.II.1.56	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-159	L.396	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-160	639	
UDLA-PL-161	649.24.II.1.56	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-162	637.24.II.1.56	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-163	651.24.II.1.56	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-164	652	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-165	503	<i>P.falciparum</i>
UDLA-PL-166	688.24.II.1.56	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-167	699	<i>P.falciparum</i>
UDLA-PL-168	680	<i>P.falciparum</i>
UDLA-PL-169	324	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-170	193.L318.3	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-171	15 Yuntzuntza	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-172	27T	

UDLA-PL-173	8T	
UDLA-PL-174	32 Yuntzuntza	
UDLA-PL-175	16 Yuntzuntza	
UDLA-PL-176	508.287.39	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-177	681.24.II.1.56	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-178	967	
UDLA-PL-179	1079	
UDLA-PL-180	954 PS	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-181	1030 L	
UDLA-PL-182	963	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-183	01 NL	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-184	Av-80-PS	
UDLA-PL-185	971 PS	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-186	757 PS	
UDLA-PL-187	957 PS	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-188	1073 PS	
UDLA-PL-189	1073 PS	
UDLA-PL-190	1053 PS	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-191	1034 L	
UDLA-PL-192	778 PS	
UDLA-PL-193	1040 L	
UDLA-PL-194	1038 L	

UDLA-PL-195	1039 L	
UDLA-PL-196	214	
UDLA-PL-197	1078	
UDLA-PL-198	1032	
UDLA-PL-199	1345L	<i>P.falciparum</i>
UDLA-PL-200	HF-06	
UDLA-PL-201	985 PS	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-202	1033	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-203	184	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-204	188 PS	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-205	191	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-206	192	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-207	288 PS	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-208	340	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-209	91	
UDLA-PL-210	395	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-211	643	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-212	60 TAB	
UDLA-PL-213	250L	
UDLA-PL-214	16MF	
UDLA-PL-215	1384	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-216	21 MF	<i>P.vivax</i>

UDLA-PL-217	16EM	
UDLA-PL-218	1381	
UDLA-PL-219	57MS	
UDLA-PL-220	19EM	
UDLA-PL-221	4EM	
UDLA-PL-222	152	
UDLA-PL-223	344	
UDLA-PL-224	309	
UDLA-PL-225	383	
UDLA-PL-226	360	
UDLA-PL-227	861	
UDLA-PL-228	1252	
UDLA-PL-229	124	
UDLA-PL-230	704	
UDLA-PL-231	701	
UDLA-PL-232	705	
UDLA-PL-233	1301	<i>P.falciparum</i>
UDLA-PL-234	12	
UDLA-PL-235	81	
UDLA-PL-236	673	
UDLA-PL-237	21PS	
UDLA-PL-238	78 PS	<i>P.falciparum</i>

UDLA-PL-239	130 PS	<i>P.falciparum</i>
UDLA-PL-240	299L	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-241	127 PS	<i>P.falciparum</i>
UDLA-PL-242	188 PS	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-243	91PS	
UDLA-PL-244	77 PS	<i>P.falciparum</i>
UDLA-PL-245	52L	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-246	46 L	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-247	147	<i>P.falciparum</i>
UDLA-PL-248	131PS	
UDLA-PL-249	75PS	
UDLA-PL-250	501PS	
UDLA-PL-251	78 PS	<i>P.falciparum</i>
UDLA-PL-252	15 Taps	
UDLA-PL-253	386PS	
UDLA-PL-254	145 PS	<i>P.falciparum</i>
UDLA-PL-255	232	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-256	3	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-257	27Taps	
UDLA-PL-258	212	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-259	60PS	
UDLA-PL-260	117 PS	<i>P.falciparum</i>

UDLA-PL-261	167L	
UDLA-PL-262	816PS	
UDLA-PL-263	847PS	
UDLA-PL-264	286	
UDLA-PL-265	63-55	
UDLA-PL-266	ICU	
UDLA-PL-267	172L	<i>P.falciparum</i>
UDLA-PL-268	318L	
UDLA-PL-269	820PS	
UDLA-PL-270	821PS	
UDLA-PL-271	829PS	
UDLA-PL-272	831PS	
UDLA-PL-273	819PS	
UDLA-PL-274	325L	
UDLA-PL-275	35 SS	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-276	27-55	
UDLA-PL-277	17-55	
UDLA-PL-278	222L	
UDLA-PL-279	1219 PS	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-280	1220 PS	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-281	1253 PS	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-282	175 PS	<i>P.vivax</i>

UDLA-PL-283	1444	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-284	88 PS	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-285	86 PS	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-286	1220L	
UDLA-PL-287	89 PS	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-288	217 PS	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-289	1193	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-290	1442	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-291		
UDLA-PL-292	C3-71	
UDLA-PL-293	160 PS	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-294	40 L	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-295	708	
UDLA-PL-296	840	
UDLA-PL-297	1042PS	
UDLA-PL-298	856PS	
UDLA-PL-299	392	
UDLA-PL-300	4	
UDLA-PL-301	5	
UDLA-PL-302	919	
UDLA-PL-303	1	
UDLA-PL-304	2	

UDLA-PL-305	3	
UDLA-PL-306	11	
UDLA-PL-307	14	
UDLA-PL-308	308	
UDLA-PL-309	496	<i>P.falciparum</i>
UDLA-PL-310	465	
UDLA-PL-311	1004	
UDLA-PL-312	1006	
UDLA-PL-313	164	
UDLA-PL-314	583	
UDLA-PL-315	168	
UDLA-PL-316	16	
UDLA-PL-317	22	
UDLA-PL-318	364F	
UDLA-PL-319	5cc	
UDLA-PL-320	563	
UDLA-PL-321	113	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-322	1120.III.16D01	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-323	1121.III.16D01	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-324	160L-20	<i>P.falciparum</i>
UDLA-PL-325	161L	<i>P.falciparum</i>
UDLA-PL-326	379	

UDLA-PL-327	268	
UDLA-PL-328	L-395	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-329	A1	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-330	P1	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-331	M1	<i>P.vivax</i>
UDLA-PL-332	54	
UDLA-PL-333	51	<i>P.vivax</i>

Anexo 2. Muestras negativas verificadas por microscopía con el código de la muestra y el código de la placa.

Muestras Negativas

Código UDLA	Código de placa
UDLA-PL-335	831
UDLA-PL-336	830
UDLA-PL-337	829
UDLA-PL-338	827
UDLA-PL-339	826
UDLA-PL-340	895
UDLA-PL-341	907
UDLA-PL-342	905
UDLA-PL-343	904
UDLA-PL-344	903

UDLA-PL-345	902
UDLA-PL-346	900
UDLA-PL-347	899
UDLA-PL-348	898
UDLA-PL-349	90
UDLA-PL-350	91
UDLA-PL-351	92
UDLA-PL-352	93
UDLA-PL-353	94
UDLA-PL-354	95
UDLA-PL-355	96
UDLA-PL-356	97
UDLA-PL-357	104
UDLA-PL-358	439
UDLA-PL-359	541
UDLA-PL-360	540
UDLA-PL-376	273
UDLA-PL-377	237
UDLA-PL-378	240
UDLA-PL-379	242
UDLA-PL-380	249
UDLA-PL-381	246

UDLA-PL-382	247
UDLA-PL-383	298
UDLA-PL-384	249
UDLA-PL-385	250
UDLA-PL-386	251
UDLA-PL-387	252
UDLA-PL-388	253
UDLA-PL-389	254
UDLA-PL-390	255
UDLA-PL-391	256
UDLA-PL-392	258
UDLA-PL-393	259
UDLA-PL-394	569
UDLA-PL-395	1570
UDLA-PL-396	1571
UDLA-PL-397	1572
UDLA-PL-398	1573
UDLA-PL-399	1574
UDLA-PL-400	1575
UDLA-PL-401	1576
UDLA-PL-402	1577
UDLA-PL-403	574

UDLA-PL-404	575
UDLA-PL-405	576
UDLA-PL-406	61
UDLA-PL-407	58
UDLA-PL-408	59
UDLA-PL-409	60
UDLA-PL-410	57
UDLA-PL-411	54
UDLA-PL-412	56
UDLA-PL-413	55
UDLA-PL-414	53
UDLA-PL-415	52
UDLA-PL-416	18
UDLA-PL-417	8
UDLA-PL-418	114
UDLA-PL-419	113
UDLA-PL-420	112
UDLA-PL-421	111
UDLA-PL-422	51
UDLA-PL-423	49
UDLA-PL-424	50
UDLA-PL-425	48

UDLA-PL-426	47
UDLA-PL-427	62
UDLA-PL-428	63
UDLA-PL-429	64
UDLA-PL-430	79
UDLA-PL-431	78
UDLA-PL-432	77
UDLA-PL-433	75
UDLA-PL-434	74
UDLA-PL-435	73
UDLA-PL-436	72
UDLA-PL-437	71
UDLA-PL-438	70
UDLA-PL-439	69
UDLA-PL-440	68
UDLA-PL-441	67
UDLA-PL-442	66
UDLA-PL-443	65
UDLA-PL-444	65
UDLA-PL-445	63
UDLA-PL-446	98
UDLA-PL-447	96

UDLA-PL-448	97
UDLA-PL-449	94
UDLA-PL-450	95
UDLA-PL-451	85
UDLA-PL-452	93
UDLA-PL-453	84
UDLA-PL-454	99
UDLA-PL-455	91
UDLA-PL-456	100
UDLA-PL-457	110
UDLA-PL-458	80
UDLA-PL-459	82
UDLA-PL-460	87
UDLA-PL-461	92
UDLA-PL-462	18
UDLA-PL-463	90
UDLA-PL-464	103
UDLA-PL-465	105
UDLA-PL-466	111
UDLA-PL-467	89
UDLA-PL-468	115
UDLA-PL-469	112

UDLA-PL-470	113
UDLA-PL-471	101
UDLA-PL-472	114
UDLA-PL-473	83
UDLA-PL-474	85
UDLA-PL-475	107
UDLA-PL-476	89
UDLA-PL-477	109
UDLA-PL-478	86
UDLA-PL-479	87
UDLA-PL-480	83
UDLA-PL-481	86
UDLA-PL-482	82
UDLA-PL-483	85
UDLA-PL-484	84
UDLA-PL-485	131
UDLA-PL-486	130
UDLA-PL-487	129
UDLA-PL-490	125
UDLA-PL-491	814
UDLA-PL-492	815
UDLA-PL-493	816

UDLA-PL-494	817
UDLA-PL-495	818
UDLA-PL-496	819
UDLA-PL-497	823
UDLA-PL-498	824
UDLA-PL-499	825
UDLA-PL-500	925
UDLA-PL-501	924
UDLA-PL-502	923
UDLA-PL-503	922
UDLA-PL-504	921
UDLA-PL-505	920
UDLA-PL-506	919
UDLA-PL-507	918
UDLA-PL-508	917
UDLA-PL-509	916
UDLA-PL-510	915
UDLA-PL-511	914
UDLA-PL-512	913
UDLA-PL-513	912
UDLA-PL-514	911
UDLA-PL-515	910

UDLA-PL-516	909
UDLA-PL-530	917
UDLA-PL-531	916
UDLA-PL-532	913
UDLA-PL-533	912
UDLA-PL-534	911
UDLA-PL-535	910
UDLA-PL-536	909
UDLA-PL-537	908
UDLA-PL-538	926
UDLA-PL-539	933
UDLA-PL-540	936
UDLA-PL-541	934
UDLA-PL-542	933
UDLA-PL-543	932
UDLA-PL-544	931
UDLA-PL-545	930
UDLA-PL-546	929
UDLA-PL-547	928
UDLA-PL-548	927
UDLA-PL-549	938
UDLA-PL-550	939

UDLA-PL-551	942
UDLA-PL-552	943
UDLA-PL-553	944
UDLA-PL-554	945
UDLA-PL-555	995
UDLA-PL-556	996
UDLA-PL-557	876
UDLA-PL-558	877
UDLA-PL-559	881
UDLA-PL-560	880
UDLA-PL-561	879
UDLA-PL-562	875
UDLA-PL-563	874
UDLA-PL-564	873
UDLA-PL-565	885
UDLA-PL-566	884
UDLA-PL-567	873
UDLA-PL-568	872
UDLA-PL-569	870
UDLA-PL-570	869
UDLA-PL-571	876
UDLA-PL-572	862

UDLA-PL-573	861
UDLA-PL-574	886
UDLA-PL-575	845
UDLA-PL-576	843
UDLA-PL-577	844
UDLA-PL-578	842
UDLA-PL-579	838
UDLA-PL-583	104
UDLA-PL-584	109
UDLA-PL-585	105
UDLA-PL-586	106
UDLA-PL-587	102
UDLA-PL-588	108
UDLA-PL-589	107
UDLA-PL-590	195
UDLA-PL-591	998
UDLA-PL-592	997
UDLA-PL-593	555
UDLA-PL-594	547
UDLA-PL-595	546
UDLA-PL-596	548
UDLA-PL-597	996

UDLA-PL-598	662
UDLA-PL-599	84
UDLA-PL-600	662
UDLA-PL-601	45
UDLA-PL-602	987
UDLA-PL-603	63
UDLA-PL-604	665
UDLA-PL-605	225
UDLA-PL-606	228
UDLA-PL-607	84
UDLA-PL-608	65
UDLA-PL-609	12
UDLA-PL-610	95
UDLA-PL-611	142
UDLA-PL-612	365
UDLA-PL-613	366
UDLA-PL-614	360
UDLA-PL-615	215
UDLA-PL-616	847
UDLA-PL-617	745
UDLA-PL-618	746
UDLA-PL-619	552

UDLA-PL-620	485
UDLA-PL-621	486
UDLA-PL-622	489
UDLA-PL-623	490
UDLA-PL-624	492
UDLA-PL-625	477
UDLA-PL-626	265
UDLA-PL-627	268
UDLA-PL-628	135
UDLA-PL-629	139
UDLA-PL-630	117
UDLA-PL-631	198
UDLA-PL-632	334
UDLA-PL-633	330
UDLA-PL-634	332
UDLA-PL-635	339
UDLA-PL-636	70
UDLA-PL-637	78
UDLA-PL-638	75
UDLA-PL-639	79
UDLA-PL-640	72
UDLA-PL-641	404

UDLA-PL-652	540
UDLA-PL-653	541
UDLA-PL-654	551
UDLA-PL-655	550
UDLA-PL-656	552
UDLA-PL-657	553
UDLA-PL-658	556
UDLA-PL-659	559
UDLA-PL-660	562
UDLA-PL-661	564
UDLA-PL-662	560
UDLA-PL-663	561
UDLA-PL-664	566
UDLA-PL-665	555
UDLA-PL-666	558
UDLA-PL-667	557
UDLA-PL-668	556
UDLA-PL-669	555
UDLA-PL-670	554
UDLA-PL-671	553
UDLA-PL-672	552
UDLA-PL-673	268

UDLA-PL-674	267
UDLA-PL-675	266
UDLA-PL-676	263
UDLA-PL-677	260
UDLA-PL-678	566
UDLA-PL-679	567
UDLA-PL-680	115
UDLA-PL-681	114
UDLA-PL-682	120
UDLA-PL-683	119
UDLA-PL-684	118
UDLA-PL-685	116
UDLA-PL-686	113
UDLA-PL-687	110
UDLA-PL-688	108
UDLA-PL-689	107
UDLA-PL-690	141
UDLA-PL-691	140
UDLA-PL-692	142

Anexo 4. Alineamiento global del producto PCR (gen 18S ARN) de la muestra 325 (*P.falciparum*) con el gen 18S ARN del cromosoma 7. El producto PCR tiene un tamaño de 391pb con 87% de identidad.

Identities = 391/449 (87%),
Positives = 391/449 (87%), Gaps = 30/449 (6%)

```

18S Plasmodium falciparum chr7 extraction 320 CAGCTTTTGAIGT-TAGGGTATTG-GCCTAACATGGCTATGACGGGTAACGGGGAATTAG 377
      AG TTT A GT AGGGTATTG GCCTAAC TGGC TGACGGGTAACGGGGAATTA
PLF-325fn extraction 1 AAGGGTTTAAAGTTAAAGGGTATTGAGCCTAAC-TGGCG-TGACGGGTAACGGGGAATTAT 58

18S Plasmodium falciparum chr7 extraction 378 AGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAATAGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGC 437
      AGTTCGATTCC GA A GAGCCTGA AATAGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGC
PLF-325fn extraction 59 AGTTCGATTCCCGAAAAGAGCCTGACAANTAGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGC 118

18S Plasmodium falciparum chr7 extraction 438 GCGTAAATTACCCAATTCTAAAGAAGAGAGGTTAGTACAAAGAAATAACAATGCAAGGCCA 497
      GCGTAAATTACCCAATTCTAAAGAAGAGAGGTTAGTACAAAGAAATAACAATGCA GGCCA
PLF-325fn extraction 119 GCGTAAATTACCCAATTCTAAAGAAGAGAGGTTAGTACAAAGAAATAACAATGCAAGGCCA 178

18S Plasmodium falciparum chr7 extraction 498 ATTTTGGTTTTTGTAAATGGGAATGGTGGGAATTTAAAACCTTCCCAGAGTAACAATTGGA 557
      ATTTTGGTTTTTGTAAATGGGAATGGTGGGAATTTAAAACCTTCCCAGAGTAACAATTGGA
PLF-325fn extraction 179 ATTTTGGTTTTTGTAAATGGGAATGGTGGGAATTTAAAACCTTCCCAGAGTAACAATTGGA 238

18S Plasmodium falciparum chr7 extraction 558 GGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTAATAATTG 617
      GGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTAATAATTG
PLF-325fn extraction 239 GGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTAATAATTG 298

18S Plasmodium falciparum chr7 extraction 618 TTGCAGTTAAAACGCTCGTAGTTGAATTTCAAGAATCGATATTTATTGTAACATTTCT 677
      TTGCAGTTAAAACGCTCGTAGTTGAATTTCAAGAATCGATATTTATTGTAACATTTCT
PLF-325fn extraction 299 TTGCAGTTAAAACGCTCGTAGTTGAATTTCAAGAATCGATATTTATTGTAACATTTCT 358

18S Plasmodium falciparum chr7 extraction 678 AGGGGAACATA----TTTTAGCTTTTCGCTT---TAAT--ACGCTTCC-T-----CTATT- 720
      AGGGGAACATA TAG TCG T TAA AC TT T C ATT
PLF-325fn extraction 359 AGGGGAACATAAG---TAG-AATCGAGTGAGTAAGAAACAATTGAGTAAGAAACAATTG 414

18S Plasmodium falciparum chr7 extraction 721 ATT-ATGTT-CT---TAAATAACAAGA 744
      A T AT TT CT TAAA AA AAAGA
PLF-325fn extraction 415 AGTGATTTTACTATATTAATAAAAAAAGA 443

```

Anexo 5. Alineamiento BLAST del producto PCR (gen 18S ARN) de la muestra 442 (*P. vivax*). Esta muestra posee un 99% de similitud con la especie *P. vivax*.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Plasmodium vivax small subunit 18S ribosomal RNA (PVX_079693)_rRNA	798	798	94%	0.0	99%	XR_003001206.1
<input type="checkbox"/> Plasmodium vivax small subunit 18S ribosomal RNA (PVX_097020)_rRNA	798	798	94%	0.0	99%	XR_003001225.1
<input type="checkbox"/> Plasmodium vivax genome assembly, chromosome: 2	798	798	94%	0.0	99%	LT635613.1
<input type="checkbox"/> Plasmodium vivax isolate SV5 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	798	798	94%	0.0	99%	JQ627157.1
<input type="checkbox"/> Plasmodium vivax isolate PV2008/TR/DEL small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	798	798	94%	0.0	99%	GQ477744.1
<input type="checkbox"/> Plasmodium vivax El Salvador asexual blood stage small subunit rRNA gene	798	798	94%	0.0	99%	U07367.1
<input type="checkbox"/> Plasmodium vivax Sal 1 blood stage small subunit rRNA gene	798	798	94%	0.0	99%	U03079.1
<input type="checkbox"/> Plasmodium vivax small subunit (SSU) rRNA gene	798	798	94%	0.0	99%	X13926.1
<input type="checkbox"/> Plasmodium vivax small subunit 18S ribosomal RNA (PVX_096002)_rRNA	793	793	94%	0.0	99%	XR_003001217.1
<input type="checkbox"/> Plasmodium vivax genome assembly, chromosome: 10	793	1156	94%	0.0	99%	LT615265.1
<input type="checkbox"/> Plasmodium vivax isolate SV6 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	793	793	94%	0.0	99%	JQ627158.1
<input type="checkbox"/> Plasmodium vivax isolate SV4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	793	793	94%	0.0	99%	JQ627156.1
<input type="checkbox"/> Plasmodium vivax isolate SV3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	793	793	94%	0.0	99%	JQ627155.1
<input type="checkbox"/> Plasmodium vivax small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	793	793	94%	0.0	99%	U83877.1
<input type="checkbox"/> Plasmodium vivax isolate SV1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	791	791	94%	0.0	99%	JQ627153.1
<input type="checkbox"/> SSUrRNA (malaria patient blood sample 9007) (Plasmodium vivax_Yunnan isolate_Genomic_641.nt)	789	789	94%	0.0	99%	S69871.1
<input type="checkbox"/> Plasmodium vivax genome assembly, chromosome: 2	787	787	94%	0.0	98%	LT615257.1
<input type="checkbox"/> Plasmodium vivax 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	787	787	94%	0.0	98%	U83233.1
<input type="checkbox"/> Plasmodium vivax isolate SV2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	785	785	94%	0.0	98%	JQ627154.1
<input type="checkbox"/> Plasmodium vivax isolate Sapu clone 111 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	771	771	94%	0.0	98%	GU815533.1

Anexo 6. Alineamiento BLAST del producto PCR (gen 18S ARN) de la muestra 325 (*P.falciparum*). Esta muestra posee un 97% de similitud con la especie *P.falciparum*.

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results						
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Plasmodium falciparum genome assembly, chromosome: 7	592	592	72%	5e-165	97%	LR129692.1
<input type="checkbox"/> Plasmodium falciparum 3D7 18S ribosomal RNA (PF3D7_0725600), rRNA	592	592	72%	5e-165	97%	XR_002273081.2
<input type="checkbox"/> Plasmodium falciparum voucher MAL10/350 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	592	592	72%	5e-165	97%	MF155937.1
<input type="checkbox"/> Plasmodium falciparum 3D7 18S ribosomal RNA (PF3D7_0531600), rRNA	592	592	72%	5e-165	97%	XR_002273101.1
<input type="checkbox"/> Plasmodium falciparum 3D7 chromosome 7 sequence	592	592	72%	5e-165	97%	CP016997.1
<input type="checkbox"/> Plasmodium falciparum 3D7 chromosome 5 sequence	592	592	72%	5e-165	97%	CP016995.1
<input type="checkbox"/> Plasmodium falciparum 3D7 chromosome 7	592	592	72%	5e-165	97%	AL844506.3
<input type="checkbox"/> Plasmodium falciparum 3D7 chromosome 5	592	592	72%	5e-165	97%	AL844504.2
<input type="checkbox"/> Chain A_Cryo-EM structure of the Plasmodium falciparum 80S ribosome bound to the anti-protozoan drug emetine, small subunit	592	592	72%	5e-165	97%	3J7A_A
<input type="checkbox"/> Plasmodium falciparum isolate SF4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	592	592	72%	5e-165	97%	JQ627152.1
<input type="checkbox"/> Plasmodium falciparum isolate SF2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	592	592	72%	5e-165	97%	JQ627150.1
<input type="checkbox"/> Plasmodium falciparum isolate SF1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	592	592	72%	5e-165	97%	JQ627149.1
<input type="checkbox"/> P.falciparum 18S ribosomal RNA in asexual parasites	592	592	72%	5e-165	97%	M19172.1
<input type="checkbox"/> Plasmodium falciparum genome assembly, chromosome: 5	586	586	72%	2e-163	97%	LR129690.1
<input type="checkbox"/> Plasmodium sp. gorilla clade G1 genome assembly, chromosome: 7	586	586	72%	2e-163	97%	LT963420.1
<input type="checkbox"/> Plasmodium sp. gorilla clade G1 genome assembly, chromosome: 5	586	586	72%	2e-163	97%	LT963418.1
<input type="checkbox"/> Plasmodium falciparum isolate SF3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	586	586	72%	2e-163	97%	JQ627151.1
<input type="checkbox"/> Plasmodium reichenowi genome assembly, chromosome: 5	580	580	72%	1e-161	96%	LT989568.1
<input type="checkbox"/> Plasmodium falciparum isolate 161 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	580	580	72%	1e-161	96%	MG725888.1

Anexo 7. Carta de aprobación del comité de bioética del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI).



Dr. Leopoldo Izquieta Pérez



COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS (CEISH) DEL INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA (INSPI)

Notificación de la revisión del Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos (CEISH) del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública –Leopoldo Izquieta Pérez (INSPI-LIP)

Para: Dr. Carlos Vinicio Chiluisa Guacho.

Título del Protocolo: “Evidencia microscópica y molecular de infección humana por filarias *Mansonella* spp. en la región amazónica, Ecuador”.

Protocolo #: CEISH-INSPI-013

Versión: 2

Fecha de recepción del protocolo: 14 de abril del 2018

Fecha de resolución: 24 de mayo 2018

Resolución: Este tipo de protocolo no se corresponde con un Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos.

Por medio de la presente se certifica que el estudio de investigación, “EVIDENCIA MICROSCÓPICA Y MOLECULAR DE INFECCIÓN HUMANA POR FILARIAS MANSONELLA SPP. EN LA REGIÓN AMAZÓNICA, ECUADOR”, fue revisado por el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos (CEISH) del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública INSPI Dr. Leopoldo Izquieta Pérez.

Para dar el aval al proyecto “Evidencia microscópica y molecular de infección humana por filarias *Mansonella* spp en la región amazónica, Ecuador”. Se requiere de lo siguiente:

- En virtud que el proyecto está basado en láminas que fueron tomados de seres humanos, se solicita adjuntar el procedimiento de anonimización de los datos y láminas.

En caso de requerir otra información adicional diríjelas al CEISH del INSPI-LIP, a la dirección: Calle Iquique N14-285 y Yaguachi. Sector el Dorado. Puede encontrar información adicional en el sitio web del CEISH, <http://www.investigacion.salud.gob.ec/webs/ceish/>, o de manera directa a su Secretaria, Verónica Toaquiza, al email ntoquiza@inspi.gob.ec.

Cordialmente,

Ana Lúcia Ruano Phd.
Presidenta del Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos (CEISH) del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública-Leopoldo Izquieta Pérez (INSPI-LIP)

29 de mayo del 2018

Fecha de Correspondencia

