

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Prevalencia del gen de la proteína rica en histidina-3 de *Plasmodium falciparum* (*pfhrp3*), en combinación con el gen *pfhrp2* y las implicaciones del uso de Pruebas de Diagnóstico Rápido (PDRs) en regiones endémicas de Guatemala

Trabajo de graduación presentado por
Nancy Vanessa Zamora Magarín
para optar al grado de Licenciada en Bioquímica y Microbiología

Guatemala

2014

Prevalencia del gen de la proteína rica en histidina-3 de
Plasmodium falciparum (*pfhrp3*), en combinación con el gen
pfhrp2 y las implicaciones del uso de Pruebas de Diagnóstico
Rápido (PDRs) en regiones endémicas de Guatemala

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Prevalencia del gen de la proteína rica en histidina-3 de *Plasmodium falciparum* (*pfhrp3*), en combinación con el gen *pfhrp2* y las implicaciones del uso de Pruebas de Diagnóstico Rápido (PDRs) en regiones endémicas de Guatemala

Trabajo de graduación presentado por
Nancy Vanessa Zamora Magarín
para optar al grado de Licenciada en Bioquímica y Microbiología

Guatemala

2014


Vo. Bo.:

(F)


Ma. Eugenia Castellanos Reynosa, M.Sc.

Tribunal examinador:

(F)


Norma R. Padilla, Ph.D.

(F)


Ma. Eugenia Castellanos Reynosa, M.Sc.

(F)


Lucía Nitsch Velásquez, M.Sc.

Fecha de aprobación: Guatemala, 13 de enero del 2014.

PREFACIO

El presente estudio fue financiado por los Acuerdos entre los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de los Estados Unidos y el Centro de Estudios en Salud de la Universidad del Valle de Guatemala (CES-UVG). Un agradecimiento especial a la Dra. Ana Cabrera de la Universidad McMaster, Canadá y a la Dra. Claudia Carranza de INVEGEM por su apoyo en la ejecución del método.

Quiero agradecer a la Dra. Norma Padilla por permitirme ser parte de la unidad de Malaria, del laboratorio de Ecología y Entomología del CES y a mi asesora M.Sc. María Eugenia Castellanos Reynosa, por el apoyo, motivación y orientación que me brindaron en todo momento, desde que inicié como practicante hasta continuar con mi trabajo de tesis. También quiero agradecer a M.Sc. Lucia Ortiz, Lic. Juan Carlos Lol y todo el equipo de la unidad de Malaria por todo su apoyo y compañerismo. Así como también, agradezco a mis colegas y amigos por la comprensión, apoyo y motivación mutua en este camino; Marines du Teil, Gabriela Samayoa, Heidy Ajcalón, Julio Alemán, José Lobo, Rudy Higueros y Laura Herrera. También agradezco a la Dra. Pamela Pennington, quién inició a orientar y apoyarme como directora del Departamento de Bioquímica y Microbiología en mis primeros años de carrera profesional. Y también agradezco a la actual directora del Departamento de Bioquímica y Microbiología, M.Sc. Lucia Nistch quién continuó apoyándome y motivándome hasta el final de mi carrera profesional.

Finalmente, y no menos importante, agradezco a Dios y ángeles en el cielo, a mis papas Estuardo y Elsa de Zamora, a mis hermanos Diego y Ángel, a mi abuela Tere, familia y amigos por su apoyo incondicional.

CONTENIDO

	Página
LISTA DE CUADROS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMEN	xii
I. INTRODUCCIÓN	1
A. Antecedentes	3
1. Malaria	3
2. Ciclo de vida del parásito	3
3. La malaria en el mundo	4
4. Erradicación de la malaria.....	5
5. La malaria en Guatemala.....	7
6. Diagnóstico de la enfermedad de Malaria.....	7
7. Genómica de la proteína rica en histidina-2 (PfHRP2) y proteína rica en histidina-3 (PfHRP3) de <i>P. falciparum</i>	12
8. Estudios de monitoreo de los genes <i>pfhrp2/pfhrp3</i>	13
9. Métodos de PCR y las variaciones en la técnicas molecular para la estandarización del ensayo.	15
B. Justificación	17
C. Objetivos	18
D. Hipótesis conceptual	19
II. MATERIALES Y MÉTODOS	20
A. Materiales utilizados en los diferentes procesos de laboratorio.....	20
B. Origen de las muestras y consideraciones éticas	23
C. Esquema de la metodología general realizada en este estudio	24
D. Revisión de literatura, identificación del método y búsqueda de secuencias publicadas.....	25
E. Diseño de cebadores alternativos para amplificar el gen <i>pfhrp3</i>	25

F.	Estandarización de la técnica de PCR <i>pfhrp3</i> Baker para amplificar aislados de ADN extraído de sangre completa y de sangre en papel filtro.....	27
G.	Evaluación de los aislados de ADN de <i>P. falciparum</i> de Guatemala con el método de PCR <i>pfhrp3</i> Baker estandarizado.	31
H.	Análisis de los aislados que no presentaron amplificación con el método de PCR <i>pfhrp3</i> Baker con PCRs de los cebadores alternativos	32
I.	Análisis de los resultados.....	32
III.	RESULTADOS	34
A.	Estandarización del método de PCR <i>pfhrp3</i> para muestras de ADN extraídas de sangre completa y sangre en papel filtro.	34
B.	Límite de detección del PCR convencional <i>pfhrp3</i> Baker para ADN extraído de sangre en papel filtro.	36
C.	Evaluación de los aislados de ADN de <i>P. falciparum</i> de Guatemala con el método de PCR <i>pfhrp3</i> Baker	38
D.	Análisis de la secuencia de la única muestra positiva para el gen <i>pfhrp3</i> de los aislados de ADN guatemalteco 98-99.....	41
E.	Análisis de los aislados con PCRs de cebadores alternativos que no presentaron amplificación con el método de PCR Baker.	43
F.	Prevalencia del gen <i>pfhrp3</i> en aislados de Guatemala del año 1998- 1999.....	46
IV.	DISCUSIÓN	498
A.	Método de PCR <i>pfhrp3</i> estandarizado para evaluar aislados de ADN extraído de dos diferentes matrices.	49
B.	Prevalencia del gen de la proteína rica en histidina-3 de <i>P. falciparum</i> (<i>pfhrp3</i>) determinada en aislados de ADN de cepas guatemaltecas.....	51
C.	Confirmación de la presencia del gen <i>pfhrp3</i> por secuenciación	52
D.	Confirmación de la ausencia del gen <i>pfhrp3</i> en las muestras que no amplifiquen el PCR estandarizado utilizando cebadores alternativos.	52
E.	Comparación de la prevalencia de los genes <i>pfhrp2/pfhrp3</i> de los aislados de <i>P. falciparum</i> de Guatemala con la prevalencia de otras regiones latinoamericanas ...	54
F.	Implicaciones en el uso de las PDRs tomando en cuenta la prevalencia de los genes <i>pfhrp2/pfhrp3</i> en Guatemala	54

V. CONCLUSIONES	57
VI. RECOMENDACIONES	59
VII. LITERATURA CITADA	60
VIII. ANEXOS	63
A. Protocolo de re-concentración de ADN para muestras con baja concentración....	63
B. Evaluación de la calidad del ADN extraído o presente por PCR 18s ADNr de las diluciones del control 3D7 en papel filtro.....	66
C. Evaluación de la calidad del ADN presente en los aislados de Guatemala 98-99 por PCR 18s ADNr	67
D. Bandas aisladas de la reacción de PCR del primer grupo de cebadores diseñados.	69

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Descripción de los reactivos utilizados en los diferentes procedimientos de laboratorio	20
Cuadro 2. Descripción del equipo utilizado en los diferentes procedimientos de laboratorio	21
Cuadro 3. Descripción de los materiales utilizados en los diferentes procedimientos de laboratorio.	22
Cuadro 4. Descripción de los parámetros tomados en cuenta para el diseño de los grupos de cebadores.....	26
Cuadro 5. Descripción de los grupos de cebadores de PCR de Baker <i>et al.</i> 2005 y los diseñados.....	27
Cuadro 6. Componentes, concentración final y volumen de la mezcla de reacción para amplificar el gen <i>pfhrp3</i> en muestras extraídas de sangre completa y de sangre en papel filtro.	29
Cuadro 7. Programa de PCR para amplificar el gen <i>pfhrp3</i> en muestras extraídas de sangre completa.	29
Cuadro 8. Programa de PCR para amplificar el gen <i>pfhrp3</i> en muestras extraídas de sangre en papel filtro.....	30
Cuadro 9. Cuadro comparativo de los dos métodos; extracción de ADN de parásitos/ μ l en papel filtro y dilución seriada del control 3D7, para determinar el límite de detección del método de PCR <i>pfhrp3</i> Baker.....	38

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ciclo de infección del parásito <i>Plasmodium</i> , etapa asexual y sexual.....	4
Figura 2. Mapa de los países endémicos de malaria.....	5
Figura 3. Distribución del número de casos de malaria por <i>Plasmodium vivax</i> y <i>P. falciparum</i> en las diferentes regiones de Guatemala reportados en el año 2008.....	8
Figura 4. Prueba rápida de diagnóstico (PRD) para la malaria por inmunocromatografía.....	10
Figura 5. Ejemplar de una prueba de diagnóstico rápido basa en PfHRP2, producto de marca BinaxNow®.....	11
Figura 6. Ciclo de vida del <i>Plasmodium falciparum</i> y la expresión del a proteína PfHRP2.....	13
Figura 7. Esquema del procedimiento general realizado a lo largo de la estandarización y análisis de muestras.....	24
Figura 8. Posición de los cebadores diseñados y los reportados por Baker <i>et al.</i> en el gen <i>pfhrp3</i>	26
Figura 9. Gel de electroforesis de los productos de PCR <i>pfhrp3</i> Baker estandarizado para ADN extraído de sangre completa.....	34
Figura 10. Gel de electroforesis de los productos del PCR <i>pfhrp3</i> Baker estandarizado para ADN extraído de sangre en papel filtro empleando cepas de genotipo conocido.....	35
Figura 11. Gel de electroforesis del límite de detección del producto de PCR <i>pfhrp3</i> Baker estandarizado para aislados de parásitos control 3D7 por microlitro en papel filtro.....	36
Figura 12. Gel de electroforesis del producto de PCR <i>pfhrp3</i> de seis diluciones seriadas del ADN del control positivo 3D7.....	37
Figura 13. Gel de electroforesis del producto de PCR <i>pfhrp3</i> Baker de ocho aislados de ADN guatemaltecos 98-99.....	39
Figura 14. Gel de electroforesis del producto de PCR <i>pfhrp3</i> de 10 aislados de ADN guatemaltecos 98-99.....	40
Figura 15. Electroferograma de la secuencia de ADN del gen <i>pfhrp3</i> de la muestra Guatemala9899-01.....	41
Figura 16. Alineación múltiple de las secuencias del gen <i>prhp3</i> de cepas con similitud del 97 y 99% con la secuencia Gt9899-01.....	42
Figura 17. Gel de electroforesis del producto de PCR convencional <i>pfhrp3</i> primer grupo de cebadores diseñados alternativamente.....	44
Figura 18. PCR de gradiente <i>pfhrp3</i> con los cebadores diseñados alternativamente.....	45
Figura 19. Gel de electroforesis del producto de PCR convencional <i>pfhrp3</i> del segundo grupo de cebadores diseñados alternativamente.....	46
Figura 20. En la gráfica se representa la prevalencia del gen <i>pfhrp3</i> obtenido en el estudio, con aislados de ADN de cepas guatemaltecas del año 1998-1999.....	47
Figura 21. Gel del producto de PCR 18s ADNr semianidado de las extracciones de ADN de las diluciones de parásitos 3D7 por microlitro de sangre en papel filtro.....	67
Figura 22. Gel del producto de PCR 18S ADNr de 10 aislados de ADN guatemaltecos 98-99.....	68
Figura 23. Gel del producto de PCR 18S ADNr de 10 aislados de ADN guatemaltecos 98-99.....	68
Figura 24. Gel del producto PCR band stab <i>pfhrp3</i> de las bandas aisladas.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
AMI	Iniciativa Amazónica contra la Malaria
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CDC	Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades
CES	Centros de Estudios en Salud
CLSI	Instituto de Estándares para Laboratorios Clínicos
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NSS	National Statistical Service
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PDR	Pruebas de Diagnóstico Rápido
<i>pfhrp2</i>	gen de la proteína rica en histidina 2 de <i>Plasmodium falciparum</i>
PfHRP2	Proteína rica en histidina 2 de <i>Plasmodium falciparum</i>
<i>pfhrp3</i>	gen de la proteína rica en histidina 3 de <i>Plasmodium falciparum</i>
PfHRP3	Proteína rica en histidina 3 de <i>Plasmodium falciparum</i>
pLDH	Lactato deshidrogenasa
LMP	Bajo Punto de Fusión
LOD	Límite de detección
UVG	Universidad del Valle de Guatemala
UV-Vis	Ultravioleta-Visible

RESUMEN

La malaria es una enfermedad endémica de Guatemala, actualmente se encuentra en vías de eliminación y está incluida en las políticas nacionales de salud. La malaria es causada por cinco parásitos de la familia *Plasmodium spp.*, siendo *P. falciparum* el más serio y fatal. El diagnóstico se basa tanto en síntomas clínicos como en microscopía, sin embargo la Organización Mundial de la Salud recomienda las Pruebas de Diagnóstico Rápido (PDR) basadas en inmunoensayos por ser rápidas, precisas y de bajo costo. En este estudio se exploró la posibilidad de utilizar la PDR que detecta las Proteínas Ricas en Histidina 2 y 3 (PfHRP2 y PFHRP3) debido a que es la más sensible desarrollada hasta el momento tomando en consideración las infecciones de baja parasitemia en el país. La presencia de los genes *pfhrp2* y *pfhrp3* es requerida para la efectividad de la PDR ya que un resultado falso negativo puede ocurrir a causa de cepas con deleciones en uno o ambos genes. La presencia del gen *pfhrp2* ha sido detectada en cepas del país, pero no el *pfhrp3*. Por lo tanto, la finalidad del presente estudio fue determinar la prevalencia del gen *pfhrp3* en aislados de muestras retrospectivas de sangre en papel filtro proveniente de la región de Escuintla por técnicas moleculares. El método de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se estandarizó con un límite de detección de 0.1pg/μL de ADN del parásito. Adicionalmente se confirmó por secuenciación las muestras que presentaron amplificación. Se determinó una prevalencia de 5% para *pfhrp3*, que en combinación con el 100% para *pfhrp2*, sugiere que el diagnóstico de malaria puede estar comprometido a fallar utilizando las PDRs PfHRP2/PFHRP3. El resultado de esta investigación preliminar puede contribuir a la orientación del programa nacional de control de la malaria en la adquisición de PDRs efectivas para el país. Por lo tanto, se recomienda considerar otra PDR que detecte un diferente biomarcador, por ejemplo la proteína lactato deshidrogenasa (pLDH). Adicionalmente, se recomienda continuar con el estudio de monitoreo de ambos genes *pfhrp2/pfhrp3*, utilizando mayor número de muestras y que hayan sido colectadas en años recientes.

I. INTRODUCCIÓN

La malaria es una enfermedad causada por cinco especies de parásitos del género *Plasmodium* siendo el parásito *Plasmodium falciparum* el más serio y fatal (Suh *et al* 2004, Tangpukdee *et al* 2009). Es importante realizar el diagnóstico rápido y preciso de las personas posiblemente infectadas. El método estándar de oro empleado es el diagnóstico por microscopía, sin embargo no es siempre viable en áreas endémicas debido al costo que este representa. Es por ello que se han implementado las Pruebas de Diagnóstico Rápido (PRDs), que son de bajo costo, fáciles de utilizar, proveen resultados rápidos y precisos (Tangpukdee *et al* 2009, Wongsrichanalai *et al* 2007).

Las PDRs se fundamentan en la detección de antígenos producidos por el parásito en el hospedero, como la proteína rica en histidina-2 (PfHRP2) específica para esta especie *P. falciparum*. La PfHRP2 se produce durante el ciclo de infección y circula en la sangre de la persona infectada, que la hace ideal para ser detectada en una muestra de sangre periférica. Sin embargo, se ha descubierto que la proteína rica en histidina-3 (PfHRP3) que también es producida por el parásito, presenta una estructura similar que es detectada al momento de realizar la prueba. La expresión de ambos genes puede favorecer la calidad y especificidad de la prueba, haciendo que sea sensible. Por el contrario, al tener deleción en uno o ambos genes (*pfhrp2/pfhrp3*), la sensibilidad de la prueba puede ser afectada proporcionando un resultado falso negativo en el diagnóstico (Baker *et al* 2011, Baker *et al* 2010, Baker *et al* 2005, Perkins & Bell 2008).

En estudios previos, se determinó que las cepas de *P. falciparum* obtenidas en la región del Río Amazonas en Perú y Brasil presentan deleciones en uno de los dos genes o combinados (Baker *et al* 2011, Baker *et al* 2010, Baker *et al* 2005, Gamboa *et al* 2010, Houze *et al* 2011). Es por ello que se requiere el monitoreo de las deleciones en los genes que codifican las proteínas PfHRP2/ PfHRP3 en los diferentes países endémicos.

En Guatemala, hasta el momento solo contaba con los resultados concluyentes del gen *pfhrp2*, pero no contaba con información sobre la distribución de la presencia o

ausencia del gen *pfhrp3* y tampoco se tenía un método estandarizado para su detección. Por lo tanto, el objetivo principal de la presente investigación fue determinar la prevalencia del gen de la proteína rica en histidina-3 en los aislados de las cepas de *Plasmodium falciparum* (*pfhrp3*) retrospectivas provenientes del departamento de Escuintla, región endémica de Guatemala. Esto se logró obtener a partir de la estandarización de un método molecular de PCR *pfhrp3* Baker para muestras de sangre en papel filtro. Alternativamente se diseñó una serie de cebadores de PCR para detectar otra región del gen *pfhrp3*, en el caso de que el método con los cebadores reportados en la literatura pudiera ser inespecíficos para las cepas del país, debido a la variabilidad que se ha reportado.

Este estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Ecología y Entomología, unidad de Malaria, del Centros de Estudios en Salud (CES). La información obtenida complementó y generó la primera información sobre la prevalencia en conjunto de los genes *pfhrp2/pfhrp3* en las cepas del país y con la misma se puede orientar al programa nacional de control de malaria en la adquisición de PDRs efectivas.

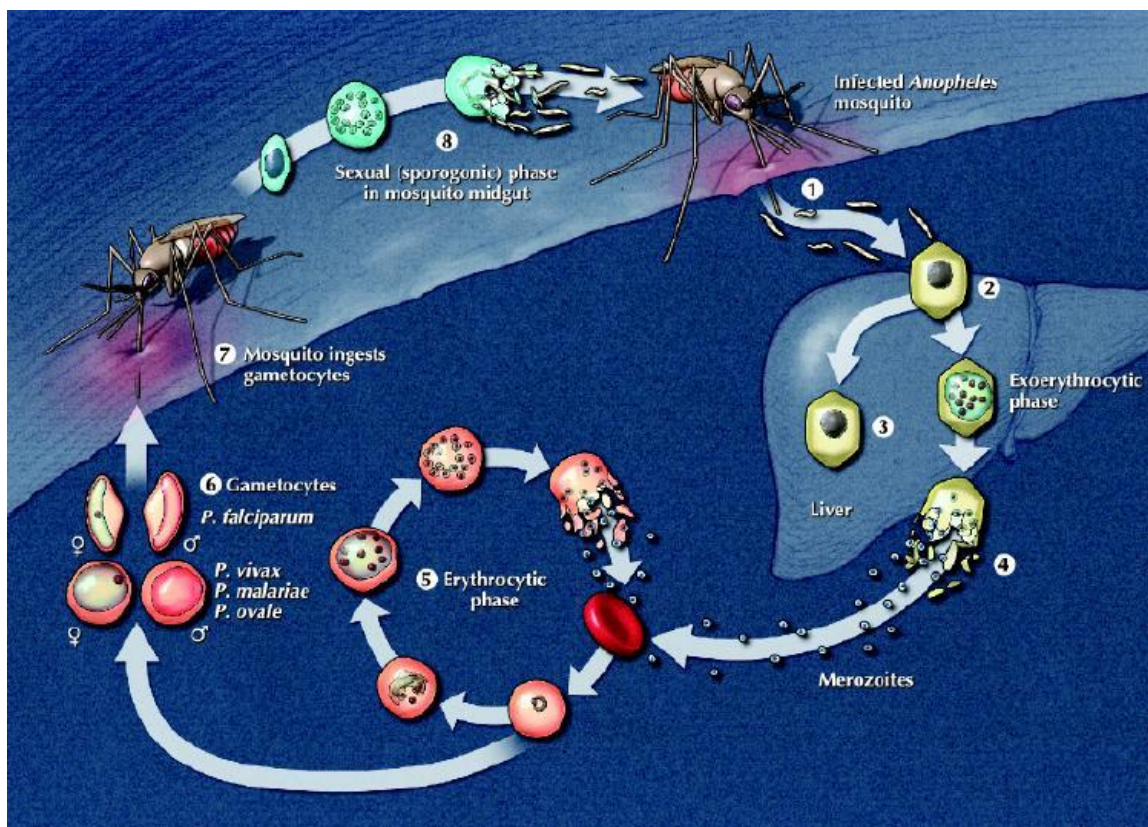
A. Antecedentes

1. **Malaria.** La malaria es una infección parasitaria que afecta a humanos, la cual ha causado una significativa morbilidad y mortalidad en todo el mundo, especialmente en las regiones tropical y subtropical (Suh *et al* 2004, Tangpukdee *et al* 2009). Las cinco especies del protozoo que causan infecciones parasitarias en humanos son de la familia *Plasmodium*; *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* y *P. knowlesi* (Suh *et al* 2004, Tangpukdee *et al* 2009).

La malaria causada por *P. falciparum* es la más seria y muchas veces fatal (Tangpukdee *et al* 2009). Se caracteriza principalmente por presentar fiebres altas, dolores de cabeza, escalofríos, mareos, náuseas, entre otros; síntomas que son variables e inespecíficos (Suh *et al* 2004, Tangpukdee *et al* 2009).

2. **Ciclo de vida del parásito.** El proceso de infección del parásito se muestra en la Figura 1. El parásito es transmitido por la picadura del zancudo *Anopheles* portador. En el hospedero humano ocurre la etapa asexual empezando con la fase exoeritrocítica. Fase donde los esporozoitos viajan por el torrente sanguíneo hasta el hígado e infectan a los hepatocitos (células del hígado) y maduran a esquizontes. El esquizonte se rompe liberando los merozoitos al torrente sanguíneo. Continúa la fase eritrocítica, donde los merozoitos infectan a los glóbulos rojos. En el zancudo hospedero ocurre la etapa sexual, después de alimentarse de una persona infectada está listo para continuar con el ciclo (Suh *et al* 2004).

Figura 1. Ciclo de infección del parásito *Plasmodium*, etapa asexual y sexual.

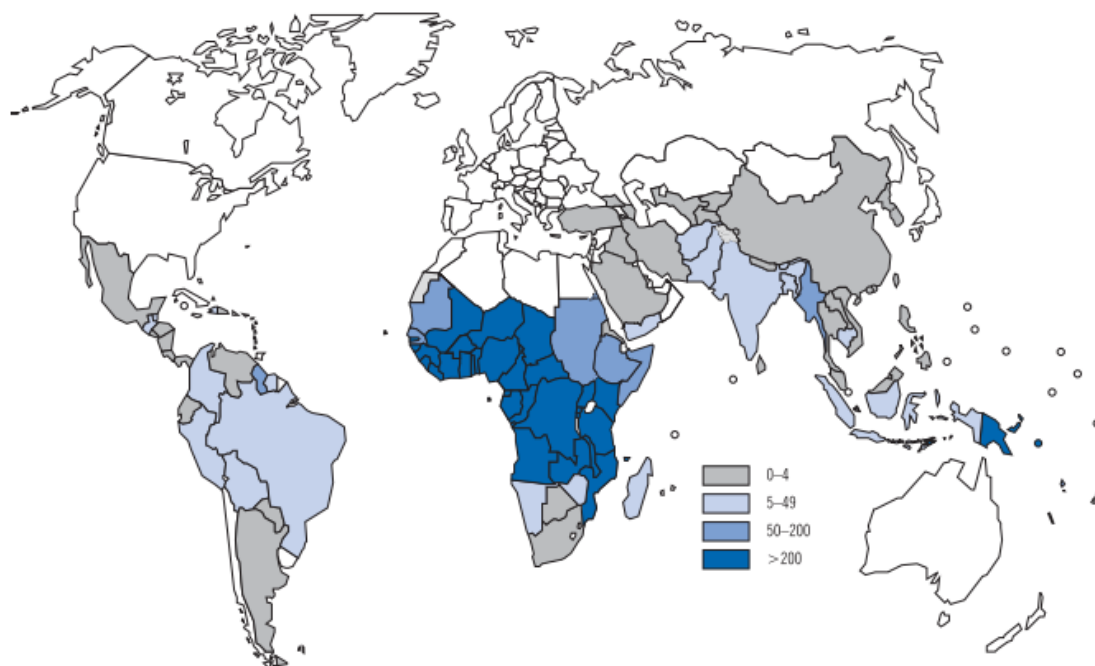


En el hospedero humano ocurre la etapa asexual, empieza con la fase de infección de hepatocitos. 1) Los esporozoitos son inyectados por la picadura del zancudo portador, 2) viajan en el torrente sanguíneo hasta el hígado, donde invaden los hepatocitos. 3) Los hepatocitos infectados maduran a esquizontes y 4) tras su ruptura, los merozoitos son liberados en el torrente sanguíneo. En la fase de infección eritrocítica, 5) los merozoitos infectan los eritrocitos o 6) se desarrollan como gametocitos. En el zancudo vector ocurre la etapa sexual, 7) los gametocitos son ingeridos por el zancudo y finalmente 8) se producen los esporozoitos en el intestino viajando posteriormente a las glándulas salivales. Fuente: (Suh *et al* 2004)

3. La malaria en el mundo. Actualmente hay 104 países endémicos de malaria; de los cuales 49 corresponden a la región de África donde ocurren la mayoría de casos y de muertes. Los países endémicos de Sur América son los que se encuentran en la región del río Amazonas: Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Guayana, Perú, Surinam y Venezuela. En Centro América los países endémicos son: Belice, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Panamá y México. Otras regiones endémicas se localizan en el Caribe y en Asia, tal como se observa en el mapa de la Figura 2 (World

Health Organization. 2010, World Health Organization. 2012b). La malaria causada por *P. falciparum* tiene mayor número de casos en África, mientras que en Asia y las Américas es menor el número de casos, siendo más común las infecciones por *P. vivax* (Winzeler 2008).

Figura 2. Mapa de los países endémicos de malaria.



Estimación de la incidencia por cada 1000 habitantes. Fuente: (World Health Organization. 2008b).

4. Erradicación de la malaria. En la lucha por eliminar la enfermedad a nivel global el Programa Mundial contra la Malaria (PMM) de la OMS, ha implementado programas de control con los objetivos de reducir y mantener la incidencia a niveles bajos, eliminarla de un área geográfica definida y por último erradicarla mundialmente. Las fases para conseguir la erradicación de la malaria consiste en: el control, la eliminación y la erradicación (World Health Organization. 2008a).

La fase de control se logra con la cobertura de tres aspectos importantes del programa de control: a) Tratamiento: que las personas tengan mayor acceso a

intervenciones antimaláricas. b) Prevención: difundir mosquiteros con insecticida y fumigación de interiores. c) Propagación: realizar el diagnóstico implementando pruebas rápidas, baratas y fiables (Cohen *et al* 2010, Mendis *et al* 2009, World Health Organization. 2008a).

La fase de transición llamada “pre-eliminación” ocurre cuando la tasa de incidencia de malaria decrece a cinco nuevos casos o menos por cada 1000 personas en riesgo al año. También se considera la tasa de confirmación parasitológica por microscopia o PDRs menor al 5%. La infección por malaria se considera suficientemente manejable y se reorienta los programas de control hacia la eliminación (World Health Organization. 2008a).

Si la incidencia disminuye por debajo de un caso por cada 1000 habitantes, nuevamente se reorienta los programas hacia la fase de “eliminación”. La prevención de la reintroducción es importante cuando el número de casos adquiridos localmente es bajo (debajo de 100 casos a nivel nacional) (World Health Organization. 2008a).

La meta es ponerle fin a la transmisión y limpiar los focos de malaria y reducir el número de transmisiones a cero. Se considera que un área es libre de malaria cuando el número de infecciones es cero en por lo menos en 3 años (Cohen *et al* 2010). Y finalmente se solicita el certificado de eliminación a la OMS (World Health Organization. 2008a).

Sin embargo, el diagnóstico, tratamiento y vigilancia no han recibido la atención en paralelo con la prevención. Es por ello que en el 2012 se implementa la iniciativa del PMM llamado “T3 (*Test, Treat, Trick*) Testee, Trate y Vigile como apoyo para cubrir la necesidad de pruebas de diagnóstico y tratamiento antimalárico y también fortalecer la vigilancia en los países (World Health Organization. 2012a).

La OMS reportó que 15 de 21 países de Centro y Sur América han disminuido la incidencia más del 75%. De los 104 países endémicos en el 2012, 97 están en la fase de

control (incluyendo Guatemala) y 7 están combatiendo contra la reintroducción (Mendis *et al* 2009, World Health Organization. 2012b, World Health Organization. 2013b).

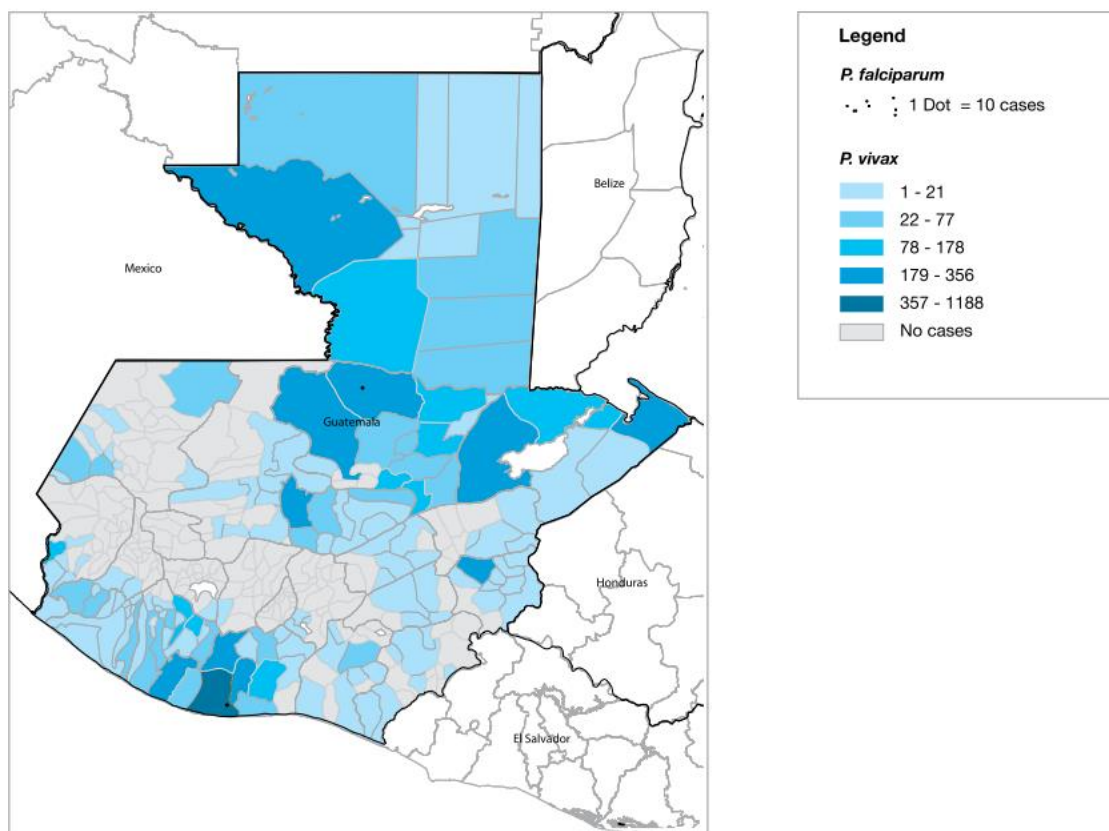
5. La malaria en Guatemala. El 70% del territorio guatemalteco es considerado endémico. El número de casos ha disminuido en la última década, pero la transmisión continua en algunos departamentos. Sin embargo, fue el segundo país de Centro América y Honduras con el mayor número de casos en el 2008, en su mayoría producido por *P. vivax*. Guatemala tiene pocos casos de *P. falciparum*, en el 2012 fueron reportados 68 (World Health Organization. 2009, World Health Organization. 2013b).

En el país, la malaria se focaliza en tres áreas: a) la región del Pacífico, en los departamentos de Escuintla, Suchitepéquez, San Marcos y Quetzaltenango; b) la región norte de la Sierra Madre en la zona este-central en el departamento de Baja Verapaz; y c) en el norte los departamentos de Alta Verapaz, Peten e Izabal como se observa en el mapa de distribución de la Figura 3.

6. Diagnóstico de la enfermedad de Malaria. A principios del 2010, la Organización Mundial de la Salud, en el Reporte Mundial de la Malaria, recomendó que todas las personas con sospecha de tener malaria deberían recibir una confirmación parasitológica, ya sea por microscopía o empleando pruebas rápidas de diagnóstico (PDRs) (World Health Organization. 2010, World Health Organization. 2011).

a. Diagnóstico clínico. Es el método comúnmente usado, menos caro proporcionado por médicos. Este se basa en el estudio de los signos, síntomas y examen físico de los pacientes. Los síntomas que se presentan suelen ser poco específicos y variables (Tangpukdee *et al* 2009).

Figura 3. Distribución del número de casos de malaria por *Plasmodium vivax* y *P. falciparum* en las diferentes regiones de Guatemala reportados en el año 2008.



En el 2008, el número de casos de malaria por *P. falciparum* fueron reportados en los departamentos de Escuintla y Alta Verapaz. Fuente: (PAHO 2010).

Los síntomas que puede presentar son fiebres altas, escalofríos, malestares, dolores de cabeza, mialgias, mareos, náuseas, vómitos, toz, anemia, en casos avanzados afecta neurológicamente produciendo coma y en algunos casos la muerte (Suh *et al* 2004, Tangpukdee *et al* 2009). Sin embargo, debido a la poca especificidad de los síntomas, se puede tener confusiones con el diagnóstico de otras infecciones de tipo viral o bacteriana, u otras enfermedades tropicales (Tangpukdee *et al* 2009, Wongsrichanalai *et al* 2007).

a. Diagnóstico por microscopía. Es el método estándar de oro, se basa en una tinción con Giemsa de gota gruesa o frote de sangre periférica sobre un portaobjetos. La muestra de sangre es extraída del dedo utilizando una lanceta estéril, la cual es examinada utilizando un microscopio de luz. Es un método simple y de bajo costo. Sin embargo, el

proceso e interpretación requieren de una intensa labor, tiempo, experiencia y entrenamiento de parte de los microscopistas (Tangpukdee *et al* 2009, Wongsrichanalai *et al* 2007).

Los microscopistas tienen la capacidad de detectar en promedio 50-100 parásitos/ μ l, y los expertos pueden detectar hasta 5 parásitos/ μ l (Tangpukdee *et al* 2009, Wongsrichanalai *et al* 2007). Debido a que la precisión del diagnóstico por microscopía se basa en la experiencia de los microscopistas y la calidad de los frotis, es difícil mantener un equipo de microscopía de buena calidad en áreas remotas donde las infecciones de malaria son más frecuentes (Wongsrichanalai *et al* 2007).

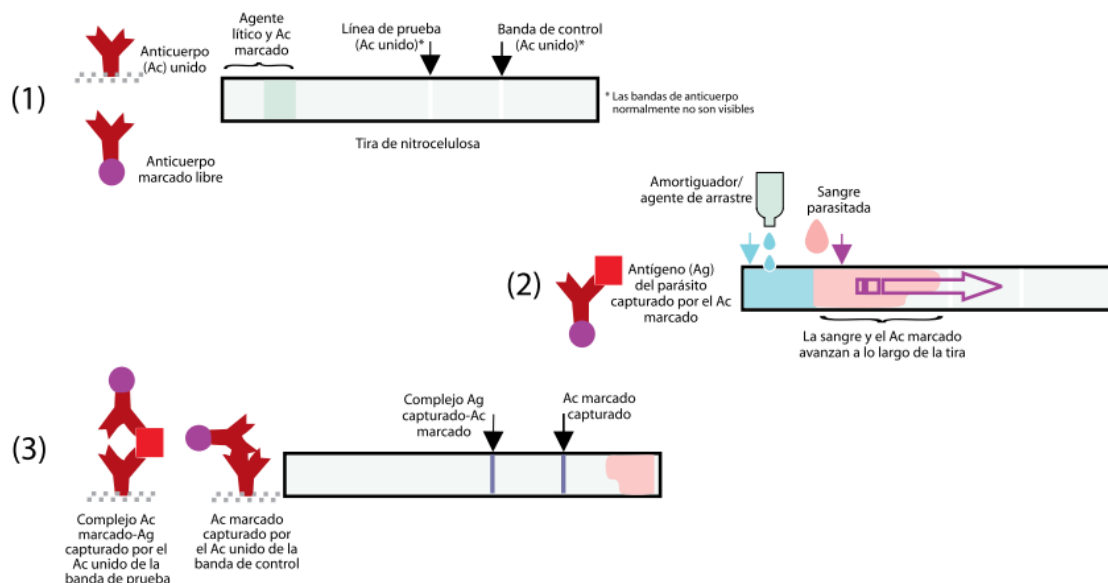
b. Pruebas de diagnóstico rápido (PDRs). Es un método inmunocromatográfico de flujo, fácil y rápido donde la muestra migra a través de la superficie de una membrana de nitrocelulosa por capilaridad, como se esquematiza en la Figura 4. Las PDRs, también son llamadas “tiras reactivas” o “dispositivos de diagnóstico rápido de la malaria”, detectan antígenos específicos producidas por el parásito. Dichos antígenos o proteínas se encuentran en la sangre de la persona infectada (Bell *et al* 2004).

El resultado al aplicar dichas pruebas se interpreta mediante un cambio de color en una tira de nitrocelulosa absorbente (Bell *et al* 2004). Son fáciles de emplear y provee resultados rápidos (de 15 a 20 minutos) sin necesidad de electricidad, equipo caro o una extensa capacitación. Algunas PDRs pueden detectar únicamente *P. falciparum*, mientras que otras pueden detectar dos o más especies, como *P. vivax*, como muestra la Figura 4 (Gamboa *et al* 2010).

Sin embargo, existen factores que pueden afectar la calidad de las pruebas.

- 1) Factores parasitarios: como las especies y sus niveles de parasitemia, la variabilidad en la estructura del antígeno y la presencia del antígeno (Wellems & Howard 1986).
- 2) Factores de la prueba: como las condiciones de la PRD, la técnica usada en la ejecución y la interpretación de resultados (Wellems & Howard 1986).

Figura 4. Prueba rápida de diagnóstico (PRD) para la malaria por inmunocromatografía.



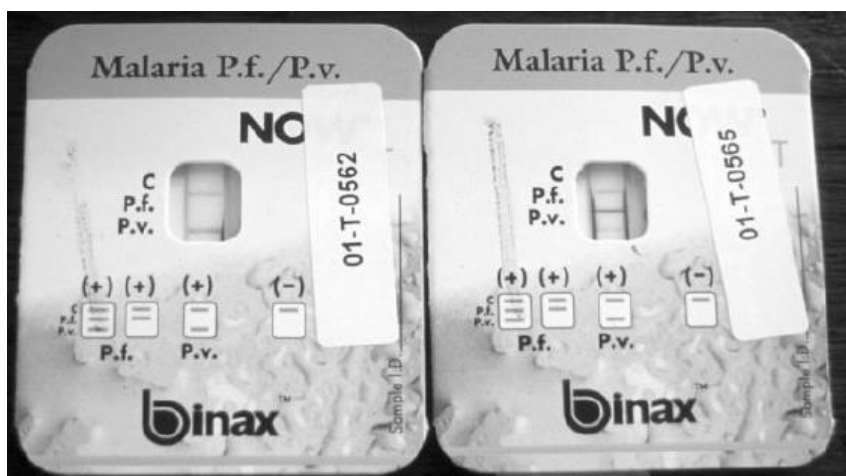
Se basa en, 1) una tira de nitrocelulosa que contiene anticuerpos marcados con un colorante y un anticuerpo fijo en una banda fina. 2) Se agrega la muestra de sangre y el amortiguador en un extremo que avanza por la tira atravesando las bandas de anticuerpos. 3) Se forma un complejo anticuerpo-antígeno-anticuerpo, con la proteína antigénica, atrapado en la banda de prueba y un complejo anticuerpo-anticuerpo en la banda control. Fuente: (Bell *et al* 2004).

Las PDRs para malaria se basan en la detección de proteínas parasitarias tales como la proteína rica en histidina-2 (PfHRP2) presente únicamente en *Plasmodium falciparum*, las proteínas *Plasmodium* lactato deshidrogenasa (pLDH) y aldolasas presentes en las cuatro especies causantes de la malaria humana (Baker *et al* 2005, Perkins & Bell 2008).

En un estudio se comparó la sensibilidad y especificidad en dos tipos de PDRs, la basada en HRP-2 y la aldolasa. El resultado obtenido fue un 95.3% de sensibilidad y 94.2% de especificidad para detectar una infección por *P. falciparum* empleando la PDR PfHRP2 y 68-9% y 99.8% respectivamente para detectar infección por algún *Plasmodium* empleando la PDR aldolasa (Murray *et al* 2008a).

En general, se ha obtenido mejor sensibilidad en las PDRs PfHRP2 que en la PDR pLDH. En el mercado existe variedad de marcas que detectan PfHRP2, se pueden nombrar algunas de las que se considera de alta sensibilidad, entre el 95% y el 100%: SD BIOLINE Malaria Ag Pf de Standard Diagnostic, Inc.; CareStart™ Malaria HRP2 de Access Bio, Inc.; BIOCREDIT Malaria pf(HRP II) de RapiGen Inc. y First Response® Malaria Ag HRP2 de Premier Medical-Corporation Ltd. (World Health Organization. 2012b).

Figura 5. Ejemplar de una prueba de diagnóstico rápido basa en PfHRP2, producto de marca BinaxNow®.



Ejemplo de un resultado positivo para *P. vivax* y positivo para *P. falciparum*.

Fuente: (Murray *et al* 2008a).

Los antígenos del parásito aldolasa y pLDH son eliminados con mayor rapidez después de un tratamiento efectivo, sin embargo, la PfHPR-2 persiste por más tiempo. Esto es importante debido a que las pruebas pueden revertir el resultado a positivo debido a que no todos los tratamientos por cloroquina y quinina son eficaces para erradicar los gametocitos. Es en esta etapa de desarrollo donde también es producida la PfHRP2 (Murray *et al* 2008a).

7. Genómica de la proteína rica en histidina-2 (PfHRP2) y proteína rica en histidina-3 (PfHRP3) de *P. falciparum*. El gen de la proteína rica en histidina 2 (*pfhrp2*) está localizado en el cromosoma 7, codifica una secuencia de aminoácidos que contiene 34% de histidina, 37 de alanina y 10% de ácido aspártico (Wellems & Howard 1986). Esta proteína es sintetizada y expresada durante la etapa asexual (Figura 6) en la superficie de los eritrocitos infectados (Howard *et al* 1986) y también circula en la sangre periférica de la persona infectadas (Biswas *et al* 2005). Estas características la hace ideal para el diagnóstico utilizando pruebas de detección de antígenos (Baker *et al* 2005).

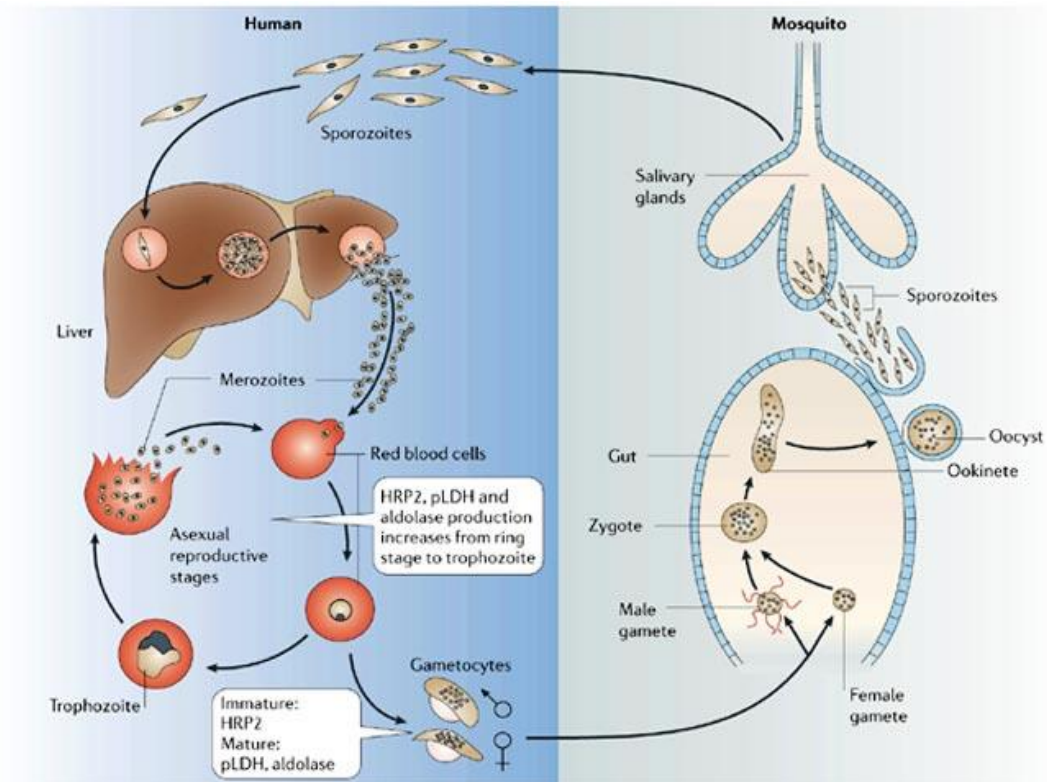
El gen de la proteína rica en histidina 3 (*pfhrp3*) se localiza en el cromosoma 13 (Kemp *et al* 1987), que comparte similitud estructural con *pfhrp2* (Baker *et al* 2005). Las cepas de laboratorio D10 y W2Mef contienen delección del gen *pfhrp2*. Las PDRs evaluadas utilizando dichas cepas, pueden proporcionar un resultado positivo debido a que los anticuerpos presentes en las pruebas detectan otro antígeno del parásito. El antígeno responsable de la reacción cruzada en la prueba es la proteína PfHRP3 (Baker *et al* 2005).

La función de PfHRP2 aún no está determinada, sin embargo se han propuesto diferentes teorías. Una teoría sugiere que la proteína puede estar involucrada en la detoxificación de heme libre convirtiéndolo en hemozoína inactiva (Choi *et al* 1999, Sullivan *et al* 1996). Otra teoría sugiere que la PfHRP2 puede estar involucrada en la remodelación del citoesqueleto de eritrocitos infectados y en la modulación de la respuesta inmune del hospedero (Bosshart & Heinzelmann 2003).

Debido a la similitud estructural de ambas proteínas, su función podría ser similar y su transcripción podría estar controlada por mecanismos similares (Baker *et al* 2011). Sin embargo, la transcripción de *pfhrp2* es más baja cuando hay delección en *pfhrp3*. De forma similar, la transcripción de *pfhrp3* es menor cuando *pfhrp2* está ausente. Esto sugiere que la sensibilidad de la prueba puede ser afectada por los bajos niveles de expresión de las proteínas. Esto es especialmente relevante en las infecciones

de baja parasitemia ($<200P/\mu l$), en los cuales pueden presentarse resultados falso negativo para malaria (Baker *et al* 2011).

Figura 6. Ciclo de vida del *Plasmodium falciparum* y la expresión de la proteína PfHRP2.



La expresión de la proteína PfHRP2 ocurre en la etapa asexual, en la fase de infección eritrocítica.

Fuente: Nature Reviews Microbiology 2006.

8. Estudios de monitoreo de los genes *pfhrp2/pfhrp3*. En un estudio se evaluó la presencia/ausencia de los genes *pfhrp2/pfhrp3* por PCR anidado en 159 muestras de *P. falciparum* colectadas en Perú entre los años 2003 y 2007. El resultado fue 41% de muestras con ausencia del gen *pfhrp2*, 70% de muestras con ausencia del gen *pfhrp3* y una ausencia combinada de los genes del 21.6%. La ausencia de los genes del parásito puede ser consecuencia de deleciones cromosomales (Gamboa *et al* 2010).

En otro estudio realizado a nivel mundial en el que evaluaron 485 aislados de *P. falciparum* colectados en 30 países endémicos de malaria por PCR semianidado, también encontraron cepas con delección de los genes *pfhrp2/pfhrp3* en aislados de la región Amazonas de Perú (Baker *et al* 2010). En un estudio sobre el diagnóstico de malaria por *P. falciparum* en la región amazónica de Brasil se reportó un falso negativo en la PDR basada en PfHRP2. En este caso, se determinó que dicha cepa presentaba delección en ambos genes (Houze *et al* 2011).

Este hallazgo implica que en las áreas endémicas como Perú y Brasil, el diagnóstico para la malaria puede fallar si se utilizan las PDRs basadas en PfHRP2/PfHRP3. Si bien las PDRs son sensibles, es importante tener precaución al emplearlas en lugares donde se reporten cepas con genotipo de una o doble delección. Por lo tanto, se recomienda iniciar el monitoreo de la presencia y propagación de los parásitos con las delecciones de dichos genes en áreas fuera de Sur América para asegurar la efectividad de las PDRs (Baker *et al* 2011, Gamboa *et al* 2010, Houze *et al* 2011).

En el año 2001, se establece una red de vigilancia de la resistencia a los antimaláricos por la Red Amazónica de Vigilancia de la Resistencia a los Antimaláricos (RAVREDA) en conjunto con la Iniciativa Amazónica contra la Malaria (AMI). En el 2009 se contó con el apoyo del Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) en la ejecución de un proyecto de vigilancia molecular con el objetivo de evaluar la magnitud de las delecciones de los genes *pfhrp2/pfhrp3*. Sin embargo, es preciso continuar con el monitoreo de la presencia/ausencia de estos genes al menos cada tres años en la región de Centro América, Sur América y el Caribe (Barnwell *et al* 2012).

En Guatemala, aún no se tenía información completa sobre la distribución de los genes *pfhrp2* y *pfhrp3*. Dentro del proyecto de AMI, personal del Laboratorio de Entomología y Ecología, unidad de Malaria del Centro de Estudios en Salud (CES) de la Universidad del Valle de Guatemala (UVG) realizó el análisis de 64 aislados provenientes de muestras guatemaltecas. Las muestras aisladas utilizadas para los análisis fueron obtenidas del departamento de Escuintla, región endémica del país.

El método molecular empleado para su análisis fue una reacción de PCR anidada, utilizando grupos de cebadores específicos para las cepas peruanas. El resultado obtenido fue 100% de las muestras con presencia del gen *pfhrp2* y 0% de las muestras con presencia del gen *pfhrp3*. Se ha demostrado que el gen tiene regiones variables, por lo que puede considerarse que los cebadores empleados no son específicos para las cepas del país antes de afirmar la ausencia del mismo.

El presente trabajo tiene como fin completar la información de la prevalencia de los genes *pfhrp2* y *pfhrp3* en cepas de *P. falciparum* del país utilizando un método molecular de PCR específico. Con la información adquirida, poder orientar al programa nacional de control de malaria en la adquisición de PDRs efectivas.

9. Métodos de PCR y las variaciones en la técnicas molecular para la estandarización del ensayo.

Tipo de PCR	Descripción	Ventajas de uso	Referencia
Convencional	Permite la amplificación de ADN o ARN a través de ciclos repetitivos <i>in vitro</i> . Cada ciclo contiene tres patrones de temperatura; desnaturalización, hibridización y elongación. Los requerimientos para la reacción son: templado de ADN, cuatro desoxyribonucleotidos, dos cebadores, Mg ²⁺ y la polimerasa termoestable.	Permite la identificación y caracterización de diferentes agentes a nivel molecular.	Hernández y Gómez. Intechopen.

Tipo de PCR	Descripción	Ventajas de uso	Referencia
Anidado-semianidado	Consiste en una reacción de PCR utilizando un grupo de cebadores externos. Después, una alícuota del primer producto es amplificado con un segundo grupo de cebadores internos. El producto obtenido es más pequeño.	Utilizado cuando hay problemas con la calidad y cantidad de templado, que puede estar relativamente muy diluido con el resto de material presente o hay una limitada pureza.	(Dieffenbach <i>et al</i> 1993)
Gradiente	Es una corrida simple en la que se puede evaluar 12 diferentes temperaturas de hibridización, elongación o desnaturalización.	Utilizado cuando existen bandas secundarias no específicas. La selección de la temperatura de hibridización es crítica en la optimización y es usualmente más alta que la calculada empíricamente.	Prezioso y Jahns, Eppendorf Scientific Inc.
Touch-Down	Durante los primeros ciclos de la reacción de PCR, la temperatura de hibridización es colocada más alta que la temperatura calculada y disminuye gradualmente con cada ciclo del PCR hasta llegar a la temperatura determinada.	Utilizado para eliminar las bandas inespecíficas al aumentar o disminuir la temperatura de hibridización.	(Johnson 2000)
Band-Stab	Se utiliza una aguja o punta para picar cuidadosamente la banda de interés en el gel de electroforesis de múltiples productos y es inoculada para realizar una segunda reacción.	El método facilita el aislamiento de un producto de PCR de una mezcla de otros productos de diferente peso molecular.	Bjourson y Cooper 1992

B. Justificación

La malaria ocasionada por *P. falciparum* es la más severa y fatal, por lo tanto su diagnóstico rápido y preciso es muy importante (Suh *et al* 2004, Tangpukdee *et al* 2009). Para ello se han implementado las Pruebas de Diagnóstico Rápido (PDRs). Dentro de las PDRs más sensibles y específicas para la detección de infecciones con bajas parasitemias (200 parásitos/ μ l) se encuentran las basadas en la detección de la Proteína Rica en Histidina-2 (PfHRP2), en combinación con la PfHRP3 (Tangpukdee *et al* 2009, Wongsrichanalai *et al* 2007).

De acuerdo a la OMS, Guatemala aún se encuentra en la fase de control en vías a la eliminación, ya que disminuyó al 95% el número de casos de infección por *P. falciparum* desde el año 2000 al 2012 (World Health Organization. 2012b, World Health Organization. 2013b). Este avance se ha logrado al utilizar una combinación de estrategias, entre ellas está proporcionar el diagnóstico parasitológico temprano y el tratamiento adecuado (World Health Organization. 2008a).

El país, como estrategia nacional, busca eliminar la malaria para el año 2020 de acuerdo a un convenio firmado por los Ministerios de Salud de Mesoamérica (The Global Found to Fight AIDS 2013, World Health Organization. 2012b). En las regiones endémicas del país, las infecciones pueden ser de baja parasitemia, por lo que es necesario evaluar los genes *pfhrp2/pfhrp3* para asegurar el uso de las pruebas rápidas basadas en PfHRP2/PfHRP3, que han reportado ser de alta sensibilidad.

En estudios previos se evaluaron aislados de cepas de *P. falciparum* de diferentes países, encontrándose ausencia de los genes *pfhrp2/pfhrp3* en muestras provenientes de la región Amazonas de Perú y Brasil. Este hallazgo implica que en regiones donde se reporten cepas con genotipo de una o doble delección el diagnóstico para malaria puede fallar si se utilizan las PDRs basadas en PfHRP2/PfHRP3 (Baker *et al* 2010, Gamboa *et al* 2010). Por lo tanto, es importante el monitoreo de la presencia y propagación de estos

parásitos en regiones endémicas donde no han sido evaluados dichos genes para asegurar la efectividad de las PDRs (Gamboa *et al* 2010).

Guatemala solo cuenta con resultados concluyentes para el gen *pfhrp2*, sin embargo no es suficiente evidencia para respaldar el uso dicha PDRs, es necesaria la información completa sobre la distribución de la presencia o ausencia de los genes *pfhrp2/pfhrp3* en conjunto. La sensibilidad de la PDR es afectada si las cepas presentaran delección en el gen *pfhrp3* y adicionalmente en los casos de infecciones con parasitemias bajas, ya que la concentración de proteína expresada sería menor (Baker *et al* 2011).

El presente estudio tiene como objetivos implementar un método molecular de PCR para la detección del gen *pfhrp3* y determinar su límite de detección, empleando cebadores reportados en la literatura y cebadores diseñados para este trabajo. También se busca iniciar el monitoreo de la presencia/ausencia en aislados de *P. falciparum* retrospectivos de la región de Escuintla, Guatemala. El resultado generará la primera información de la prevalencia de ambos genes en conjunto de cepas *de P. falciparum* del país y permitirá orientar al programa nacional de control de malaria en la adquisición de PDRs efectivas para su uso en regiones endémicas del país.

C. Objetivos

1. Objetivo general:

a. Determinar la prevalencia del gen de la proteína rica en histidina-3 en cepas de *Plasmodium falciparum* (*pfhrp3*) de Guatemala; a partir de la estandarización de un método de PCR para muestras de ADN extraídas de sangre en papel filtro.

2. Objetivos específicos:

- a. Estandarizar un método molecular de PCR que amplifique el gen *pfhrp3* para muestras de sangre en papel filtro, de acuerdo a la literatura, utilizando controles de cepas con genotipo conocido.
- b. Determinar el límite de detección del método a partir de una serie de diluciones de parásitos por microlitro.
- c. Iniciar el monitoreo del gen *pfhrp3*, evaluando los aislados de las muestras de sangre en papel filtro retrospectivas provenientes de la región de Escuintla, Guatemala.
- d. Confirmar la presencia del gen *pfhrp3* en las muestras con amplificación a partir del análisis de secuencias.
- e. Diseñar una serie de cebadores alternativos de PCR capaces de detectar el gen *pfhrp3*, si no fueran específicos para las cepas de Guatemala.

D. Hipótesis conceptual

Los aislados de cepas de *P. falciparum* obtenidos del departamento de Escuintla, Guatemala en los años 1998 y 1999 presentan el gen *pfhrp3*, amplificado por el método molecular de PCR estandarizado.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Materiales utilizados en los diferentes procesos de laboratorio.

1. Reactivos. En el Cuadro 1 se describe los diferentes reactivos utilizados en los procedimientos de laboratorio para detectar el gen *pfhrp3* en aislados de capas guatemaltecas.

Cuadro 1. Descripción de los reactivos utilizados en los diferentes procedimientos de laboratorio.

Reactivo	Marca y/o concentración
Amortiguadora para PCR	5X Colorless GoTaq® Flexi Buffer Promega
Cloruro de magnesio (MgCl₂)	25 mM, Promega
Taq polimerasa	5U/μl, GoTaq® Hot Start Polymerase Promega
Desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs)	2mM c/u, GeneChoice, Inc.
Agarosa grado molecular	Sigma Aldrich o Merck
Amortiguador TBE para geles	10X, Roche
Marcador molecular	50pb Promega
Bromuro de etidio	10mg/ml Merck
Kit de extracción	Mini kit QIAamp DNA, Quiagen

2. Equipo. En el Cuadro 2 se describe el equipo utilizados en los diferentes procedimientos de laboratorio para detectar el gen *pfhrp3* en aislados de capas guatemaltecas.

Cuadro 2. Descripción del equipo utilizado en los diferentes procedimientos de laboratorio.

Equipo	Marca y modelo
Termociclador	2720 Thermal Cycler Applied Biosystems, Inc.
Cámara de electroforesis	RunOne Electrophoresis Cell EmbiTec
Cámara fotográfica	Canon
Computadora de escritorio	Dell
Transiluminador	UVP Gel
Campana de flujo laminar	--
Centrifuga refrigerada	EBA 12 R Heittich Zentrifugen
Centrifuga	Mikro 120 Heittich Zentrifugen
Balanza analítica	Mettler AE 163
Refrigerador	Frigidare
Congelador	Frigidare
Bloque térmico	VWR Scientific
Micropipetas	1x,10x,20x,100x y 1000x Eppendorf/Rainin
Mezclador vórtex	Fisher Schientific

3. Otros materiales. En el Cuadro 3 se describen otros materiales necesarios, utilizados en los procedimientos de laboratorio para detectar el gen *pfhrp3* en aislados de capas guatemaltecas.

Cuadro 3. Descripción de los materiales utilizados en los diferentes procedimientos de laboratorio.

Material	Descripción
Puntas bloqueadas	10x, 20x, 100x y 1000x Neptune
Tubos de PCR 0.2	0.2ml Eppendorf
Tubos 1.5	1.5 ml Eppendorf
Gradillas	--
Guantes	Nitrilo
Termómetro	--
Cronometro	--
Marcadores para tubos	Sharpie
Papel parafilm	Parafilm

B. Origen de las muestras y consideraciones éticas.

Los aislados de ADN extraído de sangre en papel filtro provienen de un estudio “Marcadores moleculares en *Plasmodium vivax* asociados con resistencia a cloroquina y recurrencias” FONACYT No. 12-97”, ejecutado en los años 1998-99. En dicho estudio se contó con la firma del consentimiento informado por parte de los voluntarios. Las muestras fueron colectadas en uno de los departamentos de alto riesgo en Guatemala: Escuintla. Se realizó el diagnóstico microbiológico para confirmar la infección por malaria. El ADN de las muestras confirmadas con *P. falciparum* fue extraído y almacenado a -20°C.

Posteriormente en el año 2010, del FONACYT No. 12-97 se derivó el estudio “Prevalencia de genotipos resistentes de medicamentos antimaláricos en *P. falciparum* en Guatemala”. En el estudio se utilizaron las muestras obtenidas del proyecto mencionado anteriormente. Estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Centro de Estudios en Salud.

El presente estudio también se realizó para comprender las características genéticas de las cepas de malaria circulantes en Guatemala. Por lo tanto las consideraciones éticas tomadas en cuenta son las siguientes:

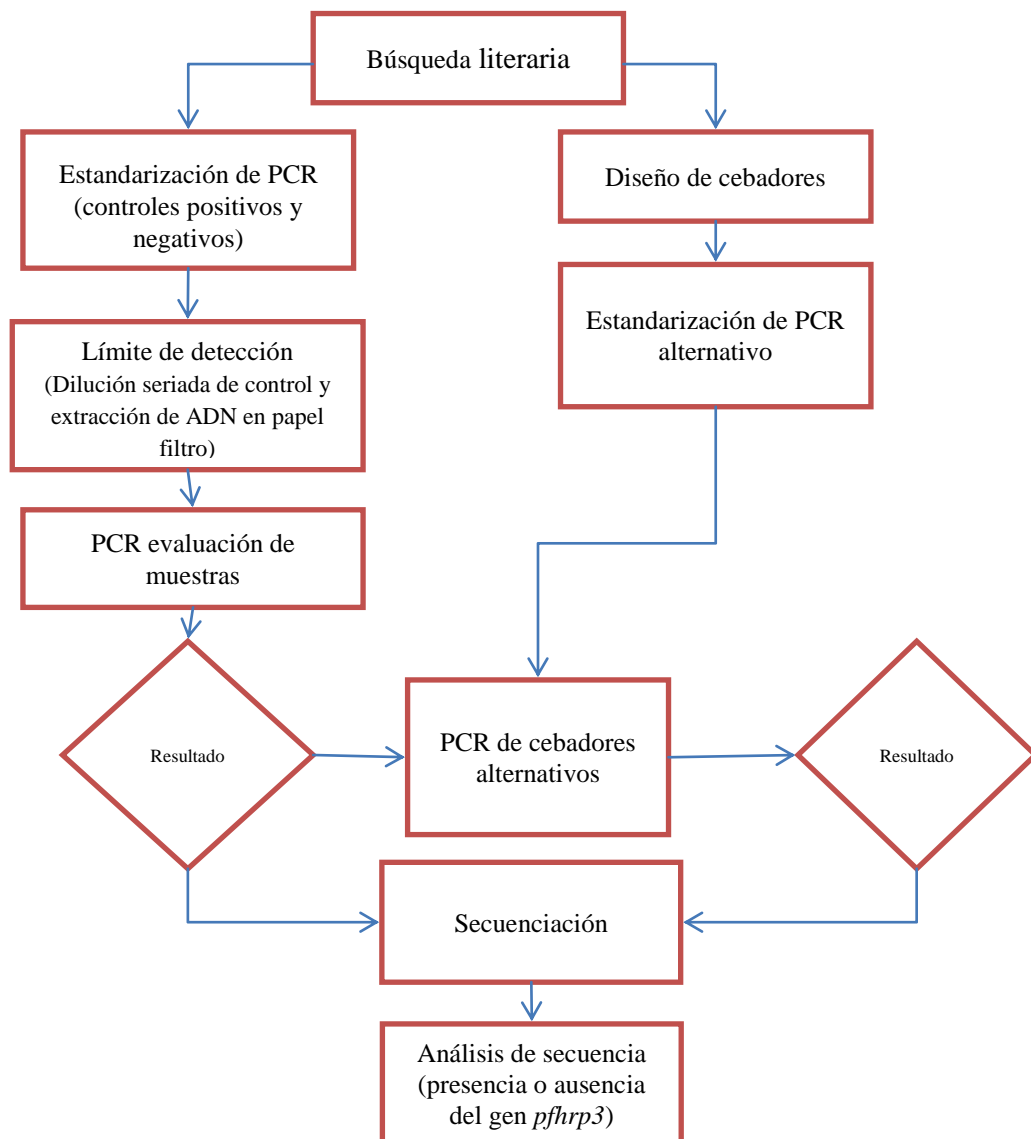
1. Los aislados de ADN y muestras están identificadas con un código numérico, por lo tanto están desenlazadas de identificadores personales.
2. No se tiene acceso a la base de datos confidenciales.
3. Se trabajó con aislados de ADN (muestras colectadas, material genético extraído, utilizado y almacenado el remanente de ADN).

Por tanto, este estudio se clasifica como una investigación que no involucra sujetos humanos.

C. Esquema de la metodología general realizada en este estudio.

El procedimiento llevado a cabo en el estudio de caracterización e identificación molecular del gen *pfhrp3* en aislados guatemaltecos se esquematizó en la Figura 7.

Figura 7. Esquema del procedimiento general realizado a lo largo de la estandarización y análisis de muestras.



D. Revisión de literatura, identificación del método y búsqueda de secuencias publicadas.

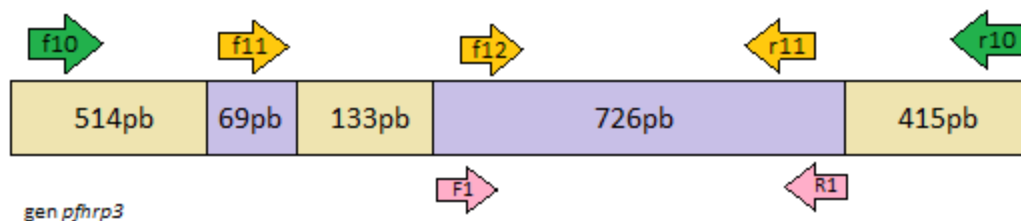
En dos estudio publicado por Baker *et al.* en el 2005 y en el 2010, utilizaron un grupo de cebadores utilizados en una técnica de PCR convencional y semianidado para evaluar el gen *pfhrp3* en cepas de diferentes países endémicos. Se realizó una búsqueda en la base de datos de nucleótidos de NCBI, con las palabras clave “hrp3”, “hrpIII” y “*Plasmodium falciparum*”. Los cebadores fueron analizados con BLAST de NCBI.

E. Diseño de cebadores alternativos para amplificar el gen *pfhrp3*.

Se realizó el diseño de dos series de cebadores alternativos para evaluar las muestras con resultado negativo con el método estandarizado de PCR Baker; uno grupo para PCR convencional y el otro para PCR semianidado. El diseño se realizó tomando en cuenta los parámetros descritos en el Cuadro 4, se utilizó la herramienta bioinformática Primer-BLAST (NCBI) y también de forma manual al excluir las opciones bajo dichos parámetros.

Se utilizó la información de la secuencia completa del gen *pfhrp3* en GenBank con el código de acceso U69552.1, y la descripción de los grupos de cebadores se encuentra en el Cuadro 5. La posición de los cebadores en el genoma, comparando los grupos diseñados con los de Baker, se observa en la Figura 8.

Figura 8. Posición de los cebadores diseñados y los reportados por Baker *et al.* en el gen *pfhrp3*.



Grupo de cebadores diseñados PCR convencional: flechas color verde.

Exón: morado

Grupo de cebadores diseñados PCR semianidado: flechas color anaranjado.

Intrón: amarillo

Grupo de cebadores Baker PCR convencional: flechas color rosado.

Cuadro 4. Descripción de los parámetros tomados en cuenta para el diseño de los grupos de cebadores.

Parámetro	Descripción
Largo	18 - 20 bases para fragmentos menores a 5 kb. 20 – 30 base para fragmentos mayores a 5kb. Esto permite que al calcular el Tm, las diferencias entre templado y el cebador se minimice.
Temperatura de fusión (Tm)	58-60°C. Diferencia de 2 a 3°C entre cebadores.
Temperatura de hibridación (Ta)	5-10°C debajo de la Tm. Alta Ta aumenta la especificidad.
Contenido G/C	En el rango de 30-70%.
Terminación 3'	La secuencia debe terminar en una G o C, CG o GC. Esto aumenta la eficiencia del cebador.
Complementariedad	Evitar terminaciones 3' de 3 o más C's y G's Evitar la auto-complementariedad.

(Dieffenbach *et al* 1993; Johnson 2000)

Cuadro 5. Descripción de los grupos de cebadores de PCR de Baker *et al.* 2005 y los diseñados.

Origen	Nombre del cebador	Orientación	Secuencia	T _m *	CG (%)*	Tamaño esperado (pb)*
Baker <i>et al.</i> 2005	Pfhrp3-F1	Sentido	5'-AATGCAAAA GGA CTTAAT TC-3'	49.82	30	719
	Pfhrp3-R1	Antisentido	5'-TGGTGTAAGTGATGCGTA GT-3'	56.59	45	
	Pfhrp3-F2	Sentido	5'AAATAAGAGATTATTACACGAAAG-3'	50.05	50.8	666
Grupo 1 diseñado	Pfhrp3-f11 exón1	Sentido externo	5'-CCGCTGCCGTTTTTGCTTCCG-3'	65.73	61.9	745
	Pfhrp3-r11 exón2	Antisentido externo	5-GCTCCATCGTGGTGTGCTCCA-3'	65.00	61.9	
	Pfhrp3-f12 exón2	Antisentido interno	5'-TGGTGAGCATGATGAGCATCAGC-3'	63.41	52.17	308
Grupo 2 diseñado	Pfhrp3-f10	Sentido	5'-ATCAACTTTGCTTTTAAAGTTTCTAC-3'	56.67	29.63	1659
	Pfhrp3-r10	Antisentido	5'-AAAGACAGTAGAAAAATCGCTATCC-3'	58.6	38.46	

*Temperatura de fusión (T_m), porcentaje de CG (%CG) y tamaño de secuencia esperado en pares de bases (pb) obtenido de del análisis de cebadores por PrimerBlast, NCBI.

F. Estandarización de la técnica de PCR *pfhrp3* Baker para amplificar aislados de ADN extraído de sangre completa y de sangre en papel filtro.

1. Cepas de *Plasmodium falciparum* de genotipo conocido para la estandarización de la técnica de PCR. Las cepas con genotipo conocido (control positivo) utilizadas para la estandarización del método fueron: Perú, 3D7 y Dd2, que presentan el gen *pfhrp3* y la cepa Hb3 que no presenta el gen (control negativo).

2. Técnica de PCR *pfhrp3* Baker modificado para aislados de sangre completa. Se realizó la estandarización de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional (Baker *et al* 2005 y 2010). El método emplea una reacción de PCR con los cebadores Pfhrp3-F1 y Pfhrp3-R1 bajo las condiciones de la mezcla de reacción que se muestran en el Cuadro 6, con la variación de realizar una dilución del ADN original (1:100). Las variaciones realizadas al programa de PCR original para obtener una banda

definida fueron; cambios en el número de ciclos (de 40 a 35) y en la temperatura de hibridación (de 55°C a 60°C), obteniendo finalmente los parámetros descritos en el Cuadro 7. Los tubos con la mezcla de reacción fueron colocados en el termociclador 2720 Applied Biosystem.

El producto se visualizó por electroforesis en gel de agarosa al 2% con buffer TBE 1X y bromuro de etidio. Se cargó 5µl del producto más 1µl de solución reguladora de cada muestra y el marcador molecular 50pb. Los parámetros de corrida fueron 100 voltios por 30-45 minutos. El gel con las muestras se visualizaron a través de un transiluminador UV, una cámara fotográfica con filtro rojo y una computadora de escritorio.

3. Técnica de PCR *pfhrp3* Baker para aislados de sangre en papel filtro. La estandarización del PCR para aislados de ADN extraído de sangre en papel filtro se realizó siguiendo la recomendación de Baker *et al.* 2005; la cual fue realizar la segunda reacción de PCR del método semianidado (con los cebadores P*fhrp3*-F2 y P*fhrp3*-R1), que es más específico y sensible para el tipo de aislado. En la estandarización se realizaron variaciones en los parámetros de la mezcla de reacción o en el programa de PCR. Las variaciones fueron principalmente; aumento de la temperatura de hibridación, disminución del número de ciclos, concentración de cebadores y de sales (MgCl₂). Los productos obtenidos fueron de un número variable de bandas inespecíficas.

La primera reacción mostro ser más específica, presentando la banda definida del tamaño esperado (600pb-700pb), por lo que se estandarizó el método para los aislados de ADN extraído de sangre en papel filtro (Baker *et al.* 2005, 2010). La técnica de PCR convencional fue nombrada: “PCR *pfhrp3* Baker”. Las condiciones de la reacción se muestran en el Cuadro 6, se utilizó el termociclador 2720 Applied Biosystem con variaciones en los parámetros del programa de PCR mostrados en el Cuadro 8.

El producto se visualizó por electroforesis en gel de agarosa como se describió en el inciso anterior (F.2.).

Cuadro 6. Componentes, concentración final y volumen de la mezcla de reacción para amplificar el gen *pfhrp3* en muestras extraídas de sangre completa y de sangre en papel filtro.

Componente de la mezcla de reacción	Concentración final	Volumen (μ L) 1 reacción
Agua	---	8.75
Buffer 10X	1X	4
MgCl ₂	2Mm	1.6
DNTPs	200 μ M dNTPs	2
Cebador Pfh _{hrp3} -F1	0.6 μ M	1.2
Cebador Pfh _{hrp3} -R1	0.6 μ M	1.2
Taq Polimerasa <i>HotStart</i>	1.25 U	0.25
Volumen final		19
ADN		1 *

*Volumen de ADN: un microlitro de una dilución 1:100 del aislados de ADN extraído de sangre completa y un microlitro de aislado de ADN puro extraído de sangre en papel filtro.

Cuadro 7. Programa de PCR para amplificar el gen *pfhrp3* en muestras extraídas de sangre completa.

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclo
Activación	94°C	10min	1
Desnaturalización	94°C	50s	
Hibridación	60°C	50s.	35
Extensión	70°C	1min	
Extensión final	70	5min	1
	4°C	∞	1

Cuadro 8. Programa de PCR para amplificar el gen *pfhrp3* en muestras extraídas de sangre en papel filtro.

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclo
Activación	94°C	10min	1
Desnaturalización	94°C	50s	
Hibridación	55°C	50s	40
Extensión	70°C	1min	
Extensión final	70°C	5min	1
	4°C	∞	1

4. Determinación del límite de detección del método de PCR *pfhrp3* Baker con aislados de ADN del control positivo 3D7 extraído de sangre en papel filtro y dilución seriada del control positivo 3D7.

a. Extracción de ADN del control 3D7 en diluciones de parásitos por microlitro en sangre almacenada en papel filtro. Se realizó la extracción de ADN del control positivo del parásito 3D7 diluido en microlitros de sangre; 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 y 10 parásitos/ μ l, almacenados en papel filtro Whatman® 3.0 proporcionados por la Dra. Ana Cabrera de los laboratorios de la Universidad McMaster, Canadá. La extracción se realizó siguiendo el procedimiento descrito por el fabricante del método por columna del Mini kit QIAamp DNA, Quiagen. El aislado se almacenó a -5°C por una noche o hasta su uso (o a -20°C por tiempos prolongados).

b. Confirmación de la eficiencia de la extracción por PCR 18S. Los productos de la extracción se evaluaron con el método de PCR 18s ADNr estandarizado (Snounou 1993 y Singh, 1999) para confirmar la eficiencia de la extracción al contar con ADN amplificable del parásito.

c. Dilución seriada del control positivo de *P. falciparum* 3D7. En paralelo, se realizó dilución seriadas del control positivo 3D7, proporcionada por los laboratorios del CDC, Atlanta. La concentración conocida del control se verificó por medio de espectrofotometría UV-Vis y se determinó que posee 4.6ng/μl. A partir del cual, se realizaron diluciones seriadas hasta obtener seis concentraciones en el rango de 4.6 a 0.02 pg/μl que corresponde de 230 a 1 parásito/μl.

d. Límite de detección del método de PCR *pfhrp3* Baker. El ADN extraído del parásito 3D7 diluido en sangre almacenado en papel filtro y las diluciones seriadas del ADN puro del control 3D7 se utilizaron para determinar el límite de detección del método de PCR *pfhrp3* Baker estandarizado para determinar el mínimo de parásitos por microlitro capaz de detectar. El producto se visualizó de acuerdo al procedimiento del inciso F.2.

G. Evaluación de los aislados de ADN de *P. falciparum* de Guatemala con el método de PCR *pfhrp3* Baker estandarizado.

1. Tratamiento de los aislados almacenados en precipitación. El ADN se encontraba almacenado en precipitado con acetato de amonio y etanol a -20°C, se resuspendió en buffer TE 1X empleando un protocolo interno del laboratorio “Resuspensión ADN en etanol con acetato de amonio almacenado a -20°C”.

2. Evaluación de los aislados re suspendidos de los aislados. Los veinte aislados de ADN de Guatemala 98-99 se analizaron empleando el método convencional de PCR *pfhrp3* Baker estandarizado, de acuerdo a los Cuadros 6 y 8. Los productos se visualizaron realizando el procedimiento de electroforesis (inciso F.2).

3. Verificación de ADN amplificable del parásito. Los aislados re suspendidos se evaluaron con el método de PCR 18s ADNr estandarizado (Snounou 1993 y Singh, 1999) para verificar la presencia de ADN amplificable del parásito. El producto se visualizó por electroforesis en gel de agarosa al 2% como se describe en el inciso F.2.

4. Aislados que presentaron amplificación del gen *phrp3* por el PCR estandarizado. Las muestras con amplificación en el rango de 294 a 700pb fueron purificadas por el método estandarizado ExoSap interno del laboratorio y se enviaron a Macrogen USA para ser secuenciadas. Posteriormente se analizaron con herramientas bioinformáticas, empleando el software: FinchTV v.1.4.0 Geospiza®, Mega v. 6.05 (Kumar *et al.* 2004) y BLAST-NCBI.

H. Análisis de los aislados que no presentaron amplificación con el método de PCR *phrp3* Baker con PCRs de los cebadores alternativos.

1. Re-concentración de aislados. Un sub-grupo de las muestras negativas fueron re-concentradas empleando un método desarrollado especialmente para muestras de baja concentración (ver Anexo “Precipitación y resuspensión de muestras con fragmentos pequeños o baja concentración de ADN”). Se midió la concentración de ADN de las muestras negativas por espectrofotometría UV-Vis y de fluorescencia antes de realizar el tratamiento y después de la reconcentración.

2. PCR de los cebadores diseñados alternativamente. Para ambos grupos de cebadores las condiciones de PCR fueron las mismas que las utilizadas para muestras extraídas en sangre de papel filtro, Cuadro 6 y 8. Sin embargo, el grupo de cebadores del PCR semianidado presento múltiples bandas. Para tratar de extraer o delimitar el número de bandas, se realizó diferentes metodologías; PCR de gradiente, PCR Touchdown, PCR Band Stab, extracción de bandas del gel de agarosa normal y de bajo punto de fusión (LMP), purificación de las bandas aisladas y por ultimo secuenciación.

I. Análisis de los resultados

1. Análisis estadístico. En la fase de estandarización no se empleó ningún análisis estadístico. La siguiente fase, consiste en evaluar y analizar los resultados del método de PCR *phrp3* Baker en 21 aislados de ADN provenientes de un estudio previo. La

prevalencia puntual (p) es la proporción de la población que padece una enfermedad o que indica un evento en un momento dado. La proporción se expresa como casos por mil o cien habitantes, ya que no tiene dimensionales y el valor se obtiene de 0 a 1 (Hernández Ávila 2007). La estimación de la probabilidad que una cepa tenga el gen *pfhrp3* en una población de 21 cepas guatemaltecas evaluadas en el estudio (momento t) se calcula mediante la siguiente ecuación:

Ecuación: Prevalencia puntual (p)

$$p = \frac{\text{número total de casos en el momento } t}{\text{total de la población estudiada en el momento } t} \times 100$$

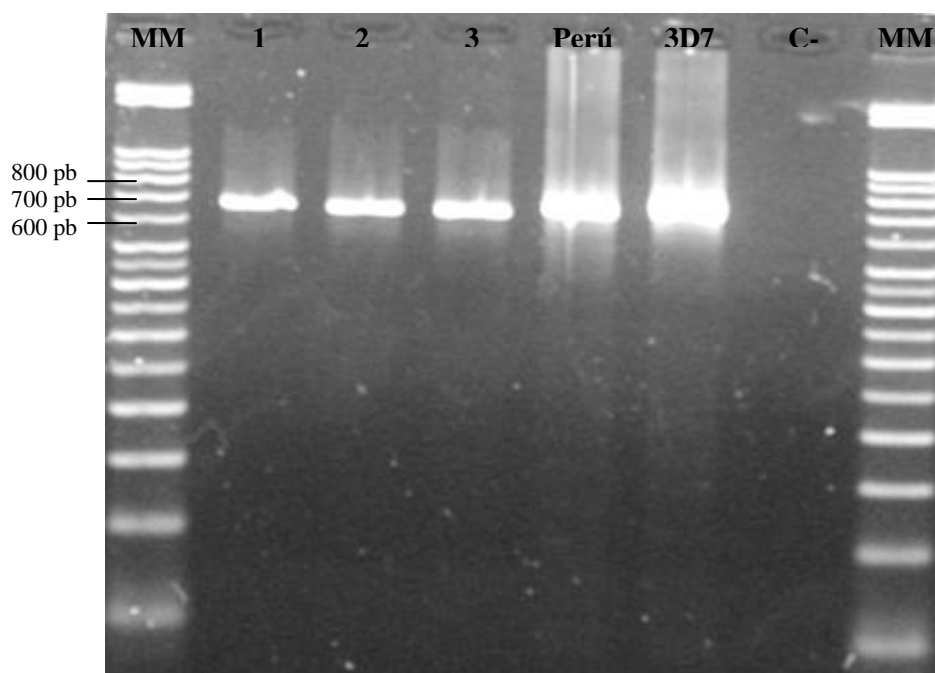
2. Análisis bioinformático. El programa utilizado para diseño de cebadores fue Primer BLAST de NCBI. El programa FinchTV v.1.4.0 Geospiza® se utilizó para visualizar la secuencia de la muestra Guatemala 9899-01 y para determinar la calidad de la misma. Se realizó la búsqueda en la base de datos llamada Nucleotide de NCBI, que mostró el porcentaje de similitud de secuencias entre 96% y 100%, posteriormente se analizó con BLAST y Mega v. 6.05 (Kumar *et al.* 2004).

III. RESULTADOS

A. Estandarización del método de PCR *pfhrp3* para muestras de ADN extraídas de sangre completa y sangre en papel filtro.

El método molecular de PCR convencional para amplificar el gen *pfhrp3* publicado por Baker *et al* 2005 fue elegido para analizar las muestras de Guatemala, debido a que se ha utilizado para evaluar la variabilidad genética de los genes *pfhrp2* y *pfhrp3* en cepas provenientes de diferentes regiones endémicas del mundo (Baker *et al* 2010, Baker *et al* 2005, Houze *et al* 2011).

Figura 9. Gel de electroforesis de los productos de PCR *pfhrp3* Baker estandarizado para ADN extraído de sangre completa

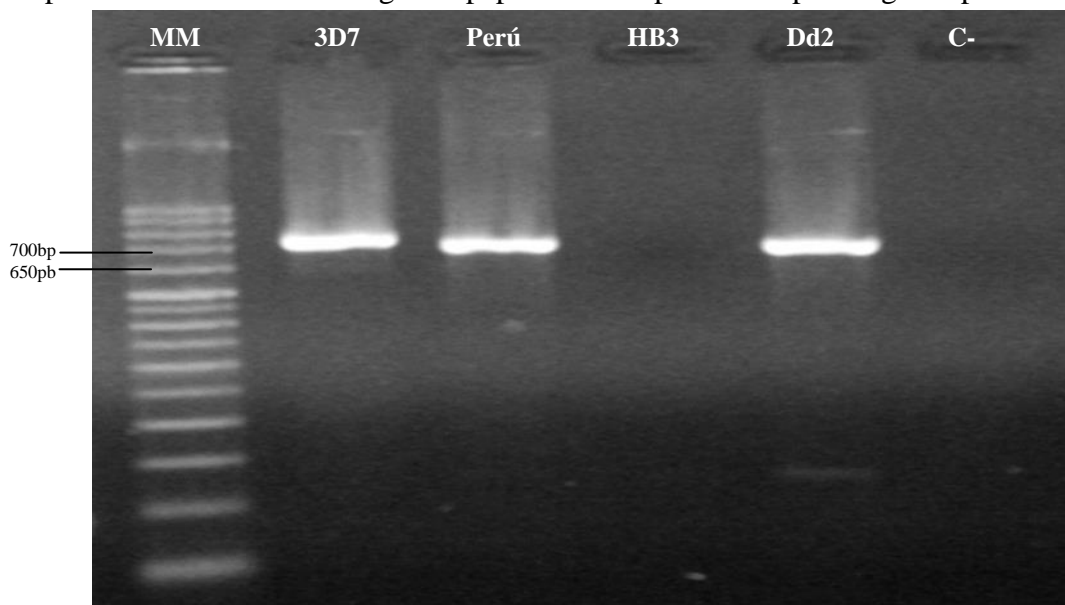


Pozos: (MM) Marcador molecular 50pb, (1) Aislado de sangre completa, control positivo interno de laboratorio diluido 1:100, (2) Aislado de sangre completa, segunda toma diluido 1:100, (3) Aislado de sangre completa, tercera toma diluido 1:100, (Perú) ADN de la cepa control positivo Pf Perú, (3D7) ADN de la cepa control positivo Pf 3D7 y (C-) Control negativo de agua. Los productos de PCR fueron corridos en un gel agarosa 2% a 100Voltios por 35 min. Banda de tamaño esperado: 700pb.

El método quedó estandarizado para aislados de ADN extraído de sangre completa con los parámetros mencionados en la metodología. En la Figura 9 se presenta la electroforesis en un gel de agarosa 2% del producto de PCR. La banda del tamaño esperado, alrededor de las 700pb, se observa definida y específica. El exceso de amplificación (“barrido”) es menor en los aislados de los controles positivos internos del laboratorio que en los controles positivos de las cepas 3D7 y Perú; esto se debe a que se realizó una dilución de 1:100 como parte de la estandarización.

Inicialmente, se siguió la recomendación de Baker *et al* 2005 de realizar la segunda reacción de PCR del método semianidado para muestras extraídas de sangre en papel filtro (Baker *et al* 2005, 2010). Sin embargo, el resultado siempre fue inespecífico. Por lo tanto, se decidió utilizar la reacción de PCR convencional utilizada para sangre completa, con modificaciones en los parámetros para el otro tipo de muestra. Finalmente, el método convencional de PCR *pfhrp3* Baker para ADN extraído de sangre en papel filtro quedó estandarizado bajo los parámetros mencionados en la metodología.

Figura 10. Gel de electroforesis de los productos del PCR *pfhrp3* Baker estandarizado para ADN extraído de sangre en papel filtro empleando cepas de genotipo conocido.



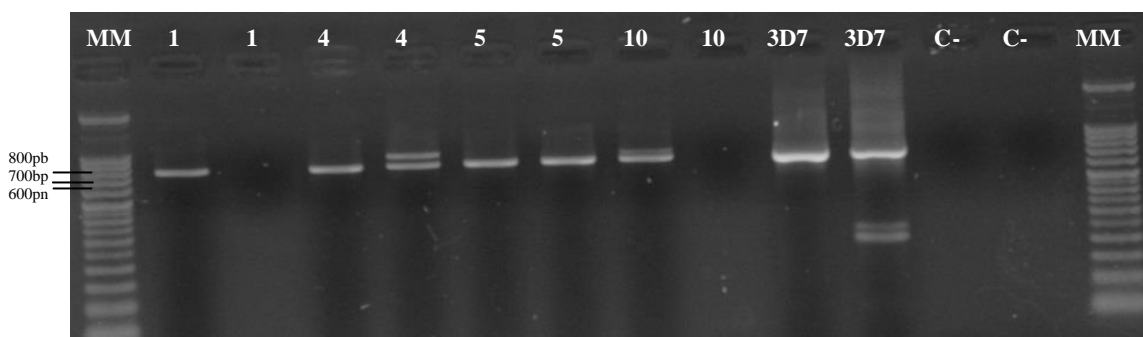
Pozos: (MM) escala 50bp, (3D7) ADN del control positivo 3D7 5ng/μl, (Perú) ADN del control positivo Perú diluido 1:10, (HB3) ADN del control negativo HB3, (Dd2) ADN del control positivo Dd2 5ng/μl y (C-) control negativo H₂O. Los productos de PCR fueron corridos en un gel de agarosa 2% a 100V por 35 min. Banda de tamaño esperado: 700pb.

En la Figura 10 se muestra el producto de la amplificación de los controles positivos; Perú (650pb aprox.) que difiere en tamaño comparado con el control 3D7 (700pb). El control negativo HB3 no presentó ninguna banda de amplificación, esto indica que los cebadores son específicos para el gen. También se utilizó el control Dd2 que en ausencia del gen *pfhrp2*, obtuvo amplificación en la región esperada.

B. Límite de detección del PCR convencional *pfhrp3* Baker para ADN extraído de sangre en papel filtro.

La calidad del ADN extraído del control positivo 3D7 en diluciones de parásitos por microlitro de sangre en papel filtro se verificó con el método de PCR 18s ADNr (Anexo Figura 18). Los aislados que presentaron amplificación para el gen 18s ADNr, (1, 4, 5 y 10 parásitos/ μ l) se utilizaron para evaluar el método de PCR *pfhrp3* Baker. Se realizó tres réplicas del método utilizando cada muestra en duplicado; en total 6 reacciones por cada una.

Figura 11. Gel de electroforesis del límite de detección del producto de PCR *pfhrp3* Baker estandarizado para aislados de parásitos control 3D7 por microlitro en papel filtro.



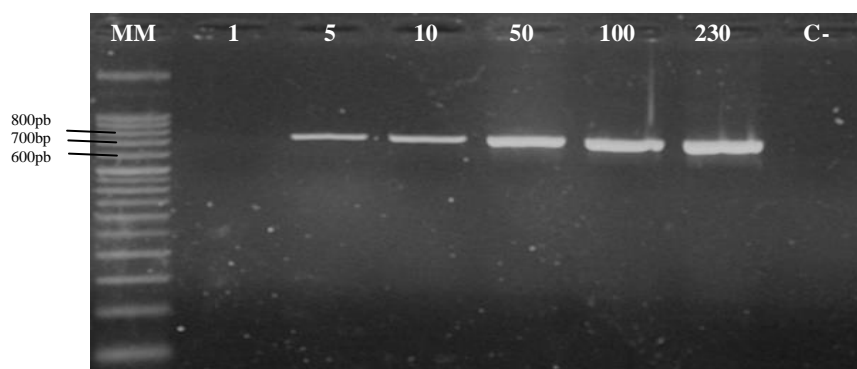
Pozos: (MM) escalera molecular 50bp, Duplicado de (1) ADN de 1 parásito/ μ l 3D7, (4) ADN de 4 parásito/ μ l 3D7, (5) ADN de 5 parásito/ μ l 3D7, (10) ADN de 10 parásito/ μ l 3D7, (3D7) ADN del control positivo 3D7 1:100 y (C-) Control negativo H₂O. Productos de PCR fueron corridos en un gel agarosa 2%, 100Voltios por 20 min. Banda de tamaño esperado: 700pb.

El resultado de las tres réplicas del método se resume en que las muestras de 5 y 10 parásitos/ μ l amplificaron 5 de 6 reacciones y las muestras de 1 y 4 parásitos/ μ l amplificaron 3 de 6 reacciones. Por lo tanto, se puede determinar que el límite de

detección del método para muestras extraídas a partir de papel filtro se encuentra en el rango de 5-10 parásitos/ μl . En la Figura 11 se muestra la electroforesis de uno de los productos de PCR un gel de agarosa 2%, en el cual se observan bandas definidas en 700bp.

El método de PCR *pfhrp3* Baker también se evaluó con las seis diluciones seriadas en el rango de 0.02 a 4.6 pg/ μl del aislado de ADN 3D7. El resultado se observa en la Figura 12, las bandas definidas van en aumento en intensidad desde 5 parásitos/ μl hasta 230 parásitos/ μl .

Figura 12. Gel de electroforesis del producto de PCR *pfhrp3* de seis diluciones seriadas del ADN del control positivo 3D7.



Pozos: (MM) Marcador molecular 50bp, (1) ADN 1 parásito/ μl 3D7 (equivalente a 0.02 pg/ μl), (5) ADN 5 parásito/ μl 3D7 (0.1 pg/ μl), (10) ADN 10 parásito/ μl 3D7 (0.2 pg/ μl), (50) ADN 50 parásito/ μl 3D7 (1 pg/ μl), (100) ADN 100 parásito/ μl 3D7 (2 pg/ μl), (230) ADN 230 parásito/ μl 3D7 (4.6 pg/ μl) y (C-) Control negativo H₂O. Los productos de PCR fueron corridos en un gel agarosa 2%, 100Voltios por 30 min. Banda de tamaño esperado: 700pb.

Este resultado concuerda con el obtenido en el límite de detección a partir de la extracción de ADN de las diluciones de parásitos/ μl de sangre en papel filtro, como se observa en el cuadro comparativo (Cuadro 9).

Cuadro 9. Cuadro comparativo de los dos métodos; extracción de ADN de parásitos/ μ l en papel filtro y dilución seriada del control 3D7, para determinar el límite de detección del método de PCR *pfhrp3* Baker.

Parásitos/ μ l	PCR <i>hrp3</i>	
	Diluciones de parásitos/ μ l 3D7 en papel filtro	Diluciones seriadas del control positivo 3D7
1	-	-
5	+	+
10	+	+

“+” representa amplificación del gen (banda definida) por el método y

“-“representa no amplificación (no banda) por el método

Con base en estos resultados se puede concluir que el límite de detección del método se encuentra en 5 parásitos/ μ l equivalente a 0.1pg/ μ l.

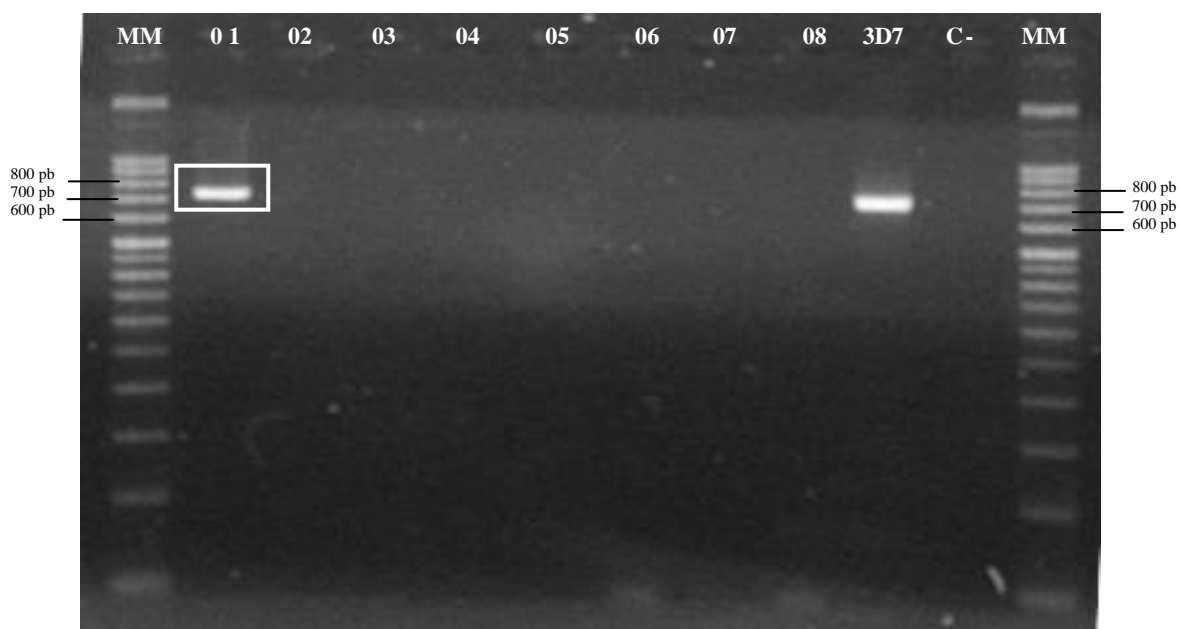
C. Evaluación de los aislados de ADN de *P. falciparum* de Guatemala con el método de PCR *pfhrp3* Baker.

Se evaluaron 24 aislados de Guatemala 98-99 con el método de PCR *pfhrp3* Baker, de las cuales dos mostraron amplificación en el rango que va de 294 a 700pb, correspondiente al gen *pfhrp3*. El tamaño de la banda de la muestra Gt9899-01 se encuentra por encima de las 700pb (Figura 12) y la banda de la muestra Gt9899-23 se encuentra por las 600pb (Figura 13). La muestra Gt9899-17 mostró amplificación por debajo de las 294pb, al encontrarse fuera del rango, podría corresponder a alguna inespecificidad. Únicamente se aisló la banda de 600pb y fue secuenciada por MacroGen USA, obteniendo secuencias inespecíficas que no corresponden al gen *pfhrp3*. El producto de amplificación de la muestra Gt9899-01, también fue secuenciado y el análisis de su secuencia se especifica en el siguiente inciso.

De los 24 aislados que fueron evaluadas por el método de PCR *pfhrp3* Baker, 22 fueron evaluadas para verificar la calidad del ADN amplificable por el método de PCR 18S ADNr, (Anexo Figura 19 y 20). Los otros dos aislados (Gt9899-09 y Gt9899-11), se omitieron ya que no había suficiente volumen del aislado. La muestra Gt9899-04 también se omite ya que no mostró amplificación para el gen 18s ADNr, indicando la falta de ADN amplificable del parásito.

En total, fueron tomados en cuenta 21 de 24 aislados para el presente estudio, evaluados por PCR *pfhrp3* Baker y PCR 18S ADNr.

Figura 13. Gel de electroforesis del producto de PCR *pfhrp3* Baker de ocho aislados de ADN guatemaltecos 98-99.

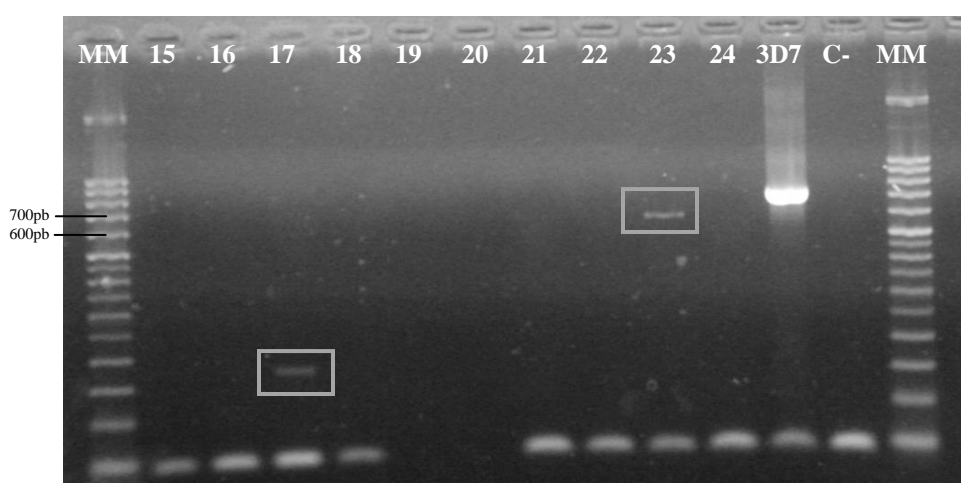


Pozos: (MM) marcador molecular 50bp, (1) ADN Gt9899- 01, (2) ADN Gt9899- 02, (3) ADN Gt9899- 03, (4) ADN Gt9899- 04, (5) ADN Gt9899- 05, (6) ADN Gt9899- 06, (7) ADN Gt9899- 07, (8) AND Gt9899- 08, (3D7) Control positivo ADN 3D7 1:1000 y (C-) Control negativo H₂O. Los productos de PCR fueron corridos en un gel de agarosa 2% a 100Voltios por 40 min. Banda de tamaño esperado: de 294 a 700pb. Recuadro muestra la banda de amplificación de la única muestra positiva para *pfhrp3*.

Los aislados de las muestras positivas para *P. falciparum* utilizadas en el estudio, fueron las colectadas en los años 1998 y 1999 en el departamento de Escuintla. Estas muestras son muy valiosas e importantes para realizar diversos estudios de

caracterización molecular del parásito. El remanente de ADN tiene un historial de manipulación que compromete la calidad del mismos; son muestras antiguas (año 1998-1999), fueron colectadas en papel filtro y extraídas en el año 2010, manipuladas en diversos estudios y el poco volumen restante (15 a 40µl) fue almacenado en precipitado en el año 2011.

Figura 14. Gel de electroforesis del producto de PCR *pfhrp3* de 10 aislados de ADN guatemaltecos 98-99.



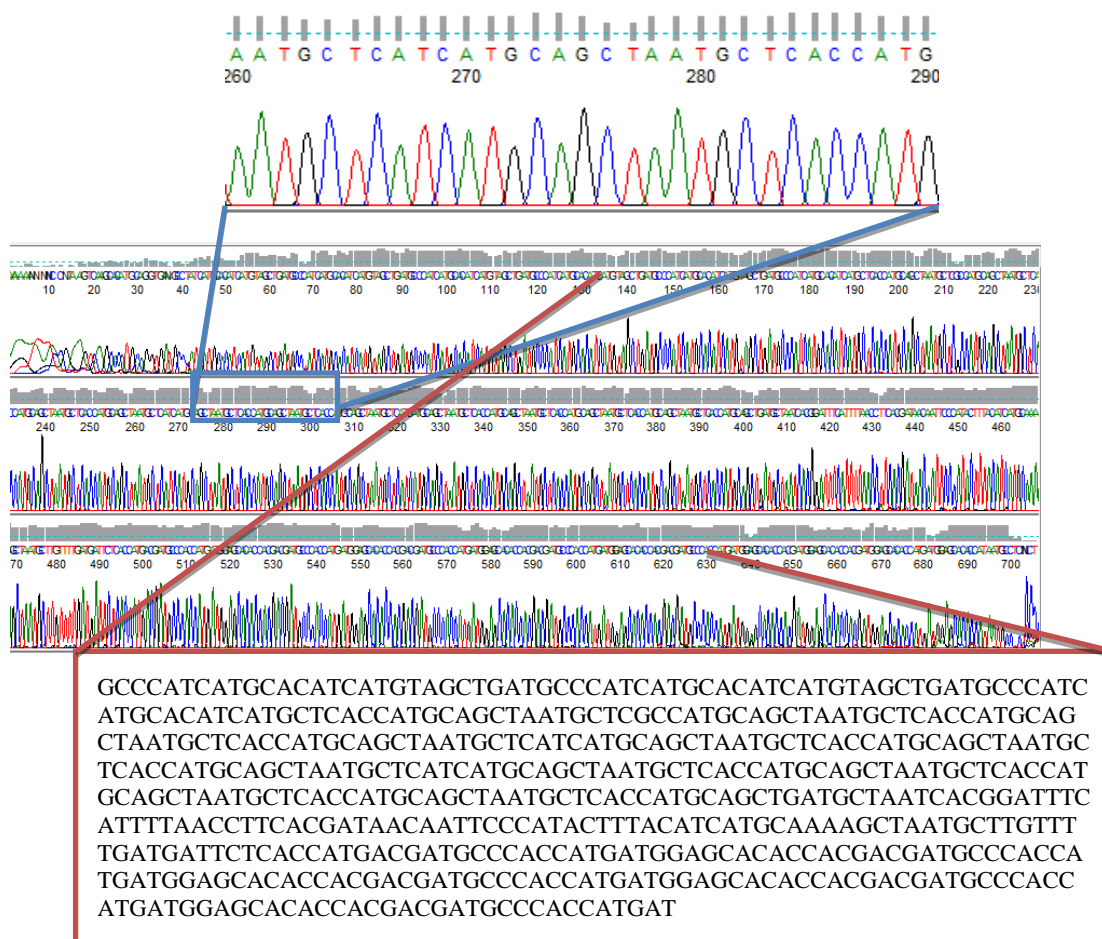
Pozos: (MM) Marcador molecular 50pb, (15) ADN Gt9899-15, (16) ADN Gt9899-16, (17) ADN Gt9899-17, (18) ADN Gt9899-18, (19) ADN Gt9899-19, (20) ADN Gt9899-20, (21) ADN Gt9899-21, (22) AND Gt9899-22, (23) ADN Gt9899-23, (24) AND Gt9899-24, (3D7) Control positivo ADN 3D7 y (C-) Control negativo H₂O. Producto de PCR corrido en un gel de agarosa 2% a 100V por 35 min. Muestras del recuadro con amplificación; Gt9899-17 por debajo (200pb) del rango esperado y Gt9899-23en el tango de 294 a 700pb.

Si bien, el PCR 18S indicó que el ADN está en calidad para amplificarse por dicho método, no se descarta la posibilidad de que la concentración sea muy baja (<0.1pg/µl) de tal manera que el método de PCR *pfhrp3* Baker no permita la amplificación de genes cromosomales del parásito. Por lo tanto, los aislados se trataron por diversas técnicas de concentración para recuperar la mayor cantidad y calidad de ADN amplificable (Anexo). Para descartar la posibilidad que la concentración de ADN no fuera suficiente para que el método lo detecte, se extrajo tres muestras a partir de la gota en papel filtro almacenado desde la toma de la misma (1998-1999). Los aislados

fueron de buena calidad (evaluados por PCR 18S) y se evaluaron por el PCR *pfhrp3* Baker, sin embargo el resultado fue nuevamente negativo.

D. Análisis de la secuencia de la única muestra positiva para el gen *pfhrp3* de los aislados de ADN guatemalteco 98-99.

Figura 15. Electroferograma de la secuencia de ADN del gen *pfhrp3* de la muestra Guatemala9899-01.



Se muestra el resultado completo del electroferograma obtenido en la secuenciación, para visualizar la calidad se aumentó la región de 260 a 290pb (cuadro azul), donde se observa picos altos y definidos, sin picos pequeños de fondo. Debido a que los extremos no son de buena calidad, se seleccionó una secuencia de consenso desde 119 a 607 pb a (cuadro rojo).

Se utilizó la herramienta bioinformática BLAST de NCBI para realizar la búsqueda y comparación de la secuencia obtenida de la muestra Gt9899-01 con las 284 secuencias reportadas del gen de diferentes regiones endémicas del mundo. El resultado obtenido fue 99% de similitud y 100% de la secuencia cubierta en el alineamiento (“query”) con el gen *pfhrp3* correspondientes a la cepa de las Islas Solomon (GenBank: AY821821.1) y la cepa 3D7 (GenBank: XM_002809080.1). Las secuencias de Madagascar y Papua Nueva Guinea presentaron 97% de similitud y 100% de query.

En la Figura 16 se muestra un segmento de la alineación múltiple realizada con el programa ClustalW de EMBL-EBI, en el se observan mutaciones de sustitución de nucleótidos que hacen la diferencia entre las distintas cepas. Por lo tanto, se confirmó que la secuencia de la muestra Gt9899-01 corresponde al gen *pfhrp3*, de una cepa de Guatemala.

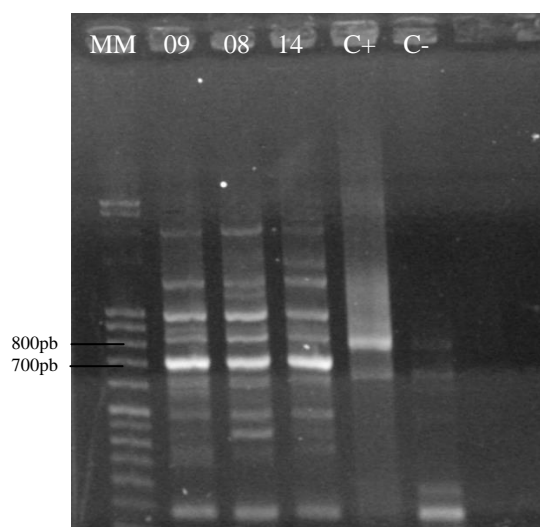
E. Análisis de los aislados con PCRs de cebadores alternativos que no presentaron amplificación con el método de PCR Baker.

1. Evaluación de los aislados con el primer grupo de cebadores alternativos para PCR semianidado. Se seleccionaron al azar tres de las 21 muestras del estudio que tuvieron resultado negativo para el gen *pfhrp3* con el PCR *phrp3* Baker y se re-extrajo el ADN a partir de la sangre en papel filtro almacenada desde el año de la toma de muestra (1998-1999). La calidad de la extracción se evaluó con el método de PCR 18S ADN_r, el cual indicó la presencia de ADN amplificable del parásito.

Nuevamente se evaluaron los tres aislados con el método del PCR *pfhrp3* Baker para descartar la posibilidad que la muestra no contara con suficiente concentración del ADN, pero el resultado fue ausencia de banda en el rango esperado. Se continuó con la estrategia planeada, los tres aislados se evaluaron con una reacción de PCR empleando los cebadores diseñados alternativamente. Las condiciones en la mezcla de reacción y del programa de PCR fueron las mismas que se utilizan para el método de Baker, Cuadro 6 y 8, utilizando el segundo grupo de cebadores del Cuadro 1. En la Figura 17 se observa la

electroforesis del producto de PCR, en el cual se observan muchas bandas no específicas en las muestras. Sin embargo, el control presentó una banda intensa en el tamaño esperado (745pb) y menos inespecificidades comparado con las muestras, aunque muestra exceso de barrido.

Figura 17. Gel de electroforesis del producto de PCR convencional *pfhrp3* primer grupo de cebadores diseñados alternativamente.

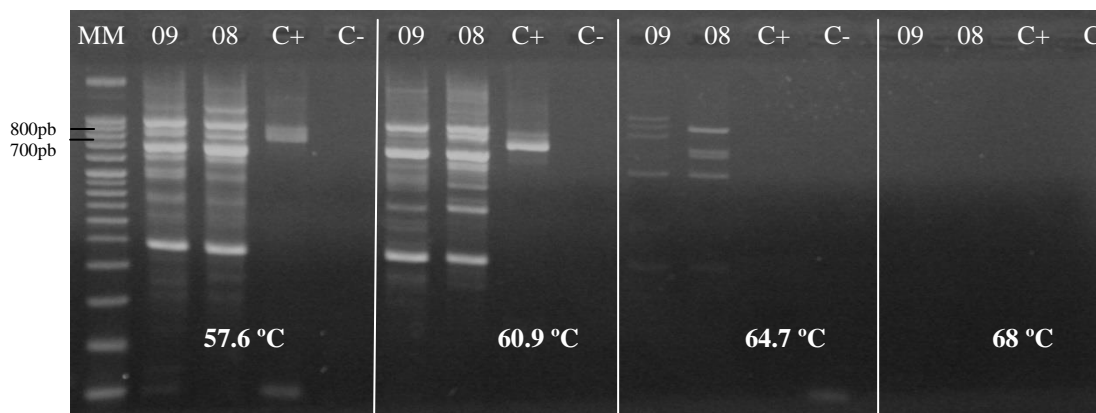


Pozos: (MM) Marcador molecular 50pb, (09) ADN Gt9899-09, (08) ADN 9899-08, (14) ADN Gt9899-14, (C+) control positivo ADN 3D7, (C-) control negativo H₂O. Productos de PCR fueron corridos en un gel agarosa 2%, 100V por 30 min. Banda de tamaño esperado: 745pb.

En esta reacción de PCR, utilizando el primer grupo de cebadores diseñados, se logró obtener amplificación aunque presentó un mayor número de bandas inespecíficas. El diseño contaba con otro cebador para hacer una segunda reacción semianidada, sin embargo no mejoró la sensibilidad y las inespecificidades fueron mayores.

Se realizó un PCR de gradiente (de 58 a 68°C) con dos muestras para determinar la temperatura óptima a la cual los cebadores se adhieren sin producir inespecificidades. El producto del PCR se visualiza en la Figura 18. La amplificación del control positivo 3D7 fue más específica a 60.9°C obteniendo una banda definida en 745pb aproximadamente. En la amplificación de las muestras se redujo el número de bandas no específicas hasta los 64°C, pero el control no amplificó.

Figura 18. PCR de gradiente *pfhrp3* con los cebadores diseñados alternativamente.



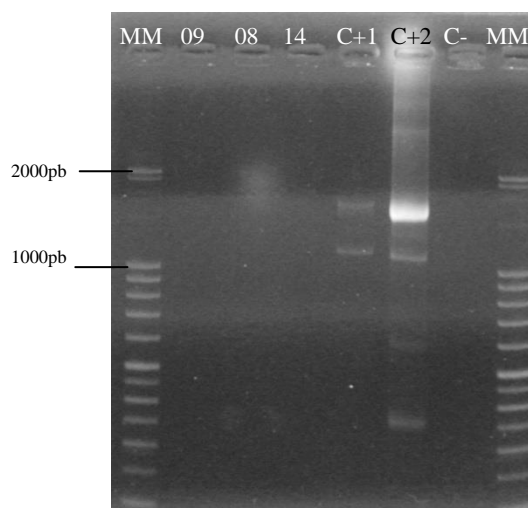
Gradiente de la temperatura de hibridación de los cebadores, de 57.6°C a 68°C. Pozos: (MM) Marcador molecular 50pb. (09) ADN Gt9899-09, (08) ADN Gt9899-08, (C+) control positivo ADN 3D7, (C-) control negativo H₂O. Gel de agarosa 2% corrido a 100Voltios por 30 min. Tamaño de banda esperado: 745pb.

Las bandas más intensas que se encontraron en el rango esperado (294 a 700pb) se extrajeron con el método de band-stab y extracción en gel, para descartar la probabilidad de que alguna pudiera corresponder al fragmento del gen *pfhrp3* (Anexo, Figura 23). Las secuencias de las bandas se evaluaron utilizando BLAST, NCBI y el resultado no concordó con el gen de interés.

2. Evaluación de los aislados con el segundo grupo de cebadores alternativos para PCR convencional. De la misma manera que la reacción de PCR anterior, se utilizaron las condiciones del método de PCR *pfhrp3* Baker (Cuadro 6 y 8) con el segundo grupo de cebadores diseñados alternativamente para amplificar una región más grande del genoma (Cuadro 1). Se evaluaron las mismas tres muestras (Gt9899-08, Gt9899-09 y Gt9899-14) y el producto de PCR se presenta en la Figura 19.

En el diseño de estos cebadores se esperaba obtener un producto grande (1659pb) ya que la región contenía tanto el exón 1 como el 2. Únicamente amplificó el control 3D7 en la región esperada, con algunas inespecíficas. Este resultado reafirma que el gen puede estar ausente en los aislados de cepas guatemaltecas.

Figura 19. Gel de electroforesis del producto de PCR convencional *pfhrp3* del segundo grupo de cebadores diseñados alternativamente



Pozos: (MM) Marcador molecular 50pb, (09) ADN Gt9899-09, (08) ADN Gt9899-08, (14) ADN Gt9899-14, (C+1) control positivo ADN 3D7 1:6, (C+2) control positivo ADN *P. falciparum* 3D7 1:1000, (C-) control negativo H₂O. Productos de PCR fueron corridos en un gel agarosa 2%, 100Voltios por 35 min. Banda de tamaño esperado: 1659pb.

F. Prevalencia del gen *pfhrp3* en aislados de Guatemala del año 1998- 1999

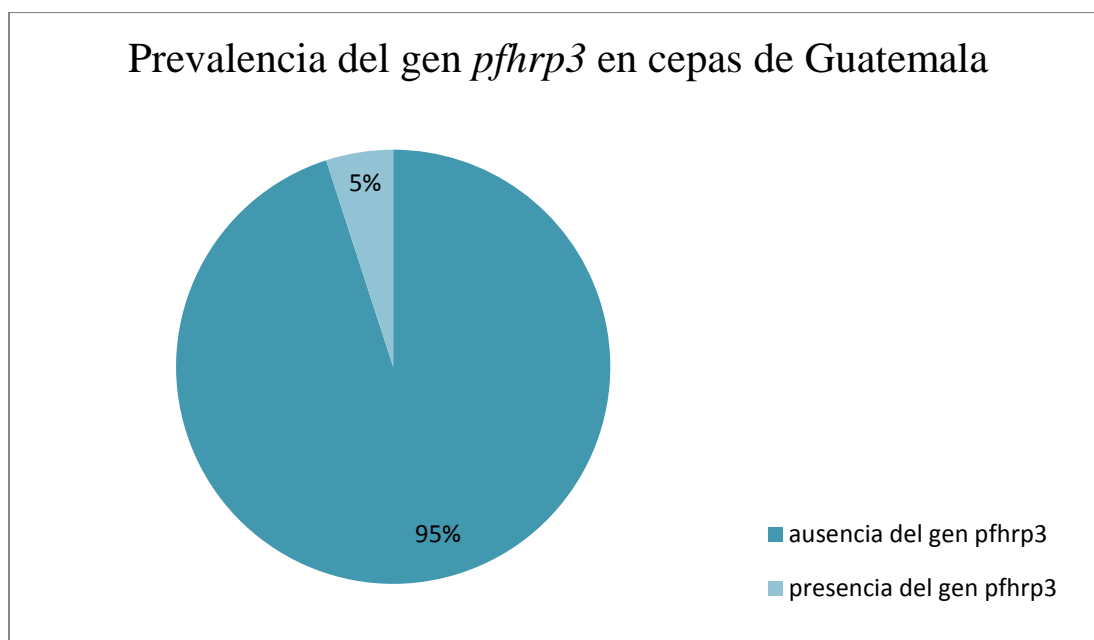
Los aislados evaluados con los tres métodos de PCR utilizando los diferentes grupos de cebadores han podido generar y coleccionar información importante. En cada método se ha amplificado el control positivo 3D7 en la región esperada, se ha confirmado la presencia de ADN del parásito con el método de 18S y se confirmó la única secuencia correspondiente al gen. A partir de estos datos, finalmente se determinó la prevalencia del gen *pfhrp3*. El cálculo de prevalencia para un total de 21 muestras evaluadas con el PCR *pfhrp3* Baker, de las cuales una fue confirmada positiva equivaldría a:

Cálculo de la prevalencia del gen *pfhrp3* en muestras guatemaltecas:

$$Prevalencia (p) = \frac{1}{21} = 0.047$$

Por lo tanto, la prevalencia expresada en porcentaje del gen *pfhrp3* en esta población es de 5%, graficado en la Figura 20.

Figura 20. En la gráfica se representa la prevalencia del gen *pfhrp3* obtenido en el estudio, con aislados de ADN de cepas guatemaltecas del año 1998-1999.



Esta es la primera información obtenida en cepas de *P. falciparum* de Guatemala, con ella se tiene la prevalencia de ambos genes: 100% del gen *pfhrp2* y 5% del gen *pfhrp3*.

IV. DISCUSIÓN

El uso de las PDRs PfHRP2/PfHRP3 debe respaldarse con la información de la prevalencia de los genes *phfrp2* y *pfhrp3* (Baker *et al* 2011, Baker *et al* 2010, Barnwell *et al* 2012, Gamboa *et al* 2010, Houze *et al* 2011). El objetivo principal del estudio fue determinar la prevalencia del gen *pfhrp3* evaluando los aislados de *P. falciparum* obtenidas de muestras de sangre en papel filtro retrospectivas provenientes del departamento de Escuintla, región endémica de malaria en Guatemala. Se plantearon una serie de objetivos secundarios para lograr determinar la prevalencia de este gen en el país, que son: a) Estandarización de la técnica, b) Evaluar los aislados guatemaltecos con el método estandarizado, c) Confirmar la presencia del gen *pfhrp3* por secuenciación y d) Confirmar la ausencia del gen *pfhrp3* utilizando cebadores alternativos en las muestras que no amplifiquen por el PCR estandarizado.

A. Método de PCR *pfhrp3* estandarizado para evaluar aislados de ADN extraído de dos diferentes matrices.

El método seleccionado para evaluar el gen *pfhrp3* en las muestras de Guatemala fue el utilizado en los estudios realizados por Baker y colaboradores. Dicho método fue utilizado para evaluar la variabilidad genética de los genes de las proteínas antigénicas del parásito, tanto para *pfhrp2* como *pfhrp3* en cientos de cepas provenientes de países endémicos del mundo (Baker *et al* 2010, Baker *et al* 2005, Houze *et al* 2011). La técnica molecular descrita por Baker consiste originalmente en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional para ADN extraído a partir de muestras de sangre completa y una técnica de PCR semianidada para muestras de sangre en el tipo de matriz en papel filtro (Baker *et al* 2010, Baker *et al* 2005).

En el presente trabajo se logró estandarizar un método de PCR convencional para ambos tipos de matrices; sangre completa y sangre en papel filtro. La banda del producto

en ambas técnicas de PCR tanto de controles positivos como de las cepas 3D7 y Perú, corresponde al tamaño esperado (700pb), es específica y definida.

El método descrito por (Baker *et al* 2010) para muestras en papel filtro utilizaba una segunda reacción del método semianidado, pero esta no conllevó al aumento de la sensibilidad de la técnica como ha sido reportado anteriormente (Baker *et al* 2011, Baker *et al* 2010). En este caso, las pruebas realizadas en el presente trabajo demostraron que el utilizar un PCR semianidado ocasiona el apareamiento de bandas inespecíficas. Por esa razón, la técnica fue estandarizada como un método de PCR de un solo paso para ambos tipos de matrices, lo que también constituye un beneficio en cuanto al costo al disminuir la cantidad de reactivos utilizados.

El método de PCR *pfhrp3* Baker utilizado para la detección del gen en ADN extraído de sangre en papel filtro quedó estandarizado bajo los parámetros descritos en la metodología original mientras que el utilizado para sangre completa tuvo modificaciones en el número de ciclos y la temperatura de hibridización para eliminar las bandas no específicas y hacer resaltar la banda de interés (Dieffenbach *et al* 1993, Johnson 2000). Si bien la estandarización de esta técnica en sangre completa no fue uno de los objetivos del presente estudio, el método será de utilidad para emplearse en el futuro, si se llega a contar con aislados extraídos a partir de sangre completa.

Debido a que las infecciones por malaria en Guatemala son de parasitemias bajas, se consideró esencial determinar los parámetros de sensibilidad y especificidad del método molecular estandarizado. Los métodos moleculares han avanzado rápidamente y los criterios existentes para la estandarización se enfocan principalmente en las técnicas para el diagnóstico clínico (Burd 2010). Las pruebas de laboratorio para investigación que son desarrolladas o modificadas pueden adoptar y aplicar ciertas características de rendimiento permitidas por el Instituto de Estándares para Laboratorios Clínicos (CLSI) u otras fuentes; no es obligatorio pero son consideradas como buenas prácticas de laboratorio (Burd 2010). Sin embargo, para la validación del ensayo de PCR para fines

de investigación es importante confirmar dos aspectos importantes: especificidad y sensibilidad (Johnson 2000).

La especificidad se determinó al amplificar un segmento en los controles positivos de genoma conocido, representado como una banda en el tamaño esperado y se demostró por secuenciación que es el gen de interés. También se demostró que la amplificación está ausente en el control negativo (Dieffenbach *et al* 1993, Johnson 2000).

La sensibilidad es una característica de rendimiento importante a evaluar para el desempeño de la prueba. La sensibilidad o capacidad para detectar bajas concentraciones en una muestra biológica, que se refiere a menudo como Límite de detección (LOD) fue determinado para el método de PCR *pfhrp3* Baker (Burd 2010). La determinación del LOD del método de PCR *pfhrp3* Baker convencional fue de 5 parásitos/ μ l ó 0.1 pg/ μ l.

Generalmente el LOD se determina mediante diluciones seriadas en el rango de detección esperado utilizando muestras de concentración conocida. También se ha recomendado incluir líneas celulares o el microorganismo de interés preparadas en cantidades conocidas y en la matriz apropiada para determinar la sensibilidad en cada tipo de matriz utilizada en el laboratorio (Burd 2010, National Committee for Clinical Laboratory Standards.). Debido a que la técnica de extracción de ADN utilizada puede afectar la sensibilidad del PCR (Zhou *et al*) se consideró fundamental determinar el LOD tanto utilizando el aislado puro de ADN de *P. falciparum* con concentración conocida como ADN extraído a partir de muestras de sangre con diluciones cuantificadas de parásitos en papel filtro. Esta última corresponde al tipo de matriz del cual provienen las muestras guatemaltecas evaluadas en el estudio.

En conclusión, el método de PCR *pfhrp3* Baker convencional estandarizado logró ser altamente sensible y específico para la detección del gen *pfhrp3* en *P. falciparum* y puede ser utilizado para evaluar aislados extraídos de sangre en papel filtro aún en muestras con baja parasitemia.

B. Prevalencia del gen de la proteína rica en histidina-3 de *P. falciparum* (*pfhrp3*) determinada en aislados de ADN de cepas guatemaltecas.

Se obtuvo una prevalencia del 5% para el gen *pfhrp3*, que en combinación con los resultados previamente obtenidos de una prevalencia del 100% para el gen *pfhrp2* ofrecen la primera información de la prevalencia de ambos genes en cepas del país.

En total se evaluaron 24 aislados con el método de PCR *pfhrp3* Baker. Estas muestras tienen un historial de manejo que compromete la calidad de las mismas: son muestras antiguas (año 1998-1999), colectadas en papel filtro y extraídas en el año 2010. También fueron utilizadas en diversos estudios y el poco volumen restante (15 a 40µl) fue almacenado en precipitado desde el año 2011, volumen con el cual se trabajó. Por lo anterior, se evaluó la calidad del ADN del parásito con el método de PCR 18S ADNr para descartar la posibilidad de que la falta de amplificación en las muestras se debiera a la ausencia de ADN amplificable. El gen 18S ADNr es considerado particularmente informativo ya que permite distinguir a la especie *P. falciparum* de las demás y de otros microorganismos (Fredricks & Relman 1999). Se consideraron para el estudio los 21 de 24 aislados que fueron positivos por el método de PCR 18S que indicó presencia de ADN del parásito.

En dos de los 21 aislados se obtuvo amplificación con el método de PCR *pfhrp3* Baker en el rango de 294 a 700pb. Se confirmó la presencia del gen *pfhrp3* en la muestra Gt9899-01 que presentó amplificación en 700pb. La información disponible de esta única muestra se comparó con las demás muestras del país. La parasitemia de la muestra Gt9899-01 es media (900 parásitos/µl), comparado con otras muestras de alta (6,000 parásitos/µl) y baja parasitemia (140 parásitos/µl). La muestra no tiene ninguna otra característica que la distingue de las demás. La segunda muestra de la que obtuvo amplificación (Gt9899-23) presentó una banda en 600pb, sin embargo al analizar la secuencia obtenida con la información en BLAST de NCBI esta no presentó similitud con el gen de interés.

C. Confirmación de la presencia del gen *pfhrp3* por secuenciación.

La única muestra guatemalteca de *P. falciparum* con presencia del gen *pfhrp3* presentó una alta similitud con las secuencias provenientes de diferentes regiones geográficas (Islas Solomon, Madagascar, Brasil, Papua Nueva Guinea). Al mismo tiempo, tal y como ha sido descrito por Baker *et al* existe cierto grado de variabilidad entre secuencias, ya que se observaron algunas sustituciones nucleotídicas sinónimas y no-sinónimas (Baker *et al* 2010, Lee *et al* 2006). La diversidad genética se puede correlacionar con las altas tasas de transmisión en las regiones endémicas de Suramérica (y África) y las frecuentes infecciones de múltiples cepas (Baker *et al* 2010). Debido a que en Guatemala sólo una muestra demostró presencia del gen *pfhrp3* no es posible determinar el grado de diversidad genética en esta población pero por la baja transmisión del país se esperaría una variabilidad menor que la de estas regiones.

D. Confirmación de la ausencia del gen *pfhrp3* en las muestras que no amplifiquen el PCR estandarizado utilizando cebadores alternativos.

La alta proporción de muestras con delección del gen *pfhrp3* en las muestras guatemaltecas no puede considerarse un problema derivado de una baja calidad/concentración de ADN, ya que los experimentos realizados tanto en el total de las muestras analizadas como en el sub-grupo de tres muestras a las que se les realizó re-extracción, demostraron la presencia de ADN amplificable de *P. falciparum* pero con un resultado negativo para la presencia del gen *pfhrp3*. De igual forma, no puede considerarse que la falta de amplificación del gen *pfhrp3* sea debida a una inadecuada hibridización de los cebadores ya que el segundo grupo de cebadores alternativos diseñados para amplificar un fragmento largo del gen (diseñados a partir de las secuencias de las regiones de intrones que flanquean los exones 1 y 2) fueron capaces de amplificar exitosamente el fragmento de interés en el control positivo 3D7 mas no así en las muestras provenientes de Guatemala. Vale la pena destacar que este grupo de cebadores permitirá amplificar una región mayor del gen *pfhrp3* y por lo tanto se recomienda su optimización. Las secuencias de nucleótidos que puedan obtenerse de esta

técnica podrán proporcionar mayor información de la variabilidad genética comparada con otras secuencias publicadas.

De esa forma, dos diferentes grupos de cebadores (Baker, segundo grupo de cebadores diseñados en este trabajo) no amplificaron el gen *pfhrp3* en los aislados de *P. falciparum* provenientes de Guatemala. Estos resultados correlacionan con los resultados anteriormente obtenidos en el estudio de vigilancia realizado en el 2010 por CES-CDC, en el cual se utilizaron un tercer grupo de cebadores. Se considera que estos hallazgos confirman que existe una delección del gen *pfhrp3* en una alta proporción (95%) de los aislados de *P. falciparum* de Guatemala.

Para determinar la magnitud de la delección cromosomal se recomienda realizar la detección de los genes flanqueantes del gen *pfhrp3*, que se han utilizado como parte de los estudios de vigilancia molecular (Barnwell *et al* 2012, Gamboa *et al* 2010). Estos genes se detectan mediante una reacción de PCR semianidada que amplifica el gen anterior Mal13P1.475 y el gen posterior Mal13P1.485 (Barnwell *et al* 2012, Gamboa *et al* 2010). Dependiendo de los resultados podría deberse a una delección parcial, si solo amplifica uno de los dos genes; o una delección completa, si no amplifica para ninguno de los dos. Una segunda alternativa más costo-efectiva que la detección de estos genes sería la utilización del PCR para *pfhrp3* con el segundo grupo de cebadores diseñados en el presente trabajo, ya que el método se ejecuta en una sola reacción de PCR convencional para una región que cubre el gen en su mayoría.

Finalmente, el primer grupo de cebadores alternativos diseñados en este estudio para amplificar el gen *pfhrp3* fueron inespecíficos ya que se adhirieron tanto a regiones del gen *pfhrp3* como a regiones del genoma de humano por lo que no deben emplearse para estudios posteriores que busquen amplificar el gen *pfhrp3*. Por lo tanto, se recomienda que al diseñar cebadores se tome en cuenta su especificidad, realizando una comparación de la similitud del genoma a investigar con el genoma de los diferentes hospederos u organismos que puedan estar presentes en las muestras tomadas (Fredslund & Lange 2007, Ye *et al* 2012). A pesar de esto, se puede resaltar que con estos cebadores

tampoco se logró amplificar el gen *pfhrp3* en un sub-grupo de muestras guatemaltecas, otra evidencia de la ausencia del gen en esta población.

E. Comparación de la prevalencia de los genes *pfhrp2/pfhrp3* de los aislados de *P. falciparum* de Guatemala con la prevalencia de otras regiones latinoamericanas

Al comparar estos resultados con los encontrados en otros países de América Central y del Sur se puede observar que éste es uno de los casos de delección más alta del gen *pfhrp3* (Barnwell *et al* 2012). El único país centroamericano que reportó información de los genes *pfhrp2/pfhrp3* fue Honduras con 44% de delección del gen *pfhrp3* y 0% del gen *pfhrp2*. Por otro lado, el porcentaje de delecciones que ocurre en Sudamérica se encuentra en 68% en Bolivia, 45 % en Colombia y 53.8% en Perú, países que también presentaron delección en el gen *pfhrp2* (Barnwell *et al* 2012). No es posible comparar la variabilidad genética de estas cepas con las de Guatemala ya que no se reportan las secuencias nucleotídicas.

En Surinam se obtuvo 1.8% de delecciones en *pfhrp3* y 0% en *pfhrp2* en el año 2009-2010, pero en este caso es importante resaltar que en el 2011 se obtuvo 8.6% de delecciones en *pfhrp3* y 47.8% de delección en el gen *pfhrp2* que un año atrás estaba presente en el 100% de las cepas (Barnwell *et al* 2012). Este acontecimiento y los resultados variables en cada país destacan la importancia de continuar con la vigilancia molecular en los países endémicos.

F. Implicaciones en el uso de las PDRs tomando en cuenta la prevalencia de los genes *pfhrp2/pfhrp3* en Guatemala.

El resultado obtenido para el país, una prevalencia del 100% para el gen *pfhrp2* y 5% para el gen *pfhrp3* tiene implicaciones en el aseguramiento del uso de las PDRs. El país se encuentra en la fase de control de la malaria, y está en vías de pasar a la fase de eliminación ya que se ha reducido el número de casos >75% entre el año 2000 y el 2012

(World Health Organization. 2013). Guatemala es uno de diez países centroamericanos y del Caribe que busca eliminar la malaria para el año 2020 de acuerdo a un convenio firmado por los Ministerios de Salud de Mesoamérica (The Global Found to Fight AIDS 2013). Una combinación de estrategias como la prevención, el diagnóstico rápido empleando PDRs confiables, entre otras, son esenciales para alcanzar este objetivo. De acuerdo a la OMS, la cantidad de PDRs y terapias están aumentando en los últimos años debido a la implementación de la iniciativa T3: “Test, Treat, Track”, que tiene como fin fortalecer el diagnóstico, tratamiento y vigilancia para poder cumplir la meta de eliminar las muertes por malaria y eventualmente erradicar la enfermedad (World Health Organization. 2012a). La importancia de asegurar el uso de las PDR radica en que son ideales para utilizarse en centros de salud, en regiones endémicas donde no se cuenta con laboratorios clínicos especializados (Bell *et al* 2004, Tangpukdee *et al* 2009, Wongsrichanalai *et al* 2007, World Health Organization. 2012a).

Las PDRs basadas en HRP-2/HRP-3 tienen alta sensibilidad y especificidad comparadas con las demás para detectar las infecciones por *P. falciparum* (Murray *et al.* 2008). Sin embargo, la ausencia de los genes *pfhrp2* y/o *pfhrp3* en *P. falciparum* implica que en regiones donde se reporten cepas con genotipo de una o doble delección y además existan infecciones de bajas parasitemias, como es el caso de Guatemala, el diagnóstico puede estar comprometido a fallar si se emplean las PDRs basadas en la detección de estos genes (Baker *et al.* 2010, Gamboa *et al.* 2010). Si bien en el país se obtuvo un 100% de presencia del gen *pfhrp2*, la alta tasa de delección del *pfhrp3* puede provocar una sensibilidad menor en las pruebas rápidas. Cuando el gen *pfhrp3* no está presente, podría considerarse que la cantidad de proteína esta compensada por la transcripción del gen *pfhrp2*, pero la cantidad de proteína transcrita puede ser insuficiente para ser detectada por los anticuerpos de la prueba. Por lo tanto, la transcripción del gen *pfhrp3* también contribuye en el resultado de la prueba (Akinyi *et al* 2013, Baker *et al* 2011, Houze *et al* 2011).

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que el uso de las PDRs-HRP2/HRP3 en el país tiene limitaciones y pueden ser no confiables. Debido a la

importancia y necesidad de tener PDRs efectivas se sugiere que para Guatemala se utilice PDRs con altos porcentaje de sensibilidad y que identifique otro antígeno como el pLDH (World Health Organization. 2013a), previamente validada su efectividad en el país.

La información presentada en este estudio demuestra la importancia de evaluar la efectividad de las PDRs en cada país que las utiliza. En Guatemala, el programa nacional de control de malaria puede ser orientado en la adquisición de PDRs que no se basen en los antígenos HRP2/HRP3, que sean sensibles y efectivas. Existen pruebas que detectan antígenos de dos especies a la vez, *P. falciparum* y *P. vivax* con un sensibilidad del 98% (World Health Organization. 2013a).

Se recomienda realizar una comparación de la evaluación molecular de los genes empleando muestras de años recientes y los resultados de la expresión fenotípica del gen al evaluar las muestras con las pruebas rápidas. La técnica estandarizada en el estudio es altamente sensible para emplearse con muestras de sangre en papel filtro y además se estandarizó un método para el otro tipo de muestra (sangre completa). Estos métodos son de un solo paso, por lo que facilita su uso en los laboratorios de salud que adopten esta iniciativa en el país.

V. CONCLUSIONES

La prevalencia del gen *pfhrp3* en aislados de muestras de sangre en papel filtro retrospectivas provenientes de la región de Escuintla, Guatemala fue del 5%; que en combinación con la prevalencia del 100% del gen *pfhrp2*, ofrecen la primera información de la prevalencia de ambos genes en cepas del país.

Se estandarizó un método de PCR convencional para la amplificación del gen *pfhrp3*, capaz de amplificar una región ente 292 y 700 pb del gen *pfhrp3*, con una sensibilidad de 0.1pg/ μ l de ADN del parásito para evaluar aislados de ADN extraído de sangre completa o de sangre en papel filtro.

La única muestra guatemalteca que presento amplificación para el gen *pfhrp3* fue confirmada por secuenciación obteniendo un 99% de similitud y 100% de cobertura al comparar con la cepa control *P. falciparum* 3D7.

El segundo grupo de cebadores diseñados en este estudio podría utilizarse como una alternativa más costo-efectiva que la detección de los genes flanqueantes para la determinación de la magnitud de la deleción cromosomal de *pfhrp3*, al ser un método que se ejecuta en una sola reacción de PCR convencional y amplifica la región que contiene los exones 1 y 2 del gen *pfhrp3*.

La baja prevalencia de gen *pfhrp3* encontrada en los aislados guatemaltecos compromete la sensibilidad del diagnóstico para *Plasmodium falciparum* por las PDRs PfHRP2/PfHRP3, especialmente en regiones donde la parasitemia es baja, ya que esto puede implicar concentraciones variables del antígeno.

La prevalencia de los genes *pfhrp2/pfhrp3* en los aislados de *P. falciparum* en Guatemala puede orientar al programa nacional de control de la malaria en la adquisición de PDRs que sean de mayor sensibilidad o PDRs que detecten dos antígenos de forma combinada.

Los resultados encontrados en este trabajo demuestran la importancia continuar realizando estudios de vigilancia molecular de los genes *pfhrp2/pfhrp3* en el país, empleando mayor número de aislados de *P. falciparum* colectados en años recientes.

VI. RECOMENDACIONES

En Guatemala el uso de las PDRs basadas en HRP2/HRP3 tiene limitaciones, por lo que se recomienda utilizar PDRs con altos porcentaje de sensibilidad y que identifique otro antígeno como el pLDH, previamente sea validado su efectividad en el país.

Se recomienda continuar con el estudio de monitoreo de ambos genes *pfhrp2/pfhrp3*, utilizando mayor número de muestras y de años recientes ya que se han observado cambios en la prevalencia de estos genes a través del tiempo. Adicionalmente, se recomienda continuar con la vigilancia molecular de estos genes en conjunto con su expresión fenotípica.

El primer grupo de cebadores alternativos diseñados fueron inespecíficos ya que se adhirieron tanto a regiones del gen *pfhrp3* como a regiones del genoma de humano, por lo que no se recomienda emplearlo para estudios posteriores que busquen amplificar el gen *pfhrp3*.

Se recomienda terminar de estandarizar el método de PCR utilizando el segundo grupo de cebadores diseñados ya que se puede utilizar como una alternativa para realizar una confirmación adicional de la delación completa del gen.

VII. LITERATURA CITADA

- Akinyi S, Hayden T, Gamboa D, Torres K, Bendezu J, *et al.* 2013. *Multiple genetic origins of histidine-rich protein 2 gene deletion in Plasmodium falciparum parasites from Peru.* Sci Rep 3: 2797
- Baker J, Gatton ML, Peters J, Ho MF, McCarthy JS, Cheng Q. 2011. *Transcription and expression of Plasmodium falciparum histidine-rich proteins in different stages and strains: implications for rapid diagnostic tests.* PloS one 6: e22593
- Baker J, Ho MF, Pelecanos A, Gatton M, Chen N, *et al.* 2010. *Global sequence variation in the histidine-rich proteins 2 and 3 of Plasmodium falciparum: implications for the performance of malaria rapid diagnostic tests.* Malaria journal 9: 129
- Baker J, McCarthy J, Gatton M, Kyle DE, Belizario V, *et al.* 2005. *Genetic diversity of Plasmodium falciparum histidine-rich protein 2 (PfHRP2) and its effect on the performance of PfHRP2-based rapid diagnostic tests.* The Journal of infectious diseases 192: 870-7
- Barnwell J, Udhayakumar VK, Macedo de Oliveira A. 2012. *Molecular Surveillance for HRP2 and HRP3 gene expression in Plasmodium falciparum parasites from South America and Central America Centers for Disease Control and Prevention*
- Bell D, Global Partnership to Roll Back Malaria., World Health Organization. Regional Office for the Western Pacific. 2004. *The use of malaria rapid diagnostic tests.* Geneva: World Health Organization. 19 p. pp.
- Biswas S, Tomar D, Rao DN. 2005. *Investigation of the kinetics of histidine-rich protein 2 and of the antibody responses to this antigen, in a group of malaria patients from India.* Annals of tropical medicine and parasitology 99: 553-62
- Bosshart H, Heinzelmann M. 2003. *Endotoxin-neutralizing effects of histidine-rich peptides.* FEBS letters 553: 135-40
- Burd EM. 2010. *Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases.* Clinical microbiology reviews 23: 550-76
- Cohen JM, Moonen B, Snow RW, Smith DL. 2010. *How absolute is zero? An evaluation of historical and current definitions of malaria elimination.* Malaria journal 9: 213
- Choi CY, Cerda JF, Chu HA, Babcock GT, Marletta MA. 1999. *Spectroscopic characterization of the heme-binding sites in Plasmodium falciparum histidine-rich protein 2.* Biochemistry 38: 16916-24
- Dieffenbach CW, Lowe TM, Dveksler GS. 1993. *General concepts for PCR primer design.* PCR methods and applications 3: S30-7
- Farnell GS, Pierce KE, Collinsworth TA, Murray LK, Demes RN, *et al.* 2008. *The influence of ethnicity on thermoregulation after acute cold exposure.* Wilderness & environmental medicine 19: 238-44
- Fredricks DN, Relman DA. 1999. *Application of polymerase chain reaction to the diagnosis of infectious diseases.* Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America 29: 475-86; quiz 87-8
- Fredslund J, Lange M. 2007. *Primique: automatic design of specific PCR primers for each sequence in a family.* BMC Bioinformatics 8: 369

- Gamboa D, Ho MF, Bendezu J, Torres K, Chiodini PL, *et al.* 2010. *A large proportion of P. falciparum isolates in the Amazon region of Peru lack pfhrp2 and pfhrp3: implications for malaria rapid diagnostic tests.* PloS one 5: e8091
- Hernández Ávila M. 2007. *Epidemiología: diseño y análisis de estudio*, ed. EM Panamericana, pp. 385
- Houze S, Hubert V, Le Pessec G, Le Bras J, Clain J. 2011. *Combined deletions of pfhrp2 and pfhrp3 genes result in Plasmodium falciparum malaria false-negative rapid diagnostic test.* Journal of clinical microbiology 49: 2694-6
- Howard RJ, Uni S, Aikawa M, Aley SB, Leech JH, *et al.* 1986. *Secretion of a malarial histidine-rich protein (Pf HRP II) from Plasmodium falciparum-infected erythrocytes.* The Journal of cell biology 103: 1269-77
- Johnson JR. 2000. *Development of polymerase chain reaction-based assays for bacterial gene detection.* Journal of microbiological methods 41: 201-9
- Kemp DJ, Thompson JK, Walliker D, Corcoran LM. 1987. *Molecular karyotype of Plasmodium falciparum: conserved linkage groups and expendable histidine-rich protein genes.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 84: 7672-6
- Lee N, Baker J, Andrews KT, Gatton ML, Bell D, *et al.* 2006. *Effect of sequence variation in Plasmodium falciparum histidine-rich protein 2 on binding of specific monoclonal antibodies: Implications for rapid diagnostic tests for malaria.* Journal of clinical microbiology 44: 2773-8
- Mendis K, Rietveld A, Warsame M, Bosman A, Greenwood B, Wernsdorfer WH. 2009. *From malaria control to eradication: The WHO perspective.* Tropical medicine & international health : TM & IH 14: 802-9
- Murray CK, Gasser RA, Jr., Magill AJ, Miller RS. 2008a. *Update on rapid diagnostic testing for malaria.* Clinical microbiology reviews 21: 97-110
- Murray LM, Thomson D, Conklin A, Wishart TM, Gillingwater TH. 2008b. *Loss of translation elongation factor (eEF1A2) expression in vivo differentiates between Wallerian degeneration and dying-back neuronal pathology.* Journal of anatomy 213: 633-45
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. NCCLS document. pp. v. Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards
- PAHO PAHO. 2010. *Report on the Situation of Malaria in the Americas, 2008.* pp. 265.
- Perkins MD, Bell DR. 2008. *Working without a blindfold: the critical role of diagnostics in malaria control.* Malaria journal 7 Suppl 1: S5
- Suh KN, Kain KC, Keystone JS. 2004. *Malaria.* CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne 170: 1693-702
- Sullivan DJ, Jr., Gluzman IY, Goldberg DE. 1996. *Plasmodium hemozoin formation mediated by histidine-rich proteins.* Science 271: 219-22
- Tangpukdee N, Duangdee C, Wilairatana P, Krudsood S. 2009. *Malaria diagnosis: a brief review.* The Korean journal of parasitology 47: 93-102
- The Global Found to Fight AIDS TaMG. 2013. *Ten Countries Rally to Eliminate Malaria in Central America and the Caribbean.* .
http://www.theglobalfund.org/en/mediacenter/newsreleases/2013-06-28_Ten_Countries_Rally_to_Eliminate_Malaria_in_Central_America_and_the_Caribbean/

- Wellems TE, Howard RJ. 1986. *Homologous genes encode two distinct histidine-rich proteins in a cloned isolate of Plasmodium falciparum*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 83: 6065-9
- Winzeler EA. 2008. *Malaria research in the post-genomic era*. Nature 455: 751-6
- Wongsrichanalai C, Barcus MJ, Muth S, Sutamihardja A, Wernsdorfer WH. 2007. *A review of malaria diagnostic tools: microscopy and rapid diagnostic test (RDT)*. The American journal of tropical medicine and hygiene 77: 119-27
- World Health Organization. 2008a. *Global malaria control and elimination : report of a technical review*. Geneva: World Health Organization. 47 p. pp.
- World Health Organization. 2008b. *World malaria report 2008*. Geneva: World Health Organization. 190 p. pp.
- World Health Organization. 2009. *World malaria report 2009*. Geneva: World Health Organization. x, 190 p. pp.
- World Health Organization. 2010. *World malaria report: 2010*. Geneva: World Health Organization. 205 p. pp.
- World Health Organization. 2011. *World malaria report 2011*. Geneva: World Health Organization. xii, 246 p. pp.
- World Health Organization. 2012a. *T3: Test. Treat. Trick*. pp. 12. Geneva: World Health Organization.
- World Health Organization. 2012b. *World malaria report 2012*. Geneva: World Health Organization. xxxiv, 249 p. pp.
- World Health Organization. 2013a. *Malaria rapid diagnostic test performance: results of WHO product testing of malaria RDTs: round 4 (2012)*. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data.
- World Health Organization. 2013b. *World malaria report : 2013*. Geneva 27, Switzerland 284 pp.
- Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. 2012. *Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction*. BMC Bioinformatics 13: 134
- Zhou Y, Ramachandran V, Kumar KA, Westenberger S, Refour P, et al. 2008. *Evidence-based annotation of the malaria parasite's genome using comparative expression profiling*. PloS one 3: e1570

VIII. ANEXOS

A. Protocolo de re-concentración de ADN para muestras con baja concentración.

Precipitación y resuspensión de muestras con fragmentos pequeños o baja concentración de ADN

3. Propósito. Describir el procedimiento a seguir para precipitar y re-suspender muestras con fragmentos pequeños o de baja concentración de ADN, y recuperar la mayor cantidad de ADN posible.

4. Procedimiento.

a. Preparación de la soluciones.

1) Acetato de amonio 3M y pH 5.2

- Pese 5,7 gramos de acetato de amonio, colóquelo en un beaker de 25ml, agregué alrededor de 7ml de agua desionizada y mezcle hasta disolver.
- Mida el pH y ajuste con ácido acético hasta llegar al pH deseado (pH 5.2) con aproximadamente 12ml de ácido.
- Afore la solución, en un balón de 25ml, con agua desionizada.
- Use una membrana de filtro esterilizada 0,22mm para esterilizar la solución.
- Cierre la botella de solución a temperatura ambiente.

Nota: la descomposición del acetato de amonio es muy fácil al calentarlo por lo que no se debe hacer uso de la autoclave.

2) Glucógeno hecho en casa (Grado Biología Molecular)

- Pese 0.25g de glucógeno y agregue en 1.5ml de H₂O_d (destilada) y agite hasta que el glucógeno este completamente disuelto en solución (puede tomar de 10 a 15min).

- Haga (2) alícuotas de la solución en tubos de 1.5 ml Eppendorf, aproximadamente 0.75ml por tubo. Agregue un volumen igual de PC-8 al glucógeno y mezcle por vortex.

Nota: después de vortexear, la fase de fenol debe ser la fase baja.

- Centrifugue a 14,000 rpm en la microcentrifuga por 10 minutos a 4°C. Transfiera la fase acuosa superior (contiene e glucógeno) en un nuevo tubo Eppendorf. Descarte la fase inferior de fenol.
- Adicione un volumen igual de cloroformo: alcohol isoamilico (49:1) frio (4°C) en la fase del glucógeno y vortexee. Nota: Después de vortexear, la fase de cloroformo debe ser la fase inferior, y el glucógeno debe estar en la fase superior.
- Centrifugue a 14,000 rpm por 10min a 4°C. Transfiera la fase superior de glucógeno a un nuevo tubo. Descartar la fase baja de cloroformo.
- Adicionar un volumen igual de etanol 100% a temperatura ambiente en la fase del glucógeno, y mezclar por inversión 4-5veces.
- Centrifugar a 14,000rpm por 10min a 4°C. Descartar el sobrenadante.
- Secar el precipitado por una noche a 30-40°C hasta que el glucógeno este completamente seco.
- Pesar el precipitado y disolver en H₂O a una concentración de 20mg/ml. El glucógeno en solución puede requerir agitación a temperatura ambiente.
- Alícuotar y almacenar a -70°C

5. Preparación del área

- Coloque reactivos requeridos a temperatura ambiente hasta que se descongelen.
- Mezcle con vórtex los reactivos.
- Los tubos deben estar rotulados con marcador permanente, colocar la fecha de precipitación/re-suspensión.
- Limpie la superficie de la campana con etanol 70%.
- Coloque las pipetas, cajas de puntas, recipiente para descarte de desechos dentro de la campana.
- Limpie la superficie de todos los materiales con cloro al 10% y etanol al 70% para prevenir la contaminación.

- Encienda la luz UV de la campana y permita que esta actúe por lo menos por 15 minutos.

6. Manejo de muestras

- Las muestras de ADN deben ser colocados en un PCR cooler o hielo a 4°C para permitir que se descongelen.
- Mezcle las muestras varias veces en un mezclador de vórtex y centrifugue las brevemente para permitir que el contenido se vaya al fondo del tubo.

7. Procedimiento de precipitación con etanol

- Mida el volumen de la muestra de ADN que precipitará (¡registre este dato, le servirá para el proceso de re-suspensión!)
- Agregue un volumen de 1/10 de Acetato de sodio 3M (obteniendo una concentración final de 0,3M) y pH 5,2.

Nota: Se asume dicha cantidad de acetato de amonio si el ADN esta re-suspendido, únicamente, en buffer TE; si el ADN está en una solución que contiene sal, ajustar la concentración de sal para lograr la final correcta.

- Adicione 2 volúmenes (calculado después de la adición de acetato de sodio) de etanol absoluto.

OPCIONAL: En esta etapa, puede agregar el glucógeno para una concentración final de 0.05-1 µg/µl. Se recomienda usar hasta 1µl de glucógeno por 20µl de solución.

- Agite con vórtex.
- Almacene a -20°C por lo menos dos horas para precipitar el ADN.

Nota: El ADN puede almacenarse indefinidamente a esas condiciones.

8. Procedimiento de resuspensión

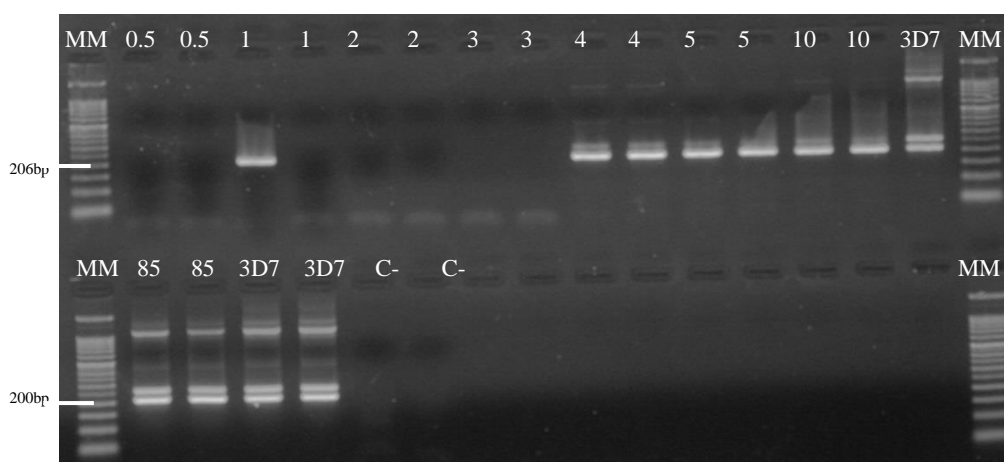
NOTA: Si el ADN precipitado no contiene glucógeno, puede realizar el paso 6.4.4 antes de iniciar la resuspensión, y debe almacenarse a -20°C por lo menos dos horas o una noche.

- El ADN debe permanecer por lo menos 2 horas a -20°C , previamente a la centrifugación.
- Centrifugue a máxima velocidad (14,000rpm) por 60 minutos a 4°C , ya que es necesario mayor tiempo y alta velocidad de centrifugación para fragmentos pequeños o baja concentración de ADN.
- Descarte con una pipeta el sobrenadante.
- Lave el sedimento con etanol 70% (200 μL), para evitar que el ADN se disuelva en mayor volumen.
- Centrifugue a 14,000 rpm por 15 minutos a 4°C y descarte con mucho cuidado el sobrenadante utilizando una pipeta.
- Bajo la campana, coloque los tubos abiertos sobre una hoja de papel absorbente (Kimwipe) y deje secar (hasta que evapore todo el etanol del tubo, aprox. 15-30 min.).
- Agregue el volumen apropiado de buffer TE (volumen calculado inicialmente en el paso 6.4.1) o puede agregar menor volumen para concentrar la muestra.
- Deje a 4°C toda la noche para permitir que el ADN se resuspenda.

B. Evaluación de la calidad del ADN extraído o presente por PCR 18s ADNr de las diluciones del control 3D7 en papel filtro.

PCR 18s ADNr para verificar la calidad del ADN extraído del control 3D7 en diluciones de parásitos por microlitro de sangre en papel filtro (0.1, 1, 2, 3, 4, 5 y 10 parásitos/ μl).

Figura 21. Gel del producto de PCR 18s ADNr semianidado de las extracciones de ADN de las diluciones de parásitos 3D7 por microlitro de sangre en papel filtro



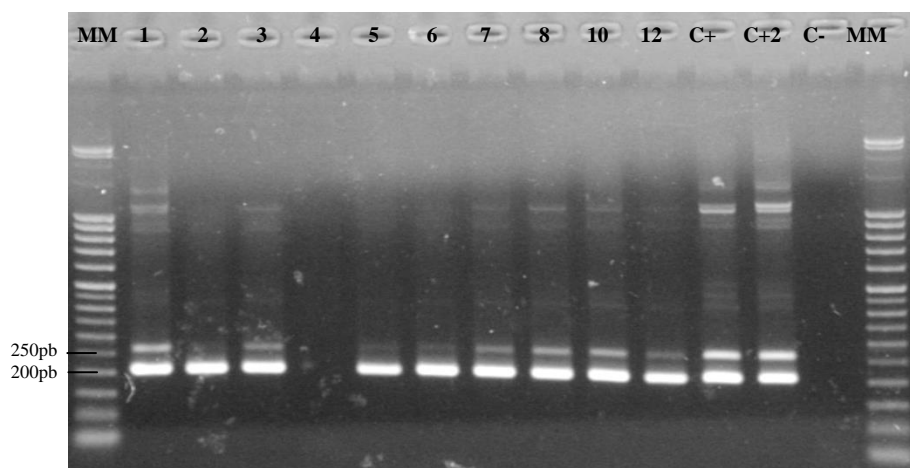
Pozos: (MM) Marcador molecular 50bp. Duplicado: (0.5) ADN 3D7 0.5 parásito/ μ l, (1) AND 3D7 1 parásito/ μ l, (2) 3D7 2 parásito/ μ l, (3) 3D7 3 parásito/ μ l, (4) 3D7 4 parásito/ μ l, (5) 3D7 5 parásito/ μ l, (10) 3D7 10 parásito/ μ l, (85) ADN control positivo interno de laboratorio, (3D7) Control positivo 3D7 1:10. (C-) Control negativo H₂O. Productos de PCR fueron corridos en un gel agarosa 2%, 100Voltios por 15 min. Banda de tamaño esperado: 206pb.

Producto de PCR 18S ADNr de las extracciones del control positivo 3D7 en diluciones de parásitos por microlitro en papel filtro. La electroforesis muestra amplificación en 1, 4, 5 y 10 parásitos por microlitro, los cuales indican la eficiencia de la extracción así como la presencia de ADN amplificable del parásito.

C. Evaluación de la calidad del ADN presente en los aislados de Guatemala 98-99 por PCR 18s ADNr

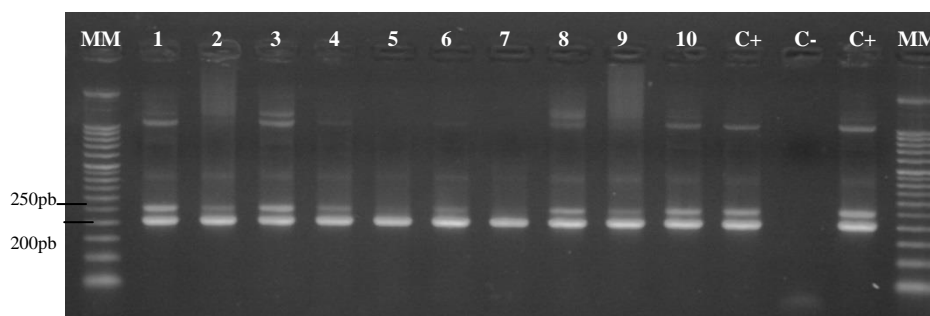
Producto de PCR 18s ADNr para verificar la calidad de los aislados de ADN de las muestras de Guatemala 98-99 que fueron almacenadas y resuspendidas, Figura 20 y 21.

Figura 22. Gel del producto de PCR 18S ADNr de 10 aislados de ADN guatemaltecos 98-99.



Pozos: (MM) Marcador molecular 50pb, (1) ADN Gt9899- 01, (2) ADN Gt9899- 02 (3) ADN Gt9899- 03, (4) ADN Gt9899- 04, (5) ADN Gt9899- 05, (6) ADN Gt9899- 06, (7) ADN Gt9899- 07, (8) AND Gt9899- 08, (10) ADN Gt9899- 09, (12) ADN Gt9899- 10, (C+) Control positivo ADN 3D7, (C+2) Control positivo ADN Hb3 y (C-) Control negativo H₂O. Productos de PCR fueron corridos en un gel agarosa 2%, 100Voltios por 30 min. Banda de tamaño esperado: 206pb.

Figura 23. Gel del producto de PCR 18S ADNr de 10 aislados de ADN guatemaltecos 98-99



Pozos: (MM) Marcador molecular 50pb, (1) ADN Gt9899- 12, (2) ADN Gt9899- 13, (3) ADN Gt9899- 14, (4) ADN Gt9899- 15, (5) ADN Gt9899- 16, (6) ADN Gt9899- 17, (7) ADN Gt9899- 18, (8) AND Gt9899- 19, (9) AND Gt9899- 20, (10) ADN Gt9899- 21, (C+) Muestra ADN 3D7 (1:10 y 1:100)* y (C-) Control negativo H₂O. Productos de PCR fueron corridos en un gel agarosa 2%, 100Voltios por 15 min. Banda de tamaño esperado: 206pb.

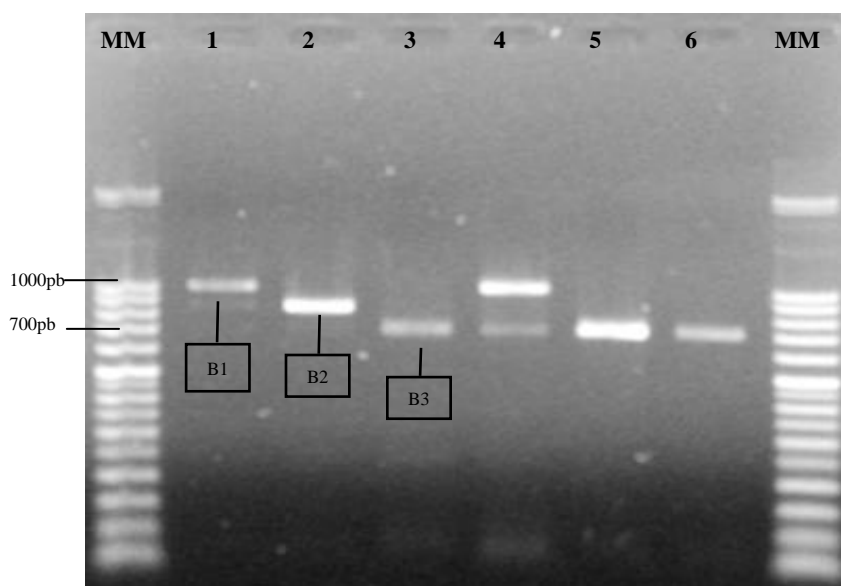
*Se utilizaron dos alícuotas de controles, la segunda se evaluó para continuar utilizándola en el proceso.

Las 10 muestras fueron exitosamente amplificables, lo que indica que hay ADN del parásito para probar el PCR *pfhrp3*.

D. Bandas aisladas de la reacción de PCR del primer grupo de cebadores diseñados.

Producto del aislamiento de las bandas inespecíficas obtenidas con el método de PCR empleando el primer grupo de cebadores. El aislamiento se logró con la ejecución de técnicas de PCR en gradiente y PCR band stab. La secuenciación de las bandas indicaron que ninguna correspondía al gen *pfhrp3*.

Figura 24. Gel del producto PCR Band-stab *pfhrp3* de las bandas aisladas.



Pozos: (MM) Marcador molecular 50pb, (1) Muestra Gt9899-08 B1 (banda 1000pb), (2) Muestra Gt9899-08 B2 (banda 900pb), (3) Muestra Gt9899-08 B3 (banda 700pb), (4) Muestra Gt9899-09 B1 (banda 1000pb), (5) Muestra Gt9899-09 B3 (banda 700pb), (6) Muestra Gt9899-09 B3 (banda 700pb). Productos de PCR fueron corridos en un gel agarosa 2%, 100Voltios por 30 min. Banda de tamaño esperado: 700 a 1000pb.