



FACULTAD DE MEDICINA HUMANA
SECCIÓN DE POSGRADO

**DISEÑO Y VALIDACIÓN DE UN ENSAYO x-MAP™ PARA
LA GENOTIPIFICACIÓN SIMULTÁNEA DE
MARCADORES MOLECULARES ASOCIADOS CON
GENES DE FARMACORESISTENCIA EN *PLASMODIUM
FALCIPARUM* Perú, 2000 - 2009**

PRESENTADA POR

CAROLA JANETTE SALAS HERMOZA

TESIS PARA OPTAR GRADO ACADÉMICO DE DOCTORA EN
BIOQUÍMICA Y NUTRICIÓN

LIMA – PERÚ

2015



**Reconocimiento - No comercial - Compartir igual
CC BY-NC-SA**

El autor permite entremezclar, ajustar y construir a partir de esta obra con fines no comerciales, siempre y cuando se reconozca la autoría y las nuevas creaciones estén bajo una licencia con los mismos términos.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>



FACULTAD DE MEDICINA HUMANA
SECCIÓN DE POSGRADO

**DISEÑO Y VALIDACIÓN DE UN ENSAYO x-MAP™ PARA LA
GENOTIPIFICACIÓN SIMULTÁNEA DE MARCADORES
MOLECULARES ASOCIADOS CON GENES DE
FARMACORESISTENCIA EN *PLASMODIUM FALCIPARUM***

Perú, 2000 - 2009

TESIS

PARA OPTAR GRADO DE DOCTORA EN BIOQUÍMICA Y NUTRICIÓN

PRESENTADA POR

CAROLA JANETTE SALAS HERMOZA

LIMA – PERÚ

2015

ASESOR:

Huatuco Collantes, Zoel, Doctor en Medicina

JURADO:

Presidente: Velasco Guerrero, Juan Carlos, Doctor en Salud Pública

Miembro: Loayza Alarico, Manuel, Doctor en Salud Pública

Miembro: Navarrete Mejía, Javier, Doctor en Salud Pública





En memoria de mi mentor Dr. Alan J. Magill, M.D.



A mis amados padres Félix y Narcisa.

*A mis amados hermanos Félix y Olenka, mis
compañeros incondicionales en mis esfuerzos de
superación profesional.*

AGRADECIMIENTOS:

Al Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Marina de los Estados Unidos (NAMRU-6) por hacer posible el desarrollo de esta tesis y por el financiamiento otorgado a través el fondo DoD/GEIS.

Al doctor Robert V. Gerbasi por el apoyo brindado en la fase de redacción de este reporte final.

Al doctor David J. Bacon por la conceptualización de la idea de investigación, asesoría y supervisión en la ejecución del diseño del ensayo.

Al doctor Paul C. Graf por brindarme supervisión y asesoría al inicio de la etapa de validación del ensayo diseñado.

A la doctora Kimberly A. Edgel por brindarme supervisión y asesoría en la etapa de conclusión de la validación del ensayo diseñado.

A la magister Carmen Lucas por supervisión durante todo el desarrollo del trabajo experimental de análisis de datos y revisión de borradores de este trabajo de investigación.

Al licenciado Vidal Felices por contribuir en aspectos de laboratorio.

Al magister Christopher Cruz por contribución técnica en aspectos de bioquímica.

Al personal de tecnólogos de investigación de Parasitología, por contribuir a la conclusión de este trabajo.

A mis colegas de la central de biología molecular de NAMRU-6 por facilitar mis trabajos de experimentación.

A los colegas del sistema administrativo de NAMRU-6 por asistirme en compra de insumos para la ejecución del trabajo experimental.

INDICE

RESUMEN.....	x
ABSTRACT	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO.....	4
1.1. Antecedentes de la investigación.....	4
1.2. Bases Teóricas:	11
1.3. Definiciones Conceptuales	21
CAPITULO II: METODOLOGIA	22
2.1. Tipo de Investigación.....	22
2.2. Diseño de investigación.....	22
2.3. Población y muestra:	22
2.4. Reactivos.....	23
2.5. Consumibles.....	26
2.6. Equipos	27
2.7. Metodología.....	27
2.8. Protocolo para la reacción de ensayos de genotipificación x-MAP ASPE.	30
2.9. Recolección de datos	33
2.10. Análisis Estadístico.....	34
2.11. Aspectos Éticos	36
CAPITULO III: RESULTADOS.....	37
3.1 Muestras Analizadas	37
3.2 Diseño de sondas de diagnóstico y asignación de microesferas.....	37
3.3 Cantidad de ADN usado para reacciones	51
3.4 Estandarización de reacciones multiplex 5X.....	51
3.5 Análisis estadísticos	53
CAPITULO IV: DISCUSION.....	64
CONCLUSIONES	87
RECOMENDACIONES.....	88
FUENTES DE INFORMACION.....	89
ANEXOS.....	97
Anexo N° 1: Abreviaturas.....	97

Anexo N° 2: VARIABLES Y OPERACIONALIZACION DE VARIABLES	100
Anexo N° 3: Protocolo de Extracción de ADN a partir de muestras de sangre	101
Anexo N° 4: Preparación de oligonucleótidos cebadores	103
Anexo N° 6: Protocolo de electroforesis en geles de agarosa	108
Anexo N° 7: Protocolo de secuenciamiento usando BigDyeTerminator v3.1	109
Anexo N° 8: Lista De 44 oligonucleótidos usados para ensayo X-MAP ASPE	110
Anexo N° 9: Protocolo para extensión específica de producto (ASEP) e hibridación a microesferas de matriz universal FlexMAP™	111
Anexo N° 10: Procedimiento de hibridación con microesferas FlexMAP™	113
Anexo N° 11: Lista de microesferas usadas	114
Anexo N° 12: Instrumento de recolección de datos	115



INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Método para de análisis de SNPs	15
Tabla 2.4.1 Oligonucleótidos usados para amplificaciones de PCR.....	25
Tabla 3.1 Procedencia de las muestras por localidad	37
Tabla 3.2.1a. SNPs de interés y bases nucleotídicas blanco – Gen <i>Pfdhfr</i>	40
Tabla 3.2.1b. Bases nucleotídicas y microesferas asignadas – Gen <i>Pfdhfr</i>	40
Tabla 3.2.2a. SNPs de interés y bases nucleotídicas blanco – Gen <i>Pfdhps</i>	40
Tabla 3.2.2b. Bases nucleotídicas y microesferas asignadas – Gen <i>Pfdhps</i>	40
Tabla 3.2.3a SNPs de interés y bases nucleotídicas blanco – Gen <i>Pfcrt</i>	42
Tabla 3.2.3b Bases nucleotídicas y microesferas asignadas – Gen <i>Pfcrt</i>	42
Tabla 3.2.4a Bases nucleotídicas y microesferas asignadas – Gen <i>Pfmdr1</i>	42
Tabla 3.2.4b Bases nucleotídicas y microesferas asignadas – Gen <i>Pfmdr1</i>	42
Tabla 3.2.7. Valores de MFI – Gen <i>Pfdhfr</i> (1X)	45
Tabla 3.2.8. Radios alélicos de la reacción multiplex (1X), Gen <i>Pfdhfr</i>	46
Tabla 3.2.9. Valores de MFI – Gen <i>Pfdhps</i> (1X).....	47
Tabla 3.2.10. Radios alélicos de la reacción multiplex (1X), Gen <i>Pfdhps</i>	47
Tabla 3.2.11. Valores de MFI – Gen <i>Pfcrt</i> (1X)	48
Tabla 3.2.12. Radios alélicos de la reacción multiplex (1X), Gen <i>Pfcrt</i>	48
Tabla 3.2.13 Valores de MFI – Gen <i>Pfmdr1</i> (1X)	49
Tabla 3.2.14 Radios alélicos de la reacción multiplex (1X), Gen <i>Pfcrt</i>	50
Tabla 3.3 Cantidad de amplicón usado para reacciones xMAP-ASPE	51
Tabla 3.5.1.1 Valores de radios alélicos para trabajos de laboratorio	55
Tabla 3.5.2.4 Frecuencia de los 11 polimorfismos usados para validación de ensayo x- MAP ASPE en la población estudiada	57
Tabla 3.5.2.5 Criterios para validez de resultados en reacciones 1X.....	58
Tabla 3.5.2.6 Criterios para validez de resultados en reacciones 5X.....	58
Tabla 3.5.4 Valores de corte para el ensayo x-MAP ASPE	62
Tabla 3.5.5 Valores de área bajo la curva (AUC), sensibilidad y especificidad – ensayo xMAP ASPE	63

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Esquema de una reacción x-MAP ASPE para genotipificación simultánea de marcadores moleculares asociados a fármaco resistencia	20
Gráfico 2.3 Ubicación de las áreas de estudio en la Costa Norte y Amazonia del Perú, 2000 – 2009.....	23
Gráfico 2.7 Flujograma de procesamiento de muestras	28
Gráfico 2.8.3.4: Análisis de Citometría de Flujo	33
Gráfico 2.9: Recolección de datos de citometría de flujo.....	33
Gráfico 2.9.2 Flujograma de análisis estadístico de datos	35
Gráfico 3.2 Flujograma de trabajo – Diseño de oligonucleótidos de diagnóstico	38
Gráfico 3.2.1 Ubicación de SNPs de interés – gen <i>Pfdhfr</i>	39
Gráfico 3.2.2 Ubicación de SNPs de interés – gen <i>Pfdhps</i>	39
Gráfico 3.2.3 Ubicación de SNPs de interés – gen <i>Pfcrt</i>	41
Gráfico 3.2.5 Uso de ddNTPs específicos – <i>Pfdhfr</i> SNP S108N	44
Gráfico 3.2.6 Uso de ddNTPs específicos vs uso de ddCTP-biotinilado - SNP A16V... ..	44
Gráfico 3.2.7. Valores de MFI – Gen <i>Pfdhfr</i> (1X).....	45
Gráfico 3.2.8 Reacción Multiplex – Gen <i>Pfdfr</i> por radio alélico.....	46
Gráfico 3.2.9 Reacción Multiplex – Gen <i>Pfdhps</i> (1X)	47
Gráfico 3.2.10 Reacción Multiplex – Gen <i>Pfdhps</i> por radio alélico	47
Gráfico 3.2.11 Valores de MFI – Gen <i>Pfcrt</i> (1X).....	48
Gráfico 3.2.12 Reacción Multiplex – Gen <i>Pfcrt</i> por radio alélico.....	48
Gráfico 3.2.13 Valores de MFI – Gen <i>Pfmdr1</i> (1X).....	49
Gráfico 3.2.14 Reacción Multiplex – Gen <i>Pfmdr1</i> por radio alélico.....	50
Gráfico 3.4a Análisis multiplex de genes de fármaco resistencia en <i>P. falciparum</i> Reacción 5X	52
Gráfico 3.4b Análisis multiplex de genes de fármaco resistencia en <i>P. falciparum</i> - Reacción 5X.....	53
Gráfico 3.5.3.1 Resultado de Curvas ROC – Gen <i>Pfdhfr</i>	59
Gráfico 3.5.3.2 Resultado de Curvas ROC – Gen <i>Pfdhps</i>	60
Gráfico 3.5.3.3 Resultados de Curvas ROC – Gen <i>Pfcrt</i>	60
Gráfico 3.5.3.4 Resultados de Curvas ROC – Gen <i>Pfmdr1</i>	61

RESUMEN

El análisis de marcadores moleculares es el medio más sencillo para monitorizar la aparición o progresión de fármaco resistencia a antimaláricos en el Perú. Para facilitar esta labor desarrollamos un sistema basado en microesferas para identificar polimorfismos de nucleótido único (SNPs) asociados con fármaco resistencia en los genes *Pfdhfr*, *Pfdhps*, *Pfcrt* y *Pfmdr-1* de *P. falciparum*. Logramos diseñar un completo método de vigilancia molecular por minisequenciamiento multiplex basado en la extensión específica de alelo (x-MAP ASPE). Partimos de amplificaciones de PCR de las secuencias blanco para generar productos fluorescentes marcados usando oligonucleótidos que contienen una secuencia específica de captura de SNPs y una mezcla de reacción de PCR que contiene ddCTP marcado con biotina. Luego de marcadas, las amplificaciones específicas de alelo fueron capturadas utilizando microesferas fluorescentes seguido por incubación con estreptavidina-R-ficoeritrina, y analizadas en el citómetro Bio-Plex™. Por lo tanto, utilizando 44 oligonucleótidos alelo-específicos y 44 microesferas el procedimiento identificó correctamente a 21 polimorfismos en los cuatro genes individualmente en reacciones específicas de gen o en una sola reacción multiplex. Al analizar aislamientos caracterizados por secuenciamiento, nuestros resultados obtenidos con estrategia x-MAP ASPE fueron concordantes según lo muestran las curvas ROC para los 11 alelos polimórficos encontrados, la sensibilidad y especificidad del ensayo fueron superiores al 80%; el punto de corte del radio alélico para los alelos mutantes fue 0.2 a 0.28. La prevalencia de SNPs influenció en el resultado final, por lo que se requiere de evaluación adicional para determinar su aplicación en zonas de transmisión de la malaria bajo tales como las existentes en el Perú.

ABSTRACT

Molecular markers determination is the easiest means to monitor the onset or progression of malaria drug resistance in Peru. To facilitate this work we developed a bead-based system to identify single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with drug resistance in *Pfdhfr*, *Pfdhps*, *Pfcr1* and *Pfmdr-1* *P. falciparum* genes. We designed a comprehensive molecular surveillance multiplex minisequencing methodology using allelic primer extension strategy (x-MAP ASPE). Fluorescently labeled allele-specific extension products were generated from PCR amplified target sequences, SNP primers containing a gene specific capture sequence and a PCR reaction mixture containing biotin-labeled ddCTP. Following labeling, the allele specific extension products were captured using fluorescent Flex-MAP™ microspheres followed by incubation with streptavidin-R-phycoerythrin, analysis with a Bio-Plex™ cytometer. Therefore, using 44 different allele specific primers and 44 Flex-MAP™ microspheres the procedure correctly identified 21 polymorphisms in *the four* genes either individually in gene specific reactions or in a single reaction. When applied to isolates characterized by DNA sequencing, our results using the x-MAP ASPE procedure were concordant as demonstrated by ROC curve results for 11 polymorphic alleles found, the sensitivity and specificity of the assay were higher than 80%. Therefore, the cut off allelic ratio was 0.2 to 0.28 for the mutant alleles. The SNPs prevalence influenced the final outcome, so further evaluation is needed to assess its implementation in low malaria transmission areas such as those existing in Peru.

INTRODUCCIÓN

La malaria es una de las infecciones parasitaria más importantes en el mundo a la que están expuestas un estimado de 3.3 billones de personas que habitan en áreas endémicas. Según la OMS en el 2013 ocurrieron unos 198 millones de casos ocasionando más de 500,000 decesos ⁽¹⁾. Las poblaciones más vulnerables incluyen a niños pequeños, mujeres gestantes, ancianos y visitantes o viajeros no inmunes que llegan a estas áreas endémicas ⁽²⁾.

Existen cientos de especies de *Plasmodium*, pero son cinco especies las que causan malaria en humanos: *P. malariae*, *P. ovale* (dos especies), *P. vivax* y *P. falciparum*; recientemente la especie *Plasmodium knowlesi* que infecta simios en el Sud Este de Asia, fue encontrada en infecciones en humanos⁽³⁾, ⁽⁴⁾. Aproximadamente un 90% de las manifestaciones clínicas y los casos de malaria severa que terminan en muertes atribuidas a malaria, son causadas por *P. falciparum*. El segundo en importancia es *P. vivax*, que es responsable del 10% restante de la incidencia global de malaria, y de los que también se han reportado casos de malaria severa ⁽⁵⁾, ⁽⁶⁾.

Con respecto a los casos de malaria por *P. falciparum* en el Perú, estos se convirtieron en un problema muy grave en los últimos 6 años de la década de los 90s en particular en la región Amazónica. Por ejemplo, mientras en 1990 se habían reportado 641 casos de los cuales 123 habían sido *P. falciparum* pasamos a reportar 121,268 casos registrados en el año 1997 ⁽⁷⁾. De otro lado en aquella época se reportaban numerosos casos de fallas clínicas al no solo al tratamiento con Cloroquina (CQ) sino también a la combinación Sulfadoxina-Pirimetamina (SP), aunque en aquella época la realización de esos estudios no estaba aún estandarizada en América del Sur ⁽⁸⁾. Posteriormente se pudo demostrar que la reemergencia de malaria observada no solo en la cuenca amazónica sino también en la costa norte del Perú estuvo asociada a una dispersión e intensificación de la resistencia de cepas de *P. falciparum* a la CQ y SP. Como consecuencia, se realizaron varias modificaciones en el esquema de tratamiento hasta establecimiento del uso de la terapia combinada con Mefloquina y Artesunato que actualmente se encuentra vigente ⁽⁹⁾, ⁽¹⁰⁾.

El Ministerio de Salud del Perú en colaboración con los países vecinos y alianzas estratégicas con OPS, CDC, RAVEDRA, AMI realizaron numerosos trabajos de investigación para poder documentar los patrones de sensibilidad y resistencia de los Plasmodium en las Américas⁽⁸⁾. Sin embargo a pesar de todos estos esfuerzos, los casos de malaria en la selva Amazónica del Perú se incrementaron sustancialmente desde el 2012. Los casos de malaria por *Plasmodium falciparum* se triplicaron entre el 2011 y 2013 y los casos de *P. vivax* se duplicaron. A la fecha el 90% de los casos de malaria proceden de la selva amazónica de la región Loreto, y se han incrementado desde el 2011 que fue particularmente más grande en las cuencas de los ríos más remotos como el Morona, Yavari, Tigre y Pastaza, en áreas de distritos que conforman la Triple frontera Perú, Colombia y Brasil según estadísticas del Ministerio de Salud⁽¹¹⁾.

El uso adecuado de la terapia antimalárica es la principal estrategia para combatir esta infección parasitaria ya que a la fecha aún no ha sido posible desarrollar una vacuna totalmente efectiva contra la malaria; considerando que la vacuna RTSS tiene una modesta eficacia según resultados de ensayos clínicos realizados en África, afortunadamente hay otras estrategias de vacunas que también se van desarrollando en paralelo a este esfuerzo⁽¹²⁾ ⁽¹³⁾. Es importante resaltar que son pocos los medicamentos antimaláricos disponibles tanto para el tratamiento así como para la profilaxis, y la situación de la población en riesgo empeora frente al surgimiento de la fármaco resistencia, que ha sido identificada no solo en *P. falciparum* sino que ya hay reportes casos de *P. vivax* resistente a CQ del Perú ⁽¹⁴⁾ y recientemente del Sud Este de Asia. ⁽¹⁵⁾.

Se sabe que la resistencia a medicamentos antimaláricos y otras funciones vitales de los Plasmodium están genéticamente determinados, y por lo tanto pueden ser estudiados por técnicas de biología molecular, así en las últimas décadas el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el secuenciamiento han permitido identificar varios marcadores de resistencia a antimaláricos. Con respecto a SP, la atención está enfocada a la caracterización molecular de los genes dihidrofolato reductasa (*Pfdhfr*) y dihidropteroato sintasa (*Pfdhps*) de *Plasmodium falciparum*, otro es el transportador de resistencia de CQ de *P. falciparum* (*Pfcrt*)⁽¹⁶⁾ y el gen de multiresistencia 1 de *P. falciparum* (*Pfmdr1*)⁽¹⁷⁾. De

otro lado, existen dos genes potencialmente asociados a resistencia a artemisina: estos son el ortólogo de la ATPasa del retículo sarco/endoplásmico Ca^{2+} (*Pf-ATP6*)⁽¹⁸⁾, y recientemente se han publicado mutaciones en el K13-hélice (*Pf K13*)⁽¹⁹⁾.

Por lo tanto es muy importante caracterizar los perfiles de fármaco resistencia y también determinar los patrones de dispersión de clonas circulantes. En consecuencia, la principal herramienta para enfrentar este problema es la determinación rápida, costo efectiva y directa de polimorfismos asociados a *Plasmodium falciparum* fármaco resistente a medicamentos antimaláricos, siendo el ideal un ensayo de identificación simultánea de polimorfismos. El ensayo de minisequenciamiento xMAP™ que se propone es sencillo demandando inversión de tiempo principalmente para el diseño de los cebadores, lo que hace posible su pronto uso para fármaco vigilancia. Esta vigilancia es necesaria para la detección temprana de la aparición de la fármaco resistencia⁽²⁾ sobre todo ante la ocurrencia de la resistencia a artemisinina⁽²⁰⁾.

Por lo tanto se formuló la siguiente pregunta Es posible realizar la identificación simultánea de marcadores moleculares asociados a *Plasmodium falciparum* fármaco resistente por medio tecnología x-MAP™?

Para alcanzar el siguiente objetivo general: diseñar y validar una prueba de genotipificación simultánea de marcadores moleculares asociados a *Plasmodium falciparum* fármaco resistente a SP, CQ y MQ, usando minisequenciamiento de tipo multiplex basado en tecnología del “arreglo en suspensión” x-MAP™.

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes de la investigación

Existen dos métodos para la evaluación de la sensibilidad de *P. falciparum* a medicamentos antimaláricos. El primero método usa como referencia los resultados de las pruebas de eficacia terapéutica *in vivo* como la base para la toma de decisiones en las políticas de tratamiento de los programas nacionales de malaria, y como lo indica la Organización Mundial de la Salud (O.M.S) estas son la prueba de oro para determinar fármaco-resistencia. Estos métodos fueron diseñados en 1965, poco tiempo después de la emergencia de la resistencia a CQ, estos protocolos han sido revisados y modificados y la penúltima versión disponible fue emitida. En general la eficacia terapéutica se caracteriza por una temprana reducción de la densidad parasitaria y se clasifica como: falla terapéutica temprana, falla terapéutica tardía como respuesta clínica y parasitológica adecuada.

Numerosos estudios de eficacia *in vivo* fueron conducidos en áreas endémicas del Perú, los que permitieron caracterizar el patrón de resistencia de *P falciparum* frente a estos medicamentos antimaláricos⁽⁹⁾, En la región Amazónica se encontraron altos niveles de resistencia tanto a CQ y SP⁽²¹⁾ ⁽²²⁾, como consecuencia se dejaron de usar estos medicamentos antimaláricos para el tratamiento de primera línea de esta infección parasitaria. Estudios similares han demostrado una alta resistencia a CQ pero una resistencia menor a SP más no resistencia a Mefloquina (MQ) en tres lugares ubicados en la costa Norte del Perú ⁽²³⁾ . Por otro lado, no se encontró resistencia a MQ ni la combinación Mefloquina-Artesunato (MQ-AS) en la región Amazónica⁽²⁴⁾.

Finalmente, basado en los resultados obtenidos en estos estudios de eficacia *in vivo*, el Ministerio de Salud del Perú decidió optar por dos terapias de combinación, SP-AS para ser usado en la costa Norte del Perú, y MQ-AS para ser usado en la cuenca Amazónica⁽⁹⁾. En la actualidad en el Perú solo se usa la combinación MQ-AS para tratar casos de malaria no complicada causada por *P. falciparum*. Otros métodos que pueden ser usados para determinar la

susceptibilidad de *P. falciparum* a los antimaláricos son las pruebas *in vitro*. La OMS refiere que los ensayos para determinar la sensibilidad *in vitro* pueden ser usados para medir la sensibilidad intrínseca de *P.f.*, sin la interferencia de los factores que causan confusión por parte del hospedero al ejecutarse las pruebas *in vivo*. Estos ensayos están basados en el cultivo de aislamientos de *P. falciparum* que son expuestos a un rango de concentración de antimaláricos precisamente conocida y el recuento del número de parásitos para determinar la inhibición de la maduración hacia el estadio de esquizontes. Existen varios métodos *in vitro*, los que varían principalmente es la forma en que se documentan y como se interpretan los resultados ⁽²⁵⁾.

El objetivo general de las pruebas *in vitro* es monitorizar la fármaco resistencia en un país o en una región. Además están indicadas en monitorización epidemiológica con la finalidad de determinar patrones de resistencia cruzada, para establecer líneas de partida de sensibilidad de una droga antes de su uso y también para monitorizar la susceptibilidad temporal y espacial de las drogas⁽²⁵⁾. En este contexto, hay otros tres métodos indicando *in vitro* pueden ayudar a clarificar o completar el panorama general de fármaco resistencia ⁽²⁶⁾ ^(27, 28). Dentro de los estudios de resistencia *in vitro*, se encuentra 1) la determinación de concentración inhibitoria de las drogas en uso, donde los parásitos son expuestos a diferentes concentraciones de fármacos antimaláricos en el laboratorio; 2) el uso de marcadores moleculares asociados a fármaco-resistencia por el aporte que brindan en la vigilancia de resistencia que podría dar muchas respuestas respecto al mecanismo de resistencia y 3) la determinación de los niveles de medicamentos antimaláricos en sangre.

Todas estas estrategias en conjunto sirven para enfrentar a la fármaco resistencia a los tratamientos antimaláricos convencionales que es un problema regional en las Américas y se está convirtiendo en un problema importante en todo el mundo y la identificación de marcadores genéticos responsables de conferir resistencia a las drogas en *P. falciparum* se han identificado para algunas pero no todas las terapias actualmente en uso^(27, 29). El uso de la información genética para la detección temprana de los focos de resistencia y futuro control de la malaria resistente a los medicamentos es una herramienta

epidemiológica potencialmente útil, en conjunto con los métodos convencionales de ensayos *in vivo* así como las evaluaciones de sensibilidad a medicamentos antimaláricos⁽²⁰⁾.

FÁRMACO RESISTENCIA A ANTIMALÁRICOS

La OMS es la entidad que brinda normas para el tratamiento de malaria a nivel global y es necesario tomar algunos de sus conceptos esenciales para entender en su magnitud al problema de la fármaco resistencia a antimaláricos: “En 1967, la OMS define resistencia como la capacidad de un parásito cepa para sobrevivir o multiplicarse a pesar de la administración y la absorción de un fármaco que se administra en dosis iguales a o superiores a los normalmente recomiendan pero dentro de la tolerancia del sujeto (OMS, 1967). Esta definición fue modificada más adelante para incluir la frase: "la forma del fármaco activo contra el parásito debe ser capaz de acceder al parásito o el eritrocito infectado durante el tiempo necesario para su acción normal" (Bruce-Chwatt et al., 1986)”⁽²⁶⁾. La fármaco resistencia a los antimaláricos surge porque los Plasmodium son seleccionados por cambios genéticos que pueden ser mutaciones puntuales o amplificaciones de los genes que confieren una sensibilidad reducida. Desafortunadamente, se ha documentado fármaco resistencia a todos los antimaláricos disponibles incluida a las artemisininas que como medida de precaución se usa en diferentes combinaciones para prolongar su susceptibilidad⁽³⁰⁾⁽²⁶⁾.

El documento donde se describe la “Estrategia Técnica Mundial contra la Malaria 2016-2030”⁽³¹⁾ establece que se requiere mejorar de la fármaco vigilancia y el seguimiento de la eficacia de los medicamentos antimaláricos para detectar eventos adversos imprevistos y la mengua de la eficacia, para poder elegir las asociaciones medicamentosas más adecuadas para las normas nacionales de tratamiento. Así mismo establece que los países deberían monitorear cada dos años la eficacia de los tratamientos antimaláricos de primera línea tanto contra la enfermedad causada por *P. falciparum* o por *P. vivax*, apoyándose en el protocolo estándar de la OMS para los estudios de eficacia terapéutica. Reforzando el concepto que el hallazgo de una tasa de fracaso terapéutico superior al 10% debería propiciar un cambio de las normas nacionales de tratamiento de la malaria. En la actualidad, los tratamientos combinados basados en la artemisinina

(ACT) siguen siendo muy eficaces, basándonos en la premisa que los otros medicamentos usados para estas asociaciones lo sean también. Alerta también sobre probable surgimiento de resistencia a la artemisinina que en consecuencia incrementa el riesgo de resistencia a los otros medicamentos de la asociación, en el caso del Perú MQ-AS.

Por lo expuesto, entendemos porque los resultados de las pruebas terapéuticas *in vivo* son la base para la toma de decisiones en las políticas de tratamiento de los programas nacionales de malaria, y como lo indica la Organización Mundial de la Salud estos son el estándar de oro para determinar la presencia de fármaco-resistencia a medicamentos antimaláricos. Sin embargo, no son los únicos métodos, ya que además se encuentran disponibles los métodos *in vitro* que pueden ayudar a clarificar o completar el panorama general ⁽²⁶⁾ ^(27, 28). Entre estos métodos de resistencia *in vitro* tenemos: 1) la determinación de concentración inhibitoria de las drogas en uso, donde los parásitos son expuestos a diferentes concentraciones de fármacos antimaláricos en el laboratorio; 2) el uso de marcadores moleculares asociados a fármaco-resistencia por el aporte que brindan en la vigilancia de resistencia que podría dar muchas respuestas respecto al mecanismo de resistencia y 3) la determinación de los niveles de medicamentos antimaláricos en sangre. Todas estas estrategias en conjunto sirven para enfrentar al fármaco resistencia a los tratamientos antimaláricos convencionales que es un problema regional en las Américas y se está convirtiendo en un problema importante en todo el mundo.

Por lo tanto, urge la identificación de marcadores genéticos responsables de conferir resistencia a las drogas en *P. falciparum* ya que a la fecha se han identificado para algunas pero no para todas las terapias actualmente en uso ^(27, 29). El uso de la información genética relacionada a *P. falciparum* es útil para la detección temprana de los focos de resistencia y futuro control de la malaria resistente a los medicamentos es una herramienta epidemiológica potencialmente útil, sumado a los métodos convencionales de ensayos *in vivo* así como las evaluaciones de sensibilidad a medicamentos antimaláricos⁽²⁰⁾. Son sobre todo muy útiles, en áreas endémicas donde la intensidad de transmisión de la infección está en franca disminución haciendo difícil la realización de estudios

de eficacia terapéutica *in vivo*, este es el escenario que vivimos en la actualidad en áreas endémicas de malaria en América del Sur.

MARCADORES MOLECULARES DE FARMACO RESISTENCIA

Otro aspecto en el que la O.M.S. está enfocado es en las pruebas de genotipificación. Durante las últimas dos décadas, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), los polimorfismos para fragmentos de restricción (RFLP) y el secuenciamiento de ADN y determinación de ciertos microsatélites asociados, se han convertido en poderosas herramientas para la evaluación de la resistencia *in vitro* de *P. falciparum* frente a drogas antimaláricas especialmente en el África⁽³²⁾ (16, 29, 33). A la fecha se conocen los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs por sus siglas en inglés) en 8 genes que han atraído el interés de la O.M.S. en la lucha por dilucidar los polimorfismos relacionados a fármaco resistencia a drogas antimaláricas y que podrían servir como marcadores moleculares específicos:

- a) Pirimetamina y Cicloguanil: asociadas al gen dihidrofolato reductasa (*Pfdhfr*).
- b) Sulfonamidas: asociadas al gen dihidropteroato sintasa (*Pfdhps*).

En nuestra opinión los marcadores más estudiados y sobre los que más se ha publicado son los asociados a resistencia a Sulfadoxina-Pirimetamina (SP)^(33, 34),⁽³³⁾ además son los únicos validados en África y Sud-América a través de ensayos de eficacia terapéutica *in vivo*⁽³³⁾ (25). Se conoce bien la distribución geográfica de los SNPs en los genes *Pfdhfr*, *Pfdhps* de *P. falciparum*. Otro aspecto bien documentado es la dispersión de estos a través de los continentes.

- c) Cloroquina: resistencia atribuida a polimorfismos en el transportador de resistencia de CQ de *P. falciparum* (*Pfcr1*) (13,18). Otro gen que ha sido muy bien caracterizado es *Pfcr1*, específicamente la mutación K76T que ha sido asociada con resistencia a CQ y que tiene una alta correlación con fallas clínicas al tratamiento con este antimalárico⁽³⁵⁾
- d) El cuarto gen es de multiresistencia 1 de *P. f.* (*Pfmdr1*) que se cree juega un rol en la modulación de resistencia a compuestos del tipo 4-quinolinametanoles, 4-aminoquinolinas y otros compuestos⁽¹⁶⁾ (36). ha sido asociado con cambios en la susceptibilidad de los parásitos a CQ, QUI y MQ.
- e) Aunque hace solo hace unos 15 años que se comenzó a usar la combinación

MQ-AS de forma global, ya se han reportado dos marcadores potencialmente asociados a resistencia a artemisina,: estos son el ortólogo de la ATPasa del retículo sarco/endoplásmico Ca^{2+} (*Pf-ATP6*)⁽¹⁸⁾, y recientemente se han publicado mutaciones en el K13-hélice (*Pf K13*)⁽¹⁹⁾.

- f) De otro lado, también se ha demostrado que una mutación en el gen Citocromo b, (Y268N o Y268S), puede estar ligada a la resistencia *in vitro* a Atovacuona especialmente cuando es usada en monoterapia, provocando un incremento de 10,000 veces el IC₅₀ de la droga, aunque su rol es todavía controversial ^{(37), (30)}.
- g) As mismo tenemos reportes sobre la existencia de mutaciones asociadas a Clindamicina reportadas en un grupo de muestras procedentes del Perú.⁽³⁸⁾ .

La mayoría de las mutaciones mencionadas fueron identificadas en cepas de *P. falciparum* de referencia y validadas subsecuentemente por pruebas *in vitro* usando aislamientos de pacientes. Estos estudios han permitido determinar la correlación existente entre los datos *in vitro* y los marcadores moleculares. Por lo tanto, los marcadores moleculares pueden reemplazar a los ensayos *in vitro* bajo ciertas circunstancias. Existe un interés particular en el estudio de drogas que demandan condiciones *in vitro* muy exigentes o cuyos resultados son difíciles de reproducir (Pirimetamina, Cicloguanil, Sulfadoxina).

A pesar de que son pocos estos marcadores moleculares es posible utilizarlos para predecir los resultados de los tratamientos administrados con estos medicamentos, es en este campo que requerimos de contar con métodos de genotipificación disponibles para realizar trabajos de monitorización de aparición de mutaciones como un sistema rápido aunque indirecto de alerta para emergencia de fármaco resistencia.

Existe una necesidad creciente por lograr el desarrollo de nuevas tecnologías que permitan una determinación rápida, costo efectiva y directa de polimorfismos asociados a *Plasmodium falciparum* fármaco resistente a medicamentos antimaláricos de uso terapéutico común, siendo el ideal un ensayo de identificación simultánea de polimorfismos. La contribución del secuenciamiento ^{(32) (16, 29, 33) (39) (29), (40), (16)}. Estos análisis de biología molecular permiten construir

bases de datos de vigilancia epidemiológica molecular y determinar la evolución del fármaco resistencia regional.

MARCADORES MOLECULARES DE FARMACO RESISTENCIA-AMERICAS

La vigilancia molecular ha sido aplicada en América del Sur por diversos grupos de investigación, sobre todo por ser un área con baja transmisión de malaria pero que controversialmente puede albergar parásitos muy resistentes a tratamientos de primera línea y que pueden diseminar su capacidad de resistencia a lo largo de la selva Amazónica.⁽⁴¹⁾, Este es un interés compartido por Venezuela⁽⁴²⁾, Colombia⁽⁴³⁾ y Brasil⁽⁴⁴⁾ con ayuda de colaboradores como CDC⁽⁴⁵⁾. Los marcadores moleculares más estudiados son *Pfdhfr* y *Pfdps* en los que la dinámica de su dispersión, origen y fijación de algunos SNPs en la población hacen interesantes su vigilancia⁽⁴⁶⁾.

ESTUDIOS REALIZADOS EN PERU

Existen estudios realizados en zonas endémicas de América del Sur^(42, 47, 48) incluyendo al Perú, en los que estas técnicas de biología molecular fueron usadas exitosamente para identificar SNPs en *P. falciparum* y así detectar (i) mutaciones puntuales en *Pfdhfr* y *Pfdhps* que confieren resistencia a drogas como Pirimetamina y sulfonamidas ⁽⁴⁹⁾ (ii) mutaciones puntuales en la posición K76T del gen *Pfcrt* en una cohorte para evaluar eficacia de CQ (14) y (iii) mutaciones puntuales en el gen *pfmdr1*, en los residuos de aminoácidos Cys 1034, Asp 1042, y Tyr 1246, en una cohorte en la que se comparó la eficacia terapéutica *in vivo* de MQ vs MQ-AS ^(36, 50).

Sin embargo se hacen necesarias herramientas más rápidas, eficaces y de bajo costo para establecer un mecanismo efectivo de vigilancia y emergencia de mutaciones asociadas a genes de fármaco resistencia a antimaláricos, estas son las llamadas “técnicas de genotipificación” que aunque inicialmente aplicadas al estudio del genoma humano son tecnologías que permiten la amplificación, identificación y detección de SNPs ⁽⁵⁰⁾ de genes asociados a fármaco resistencia a antimaláricos. Sin duda, uno de los estudios más completos realizados a la fecha fueron publicado por Bacon et al⁽⁵¹⁾ quien establece las caracterización molecular de los genes *Pfdhfr*, *Pfdhps*, *Pfcrt*, *Pfmdr1* y *PfSERCA* en aislamientos de *P.*

falciparum colectados en los 90s y compara los resultados con los encontrados después del 2005, es decir antes y después del uso de la combinación MQ-AS y que permite realizar trabajos comparativos después de 5, 10 y 15 años para determinar la evolución de estos marcadores moleculares tanto en ausencia como en presencia de estos antimaláricos.

1.2. Bases Teóricas:

MÉTODOS DE GENOTIPIFICACIÓN:

El secuenciamiento del genoma humano dio lugar al conocimiento de genes y la necesidad de caracterizarlos para poder determinar cuáles eran causantes de enfermedades y en consecuencia a la necesidad de genotipificarlos⁽⁵²⁾.

Kwok⁽⁵³⁾, nos presenta una excelente revisión sobre la detección de SNPs y describe a los métodos de genotipificación usados en los años 80s y 90s que comprendían básicamente al RFLP y al secuenciamiento. El secuenciamiento fue desarrollado y considerado “prueba de oro” para el descubrimiento de SNPs a pesar de las dificultades que implicaba la síntesis de cebadores, el alto costo de estos reactivos y la desventaja de ser muy laboriosos.

Así es como surge la necesidad de disponer de métodos de genotipificación de SNPs conocidos, y también la pregunta: Como debía ser ese “método de genotipificación ideal”? el que ciertamente aún no se ha logrado alcanzar; en teoría debería ser sencillo y de fácil desarrollo conociendo la secuencia de nuestro interés, además de robusto, económico, adaptable, con capacidad de ser automatizado y que produzca datos que sean de fácil análisis. Elementos de química adecuada, equipo de detección y software de análisis ayudarían a tener este método ideal. Son tres aspectos clave que contribuyen al desarrollo de un buen método de genotipificación:

1. La discriminación alélica: Comprende a: la hibridación, extensión de cebadores, ligamiento, o rotura; que usan “sondas específicas” diseñadas considerando al alelo silvestre y todas las variantes génicas posibles, es de nuestro interés enfocarnos en las tres primeras:

1.1 Hibridación de alelos específicos: Si tenemos en cuenta que un único desparejamiento es suficiente para desestabilizar la hibridación y prevenir que la sonda alélica se alinee con la secuencia blanco. Cuando las sondas alélicas son inmovilizadas en una superficie sólida, las muestras marcadas de ADN son capturadas, y la hibridación es visualizada por medio del marcaje de las sondas. Sabiendo la localización de las secuencias de las sondas en el soporte sólido, es posible conocer el genotipo de la muestra de ADN blanco. Este es el mecanismo más simple aplicado para la genotipificación de alto rendimiento sin usar enzimas. El principal reto para asegurar una buena discriminación alélica reside en el diseño de la sonda. Es posible realizar una clasificación en 3 categorías 1) Secuenciamiento 2) PCR alelo específico y 3) extensión específica de alelo cuando una o muchas bases son incorporadas solo si el extremo 3' de la sonda alelo específica se acopla con la base polimórfica en la secuencia blanco. Por lo tanto, el producto de amplificación que contiene al sitio polimórfico sirve como molde y el extremo 3' de la sonda que extiende al cebador que incluye en su secuencia a la base alélica de interés. El cebador es extendido solo y si la base del extremo 3' es complementaria al alelo presente en el ADN blanco. El monitoreo del evento de la extensión del cebador nos permite inferir cuál es el o son los alelos presentes en el ADN.⁽⁵⁴⁾

1.2 *Extensión específica de alelo*: Es muy flexible y requiere un mínimo de oligonucleótidos, sondas y el uso de una DNA polimerasa para incorporar a los desoxiribonucleótidos a la secuencia de un ADN molde. En el caso de la detección de SNPs, el fragmento de ADN que contiene el SNP, sirve como molde para la sonda, que se unirá a este fragmento solo si ambas son complementarias en el sitio polimórfico de interés.^{(55), (54)}

1.3 *Ligamiento de oligonucleótidos específicos de alelo (OLA)*: este método se basa en la unión de una sonda al fragmento de ADN que contiene el SNP mediante la ayuda de ADN ligasa. Aunque el ligamiento logrado tiene muchas ventajas, esta es la reacción más lenta y requiere el mayor número de sondas modificadas. Hay que resaltar que OLA puede amplificar el ADN blanco sin necesidad de un PCR previo.⁽⁵⁴⁾

2. Los formatos de reacción usados

En general, las reacciones bioquímicas son más robustas en solución, pero la captura de los productos de reacción en soportes sólidos permite la detección en paralelo al aumentar sustancialmente el rendimiento. Usando como referencia al tipo de soporte usado tenemos las que se realizan en solución, también llamadas reacciones “homogéneas” y las que necesitan un “soporte sólido”.

a. *Reacciones homogéneas*, usan los sistemas de lectura por fluorescencia (Taqman, Molecular Beacon o Scorpion).

b. *Reacciones en soporte sólido:*

Biochips y microarreglos de ADN: que consisten en una serie de oligonucleótidos anclados a un soporte sólido en una disposición regular y prefijada, los que con ayuda de una ADN polimerasa permiten el uso de estos chips para realizar reacciones específicas de alelos para genotipificación. El ADN blanco debe estar marcado con un reactivo fluorescente o radiactivo antes de la hibridación. Estos ensayos son de alto rendimiento por su versatilidad y alta capacidad de alcanzar reacciones multiplex.⁽⁵⁶⁾

Métodos que emplean partículas: En este caso los oligonucleótidos están anclados a micro esferas de 3-5 micras de diámetro. Estos sistemas pueden combinarse con la mayoría de las reacciones químicas de discriminación de alelos empleadas en los métodos basados en chips de ADN, tales como reacciones de extensión de sondas y ligamiento de oligonucleótidos. Un ejemplo de estas partículas son las micro esferas LUMINEX 100™ que están recubiertas por fluorocromos identificables por citometría de flujo. Si se dispone de cientos de micro esferas diferentes y cada una con una relación de fluorescencia distinta, es posible realizar cientos de reacciones de detección en un mismo tubo y alcanzar reacciones multiplex eficientes. Cada tubo se comporta como un chip de ADN con cientos de posibles posiciones. Con una excelente resolución, el número de posibles combinaciones de cantidades de marcador fluorescente para la identificación de micro esferas es de 100 en un mismo tubo. Esta es la estrategia que desarrollaremos en esta investigación.

3. Detección de la señal generada.

Entre las estrategias de detección usadas para reacciones de discriminación alélica tenemos a la monitorización de la emisión de luz que es la modalidad de detección más empleada en la genotipificación, esta puede realizarse mediante: luminiscencia, fluorescencia, transferencia de energía entre fluoró cromos (FRET) y fluorescencia por polarización.

Un esquema integrado de genotipificación de SNPs se logra si dividimos el proceso en dos grandes áreas que requieren de automatización: 1) el procesamiento de las muestras y 2) el método de detección empleado, por lo que las combinaciones son múltiples; sin embargo será determinante que pregunta deseamos responder: a) identificar muchos SNPs en algunas muestras o por el contrario b) identificar algunos SNPs en pocas muestras.⁽⁵⁴⁾

Finalmente, existen revisiones más detalladas sobre este tema, sin embargo el esquema modificado de la versión publicada por Landegren⁽⁵⁷⁾ que presentamos a continuación presenta a los métodos de genotipificación considerando tres aspectos: tipo de discriminación alélica, el formato de reacción usado y el método usado para la detección de la señal o equipo requerido para registrarla. Esta información es esencial para poder comprender las consideraciones tomadas para la elección de método que proponemos.

Tabla 1: Método para de análisis de SNPs

	MÉTODO	DISCRIMINACIÓN ALÉLICA POR	FORMATO DE REACCIÓN	DETECCIÓN DE SEÑAL
Ensayos de Hibridación en arreglo	MASDA (Multiple allele specific Dx. Assay)	Hibridación específica de alelo (ASO)	Formato 1 array + gel	ninguno
	Affimetrix SNP microarray		Formato 2 array	Escáner de microarray
Hibridación homogénea RFLP	TaqMan Molecular beacons	Clivaje por restricción	reacción en tubo cerrado - homogéneo ^(a)	TaqMan
Distinción del desparejamiento por polimerasas y ligasas	PCR específico de alelo	3' matched/mismatched Oligonucleótido	gel	ninguno
	Ligamiento de oligonucleótidos específicos de alelo (OLA)	Ligación	fase sólida , lectura en placa de micro titulación	Fluorespectometro
	OLA multiplex gel		gel	Secuenciador automático
Minisequenciamiento	Minisequenciamiento en fase solida		fase sólida , lectura en placa de micro titulación	Contador de centelleo
	Minisequenciamiento en arreglo		Formato 2 array	Fosfoimagen secuenciador automático
	Minisequenciamiento multiplex gel	Incorporación de	fase solida + gel	TaqMan
	Minisequenciamiento con FRET	nucleótidos	homogéneos, adición de reactivo ^(b)	
	Pirosequenciamiento de núcleo nucleótido		homogéneos, adición de reactivo ^(b)	Luminómetro

Reactivos para amplificación y discriminación del alelo se mezclan todos juntos desde el principio, y los resultados son colectados sin tener que abrir ese tubo
Luego de la amplificación, los reactivos para la detección son agregados al tubo de reacción, pero no se requiere de separaciones antes de la recolección de datos

Modificado por Carola Salas de "Reading bit of genetic information: "Methods for Single-Nucleotide Polymorphism Analysis", de Landegren U, Genome Research, 1998 (57) (52)

LA TECNOLOGIA X-MAP

Una nueva y robusta plataforma de detección multiplexada es la “tecnología Multi Analyte Profile” (xMAP) de Luminex. Esta es una tecnología emergente que utiliza microesferas de poliestireno que internamente se tiñen con dos colorantes fluorescentes uno rojo y otro fluorocromo infrarrojo. El hecho de detectar una variación en la relación de los dos fluorocromo, hace posible la diferenciación de hasta 100 diferentes microesferas, y cada conjunto de microesferas puede acoplarse con una sonda biológica o cebador de detección diferente.

Las microesferas son detectadas y caracterizadas por un citómetro de flujo dedicado usando un láser rojo (635 nm) para longitudes de onda de excitación y de emisión se miden entre 645 y 669 nm y > 712 nm. Después de que las microesferas se clasifican, se mide la señal de reportero. La molécula reportera general utilizada Ficoeritrina que es excitado por un láser verde (532 nm) y la emisión se mide a 580 nm.

El sistema de PCR-Luminex, desarrollado originalmente para el alto rendimiento análisis de polimorfismos de nucleótido único (SNPs), se basa en la hibridación entre un producto PCR marcado con biotina y una sonda de oligonucleótidos junto a distintos marcadores que reconocen específicamente las diferencias de secuencias de nucleótidos.⁽⁵⁸⁾

Existen diferentes tipos de microesferas como las xTAG® que pueden ser usadas en pruebas para detectar ADN, con superficie especialmente acondicionada para el análisis de las muestras problema. Todas estas variedades tienen un tamaño en común igual a 5,6 μm . El trabajo con estas microesferas es sumamente versátil ya que pueden acoplarse con una gran variedad de biomoléculas como nucleótidos, péptidos, proteínas, anticuerpos, receptores, polisacáridos y lípidos⁽⁵⁹⁾

APLICACIONES DE LA TECNOLOGIA LUMINEX

Existen un aproximado de 20,000 publicaciones relacionadas a esta tecnología⁽⁶⁰⁾. Las áreas de laboratorio es las que se han usado la tecnología x-MAP son seis y están relacionadas a descubrimiento de patógenos, inmunología clínica,

genética humana, descubrimiento de proteínas. De estas las pruebas inmunológicas son las más comunes y son las preferidas por sus altos niveles de detección, más poderoso que el ELISA. Como ejemplos tenemos a publicaciones sobre el uso de sistema Bioplex para cuantificación de citosinas en LCR de pacientes con meningitis, un fluido del que usualmente se dispone en pequeñas cantidades⁽⁶¹⁾. Múltiples aplicaciones sobre marcadores inflamatorios sanguíneos⁽⁶²⁾, pruebas de expresión génica⁽⁶³⁾, y mediciones de anticuerpos a polisacáridos de neumococos.⁽⁶⁴⁾ También se han publicado diferentes estudios animales⁽⁶⁵⁾

Otras dos áreas son microbiología general y clínica combinadas con las de investigación de ácidos nucleicos puede verse reflejada en las siguientes publicaciones: diagnóstico de parásitos intestinales de *Cryptosporidium*⁽⁶⁶⁾, *Cyclospora cayetanensis*⁽³⁹⁾. La validación de Spoligotyping para *Microbacterias*, esta usa el multiplex en una versión nueva de microesferas magnéticas, que hacen el trabajo más versátil y económico listo para ser usado en campo en tiempo real⁽⁶⁷⁾,⁽⁶⁸⁾. Detección multiplex de marcadores en ácidos nucleicos de hongos asociados a infecciones oportunistas⁽⁶⁹⁾.

Otra área de virología, es el tamizaje de EBV en sueros de pacientes con diferentes etiologías y orígenes geográficos, como al dosaje de IgA gp78 y IgG-gp78 como biomarcadores de la enfermedad⁽⁷⁰⁾⁽⁷¹⁾, usando combinaciones de dos tipos de microesferas y péptidos sintetizados para este propósito⁽⁷²⁾, También se describe la detección de ocho diferentes virus respiratorios en una plataforma multiplex basada en microesferas que es una alternativa eficaz ante los procedimientos de cultivos y detección de fluorescencia que son usados de rutina para estos diagnósticos⁽⁷³⁾. De otro lado tenemos el análisis de la metilación del ADN en un modelo de "citología basada en fluidos" para tamizaje de fase pre invasiva de cáncer cervical, usando un PCR multiplex y plataforma Luminex para diagnóstico de virus del papiloma humano⁽⁷⁴⁾. Y también estrategias para diagnóstico diferencial de fiebre aftosa y otra similar usando un ensayo multiplex de RT-PCR basado en microesferas, una alternativa eficaz para tamizaje y vigilancia en veterinaria⁽⁷⁵⁾. Este ensayo ya ha sido empleado con éxito para el diagnóstico de diversas enfermedades genéticas e infecciosas.⁽⁷⁶⁾

La citometría de flujo es una aliada de la flexibilidad de la plataforma x-MAP. Inicialmente un método automatizado creado para la medición óptica o características de células o partículas en suspensión, y de amplio uso en la fenotipificación inmunológica de elementos sanguíneos que en la actualidad son muy amigables, y de costo adecuado para uso en laboratorios de diagnóstico clínico. Su uso se extendió a análisis en aplicaciones que requieren ADN. Y combinados con uso de microesferas representan una poderosa estrategia para procedimientos de alto rendimiento.⁽⁷⁷⁾.

USO DE LUMINEX EN MALARIA

La reacción de extensión de cebador es un método simple y a la vez robusto para el análisis de múltiples SNPs. En consecuencia la tecnología xMAP™^(58, 78) provee un ensayo alternativo de tipo multiplex que permite analizar hasta 100 analitos en un ensayo simultáneo que permite analizar ADN, siendo el objetivo final brindar una alternativa frente al secuenciamiento que en la actualidad es la prueba de oro para el estudio de polimorfismos asociados a *P. falciparum* fármaco resistente a medicamentos antimaláricos.

El uso de la tecnología x-MAP™ para analizar ADN de *P. falciparum*^(58, 78) ⁽⁷⁶⁾ nos permitirá contar con un ensayo que permitirá la evaluación simultánea de hasta 100 analitos por medio de un ensayo multiplex. El objetivo es brindar una alternativa rápida y costo efectiva para el estudio de polimorfismos asociados a *P. falciparum* fármaco resistente a medicamentos antimaláricos. De esta forma el uso de una reacción multiplex que contiene cinco productos de PCR, 44 oligonucleótidos específicos de diferentes SNP y 44 microesferas, al mismo tiempo podemos determinar 21 diferentes SNPS en cuatro genes demostrados previamente para ser asociado a resistencia a los medicamentos de la malaria. La tecnología fue aplicada a una vigilancia completa de marcadores de resistencia a drogas en aislamientos de *P. falciparum* recogido en los tres lugares geográficos diferentes en el Perú, la cuenca del Amazonas, Amazonia occidental del norte y la costa norte peruana Amazonas⁽²⁵⁾

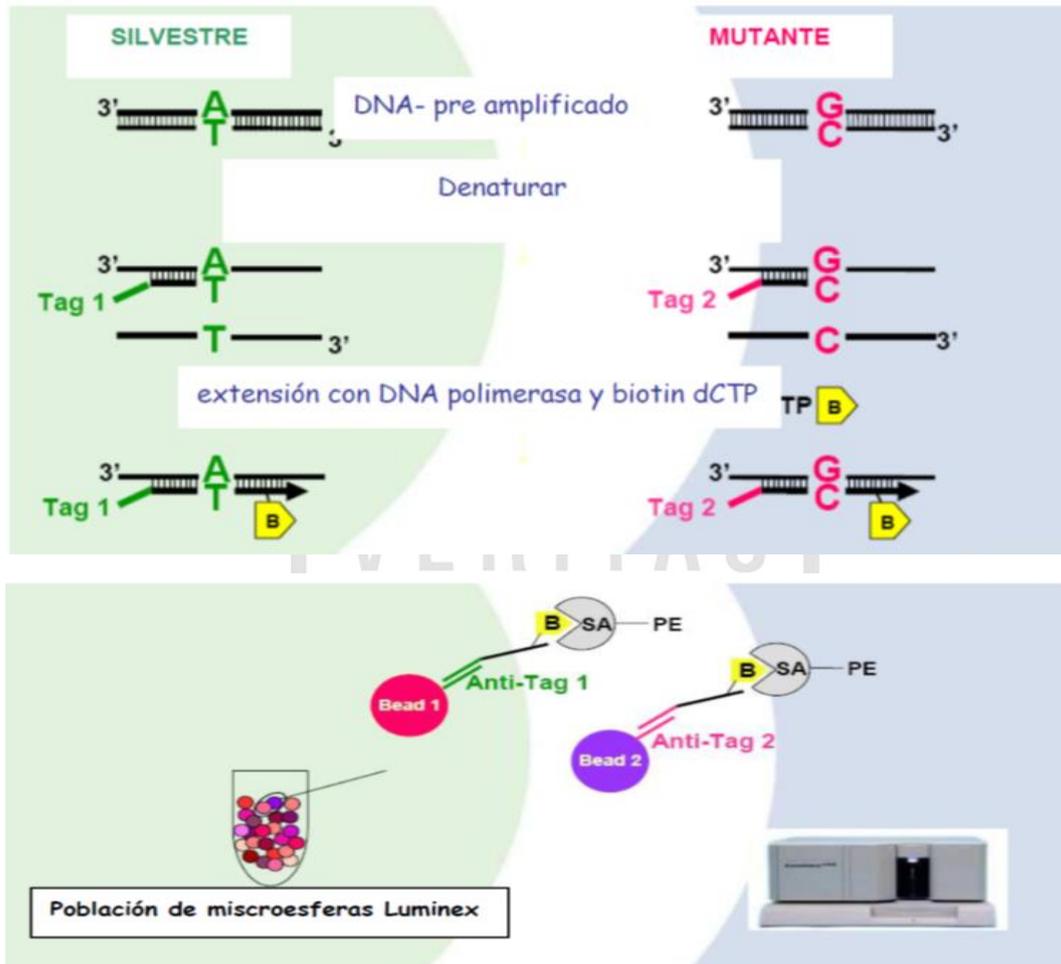
ESTRATEGIA ASPE

La estrategia fue usar reacciones de PCR (Gráfico 1), que luego de ser purificadas serán usadas como molde para una reacción de minisequenciamiento y usando la tecnología de FlexMAP™ y la estrategia ASPE o extensión de cebador específico del alelo. Más específicamente, el ensayo se basa en el uso de cebadores específicos que tienen una secuencia de captura en el extremo 5' diseñados de forma tal que el cebador hibridiza directamente en el dinucleótido trifosfato (dNTP) donde se encuentra el polimorfismo.

Esta reacción requiere del uso de dNTPs marcados con biotina así como cebadores que tienen una secuencia adherida en el extremo 5' que es complementaria a la secuencia que se encuentra en las microesferas que serán usadas para el diagnóstico (Gráfico 2). Al generar productos de extensión específicos de alelos mediante el uso de la reacción de PCR que contiene un dCTP (2'-deoxicitidina 5'-trifosfato) biotinilado y los otros 3 dNTPs no marcados. El siguiente paso es usar micro esferas fluorescentes que contienen una secuencia complementaria al ADN que se encuentra en los cebadores. El uso de un reportero: Estreptavidina/Ficoeritrina⁽⁷⁹⁾, permite la detección en el citómetro de flujo Bio-Rad de Bio-Plex™.

El objetivo de este estudio fue diseñar y validar ensayos para la identificación simultánea de genotipos conocidos en los genes de *P. falciparum*: dihidrofolato reductasa (*Pfdhfr*), codones 16, 50, 51, 59, 108 y 164), dihidropteroato sintasa (*Pfdhps*) codones 436, 437, 540, 581 y 613, así mismo en el gen transportador de resistencia a Cloroquina (*pfcr1*) codones 72, 74, 75 y 76 y finalmente en el gen de multifármaco resistencia 1 (*Pfmdr1*), codones 86, 142, 184, 1034, 1042 y 1246, para en un futuro cercano reemplazar el secuenciamiento automatizado por el minisequenciamiento basado en micro esferas.

Gráfico 1 Esquema de una reacción x-MAP ASPE para genotipificación simultánea de marcadores moleculares asociados a fármaco resistencia



Fuente : Tm Biosciences. modificado por Carola Salas

Esquema de la estrategia que usada y que fue probada individualmente para cada gen validado y posteriormente ensayada en reacciones dúplex (alelo silvestre y mutantes en reacciones separadas) y posteriormente múltiplex (los cuatro genes en una reacción).

1.3. Definiciones Conceptuales:

1. Genotipos:

Para los veintidós polimorfismos en los siguientes genes de *P. falciparum*: *Pfdhfr*, *Pfdhps*, *Pfcrt* y *Pfmdr1*, en los siguientes codones:

1. *Pfdhfr* (codones A16V, C50R, N51I, C59R, S108N/T y I164L).
2. *Pfdhps* (codones S436G/T, A437G, K540E, A581G y A613S/T).
3. *Pfcrt* (codones C72S, M74I, N75E y K76T).
4. *Pfmdr1* (codones N86Y, D142G, Y184F, S1034C, N1042D y D1246Y).

2. Intensidad de fluorescencia intermedia (MFI).

Emitida por 44 micro esferas que se registra en unidades de intensidad media de fluorescencia (MFI), estas son inherentes a cada una de las micro esferas y serán recolectadas a través de un citómetro de flujo. Posteriormente se determinó el radio de valores de MFI de los genotipos silvestres versus los mutantes y si la relación arbitraria mínima es de 1:5 entonces la prueba fue considerada válida.

3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Método de genotipificación usado para documentar polimorfismos asociados a fármaco resistencia

Hipótesis:

La tecnología del arreglo en suspensión (χ -MAP™) nos permitirá la identificación simultánea de polimorfismos en los genes en *Pfdhfr*, *Pfdhps*, *Pfcrt* y *Pfmdr1*.

CAPITULO II: METODOLOGIA

2.1. Tipo de Investigación: **Experimental.**

2.2. Diseño de investigación: **Analítico.**

2.3. Población y muestra:

Las muestras de ADN de este estudio provienen de estudios de investigación realizados tanto en la Costa Norte así como en la Cuenca Amazónica Peruana las que fueron tomadas entre los años 2006 – 2009. En el gráfico 2.3 se observa la ubicación de las áreas de estudio las que fueron descritas en publicaciones anteriores.

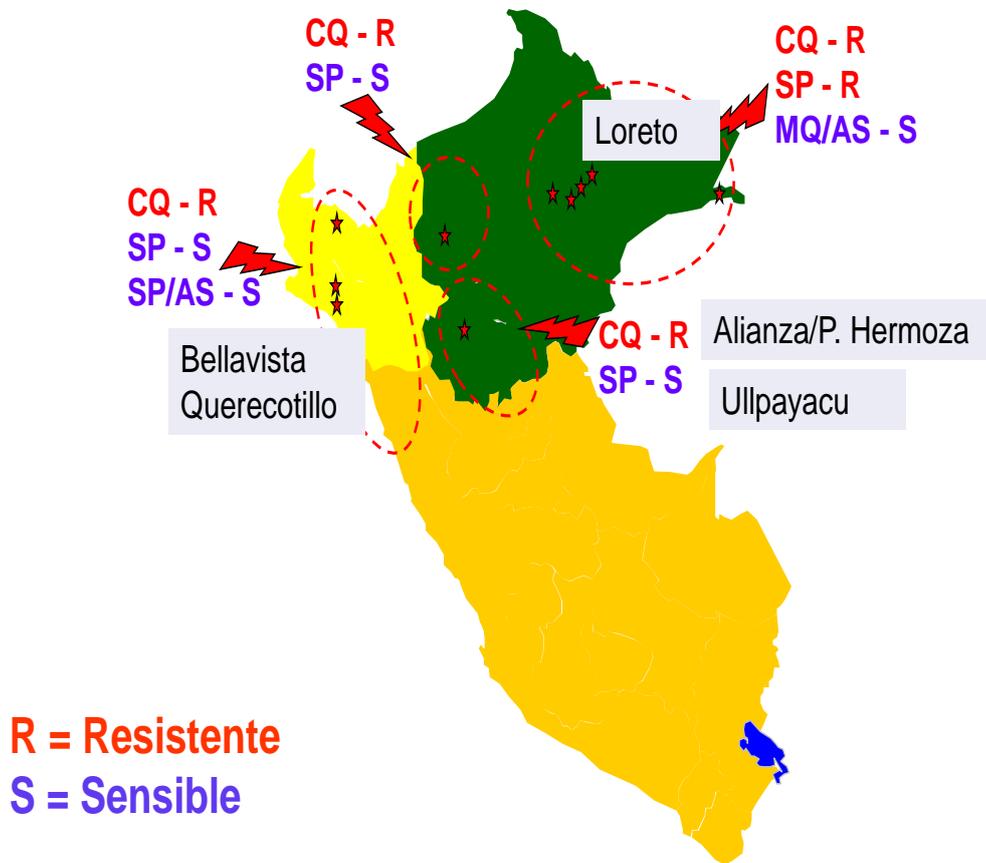
1. Se usaron los ADN de los 76 voluntarios asignados al tratamiento con SP. Este estudio fue realizado el 2000 en las poblaciones de Alianza y Pampa Hermosa, y en el 2002 en la localidad de Ullpayacu⁽²⁰⁾.
2. Se enrolaron un total de 91 voluntarios que fueron tratados con la combinación SP-AR en estudios conducidos el 2000 en los centros de salud de Bellavista y Querecotillo ubicados cerca a la ciudad de Sullana en la costa norte del Perú⁽⁸⁰⁾.
3. Las 100 muestras que fueron colectadas que tuvieron diagnostico positivo de malaria provenientes de la región Loreto pertenecen a estudios observacionales llevados a cabo para determinar la etiología de los síndromes febriles en una variedad de poblaciones del Perú⁽⁵¹⁾.

2.3.1 Material Biológico: ADN genómico

- a. ADN extraído de alícuotas de 200 µL de sangre colectada con EDTA que se encontraban en el banco de cepas de US NAMRU-6, congeladas a –80°C.
- b. ADN extraído de papeles de filtro IsoCode Stixs™ (Schleicher & Schuell, NH, USA) procedentes de estudios de realizados Costa Norte y el Oeste de Amazonia Peruana.

2.3.2 Controles internos: Los controles positivos usados fueron cepas de referencia *P. falciparum* (3d7, 7G8, DD2, W2 y D6), estas cepas son propiedad del laboratorio NAMRU-6 y poseen mutaciones únicas documentadas por secuenciamiento. Los controles negativos fueron agua para PCR.

Gráfico 2.3 Ubicación de las áreas de estudio en la Costa Norte y Amazonia del Perú, 2000 – 2009



CQ = Cloroquina, SP = Sulfadoxina/Pirimetamina, MQ-AS = Mefloquina-Artesunato
SP/AS = Sulfadoxina/Pirimetamina-Artesunato

2.4. REACTIVOS:

Todos los reactivos usados en los ensayos fueron de grado molecular.

2.4.1 Amplificaciones de PCR - Genes *Pfdhfr*, *Pfdhps*, *Pfcr1* y *Pfmdr1*

- a. Kit de extracción de DNA QIAmp® Mini kit (52).
- b. dNTPS DE INVITROGEN
- c. Oligonucleótidos iniciadores, solución madre a 50µM, proveedor Proligo y Sigma Aldrich

d. Enzima Taq DNA Polimerasa Recombinante Nativa 1500U, 5U/ μ L, Invitrogen®

- 50 mM MgCl₂
- Buffer PCR 10X (200mM Tris-HCl, pH8.4; 500mM KCl)
- Agua destilada libre de DNAasa/RNAasa

2.4.2 Electroforesis.

- Agua para PCR libre de DNAasa/RNAasa
- Agarosa grado analítico (Biorad)Tampón TAE, Solución stock concentrada (por litro) 50X:
 - Tris base 242g
 - Ácido acético glacial 57.1mL
 - EDTA (pH 8.0) 0.5M 100mL
- Buffer de carga de muestra 3X: XYLENE XYANOL
- Marcadores de tamaño molecular (escalera)
 - de 123 bp, Invitrogen®
 - de 100 bp y 1Kb (Fermentas®)
- Soluciones de Bromuro de etidio (10 mg/mL)

2.4.3 Reacciones de Secuenciamiento

- BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit P/N 4337456.
- BigDye® Terminator v1.1/v3.1 Sequencing Buffer (5X) P/N 4336697
- BigDye® Terminator v3.1 Sequencing Standard P/N 4336935

Tabla 2.4.1 Oligonucleótidos usados para amplificaciones de PCR

Gen	Oligonucleótidos	Condiciones	Referencia
Pfm _{dr1}	SNP86 F - 727up: 5'- GTG TTT GGT GTA ATA TTA AAG - 3' R - 1080Dn: 5' - CAA ACG TGC ATT TTT TAT TAA TG - 3'	1 ciclo: 95°C por 3 min. 40 ciclos: 95°C por 30 segundos 58°C por 45 segundos 72°C por 45 segundos 1 ciclo: 72°C por 2 min. 4°C	Mehlotra et al. 2001 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 (22), 12689- 12694 ⁽⁸¹⁾
	SNP1034 F - mdr1: 5' - GCT ATT GAT TAT AAA AAT AAA GGA C - 3' R - mdr2: 5' - CCA AAT TTG ATA TTT TCA TAT ATG GAC - 3'	1 ciclo: 95°C por 5 minutos 35 ciclos: 94°C por 1 minuto 55°C por 1 minuto 72°C por 1 minuto 1 ciclo: 72°C por 7 minutos 4°C	Pillai DR, et al. Am J Trop Med Hyg. 2003 Jan; 68(1):107-10. (36)
Pfd _{hfr}	F - AMP1: 5' - TTT ATA TTT TCT CCT TTT TA 3' R - AMP2: 5' - CAT TTT ATT ATT CGT TTT CT 3' F- SP1: 5' ATG ATG GAA CAA GTC TGC GAC 3' R- SP2: 5'ACA TTT TAT TAT TCG TTT TC 3' R- SP3: 5` TTT AAT TTC CCA AGT AAA AC.	1 ciclo: 95°C por 3min 45 ciclos: 94°C por 30 seg. 45°C por 45 seg. 72°C por 45 seg. 1 ciclo: 72°C por 5 min 4°C	Plowe, C et al. Am..J.Trop.Med.H yg. 52(6), pp565- 568 ⁽³³⁾
Pfd _{hps}	F - M3717: 5' - CC ATT CCT CAT GTG TAT ACA ACA C 3' R - #186: 5'- G TTT AAT CAC ATG TTT GCA CTT TC 3' F- #185: 5' TGA TAC CCG AAT ATA AGC ATA ATG 3' R- #218: 5'ATA ATA GCT GTA GGA AGC AAT TG 3' 165-R: 5` TTTTCATTTTGTGTTTCATCATG 3'	1 ciclo 95°C por 3min 1 ciclo :50°C por 20 sec 30 ciclos: 70°C por 3 min 90°C por 20 seg. 50°C por 20 seg. 1 ciclo 70°C por 10 min 4°C	Ping Wang, et al. Mol Biochem Parasitol. 1995 Apr;71(1):115-25. (1997) ; Mol. Biochem. Parasitol 89, 161- 177. ⁽⁸²⁾
Pfc _{rt}	SNPs 72-76, 97 F - 23327up 5' -CATTGTCTTCCACATATATGACATAAA - 3' R - 24076dn 5'- TTGGTAGGTGGAATAGATTCTCTT - 3'	1 ciclo 95°C por 3 min. 45 ciclos 94°C por 30 seg. 56°C por 30 seg. 60°C por 1 min 1 ciclo 60°C por 3min 4°C	Mehlotra et al. 2001 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 (22), 12689- 12694 ⁽⁸¹⁾
	F - 23402up. 5'- CCGTTAATAATAAATACACGCAG - 3' R - 24011dn.5' - AATTTCCCTTTTATTTCCAAATAAGG - 3'	1 ciclo 95°C por 3 min 25 ciclos 94°C por 30 seg. 56°C por 30 seg. 60°C por 2 min 1 ciclo 60°Cpor 3min 4°C	

Leyenda: La tabla presenta todos los oligonucleótidos usados para las amplificaciones de PCR así como las condiciones

de los PCRs, estas fueron tomadas de una publicación previa ⁽⁵¹⁾.

2.4.4 Reactivos x-MAP

2.4.4.1 Reacciones de extensión específicas de alelo

- Oligonucleótidos cebadores sentido o anti sentido SIGMA- Aldrich, sintetizados a una escala de 5 OD sin purificación. Una vez que estos llegaban a nuestro laboratorio eran preparados a una concentración stock de 100uM y de allí se preparaban las mezclas para reacciones multiplex.
- Oligonucleótidos cebadores para la reacción ASPE con una modificaciones en el extremo 5' re suspendidos en agua libre de ADNasa y RNAasa a una concentración de trabajo de 50µM.
- ExoSAP-IT (USB Cat. No. 78200).
- Enzima Taq DNA Polimerasa (Invitrogen Cat. 18038240).
- dNTPs, concentración de 100 mM (Invitrogen Cat. No. 10297-018).

2.4.4.2 Reactivos para Hibridaciones

- Biotin-14-dCTP at 0.1 mM (Invitrogen Cat. No. 19518-018).
- 2X Tm Buffer de hibridación:
 - 0.4 M NaCl, 0.2 M Tris, 0.16% Triton X-100, pH 8.0
- 1X Tm Buffer de hibridación:
 - 0.2 M NaCl, 0.1 M Tris, 0.08% Triton X-100, pH 8.0
- Estreptavidina-R-Ficoeritrina (Invitrogen Cat, #S-866).

2.4.5 Reactivos para Citómetro de Flujo BioPlex™ Biorad™

- Bio-Plex® Validation Kit 4.0, Cat.# 171-203001
- Bio-Plex® Calibration Kit, Cat.# 171-203060
- Buffer para corrida 20X Catalogo # #171-000055
- alcohol isopropilico.
- lejía al 10%
- agua libre de DNA/RNA asas

2.5. CONSUMIBLES

- a) Placas de 96 pozos – color negro, Corning Cat # 07-200-565
- b) Pipetas multicanal Finnitip, 50 µL – 300µL, de 8 puntas

- c) Tips Finnitip 300 µL.
- d) Tubos de micro centrifuga de baja retención
- e) Agua destilada ultra pura, Cat. # 10977, Gibco®.

2.6. EQUIPOS:

2.6.1 Prueba de Oro:

1. Secuenciador ABI Prism 3100 xl Avant Genetic Analyzer.
2. Termocicladores 9700 Perkin-Elmer, Applied Biosystems®
3. Congeladoras –80°C, y –20°C
4. Refrigeradoras de 4 °C
5. Equipo de Electroforesis: fuentes de poder y cámaras electroforéticas.
6. Micro centrífuga
7. GELDOC-BIORAD®: Transiluminador y lector para geles.

2.6.2 Ensayo x-MAP ASPE:

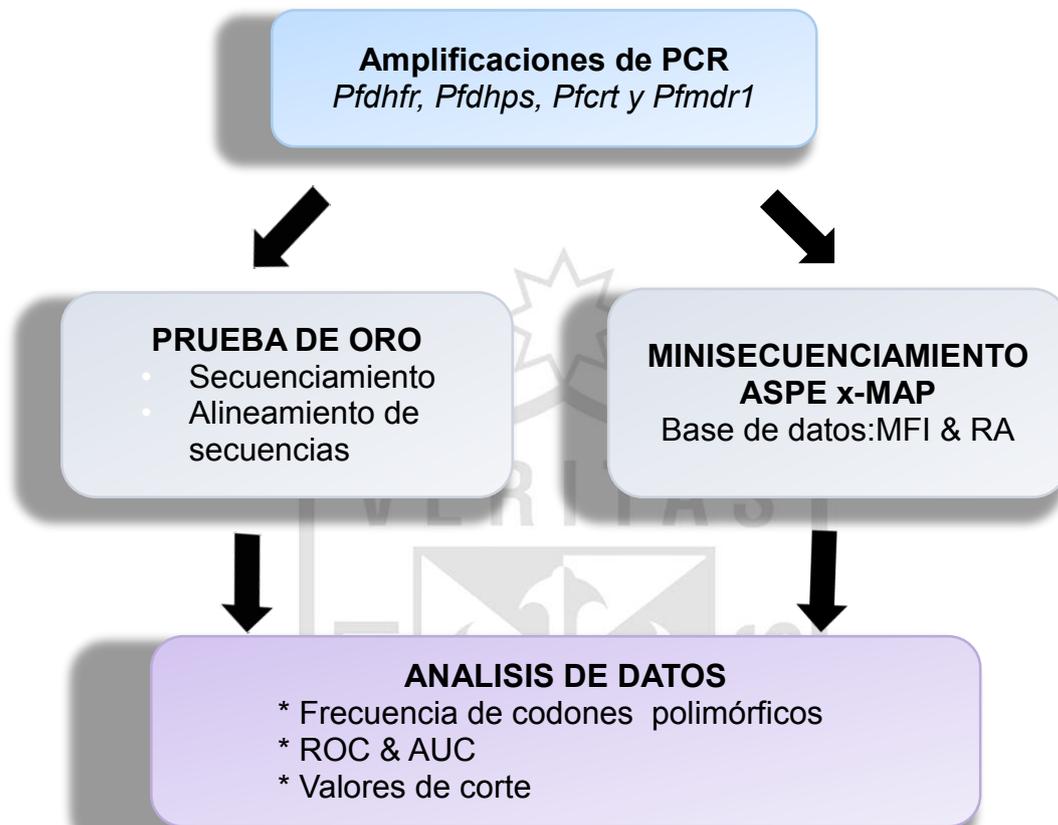
1. Incubadoras con bloque de metal (heating block).
2. Savant DNA120 SpeedVac system, Thermo Electro Corporation
3. Sistema para filtrado de placas –MultiScreenHTS Vacuum Manifold, Millipore Cat. # MSVMHTS00.
4. MaxQ 4450 Incubated Shaker – Thermo Scientific
5. Titer plate shaker, Lab-Line Instruments.Inc
6. Mezcladores tipo Vortex.
7. Sonicador.
8. Horno microondas.
9. Bio-Plex® 100 System, BIORAD™
 - a. Plataforma
 - b. Lector
 - c. Bio-Plex™ HTF System
 - d. Computadora, PC

2.7. METODOLOGIA

Las pruebas de biología molecular que se ejecutaron para la validación de este ensayo fueron realizadas el Departamento de Parasitología y Central de Biología Molecular del NAMRU-6, Lima, Perú.

Se siguió una secuencia de procedimientos de laboratorio de acuerdo al gráfico 2.7.

Gráfico 2.7 Flujograma de procesamiento de muestras



Leyenda: El esquema muestra el plan de trabajo realizado para la recolección de datos.

2.7.1 Extracciones de ADN:

Se usaron muestras de ADN genómico de *P. falciparum* que habían sido previamente extraídas. Cuando fue necesario se extrajo más ADN de alícuotas de 200µl de sangre total-EDTA. En el caso de las cepas de referencia se utilizó alícuotas de 200µl de cultivo. Se usaron muestras de papel de filtro (ULL, AL, PH). La extracción del ADN genómico se realizó utilizando el kit QIAGEN® (Qiagen, Alemania) (Anexo N° 3) o según instrucciones del fabricante de IsoCode Stixs™ (Schleicher & Schuell, NH, USA).

2.7.2 Amplificaciones de PCR

Se realizaron los PCRs siguiendo protocolos previamente publicados. La Tabla 2.4.1 nos muestra los oligonucleótidos cebadores, condiciones de amplificación y referencias correspondientes, el detalle se encuentra en el anexo 5. Posteriormente se realizaron las electroforesis de ADN para visualizar los resultados de las amplificaciones, según se establece en el anexo 6.

2.7.3 Visualización, Registro y Análisis de Productos de Amplificación

Los productos de amplificación de todas las reacciones fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1 o 2%, coloreados en soluciones de bromuro de etidio (0.5µg/mL), y observados bajo luz UV según se indica en el anexo 6.

2.7.4 Purificación de productos de Amplificación:

Una vez confirmada la presencia del producto amplificado en el gel se procedió a purificarlo para eliminar cualquier residuo de dNTPs, cebadores y buffer de PCR que puedan afectar los siguientes pasos. Los productos amplificados se purificaron con el kit QIAquick® (Qiagen, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se verificó la integridad de los productos purificados con una electroforesis en gel de agarosa posterior.

2.7.5 Cuantificación de los productos de amplificación:

Se cuantificó los productos de PCR purificados utilizando el kit de Invitrogen Quant-iT™ dsDNA HS Assay (Invitrogen™, USA) y el Qubit™ (Invitrogen™, USA), siguiéndose las instrucciones del fabricante. Se relacionó intensidad de banda del gel de purificación con la concentración del producto purificado para tener una base de comparación. Tomando los resultados de la primera electroforesis como base, se tomó en consideración el volumen de elución en la purificación para obtener 50 ng de ADN para cada de las reacciones.

2.7.6 Reacción de extensión de los productos purificados: BDT v 3.1

Los productos purificados fueron secuenciados utilizando técnica de secuenciamiento de BigDye® Terminator (BDT) de Applied Biosystems siguiéndolas instrucciones del fabricante. Las reacciones de secuenciamiento, de

extensión de los productos purificados, se realizaron en el termociclador GeneAmp® PCR Systems 9700. Los ciclos de temperaturas que se utilizaron para todas las reacciones de secuenciamiento fueron: denaturación inicial a 96 °C por 1 minuto; denaturación a 96 °C por 10 segundos, hibridación a 50 °C por 5 segundos, extensión a 60 °C por 4 minutos, por 30 ciclos. Los productos de secuenciamiento fueron analizados por secuenciamiento automatizado en el equipo ABI Prism XL-3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California). Las secuencias obtenidas y los cromatogramas fueron analizados utilizando el programa Sequencher v4.7 (Gene Codes Corporation).

2.7.6.1 Reacciones de secuenciamiento:

Las reacciones de secuenciamiento se prepararon usando de 20ng de producto purificado, en volúmenes de reacción de 20µl. Los oligonucleótidos cebadores utilizados para secuenciar el gen *pfmdr1* fueron *727up*, *1080dn*, *mdr1* y *mdr2*. Asimismo para las reacciones de *Pfdhfr* y *Pfdhps* se usaron, AMP2 y SP3 y el par 185 y 163 respectivamente. Las concentraciones para la reacción de secuenciamiento fueron modificadas a partir del método recomendado por el fabricante a 0.5µM del oligonucleótido, 0.25X ó 0.375X de la mezcla de BigDye® Terminator v3.1 para el fragmento A y B respectivamente, y 0.75X del BigDye® Terminator v3.1 Sequencing Buffer. El detalle del POEs está en el anexo 7.

2.7.6.2 Prueba de oro - Análisis del secuenciamiento

Para analizar los archivos producidos por el ABI Prism XL-3100 Genetic Analyzer se utilizó el programa "Sequencing Analysis software v.5.3. Los archivos fueron luego analizados con el programa Sequencher v4.8 (Gene Codes Corporation), las secuencias fueron alineadas con las cepas de referencia de *P. falciparum* que se obtuvieron del Genbank. Se consideró que había una mutación al cambio de base con respecto a la secuencia de referencia. Si la mutación generaba un cambio de aminoácido en el producto final del gen la mutación era no sinónima. Si no se generaba un cambio en el aminoácido final del gen se denomina mutación sinónima.

2.8. Protocolo para la reacción de ensayos de genotipificación x-MAP ASPE₂

2.8.1 Purificación de los productos de extensión del PCR

Para la purificación de productos de amplificación que se usaron en el ensayo de minisequenciamiento se usaron dos métodos: el primero usando el kit QIAquick PCR Purification y se comparó con el desempeño de ExoSAP-IT™ por referencias de la literatura. Estos se procesaron siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

2.8.2 Diseño de oligonucleótidos usados para el ensayo ASPE

- Los oligonucleótidos ASPE, se extienden hacia y se detienen en la base del nucleótido del extremo terminal 3'.
- fueron sintetizados para todas las variantes existentes de la secuencia de interés de los 4 genes.
- Todos tenían en común una Temperatura de melting™ de 51-56 °C.
- El programa de diseño de cebadores Tag-It™ fue usado para seleccionar una secuencia TAG, luego los cebadores fueron sintetizados con la secuencia TAG incorporada en el extremo 5' terminal.
- Los cebadores fueron sintetizados inicialmente por la empresa PROLIGO y posteriormente por SIGMA-ALDRICH®.

2.8.3 Ensayo x-MAP ASPE

2.8.3.1. Determinación de la especificidad analítica

Las reacciones de minisequenciamiento fueron preparadas con 20ng de DNA previamente purificado.

- 1) Se prepararon dos tubos de reacción, cada uno en un volumen de reacción de 20µL que contenían 1X ASEP Buffer ASPE (20mM Tris-HCl, pH 8.4; 50mM KCl), de 1.25 a 2.5mM de MgCl₂, 25nM de cada oligonucleótido TAG-ASEP, 0.75 U de Taq DNA polimerasa (nativa recombinante) Invitrogen®, una mezcla de tres dNTPs regulares y 5µM de ddNTP marcado con biotina complementario al alelo silvestre y en otro tubo otro en condiciones similares pero con el ddNTP marcado con biotina específico para el alelo mutante.
- 2) Así mismo se prepararon reacciones dúplex usando la mezcla de 2 dNTPs regulares y la mezcla de 2 ddNTPs biotinilados (uno que flanquea al alelo silvestre y el otro al alelo mutante)

- 3) Para todas las reacciones de estandarización se usaron controles positivos (cepas de referencia de *Pf* y controles negativos (agua de PCR libre de ADN/RNA asas).
- 4) Las condiciones de amplificación
- 5) para estas reacciones fueron: Un ciclo de denaturación inicial de 96 °C por 2 minutos, denaturación de 94 °C, 30 segundos, hibridación 55 °C, 1 minute y extensión de 74°C por 2 minutos por un total de 35 ciclos y posteriormente las mezclas mantuvieron en un ciclo final a 4 °C. ⁽⁸³⁾

2.3.8.2 Reacciones de Validación

- 1) Las reacciones de minisequenciamiento fueron preparadas con 100ng - 1µg de las mezclas de los 5 fragmentos de PCR previamente purificados.
- 2) Se usaron volúmenes de reacción de 20µL que contenían 1X ASEP Buffer ASPE (20mM Tris-HCl, pH 8.4; 50mM KCl), 1.25 a 2.5mM de MgCl₂, 25nM de cada cebador TAG-ASEP, 0.75 U de Taq DNA polimerasa Invitrogen®, una mezcla de dNTP conformada por 5µM de dATP, dTTP y dGTP, así como 5µM dCTP-marcado con biotina.
- 3) Para todas las reacciones de estandarización se usaron controles positivos (cepas de referencia de *P. falciparum* Dd2, W2, D6, 3D7, 7G8) y controles negativos (agua de PCR libre de ADN/RNA asas).
- 4) Las condiciones de amplificación fueron las mismas para todos los experimentos⁽⁸³⁾.

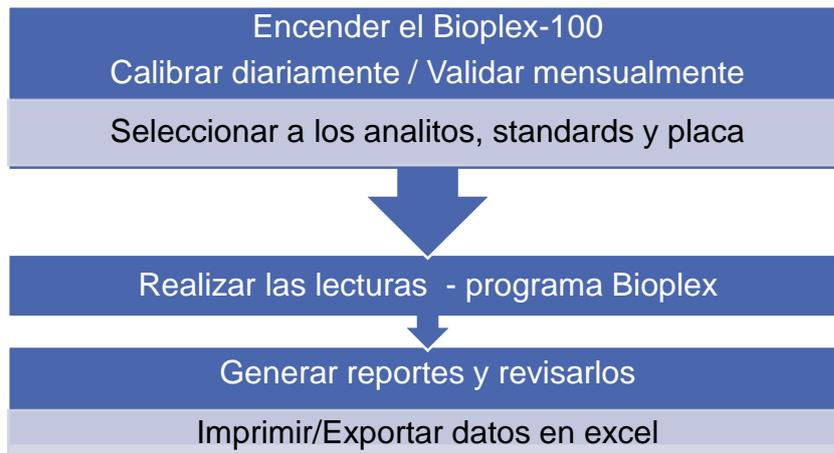
2.8.3.3 Procesamiento de Hibridación con microesferas.

Cada reacción de hibridación que se llevó a cabo usando unas ~250 micro esferas de cada una de la población de micro esferas que tienen una secuencia anti-TAG adherida en su superficie. Se siguió un ciclo de desnaturalización a 96 °C por 2 min, seguido de hibridación a 37 °C. Luego se filtró a través de una membrana Millipore ® de 1.2 µm y se hicieron lavados con tampón de hibridación de 1X TM. Se utilizaron 2µ/mL estreptavidina-ficoeritrina (SAPE)⁽⁸⁴⁾ como reportero y se concluyó con un paso de incubación por 15 minutos a 37 °C.

2.8.3.4 Análisis de Citometría de Flujo.

La secuencia de actividades se detalla en el gráfico 2.8.3.4:

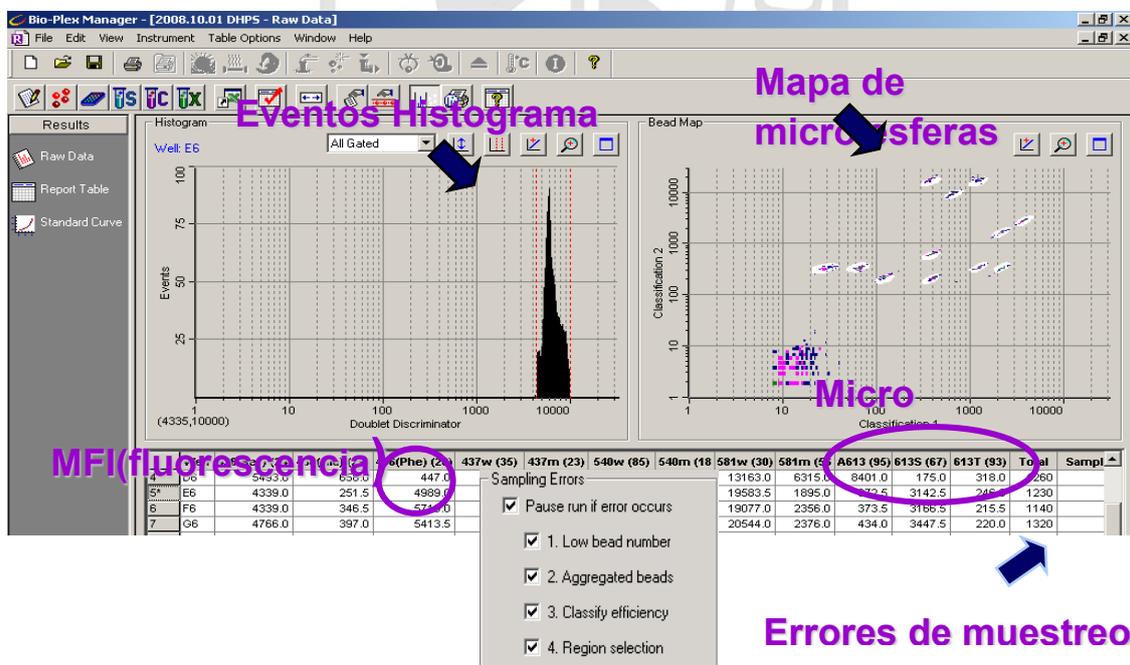
Gráfico 2.8.3.4: Análisis de Citometría de Flujo



2.9. Recolección de datos

Los datos recolectados por el programa Bioplex Manager v6.0, el gráfico 2.9 representa una salida de los resultados obtenidos después de realizar las corridas en el citómetro de flujo Bioplex-100 Biorad™

Gráfico 2.9: Recolección de datos de citometría de flujo



Leyenda: Recolección de datos de Citómetro de Flujo Bioplex-BIORAD
Según salida del programa Bioplex Manager v.6.0

2.9.1 Variables:

Un total de 44 genotipos a ser identificados en cuatro genes asociados a *Plasmodium falciparum* fármaco resistente, fueron analizados simultáneamente.

2.9.2 Validación de ensayo x-MAP

- 1) Las secuencias obtenidas de la prueba de oro fueron analizadas usando el programa Sequencher 4.8 (Gene Codes®), luego los resultados fueron exportados a hojas Excel los que no estaban disponible la persona que preparaba los ensayos de minisequenciamiento.
- 2) Se analizaron las frecuencias de las mutaciones, genotipos en los genes *Pfdhfr*, *Pfdhps*, *Pfcrt* y *Pfmdr1* de muestras colectadas entre los años 2000-2009.
- 3) Los datos fueron extraídos de forma automática del lector en hojas Excel que contenían tres parámetros:
 - intensidad de fluorescencia (MFI)
 - intensidad de fluorescencia menos blancos
 - número de micro esferas detectadas.

2.10. Análisis Estadístico:

Para realizar el análisis de los genotipos encontrados por secuenciamiento y asociarlos con los valores de MFI de las variables polimórficas se usó el programa Stata® 13 (State Corp., College Station, TX), el flujograma de procedimientos se detalla en el gráfico 2.9.2.

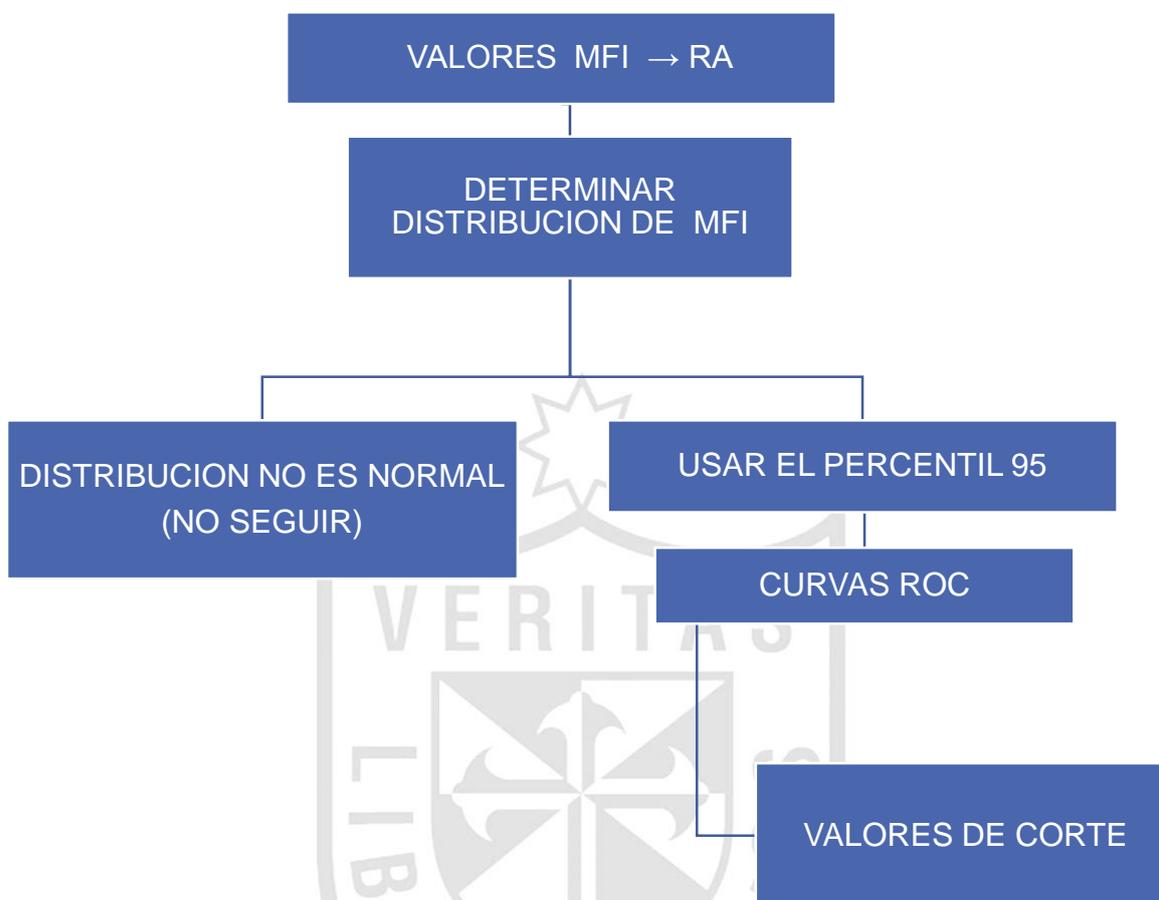
2.10.1 Cálculo del valor del blanco:

Se realizaron exploraciones de los datos correspondientes a los blancos para determinar el tipo de patrón que seguían ya sea paramétrico o no paramétrico.

2.10.2 Calculo de promedio de MFI.

Se calcularon los promedios de los triplicados, bastaba con dos datos para documentar a un SNP. Determinamos que podíamos hacer el diagnostico al calcular el promedio de las dos primeras lecturas para generar la faltante. En caso de no disponer de una tercera.

Gráfico 2.9.2 Flujograma de análisis estadístico de datos



Leyenda: El esquema muestra cómo se procesaran los datos a partir del registro inicial tomado del citómetro de flujo. Posteriormente se obtendrán los promedios de frecuencias, enseguida los coeficientes de variación intra-alelos para luego determinar el radio: Silvestre/Mutante y finalmente obtener el genotipo Pfdhfr/Pfdhps/Pfcr/Pfmdr1 de cada muestra analizada

2.10.3 Cálculo de radios alélicos (RA):

Con el fin de realizar un análisis exploratorio se calculó el genotipo de cada muestra fue calculada usando el radio alélico (RA):

$$RA = \frac{\text{MFI alelo silvestre (o mutante)}}{\text{MFI alelo silvestre} + \text{MFI alelo mutante}}$$

2.10.4 Graficas de curvas ROC y cálculo de área bajo la curva (AUC)

- El análisis de los eventos mutantes se realizaron aplicando la regresión múltiple, con un nivel de significancia de $p\text{-valor} < 0.05$. Esta decisión se basa en el objetivo principal que es validar la prueba de genotipificación Luminex.
- Los datos se organizaron depurando los casos donde sólo existían diagnósticos positivos o negativos. Cada valor se determinó con su IC al 95%. Los puntos de corte para la intensidad de fluorescencia media se obtuvieron aplicando las curvas ROC.

2.10.5 Determinación del punto de corte.

Se hicieron cálculos de las AUC y posteriormente de determinaron manualmente la sensibilidad y la mayor especificidad posible para poder calcular los puntos de corte de todas las variables.

2.11. Aspectos Éticos:

Las muestras para los análisis fueron seleccionadas de diferentes estudios de investigación llevados a cabo entre 1999 y 2009 en las zonas geográficas designadas y fueron aprobados por el comité de ética del NAMRU-6 con protocolo # 2010.003. Los estudios en los que se recolectaron las muestras de sangre presentaban en el Consentimiento Informado la cláusula en la cual se indica que la “sangre puede ser almacenada” y podrá ser “utilizada para cualquier propósito científico en el futuro”. Adicionalmente y con el fin de preservar el anonimato de los voluntarios enrolados y seleccionados para este análisis, todas las muestras se manipularon usando códigos, así mismo el análisis de los polimorfismos y determinación de genotipos se basaron en los resultados de fluorescencia obtenidos para cada alelo bajo en análisis.

CAPITULO III: RESULTADOS

3.1 Muestras Analizadas

Se estudiaron un total de 181 muestras de voluntarios que fueron elegibles para los ensayos de validación de la prueba de minisequenciamiento x-MAP ASPE que proponemos. Las características clínicas de las cohortes fueron publicadas con anterioridad. ^(20, 80). Todas las muestras entraron al análisis estadístico de datos. El detalle se encuentra en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1 Procedencia de las muestras por localidad

Región	Años	Muestra	Localidad	N=	%
LORETO	2006-2008	Sangre total	Iquitos	91	50.28
			Alianza	8	4.42
	2000-2002	Papel filtro Isocode-Stixs	Pampa Hermosa	9	4.97
			Ullpayacu	7	3.87
COSTA NORTE	2000	Sangre total	Querecotillo	49	27.07
	2008		Bellavista	16	8.84
			Tumbes	1	0.55
Total				181	100%

3.2 Diseño de oligonucleótidos de diagnóstico de SNPs y asignación de microesferas

- Se diseñaron oligonucleótidos de diagnóstico ASPE que estaban ligados a secuencias TAG de manera que estos pudieran hibridar en el extremo 3' del SNP de interés, ya sea en sentido o en anti sentido a la secuencia del ADN blanco para que terminen directamente sobre el SNP blanco.
- Por lo tanto se diseñaron dos cebadores por cada SNP uno que terminada específicamente en un nucleótido que era complementario a la secuencia que se une al alelo silvestre mientras que el segundo terminaba en un nucleótido específico complementario a la secuencia mutante. La lista completa de cebadores se incluye en el anexo 08
- El diseño de las sondas seguía este proceso que se inicia con la identificación de las secuencias blanco para después diseñar a las sondas ASPE, el

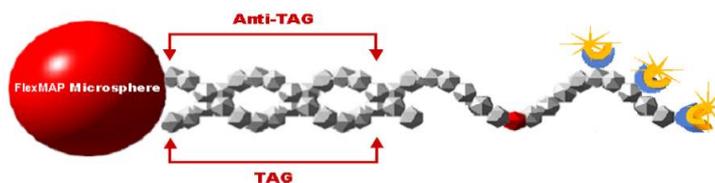
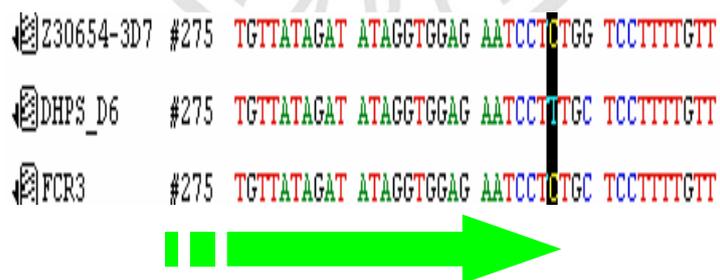
siguiente paso fue asignar una micro esfera Flex-MAP™ a cada alelo una para el silvestre y otra para el mutante.

- Finalmente se ordenaron las sondas para su posterior evaluación y estandarización de reacciones, según se describe en el gráfico 3.2 y en más detalle en la figura 3.2.

Gráfico 3.2 Flujo de trabajo – Diseño de oligonucleótidos de diagnóstico



Oligonucleótidos de diagnóstico de SNPs - usados para el ensayo ASPE

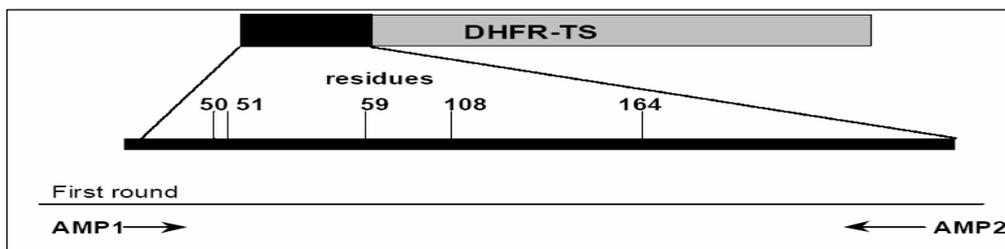


Leyenda: el gráfico representa las fases del diseño de cebadores de diagnóstico para identificar los polimorfismos interés

3.2.1 Diseño de Cebadores de diagnóstico – Gen *Pfdhfr*

Usamos este esquema para visualizar un amplicón de 730 bp y las ubicaciones de los SNPs de nuestro interés, según el gráfico 3.2.1. ⁽⁴⁸⁾

Gráfico 3.2.1 Ubicación de SNPs de interés – gen *Pfdhfr*



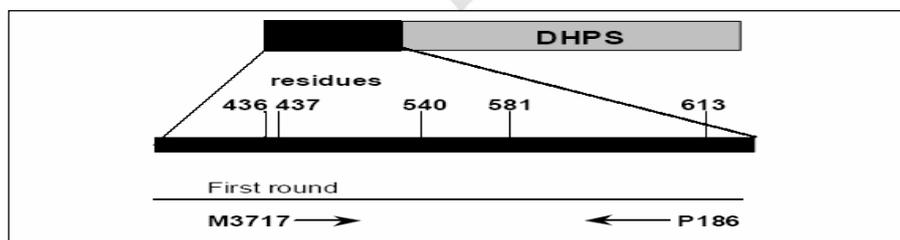
Referencia : Vasconcelos et al., Mem Inst Oswaldo Cruz. 2000 Sep-Oct; 95(5):721-8. ⁽⁴⁸⁾

Determinamos cuales eran las bases nucleotídicas blanco las que debían ir ubicadas en el extremos 3' al que se hibridara el oligonucleótido iniciador que diseñamos, también sirvió para identificar al ddNTP biotinilado que deberíamos emplear para la estandarización de las reacciones. Las bases nucleotídicas están representadas y subrayadas para una fácil identificación en la Tabla 3.2.1^a.

3.2.2 Diseño de Cebadores de diagnóstico – Gen *Pfdhps*

Usaremos este esquema para visualizar un amplicón de 1200 bp y las ubicaciones de los SNPs de nuestro interés, según el gráfico 3.2.2. ⁽⁴⁸⁾

Gráfico 3.2.2 Ubicación de SNPs de interés – gen *Pfdhps*



Reference : Vasconcelos et al., Mem Inst Oswaldo Cruz. 2000 Sep-Oct; 95(5):721-8. ⁽⁴⁸⁾

Luego usando las secuencias de las cepas de referencia identificamos a las ddNTPs que deben ser marcados con biotina y luego se asignaron las microesferas correspondientes (tablas 3.2.2 a y b).

Tabla 3.2.1.a. SNPs de interés y bases nucleotídicas blanco – Gen *Pfdhfr*.

SNPs	A16V		C50R			N51I		C59R	S108N/T		I164L	
Silvestre	C	TGT	Cis	AAT	N	TGT	C	AGC	S	ATA	I	
Mutante	T	<u>C</u> GT	Arg	<u>A</u> TT	I	<u>C</u> GT	R	AAC	N	<u>I</u> TA	L	
								<u>A</u> CC	T			

Tabla 3.2.1.b. Bases nucleotídicas y microsferas asignadas – Gen *Pfdhfr*

SNPs	A16	16V	C50	50R	N51	51I	59W	59M	108S	108N	108T	164W	164M
base	C	T	T	G	A	T	T	C	G	A	C	A	T
Base-microesfera	C-44	T-33	T-50	G-28	A-80	T-100	T-65	C-27	G-7	A-59	C-14	A-37	T-88

Tabla 3.2.2.a. SNPs de interés y bases nucleotídicas blanco – Gen *Pfdhps*

SNPs	S436G/T		A437G		K540E		A581G		A613S/T	
Silvestre	TCT	S	GCT	A	AAA	K	GCG	A	GCC	A
Mutante	<u>G</u> CT	A	<u>G</u> GT	G	<u>G</u> AA	E	<u>G</u> GG	G	<u>I</u> CC	S
	<u>T</u> TT	F							<u>A</u> CC	T

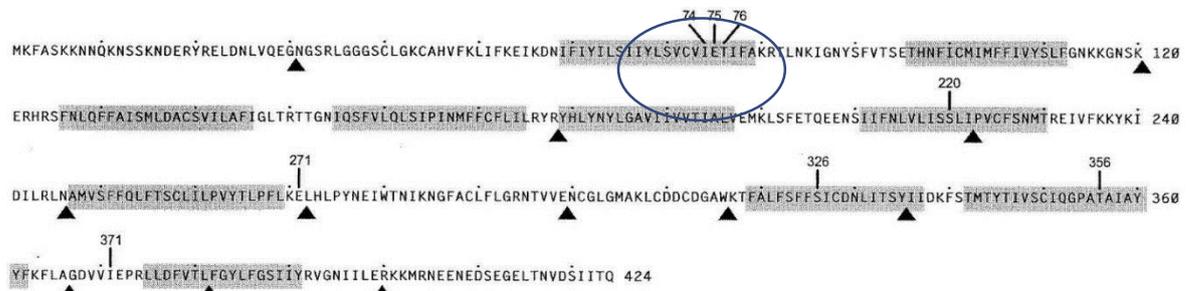
Tabla 3.2.2.b. Bases nucleotídicas y microsferas asignadas – Gen *Pfdhps*

SNPs	436w	436m	437w	437m	540w	540m	581w	581m	A613	613S	613T
Microesfera	24	29	35	23	85	18	30	56	95	67	93
Base-microesfera	C-24	G-29	C-35	G-23	A-85	G-18	C-30	G-56	G-95	T-67	A-93

3.2.3 Diseño de Cebadores de diagnóstico – Gen *Pfcr*t

Usaremos este esquema para visualizar un amplicón de 630 bp y las ubicaciones de los SNPs de nuestro interés, según esta tabla que representa los SNPs blanco en *Pfcr*t. ⁽⁸¹⁾

Gráfico 3.2.3 Ubicación de SNPs de interés – gen *Pfcr*t



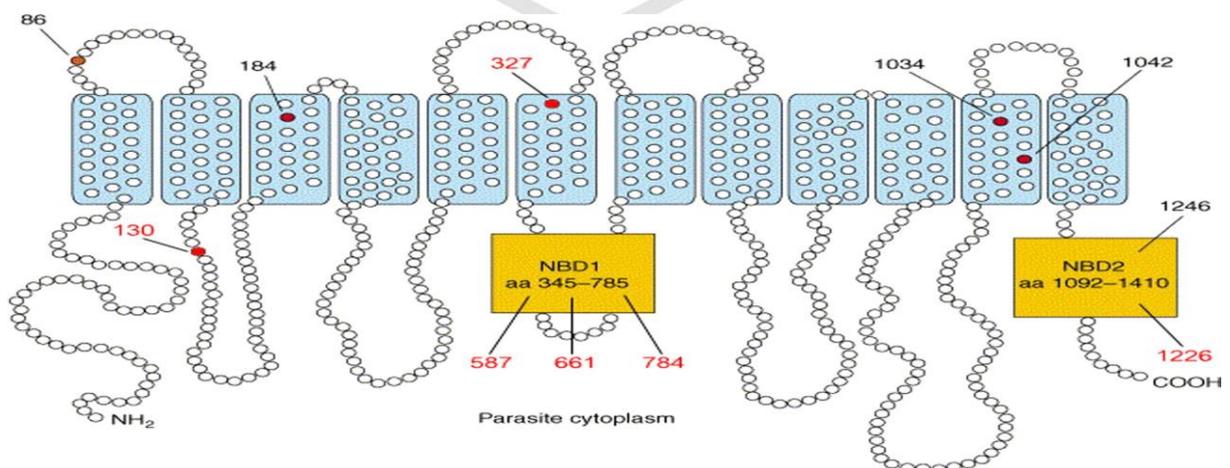
Fidock DA, et al, Mutations in the P. falciparum digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. Mol Cell. 2000 Oct;6(4):861-71. (29)

Estos son todos los blancos identificados por secuenciamiento: tabla 3.2.3a
Para los que se diseñaron los cebadores de diagnóstico para los cuatro SNPs en el gen *Pfcr*t a los que se asignó una microesfera específica en la tabla 3.2.3b

3.2.4 Diseño de Cebadores de diagnóstico – Gen *Pfmdr*1

Usaremos gráfico 3.2.3 para visualizar las ubicaciones de los SNPs de nuestro interés, y las tablas 3.2.4 a y b para determinar las microesferas asignadas a las bases nucleotídicas blanco.

Gráfico 3.2.3 Ubicación de SNPs de interés – gen *Pfmdr*1



Predicted structure and representative haplotypes of P. falciparum multidrug resistance transporter. PfMDR1 is predicted to have 12 transmembrane domains, with its N and C termini located on the cytoplasmic side of the digestive vacuole membrane (adapted from reference 19). Mutations identified in pfmdr1 full-length sequences from Pailin and WangPha are indicated by the red circles. aa, amino acid.

Tabla 3.2.3.a SNPs de interés y bases nucleotídicas blanco – Gen *Pfcr1*

Cepa P. f.	C72S	M74I	N75E	K76T
Dd2	TGT - C	ATT - I	TGA - E	TAC - T
3d7	TGT - C	ATG - M	GAA - N	TAA - K
7G8	AGT - S	ATG - M	GAA - N	TAC - T

Tabla 3.2.3.b Bases nucleotídicas y microesferas asignadas – Gen *Pfcr1*

<i>Pfcr1</i> –SNPs	72W (81)	72M (68)	74W (15)	74M (50)	75W (78)	75M (34)	76W (70)	76M (10)
Microesfera	81	68	15	50	78	34	70	10
Base-microesfera	G-81	C-68	G-15	T-50	A-78	G-34	A-70	C-10

Tabla 3.2.4.a Bases nucleotídicas y microesferas asignadas – Gen *Pfmdr1*

Cepas <i>P.f.</i>	SNPs Gen <i>pfmdr1</i>					
	N86Y	D142G	Y184F	S1034C	N1042D	D1246Y
3D7	Asn (AAT)	GAT (D)	Tyr	Ser	Asn (AAT)	Asp (GAT)
7G8	Asn	D	Phe (TTT)	Cys (TGT)	Asp (GAT)	TAT(Tyr)
Dd2	Tyr (TAT)	D	Tyr (TAT)	Ser(AGT)	Asn	Asp
Algunas Peruanas		GGT (G)				

Tabla 3.2.4.b Bases nucleotídicas y microesferas asignada – Gen *Pfmdr1*

<i>Pfmdr1</i>	N86	86Y	D142	142G	Y184	184F	S1034	1034C	N1042	1042D	D1246	1246Y
Microesfera	T-48	A-98	A-86	G-40	A-49	T	A-53	T-94	A-77	G-1	G-42	T-86
Base-microesfera	48	98	86	40	49	39	53	94	77	1	42	86

3.2.5 Estandarización del ensayo de minisequenciamiento y uso de ddNTPs marcados con biotina.

1. Se estandarizaron cinco reacciones 1X que corresponden a cada uno de los amplicones en análisis, cada uno con un número de oligonucleótidos de diagnóstico diferentes.
2. Evaluamos la especificidad del ensayo usando la estrategia del extensión alelo específica que usaba a los dinucleótidos trifosfato marcados con biotina: ddATP, ddTTP, ddCTP y ddGTP (Perkin Elmer®); para cada SNP conocido, tanto para el alelo silvestre como para el mutante cada uno en tubos separados.
3. Describiremos el proceso de estandarización usando al gen *Pfdhfr* que fue usado como un modelo para la optimización y posterior validación del ensayo ASEP. Como un ejemplo citaremos al SNP 51 en *Pfdhfr*: el cebador específico del alelo silvestre terminaba en una **A** ligada a la microesfera 80 (A-80) mientras que el cebador específico del alelo mutante terminaba en una **T** ligada a la microesfera 100 (T-100). Cada tubo representaba una reacción 1X de validación, la combinación de ambos alelos en el mismo tubo se etiquetó como reacción dúplex (2X).
4. Se usaron las cepas de referencia 3d7 y D6 por presentar el alelo silvestre en el SNP 108, en esa posición encontraremos una Serina que fue correctamente diagnosticada por la sonda que tenía una ddATP biotinilado y la micro esfera 59, mientras que la muestras # 15 que tenía una Asparragina en esa posición fue diagnosticada con un ddGTP biotinilado y la microesfera – 07 Este resultado se visualizó en el Gráfico 3.2.5.
5. Luego de revisar literatura y siguiendo las recomendaciones de Luminex corp, encontramos que el uso de un solo dinucleótido trifosfato marcado podía reemplazar a el uso de dos específicos en dos reacciones 1X, por lo tanto ddCTP nos dio los resultados más acertados y los más confiables al comparar los resultados ASPE con los obtenidos del análisis de las secuencias obtenidas del secuenciamiento automatizado.
6. El siguiente paso fue la evaluación de las reacción dúplex (2X) (tanto el alelo silvestre como el mutante en la misma reacción), haciendo uso de solo ddCTP marcado con biotina y también se pudo identificar a los alelos de forma correcta, para seguir con nuestro ejemplo el uso de A-80 y T-100 en

reacción separadas y también de las dos en un mismo tubo. Los valores de MFI de las mezclas específicas son muy específicas y por lo tanto mayores en términos de MFI crudos, en cambio los valores de la reacción dúplex son aproximadamente 50% más bajos sin embargo son muy específicos y permiten tener valores muy certeros que identifican de forma correcta que alelo se encuentra presente Gráfico 3.2.6.

Gráfico 3.2.5 Uso de ddNTPs específicos – *Pfdhfr* SNP S108N

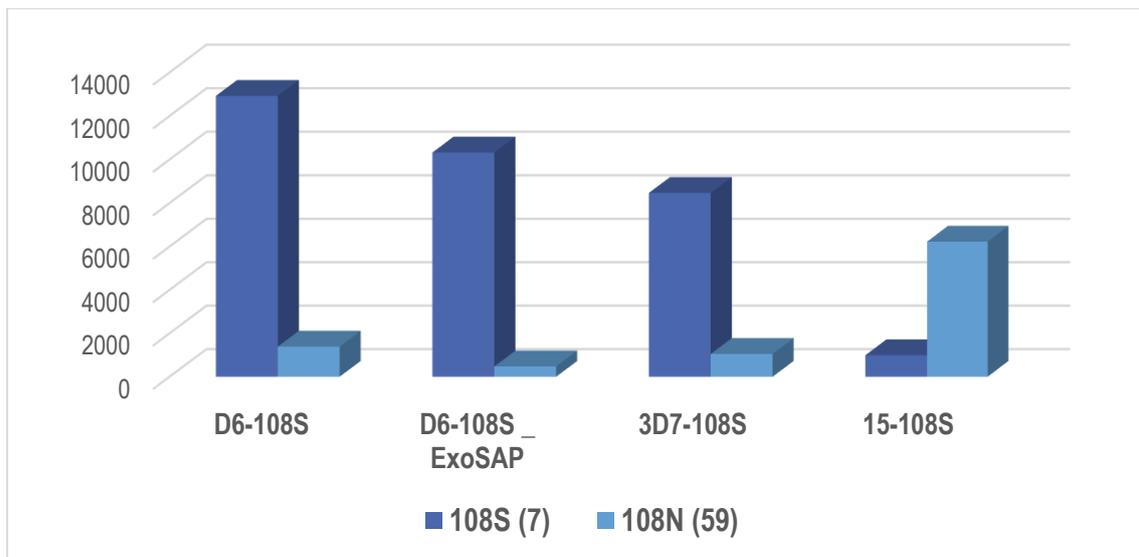
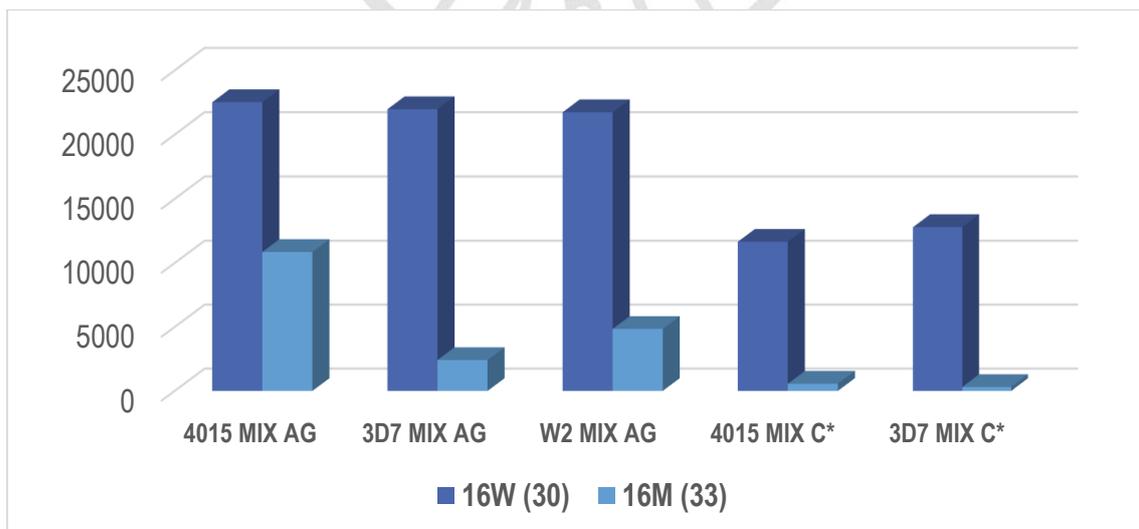


Gráfico 3.2.6 Uso de ddNTPs específicos vs uso de ddCTP biotinilado - SNP A16V



7. Validación del ensayo de minisequenciamiento

Procedimos a realizar las reacciones multiplex cada uno de los genes usando solo ddCTP biotinilado, Por estos experimentos iniciales determinamos que un incremento de 5 a 10 veces el valor proporcional de MFI entre alelos de un SNP representaría el valor deseado de punto de corte que nos permitiría discriminar entre la presencia de un alelo mutante vs un silvestre en el gen *Pdhfr*. El mismo principio de prueba fue aplicado a los otros tres genes en análisis. Los resultados se encuentran detallados en los gráficos y tablas 3.2.7 a 3.2.14.

Gráfico 3.2.7. Valores de MFI – Gen *Pdhfr* (1X)

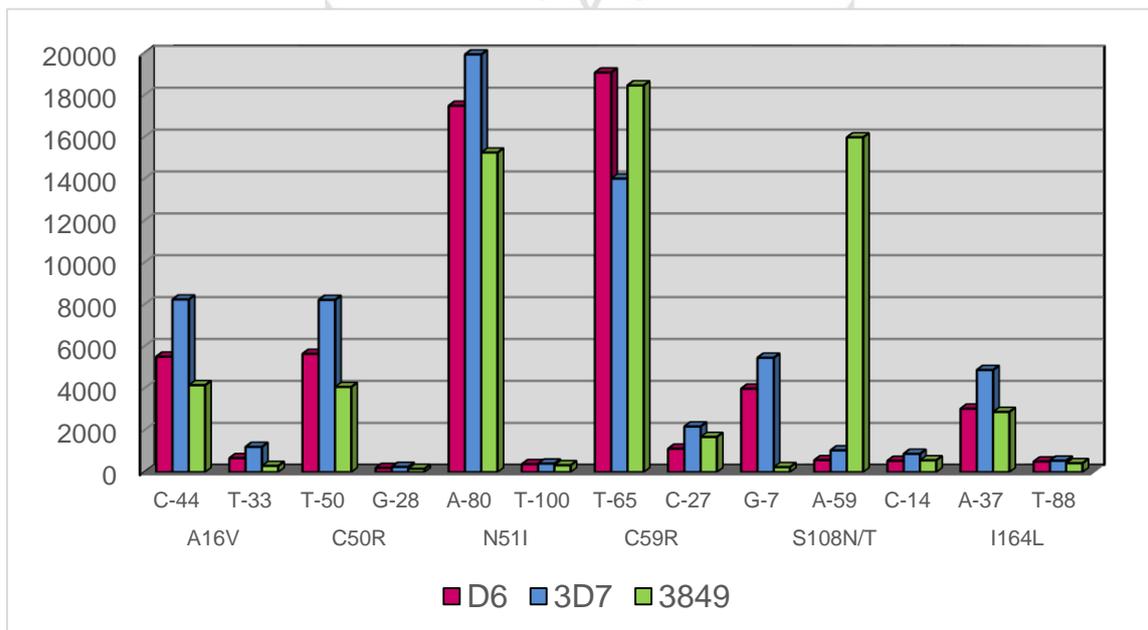


Tabla 3.2.7. Valores de MFI – Gen *Pdhfr* (1X)

	A16V		C50R		N51I		C59R		S108N/T			I164L	
	C-44	T-33	T-50	G-28	A-80	T-100	T-65	C-27	G-7	A-59	C-14	A-37	T-88
D6	5507	667	5638	198	17487	382	19076	1118	3982	574	541	3027	506
3D7	8236	1206	8216	251	19939	409	14009	2176	5453	1037	875	4870	550
3849	4145	300	4063	159	15252	332	18461	1680	242	15979	566	2873	430

Gráfico 3.2.8 Reacción Multiplex – Gen *Pfdfr* por radio alélico

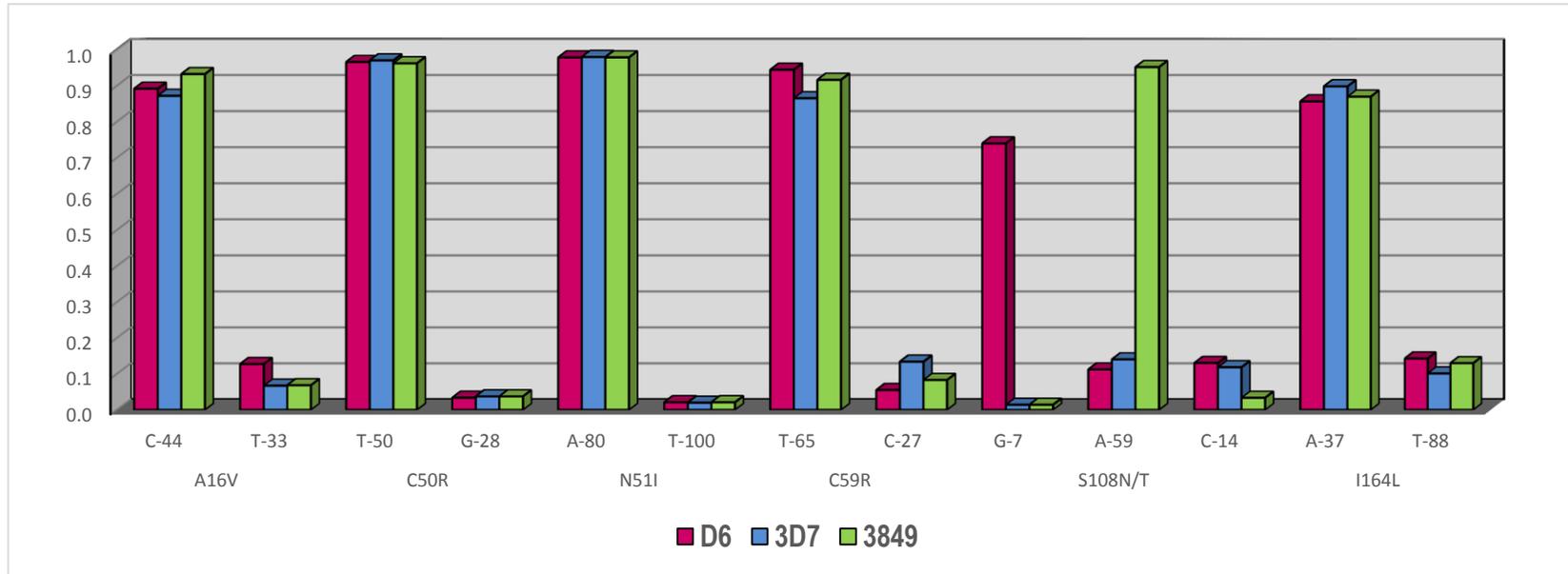


Tabla 3.2.8. Radios alélicos de la reacción multiplex (1X), Gen *Pfdhfr*

ID	A16V		C50R		N51I		C59R		S108N/T		I164L		
D6	0.9	0.1	1.0	0.0	1.0	0.0	0.9	0.1	0.7	0.1	0.1	0.9	0.1
3D7	0.9	0.1	1.0	0.0	1.0	0.0	0.9	0.1	0.0	0.1	0.1	0.9	0.1
3849	0.9	0.1	1.0	0.0	1.0	0.0	0.9	0.1	0.0	1.0	0.0	0.9	0.1

Gráfico 3.2.9 Reacción Multiplex – Gen *Pfdhps* (1X)

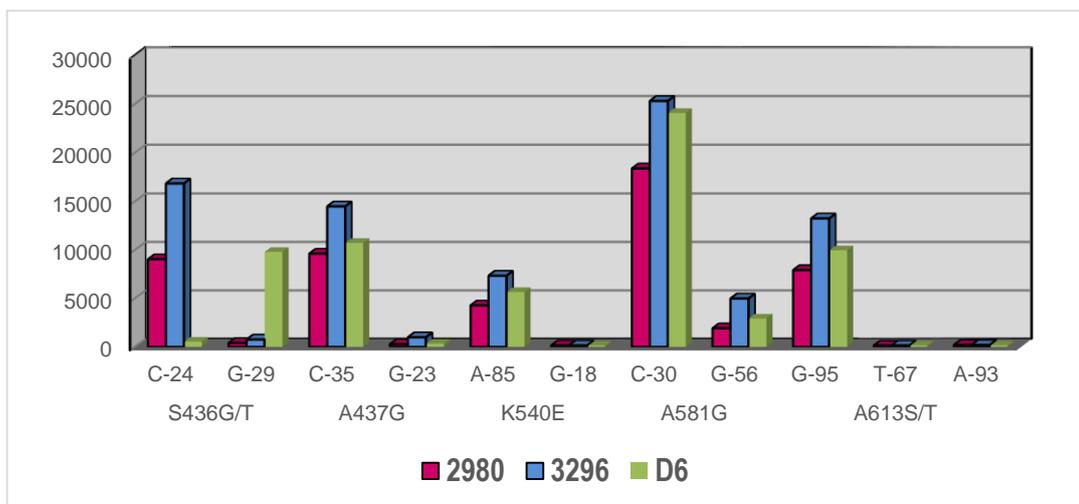


Tabla 3.2.9. Valores de MFI – Gen *Pfdhps* (1X)

ID	S436G/T		A437G		K540E		A581G		A613S/T		
2980	9050	408	9621	282	4278	152	18391	1924	7927	133	203
3296	16862	761	14501	995	7349	153	25323	4991	13257	144	204
D6	546	9806	10729	336	5659	137	24092	2930	9965	158	158

Gráfico 3.2.10 Reacción Multiplex – Gen *Pfdhps* por radio alélico

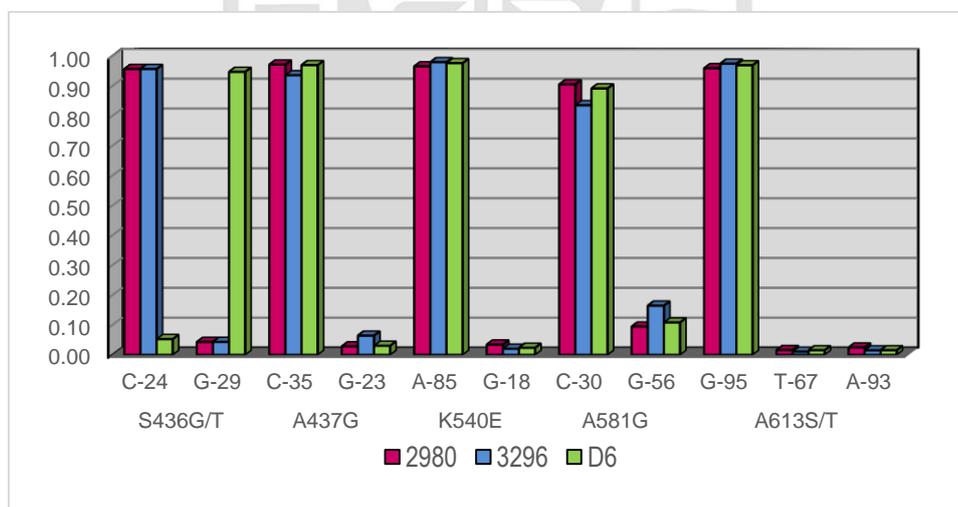


Tabla 3.2.10. Radios alélicos de la reacción multiplex (1X), Gen *Pfdhps*

ID	S436G/T		A437G		K540E		A581G		A613S/T		
2980	0.96	0.04	0.97	0.03	0.97	0.03	0.91	0.09	0.96	0.02	0.02
3296	0.96	0.04	0.94	0.06	0.98	0.02	0.84	0.16	0.97	0.01	0.01
D6	0.05	0.95	0.97	0.03	0.98	0.02	0.89	0.11	0.97	0.02	0.02

Gráfico 3.2.11 Valores de MFI – Gen *Pfcr1* (1X)

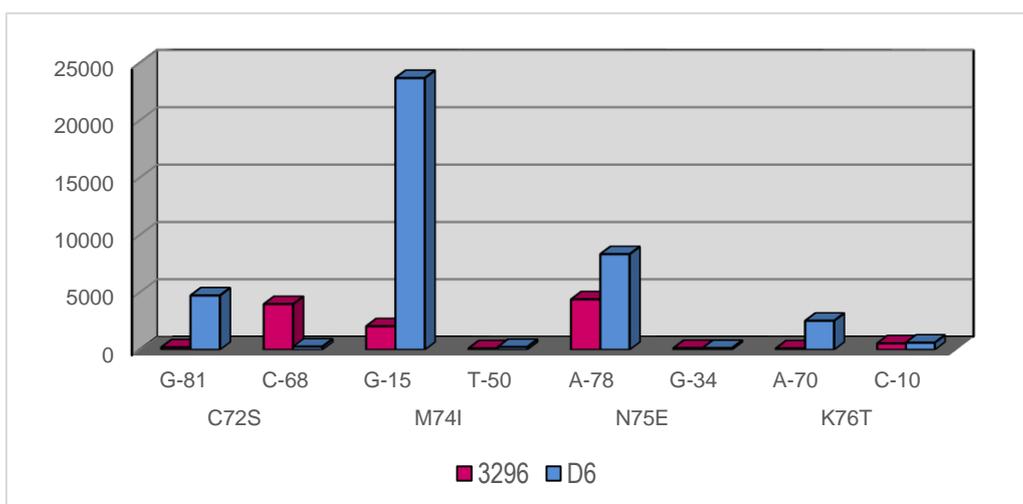


Tabla 3.2.11. Valores de MFI – Gen *Pfcr1*

	C72S		M74I		N75E		K76T	
	G-81	C-68	G-15	T-50	A-78	G-34	A-70	C-10
3296	221	3984	2053	128	4401	150	119	564
D6	4738	278	23703	245	8341	157	2532	627

Gráfico 3.2.12 Reacción Multiplex – Gen *Pfcr1* por radio alélico

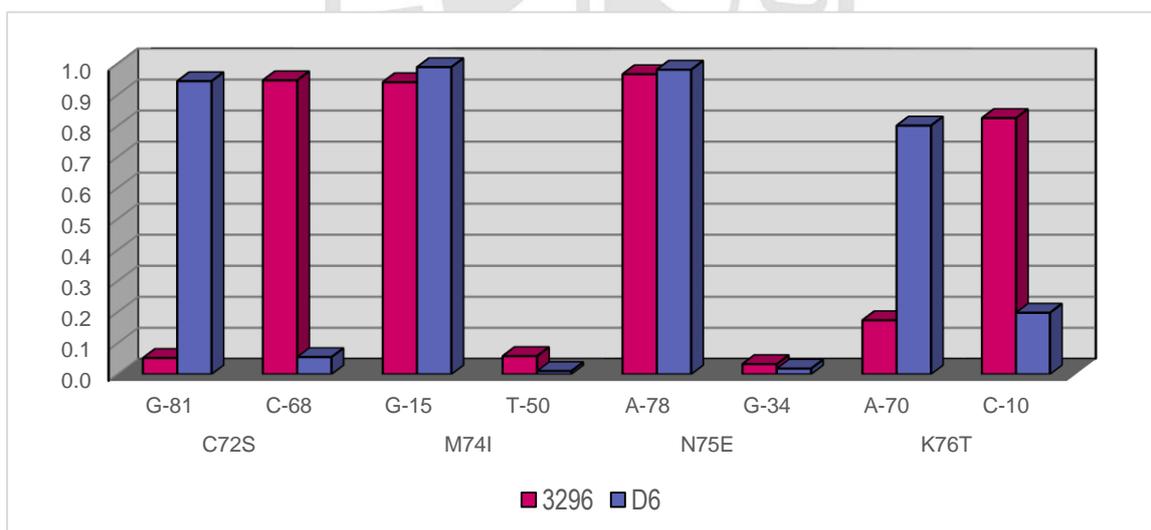


Tabla 3.2.12. Radios alélicos de la reacción multiplex (1X), Gen *Pfcr1*

ID	C72S		M74I		N75E		K76T	
3296	0.1	0.9	0.9	0.1	1.0	0.0	0.2	0.8
D6	0.9	0.1	1.0	0.0	1.0	0.0	0.8	0.2

Gráfico 3.2.13 Valores de MFI – Gen *Pfmdr1* (1X)

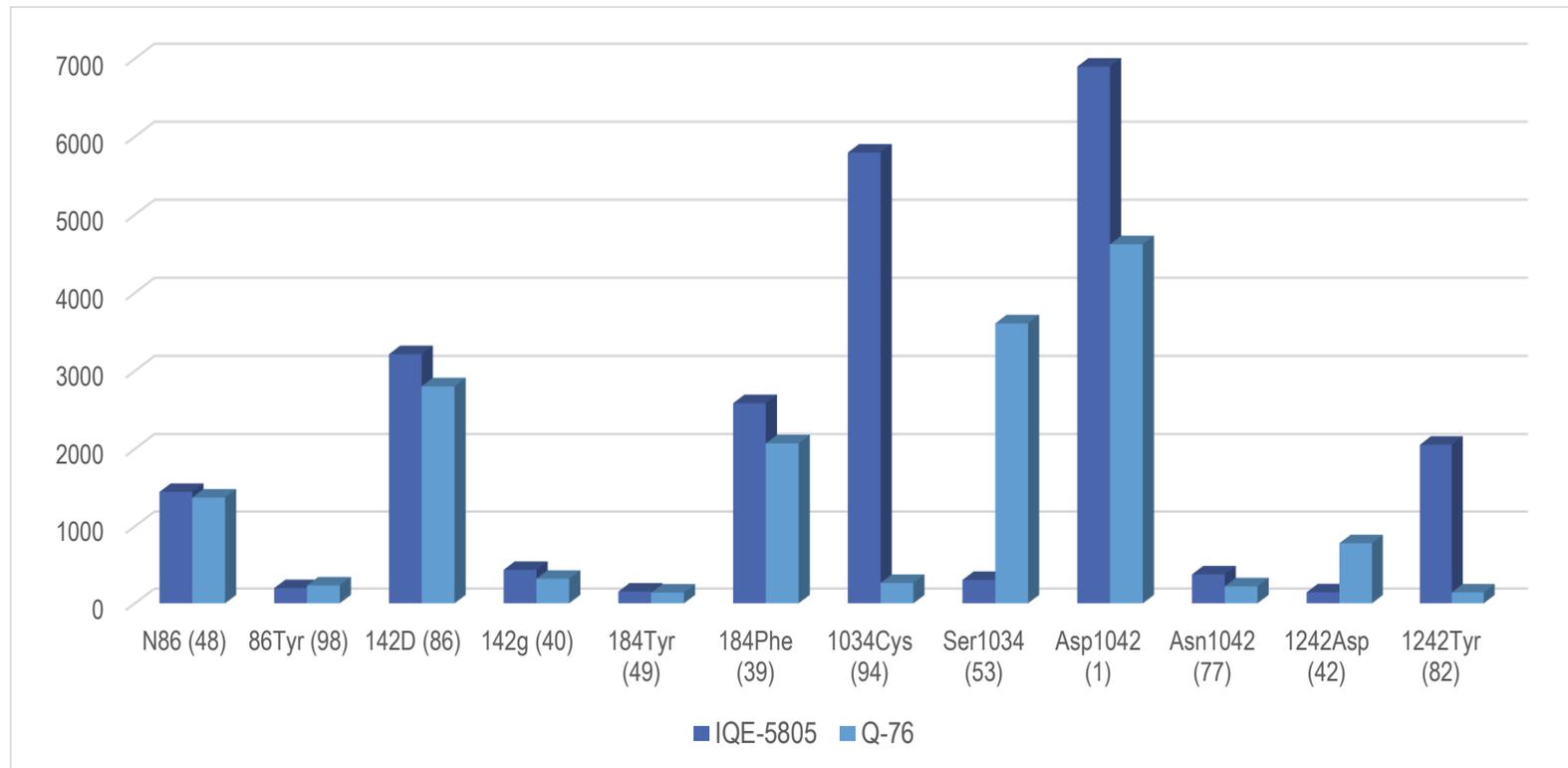


Tabla 3.2.13 Valores de MFI – Gen *Pfmdr1* (1X)

ID	N86 (48)	86Tyr (98)	142D (86)	142g (40)	184Tyr (49)	184Phe (39)	1034Cys (94)	Ser1034 (53)	Asp1042 (1)	Asn1042 (77)	1242Asp (42)	1242Tyr (82)
IQE-5805	1447	199	3214	435	154	2586	5797	304	6898	377	144	2053
Q-76	1374	232	2802	319	140	2072	265	3608	4623	221	781	142

Gráfico 3.2.14 Reacción Multiplex – Gen *Pmdr1* por radio alélico

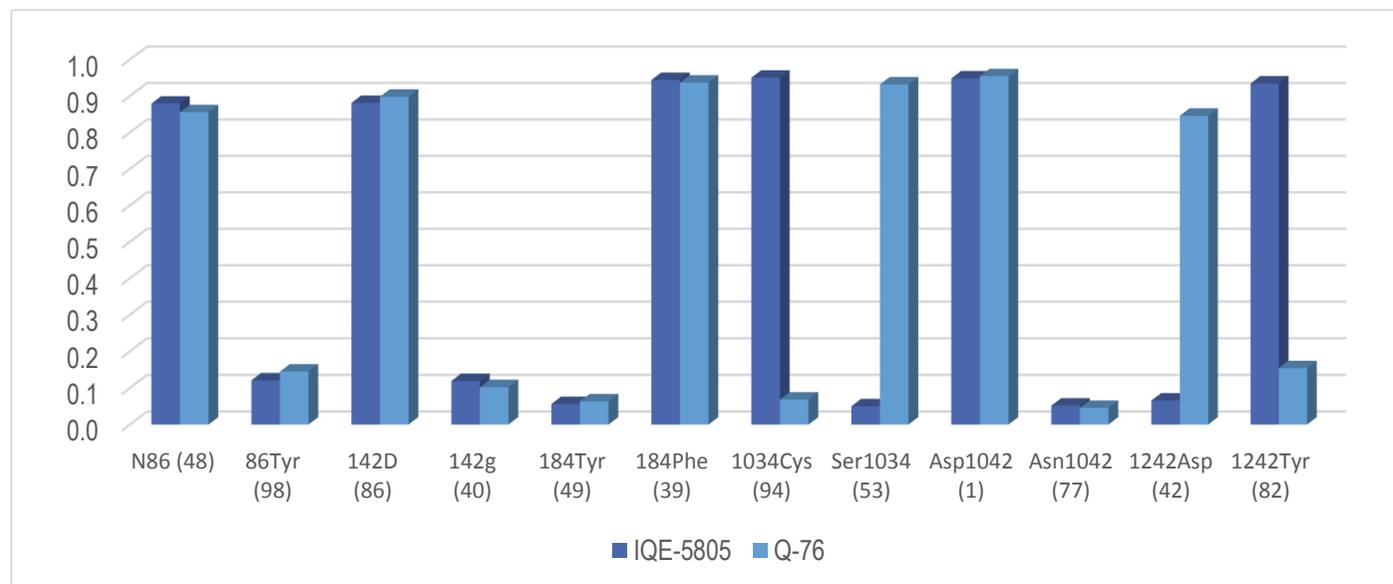


Tabla 3.2.14 Radios alélicos de la reacción multiplex (1X), Gen *Pfmdr1*

ID	N86 (48)	86Tyr (98)	142D (86)	142g (40)	184Tyr (49)	184Phe (39)	1034Cys (94)	Ser1034 (53)	Asp1042 (1)	Asn1042 (77)	1242Asp (42)	1242Tyr (82)
IQE-5805	0.9	0.1	0.9	0.1	0.1	0.9	1.0	0.0	0.9	0.1	0.1	0.9
Q-76	0.9	0.1	0.9	0.1	0.1	0.9	0.1	0.9	1.0	0.0	0.8	0.2

3.3 Cantidad de ADN usado para reacciones

Estandarización de los ensayos xMAP-ASPE, se realizaron pruebas para escalar la cantidad de ADN necesario para un buen desempeño de la prueba. Según el siguiente patrón:

Tabla 3.3 Cantidad de amplicón usado para reacciones xMAP-ASPE

Tipo de reacción x-MAP	Gen	Cantidad de ADN
1X	<i>Pfdhfr, Pfdhps, Pfmdr1-a, Pfmdr1-b o Pfcr1</i>	100 ng
	<i>Pfdhfr, Pfdhps, Pfmdr1-a y Pfmdr1-b</i>	100 ng
5X	<i>Pfcr1</i>	500ng – 1µg

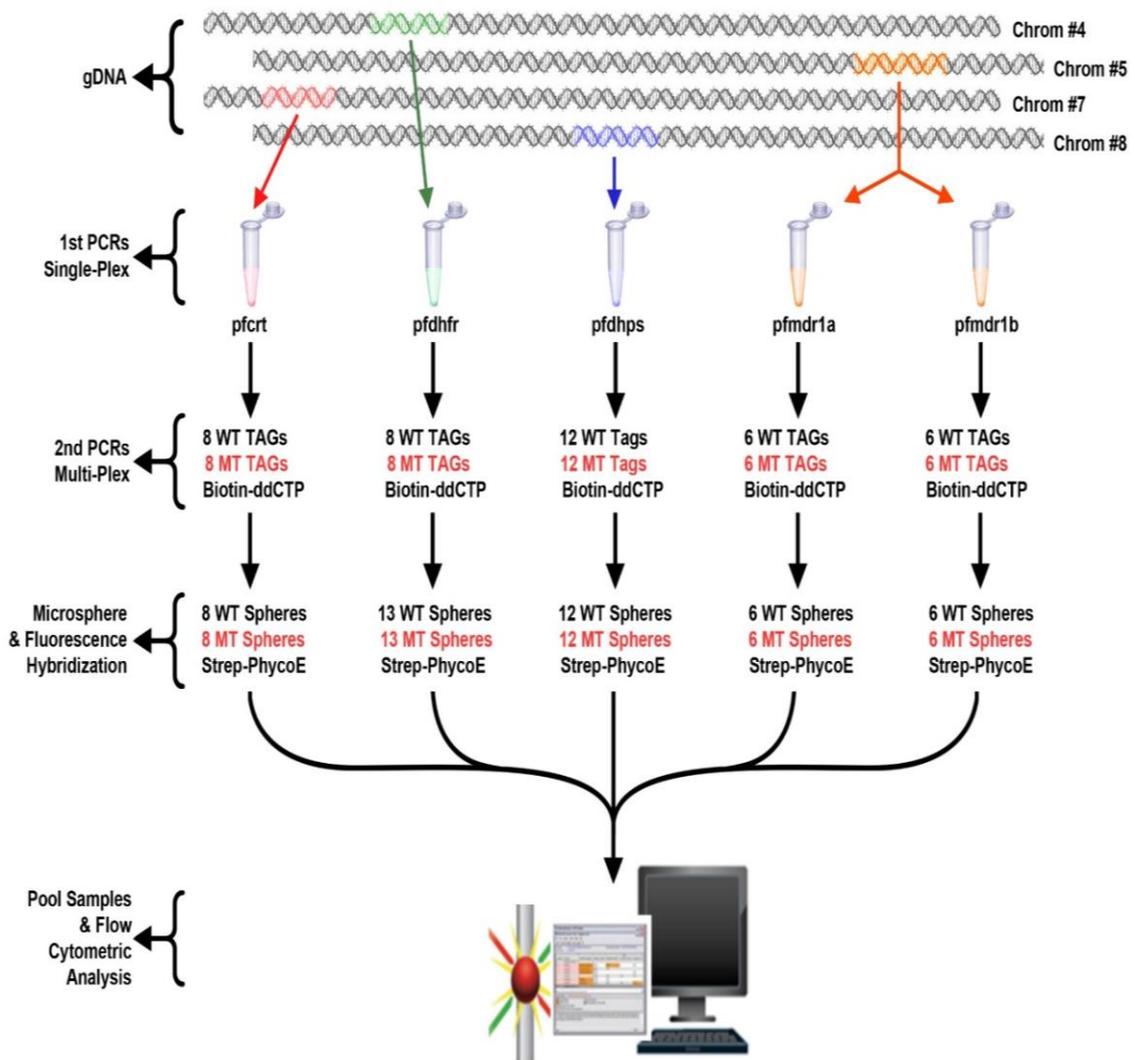
3.4 Estandarización de reacciones multiplex 5X

Para validar nuestros resultados con los del secuenciamiento automatizado encontramos que estos eran 100% concordantes con las MFI obtenidas para los 44 SNPs analizados. Una representación de la salida que observamos en la salida del citómetro de flujo Bioplex- BIORAD está representada en los gráficos 3.4 a y b

Gráfico 3.4a Análisis multiplex de genes de fármaco resistencia en *P. falciparum*

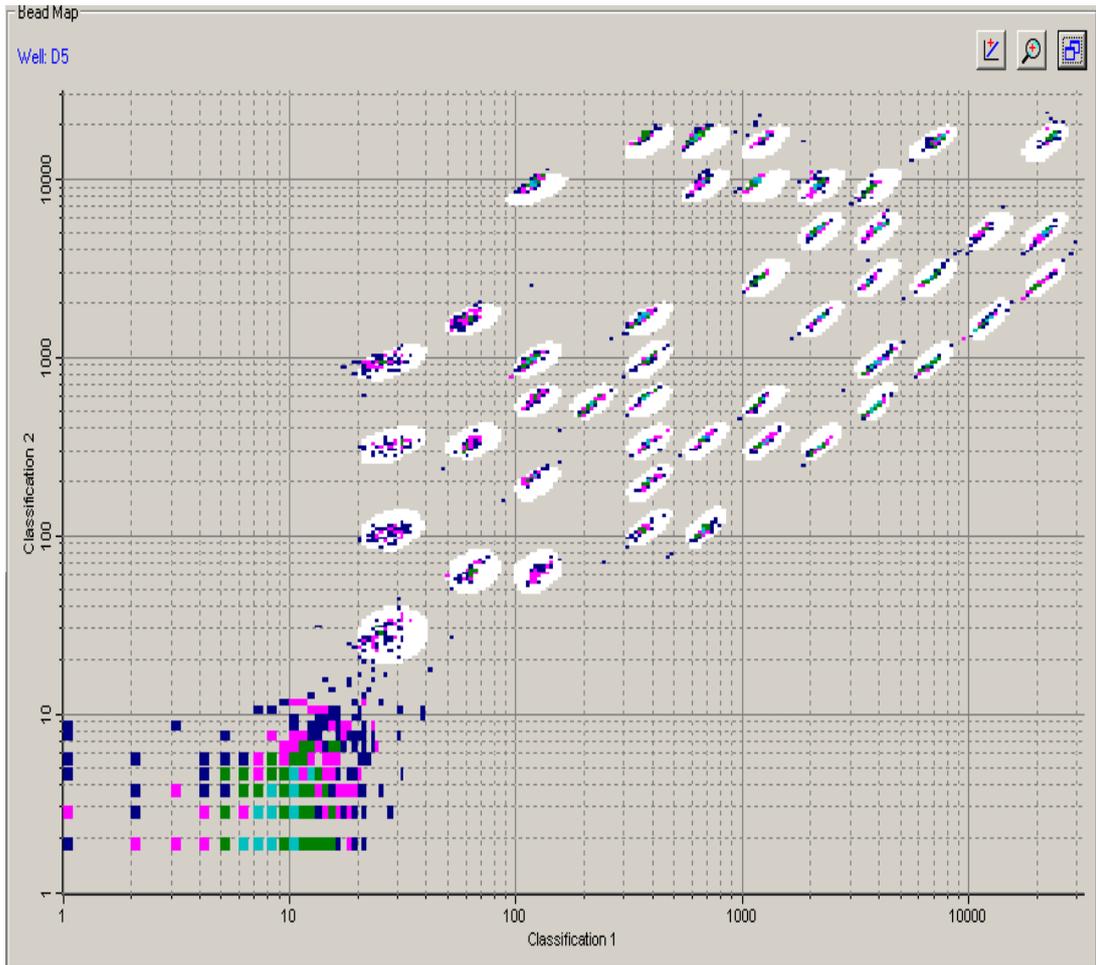
Reacción 5X

Multi-Plex Microsphere Analysis of *P. falciparum* Drug Resistance



Leyenda: La figura representa los experimentos de laboratorio. (cortesía del Dr. Mike Deshotel.)

Gráfico 3.4b Análisis multiplex de genes de fármaco resistencia en *P. falciparum* - Reacción 5X



Leyenda: Un total de 44 oligonucleótidos iniciadores específicos de alelo fueron usados para interrogar a 21 SNPs de interés en los genes Pfdhfr y Pfdhps, Pfcrt Pfm-dr1 en una reacción simultánea. Esta es una captura de pantalla del lector Bio-Plex® 100.

3.5 ANALISIS ESTADISTICOS

Resultados de Genotipificación del ensayo x-MAP ASPE:

Inicialmente observamos que los resultados de las MFI fueron mayores cuando las reacciones fueron estandarizadas para la prueba para cada gen (1X), y que fueron reduciéndose progresivamente según avanzábamos con la estandarización de la reacción múltiple para cada gen. Cuando decidimos pasar al siguiente nivel y preparar las reacciones múltiples (5X) observamos que estas podían ser muy eficientes y mantener un radio alélico tan alto como el 1X solo cuando se agregaba la cantidad de ADN apropiado para cada gen. Como resultado, se determinó que el rango positivo estaba entre 5 a 10 veces el radio entre los

valores MFI del alelo salvaje vs el alelo mutante y esto fue valido para todas las reacciones.

Se determinó que un resultado era “valido” (MFI) cuando las unidades de fluorescencia para un alelo eran como mínimo unas 10 veces del valor de MFI para el alelo que no era el blanco de la reacción y a la vez ser por lo menos mucho más grande que el valor de los blancos que se usaron reacciones de control . Las muestras se corrieron en triplicado para asegurar un la precisión del resultado obtenido. Se consideró que un resultado era “negativo” basado en resultados del blanco y que deberían ser menor a 200 MFI que fue útil para determinar un mínimo un que un resultado fuera no valido.

Los resultados de procesaron inmediatamente después de las lecturas iniciales, usando exploratorio por proporciones. Las muestras que tenían un resultado cercano al blanco eran seleccionadas para preparar hibridaciones en replicados para proceder al reemplazo de los resultados dudosos.

Así mismo al final de los ensayos se consolidaron los resultados en una única base de datos, nuestro objetivo fue documentar el valor de blanco para cada polimorfismo.

3.5.1 Obtención de resultados del ensayo de minisequenciamiento x-MAP ASPE

Los datos fueron extraídos de forma automática del lector Bio-Plex® 100 en hojas Excel

3.5.1.1 Las variables que obtuvimos del lector Bio-Plex® 100 fueron 132 decidimos trabajar con 44 correspondiente a 21 SNPs, según este detalle:

- 1) intensidad de fluorescencia (MFI) Se calcularon los promedios de los triplicados, bastaba con dos datos para documentar a un SNP.
- 2) intensidad de fluorescencia menos blancos: No se usaron estos datos.
- 3) número de micro esferas detectadas: De otro lado no se consideraron los valores de las microesferas ya que la inclusión de esta variable no fue un objetivo de este trabajo de investigación.

La decisión de repetir una prueba se tomó al terminar la lectura de una placa y tomando en cuenta las proporciones presentadas en la Tabla 3.6.1 y que al final fueron corroboradas por el análisis estadístico.

Tabla 3.5.1.1 Valores de radios alélicos para trabajos de laboratorio

RA _s	RA _m	Proporción	Regla
0.2	0.8	5	Valido
0.21	0.79	4.75	Valido
0.22	0.78	4.5	Valido
0.235	0.765	4.25	Valido
0.25	0.75	4	Valido
0.26	0.73	3.75	Invalido-repetir
0.28	0.72	3.5	Invalido-repetir
0.30	0.70	3.25	Invalido-repetir
0.33	0.66	3	Invalido-repetir

3.5.1.2 DETERMINACION DE DISTRIBUCION DE LAS LECTURAS DE MFI

Se realizaron análisis exploratorios para observar la distribución de las MFI, encontramos que no tenían una distribución normal, por lo tanto se decidió usar una estrategia no paramétrica para el análisis estadístico de datos.

3.5.1.3 ANALISIS DE DATOS DE MFI – USANDO EL PERCENTIL 95%

Los datos fueron analizados usando esta estrategia no paramétrica se exploraron valores de los blancos para determinar el promedio el rango de estos y también decidimos no considerar valores de blanco superiores a 500MFI por tratarse de artefactos ocasionados por la manipulación de las microesferas en el proceso de hibridación con el ADN blanco.

3.5.1.4 CALCULO DE LOS (RA) PARA CADA SNP POLIMORFICO

Los valores obtenidos fueron clasificados fueron colectados según la corrida que se generó y posteriormente de uso la fórmula de RA para cada una de las variables.

3.5.2 Validación Clínica del ensayo de minisequenciamiento x-MAP ASPE

Estos resultados de la prueba de oro se usaron para la validación del ensayo x-MAP. Inicialmente describimos a los genotipos hallados en la población en general y después se describieron a los polimorfismos que posteriormente se usaron para preparar a las curvas ROC. El ensayo de minisequenciamiento fue capaz de identificar los siguientes SNPs y en conjunto de diagnosticar a los siguientes genotipos.

3.5.2.1 Polimorfismos y genotipos en los genes *Pfdhfr* y *Pfdhps*

- DHFR mutante simple (1M): S108N
- DHFR doble mutante (2M): S108N/ C50R
- DHFR triple mutante (3M): S108N / N51I / I164L
- DHPS silvestre : ausencia de mutaciones
- DHPS doble mutante (2M) : 437Gli/A581Gli
- DHPS triple mutante (3M): 437Gli/A581Gli y 540Glu

3.5.2.2 Polimorfismos y genotipos en el gen *Pfcrt*

- CRT silvestre: C72S / M74I /N75E /K76T (CMNK)
- CRT mutante: C72S / M74I /N75E /K76T (SMNK)

3.5.2.3 Polimorfismos en *Pfmdr1* en los dos fragmentos del *Pfmdr1*:

- *Pfmdr1* fragmento 1 fueron: Y184F, D142G así como Y184F
- *Pfmdr1* fragmento 2 fueron: S1034C, N1042D y D1246Y

3.5.2.4 Selección de polimorfismos para la validación de ensayo ASPE

Luego de examinar los resultados de la prueba de oro y describir los genotipos procedimos a seleccionar a los alelos que serían usados para el análisis estadístico. Primero se seleccionaron los alelos que no presentaban polimorfismos ya sean silvestres o mutantes: M74I, I75N, K76T, N86Y, Y184F, N1042D, S436A, 613, A16V, C59R, posteriormente estas fueron excluidas del análisis estadístico.

Enseguida se seleccionaron a los alelos polimórficos, por lo tanto las tablas que siguen nos presentan una mejor visión del número de muestras analizadas y cuáles fueron los alelos mutantes encontrados por cada uno de los genes en análisis, así mismo podemos ver cuál fue la distribución de los alelos en la población, este paso fue necesario para poder determinar que variables entraban al análisis por curvas ROC.

Observamos que los alelos polimórficos con menos prevalencia fueron C50R, I164L y K540E con porcentajes de alelos mutantes inferiores al 10%.(tabla 3.5.2.4)

Tabla 3.5.2.4 Frecuencia de los 11 polimorfismos usados para validación de ensayo x-MAP ASPE en la población estudiada

	SNP	muestras	alelo silvestre		alelo mutante	
			n=	%	n=	%
1	72	103	94	89	12	11
2	142	108	91	81	21	19
3	1034	100	44	41	64	59
4	1242	98	94	89	12	11
5	437	104	100	88	14	12
6	540	101	107	94	7	6
7	581	112	100	88	14	12
8	50	104	107	94	7	6
9	51	110	99	87	15	13
10	108	103	22	19	92	81
11	164	72	106	93	8	7

3.5.2.5 Criterios considerados para determinar la validez de resultados

Los valores obtenidos fueron clasificados fueron colectados según la corrida que se generó y posteriormente de uso la fórmula de radio alélico para cada una de las variables según se visualiza en la Tabla 3.5.2.5, luego de determinaron normas para determinar la validez de un resultado como sigue:

Tabla 3.5.2.5 Criterios para validez de resultados en reacciones 1X

Criterios	MFI	Radio Alélicos
VALIDO (usar el resultado)	> Blanco en todos los SNPs	0.2 - 0.8 0.1 – 0.9 0 - 1
INVALIDO (repetir el set completo)	< Blanco en uno o más SNPs	0.5 – 0.5 0.3 – 0.7 0.4 – 0.6

Tabla 3.5.2.6 Criterios para validez de resultados en reacciones 5X

Criterios	MFI	Radio Alélicos
VALIDO (usar el resultado)	> Blanco en todos los SNPs	0.25 – 0.75 0.2 – 0.8
INVALIDO Repetir (repetir el set completo)	< Blanco en uno o más SNPs	0.5 – 0.5 0.3– 0.7 0.4 – 0.6

3.5.3 CALCULO DEL AREA BAJO LA CURVA (AUC).

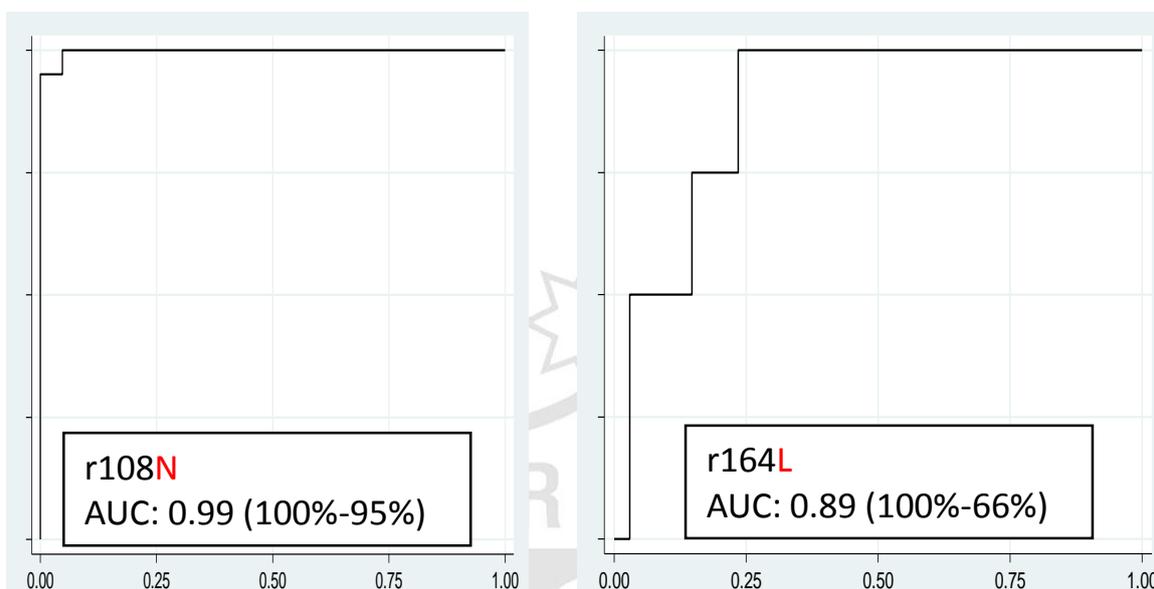
Se calcularon las áreas bajo la curva de un total de 11 SNPs polimórficos. Cada curva representa la asociación de dos variables una numérica y otra variable dicotómica y todas las áreas bajo la curva fueron estadísticamente significativas, con intervalos de confianza al 95%, así mismo ninguna se acerca a las diagonales. Procedemos a describir características resaltantes de los hallazgos por cada gen analizado.

3.5.3.1 Características de SNPs en el gen *Pfdhfr*:

El gráfico 3.5.3.1 describe los valores de área bajo la curva y de SNPs en *Pfdhfr* para S108N y I164L, los más importantes de acuerdo a los patrones de fármaco resistencia a SP observados en el Perú, además para representar los hallazgos al determinar valores de S y E para variables que tienen una buena prevalencia en la población S108N en la que el alelo Asparragina tiene un porcentaje de mutantes de 81% y que permitió obtener un AUC de 1 con intervalos de confianza de (100%-95%). Así mismo presentamos los valores para I164L, cuyo alelo

mutante Leucina tiene una prevalencia de 7% con un AUC de 0.89 y con intervalos de confianza de (100%-66%) que nos revela esta característica en la población.

Gráfico 3.5.3.1 Resultado de Curvas ROC – Gen *Pfdhfr*

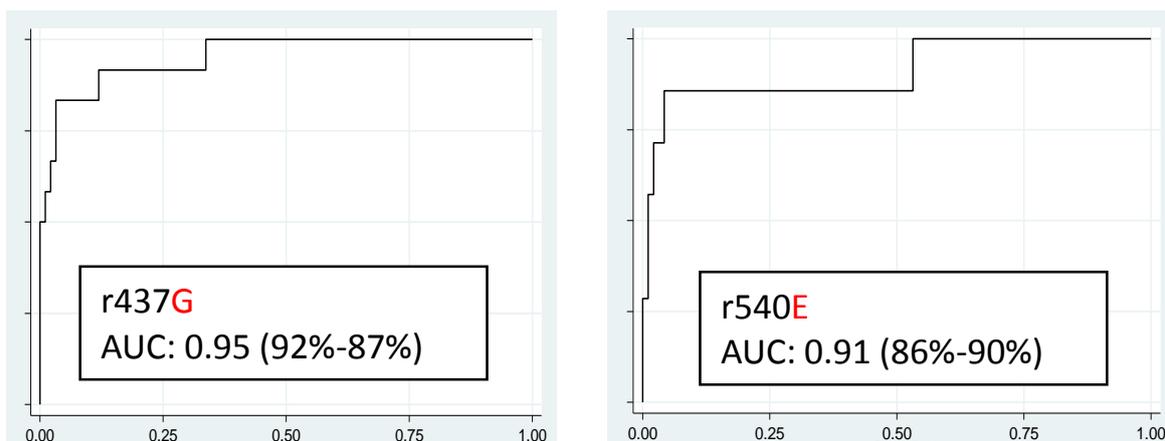


Leyenda: AUC (área bajo la curva) = (%sensibilidad – %especificidad)

3.5.3.2 Características de SNPs en el gen *Pfdhps*

El gráfico 3.5.3.2 describe los valores de área bajo la curva y de SNPs en *Pfdhps* para A437G Y K540E los más importantes de acuerdo a los patrones de farmacoresistencia a SP observados en el Perú, además para representar los hallazgos al determinar valores de S y E para variables que a pesar de ser claves para la determinación del perfil de fármaco-resistencia de los aislamientos tiene baja prevalencia en la población A437G en la que el alelos Glicina tiene un porcentaje de mutantes de 12% y que permitió obtener un AUC de 0.95 con intervalos de confianza de (92%%-88%). Así mismo presentamos los valores para K540E cuyo alelo mutante Leucina tiene una prevalencia de 6% con un AUC de 0.91 con intervalos de confianza de (86%-89%) que nos revela esta característica en la población

Gráfico 3.5.3.2 Resultado de Curvas ROC – Gen *Pfdhps*



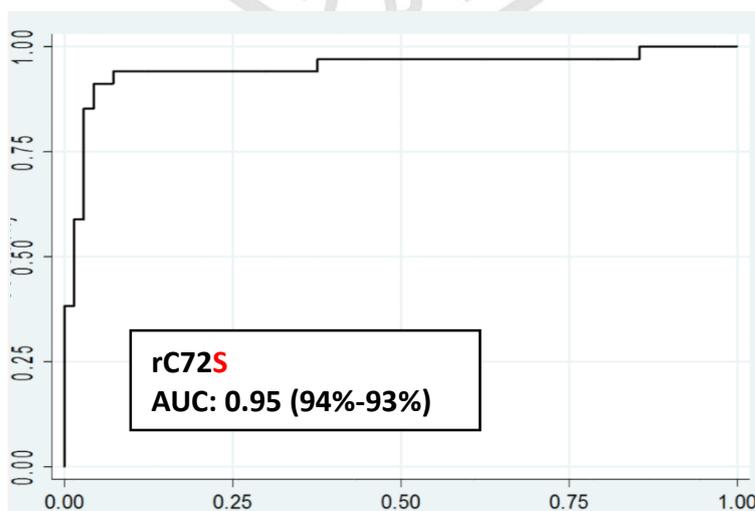
Legenda: AUC (área bajo la curva) = (%sensibilidad – %especificidad)

3.5.3.3 Características de SNPs en el gen *Pfcrt*

El gráfico 3.5.3.3 describe los valores de área bajo la curva y de SNPs en *Pfdhps* para C72S el único SNP polimórficos en la población en estudio y clave para fármaco-resistencia a CQ en el Perú.

En este caso la prevalencia del SNP fue de 37%, y aunque el AUC es 0.95 con intervalos de confianza de (94%-93%), la forma sinuosa nos da evidencia de los valores encontrados y las múltiples repeticiones de mezclas de ADN 5X y 1X que tuvieron que realizarse para documentar a este polimorfismo.

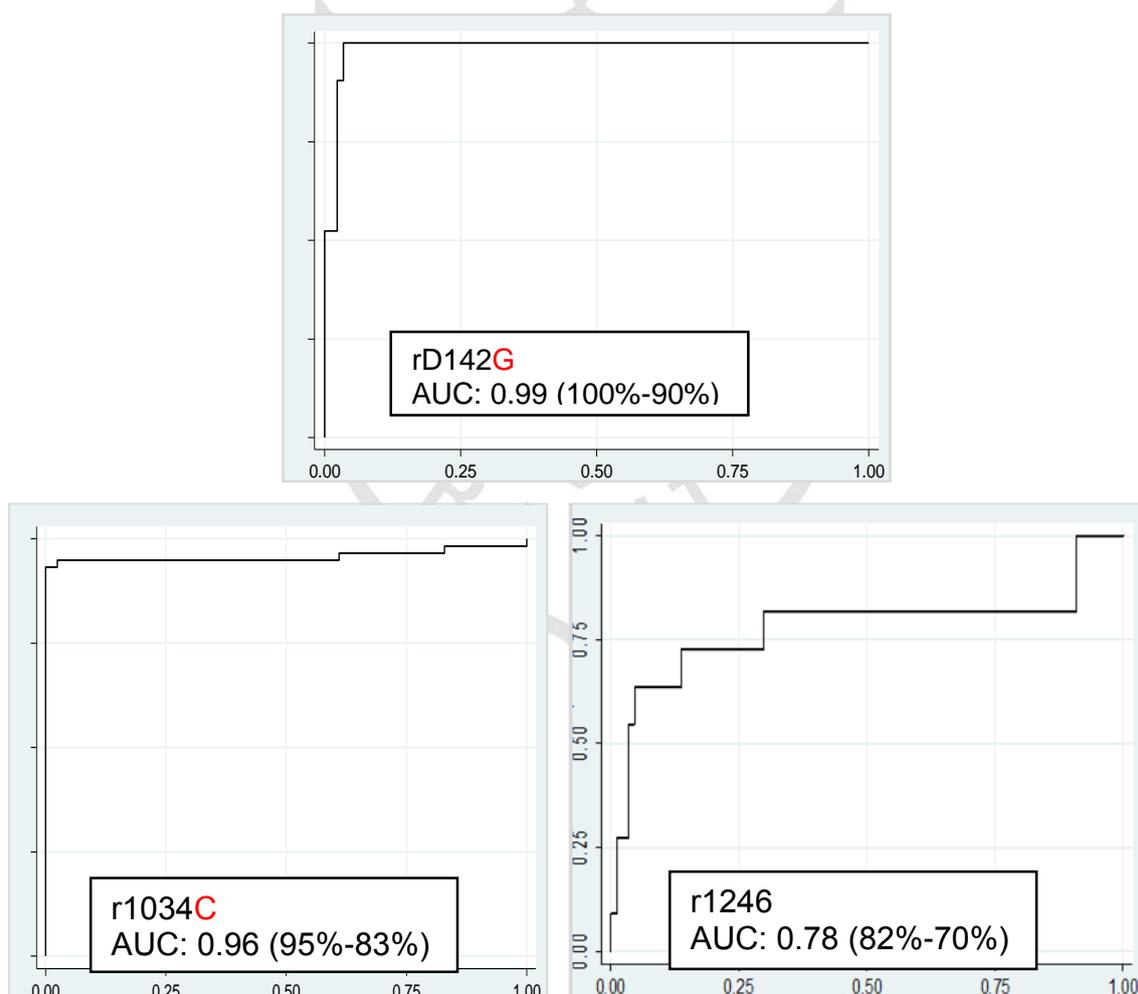
Gráfico 3.5.3.3 Resultados de curvas ROC – gen *Pfcrt*



3.5.3.4 Características de SNPs en el gen *Pfmdr1*

El gráfico 3.5.3.4 describe los valores de área bajo la curva y de SNPs en *Pfdhps* para los SNPs 142 en fragmento A del *Pfmdr1* así como de 1034 y 1242 en los fragmentos 2. Todos están incluidos considerando que el gen esta potencialmente asociado a fármaco-resistencia a MQ y por ser este medicamento es parte de la combinación MQ-AR de primera línea de tratamiento de *P. f.* malaria no complicada en nuestra Amazonia. Tenemos para 142 AUC=0.99 (100%-90%) y para S1034C AUC=0.96 (95%-83%), finalmente tenemos a D1246Y AUC=0.78 (82%-70%), con una prevalencia de alelos mutantes de 11% en una población de 12 voluntarios y representa una curva más sinuosa.

Gráfico 3.5.3.4 Resultados de curvas ROC – gen *Pfmdr1*



Legenda: AUC (área bajo la curva) = (%sensibilidad – %especificidad)

3.5.4 Cálculo de los valores de corte:

Los valores de corte fueron calculados tomando como referencia la sensibilidad e identificando la máxima sensibilidad dentro de los parámetros que habíamos establecido previamente. Los valores crudos copiados de la salida de Stata® 13 están en la tabla 3.5.4, que nos da una visión de las proporciones de alelos silvestres y mutantes, que nos permitieron interpretar los valores de AUC.

Tabla 3.5.4 Valores de corte para el ensayo x-MAP ASPE

	SNPs	Puntos de Corte	
		alelo mutante	alelo silvestre
1	72	0.23	0.78
2	142	0.21	0.79
3	1034	0.28	0.72
4	1242	0.24	0.76
5	437	0.23	0.77
6	540	0.26	0.74
7	581	0.21	0.79
8	50	0.21	0.79
9	51	0.22	0.78
10	108	0.25	0.75
11	164	0.24	0.76

Leyenda: se describe el SNP polimórfico, el valor de radio alélico para el alelo mutante y también el del alelo silvestre

La tabla 3.5.5 presenta los valores calculados comenzando con los valores del radio alélico (RA) mutante para los 11 SNPs polimórficos, seguido del punto de corte seleccionado y los valores de sensibilidad y especificidad correspondientes a ese punto. También se indica el área bajo la curva (AUC) encontrado y el error estándar implicado en un intervalo de confianza al 95%. Finalmente, incluimos el número de muestras que se analizaron por cada SNP considerando que este influye en los valores hallados:

Tabla 3.5.5 Valores de área bajo la curva (AUC), sensibilidad y especificidad – ensayo xMAP ASPE

SNP	Punto de corte RAm	Sensibilidad	Especificidad	AUC	Error Estándar	(95% Conf. Interval)	muestras
72	0.228	94.12%	92.75%	0.95	0.0287	0.89225 1.000	103
142	0.2079	100.00%	89.66%	0.99	0.0083	0.97172 1.000	108
1034	0.27681	94.92%	82.93%	0.96	0.024	0.91119 1.000	100
1242	0.2399	81.82%	70.11%	0.78	0.1068	0.57027 0.98877	98
437	0.2262	91.67%	86.96%	0.95	0.0296	0.89571 1.000	104
540	0.2568	85.71%	90.43%	0.91	0.075	0.76489 1.000	101
581	0.212	92.31%	84.85%	0.96	0.0374	0.88316 1.000	112
50	0.2057	85.71%	82.47%	0.95	0.0427	0.86485 1.000	104
51	0.2228	93.33%	86.32%	0.96	0.0353	0.89581 1.000	110
108	0.2505	100.00%	95.24%	1	0.0026	0.99261 1.000	103
164	0.24	100.00%	60.29%	0.89	0.0573	0.77739 1.000	72

CAPITULO IV: DISCUSION

En este estudio se realizó un análisis retrospectivo de tipo experimental de 181 muestras de ADN con la finalidad de determinar polimorfismos en cuatro genes de *Plasmodium falciparum* asociados con fármaco resistencia a medicamentos antimaláricos de uso común. La prueba de oro que usamos fue la genotipificación por secuenciamiento, Los resultados de la prueba de oro fueron esenciales para el diseño y validación de la prueba de genotipificación simultánea de los mismos polimorfismos usando el método ASPE x-MAP propuesto. Este estudio responde a una necesidad de contar con herramientas para enfrentar el problema de fármaco resistencia en áreas endémicas de malaria como el Perú.

La malaria es una enfermedad emergente en el Perú y la que en estos últimos 20 años presentaba una tendencia hacia la disminución de casos hasta el año 2010, a partir de este período se observó un incremento sostenido de la incidencia de casos. La disminución lograda se debe a los esfuerzos conjuntos de los órganos del MINSA y las DIRESA, así como el seguimiento de resistencia a los medicamentos antimaláricos por el programa nacional de control de la malaria - Perú (PNCM) en el año 1994; se debe también al apoyo brindado por el Proyecto VIGIA entre 1998 y 2007, además del cambio de la política nacional de tratamiento antimaláricos desde el año 1999 con la aprobación del mismo en 2001 ⁽⁹⁾. Es conveniente resaltar la intervención del proyecto de control de la malaria en las zonas fronterizas de la región Andina (PAMAFRO) de Perú, Colombia, Ecuador y Venezuela durante el período 2004-2009 ⁽¹¹⁾.

MALARIA Y FARMACORESISTENCIA

La fármaco resistencia es un grave problema que deben enfrentar los ministerios de salud donde la malaria causada por *P. falciparum* es endémica, primero por la falta de una vacuna muy eficaz ⁽¹³⁾ y segundo por la falta de medicinas disponibles para usar cuando las primeras líneas de tratamiento basadas en combinaciones a base de Artemisinina ya no sean eficaces ⁽⁸⁵⁾. Por esa razón, son permanentes los esfuerzos científicos por descubrir los mecanismos involucrados en el desarrollo progresivo de fármaco resistencia y aquí son evidentes los avances logrados por los análisis de secuenciamiento de nueva generación que sumados

a las herramientas de bioinformática nos brindan información actualizada sobre potenciales nuevos marcadores de fármaco-resistencia que hagan posible diseñar estrategias de vigilancia epidemiológica con la que los países puedan preparar planes de acción de salud pública eficaces para enfrentar este problema ⁽⁸⁶⁾.

Además de documentar estos hallazgos, estas estrategias pueden darnos información que luego podemos usar para el desarrollo de nuevas metodologías de vigilancia epidemiológica para adaptarlas y poder usarlas en nuestros laboratorios regionales y hacer posible la evaluación de estos marcadores en América del Sur. Estas tecnologías son los llamados “métodos de genotipificación” los que fueron desarrollados inicialmente para ser aplicadas al estudio del genoma humano son tecnologías que permiten la amplificación, identificación y detección de SNPs⁽⁵⁰⁾ y que permitió que durante las últimas dos décadas fueran desarrolladas otras técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), los polimorfismos para fragmentos de restricción (RFLP), el secuenciamiento de ADN y determinación de ciertos microsatélites asociados ^{(55) (53)}., los que en la actualidad se han convertido en poderosas herramientas para la evaluación de la resistencia *in vitro* de *P. falciparum* frente a drogas antimaláricas. Estas herramientas son muy importantes particularmente en este siglo cuando los medicamentos antimaláricos son muy escasos y ante la falta de más alternativas solo nos queda usarlos con sabiduría o reciclar los principios activos para luego usarlos en nuevas alternativas de combinaciones de tratamientos.

En nuestros laboratorios locales necesitamos metodologías de laboratorio disponibles para analizar miles de muestras como las que se deben analizar en casos de brotes y cuando es necesario dar resultados rápidos y confiables y esto es posible solo usando métodos que usen soporte sólido como los array. Pero estos métodos tienen la desventaja de estar aún en desarrollo y por lo tanto los costos de reactivos y equipos, la falta de personal adecuadamente capacitado para hacer estos trabajos y que puedan estandarizarlos rápidamente y de otro lado su falta de reproducibilidad y poca flexibilidad son algunos hechos que aún están pendientes por ser vencidos. Estas dificultades se vieron resueltas con la combinación de dos estrategias como la citometría de flujo ⁽⁷⁷⁾ y la introducción

de las microesferas de poliestireno. De esta forma fue posible diseñar ensayos multiplex para genotipificación de alto rendimiento y que eran de fácil desarrollo y mínimo esfuerzo para ser optimizados. Estas estaban basadas en el uso del sistema LabMAP™ de Luminex.

USO DE LOS MARCADORES MOLECULARES

Nuestro interés en el análisis de marcadores moleculares responde a una línea de investigación que se inició a inicios de los años 2000 con la validación de los marcadores asociados a resistencia a la combinación Sulfadoxina-Pirimetamina que tiene como blanco a las enzimas *Pfdhfps* y *Pfdhps* y determinar su uso como pruebas *in vitro* ⁽²⁵⁾ y que luego sirvió para documentar su utilidad y contribución como herramienta de epidemiología molecular para vigilancia de emergencia de genotipos mutantes de ambos genes circulantes en el Perú y que fueron publicadas en el 2009 por Bacon et al ^(51, 87). Este esfuerzo se realizó como una alternativa considerando las implicancias logísticas de llevar a cabo ensayos clínicos *in vivo* y también debido a las dificultades que encontramos para realizar pruebas de sensibilidad *in vitro* en las que se depende del crecimiento del *Plasmodium falciparum* y de herramientas adecuadas de diagnóstico por microscopia, presupuesto y personal entrenado para mantener la capacidad de los cultivos *in vitro*.

Así pues, de la misma forma en que las pruebas *in vitro* son útiles, los marcadores moleculares también pueden ser usados para determinar patrones de fármaco resistencia a medicamentos antimaláricos de uso común en países endémicos de malaria; la utilidad de estas herramientas es esencial para documentar el estado basal de susceptibilidad a estos antimaláricos de una población de parásitos antes de iniciar el uso de una medicina nueva en una región determinada y de otro lado pueden ser útiles para monitorizar la susceptibilidad de los parásitos en tiempo y espacio de frente a un antimaláricos que ya no se usa en el área⁽⁸⁸⁾ según se documenta en la literatura en países africanos en los que CQ ya no se usa pero se monitoriza para documentar reversión a la sensibilidad^{(88) (89)}.

Este tipo de estrategias se aplica en situaciones cuando una combinación de medicamentos se usa y en lugares donde es logísticamente imposible realizar estudios de eficacia *in vivo* para cada uno de los componentes de la mezcla de medicinas en uso como sucede con la combinación SP, en consecuencia valoramos tener disponibilidad de las pruebas *in vitro* y poder usarlas como poderosas estrategias de vigilancia de la susceptibilidad a cada uno de los componentes de estas combinaciones de medicinas⁽⁹⁰⁾ este mismo concepto puede ser extendido a los métodos moleculares.

El uso de los marcadores moleculares ofrece muchas ventajas incluyendo la disponibilidad de una cantidad mínima de material genético, independiente de la necesidad de contar con la presencia física del hospedero y de los factores ambientales que rodean a las áreas endémicas de malaria, y de forma más resaltante la capacidad de conducir una gran cantidad de pruebas de laboratorio en un tiempo razonablemente corto. Los marcadores moleculares nos brindan información de fácil interpretación y generalización de su uso en laboratorios similares que tienen que realizar trabajos de vigilancia de emergencia de fármaco-resistencia, en consecuencia el ensayo x-MAP ASPE cumple todos estos requerimientos⁽⁹¹⁾.

USO DE SISTEMAS MUTIPLEXADOS Y MICROESFERAS

Son variadas las aplicaciones que requieren el uso de sistemas multiplex y micro esferas, entre estas tenemos inmunoensayos, cuantificación de citoquinas⁽⁹²⁾, identificación de bacterias, virus y parásitos⁽⁷⁶⁾, pruebas HLA, pruebas autoinmunes, ensayos de fosforilación de proteínas y también la genotipificación de SNPs.⁽⁵⁸⁾ Existen tres diferentes métodos para la identificación de genotipos de SNPs usando estrategias enzimáticas: primero la identificación por oligoensayo (OLA)⁽⁹³⁾ y segundo la extensión específica de la base de un alelo (SBCE)⁽⁹⁴⁾ ⁽⁸³⁾⁽⁹⁵⁾. En estos métodos, una molécula fluorescente actúa como reportero que es enzimáticamente agregado a la sonda de captura para determinar en el genotipo del SNP (Gráfico 1). Para un SNP determinado, el método OLA permite el análisis de diferentes alelos en el mismo tubo de ensayo, mientras que el SBCE requiere de dos reacciones separadas es decir un tubo para cada alelo. Una tercera estrategia está representada por la extensión específica de alelo (ASEP)⁽⁹⁵⁾, ⁽⁹⁶⁾,

esta es una metodología que requiere el uso de DNA polimerasa. Las sondas de captura ASPE, diseñadas como oligonucleótidos específicos de alelo que terminan en la base polimórfica, son idénticas a las sondas de captura OLA. En esta estrategia, los dNTPs marcados son usados en lugar de un dNTPs sin marcar que estará ubicado en el lado 3' terminal de la cadena, permitiendo así el análisis múltiplex de SNPs con varias mezclas de variantes alélicas⁽⁵⁹⁾.

CARACTERÍSTICAS RESALTANTES DEL ENSAYO X-MAP ASPE PROPUESTO

El ensayo de minisequenciamiento x-MAP ASPE diseñado para la genotipificación de SNPs asociados con resistencia a medicamentos antimaláricos se compone básicamente de cuatro pasos: 1) discriminación alélica por PCR de ADN genómico en una reacción enzimática en solución, 2) captura de los productos de la reacción enzimática por hibridación de secuencias de ADN (códigos ZIP) en la sonda de captura con secuencias complementarias en la superficie de la micro esfera y 3) el análisis de citometría de flujo de las micro esferas para identificar tanto a la población de micro esferas y también a la señal fluorescente asociada con un genotipo. ⁽⁹⁷⁾ ⁽⁵⁹⁾. Finalmente requiere de un sencillo análisis de datos, basado en las proporciones entre la fluorescencia emitida por el alelo silvestre en comparación con el mutante. Continuación trataremos las características finales del ensayo diseñado.

Método de purificación

La elección del método de purificación fue crucial para lograr la estandarización del método de minisequenciamiento Exo-SAP afectaba la cantidad de producto final obtenido, además su adquisición era muy difícil así como el procesamiento que requería de una incubación, por esa razón optamos por usar el mismo método de purificación que para la prueba de oro.

Diseño de oligonucleótidos cebadores de diagnóstico ASPE

El programa de cómputo para el diseño de oligonucleótidos cebadores fue inicialmente el software TAG-it que nos ayudó a realizar esta tarea, desafortunadamente fue desactivado y al no contar con otro recurso exploramos la posibilidad de hacer un trabajo manual que aunque tedioso es factible de ser realizado. Una vez encontrada la secuencia que contenía al SNP de interés,

debíamos calcular el T_m adecuado que por recomendación de Luminex debería estar entre 50-56⁰ C, se podían agregar más bases nucleotídicas al final de la secuencia del cebadores, estos pueden tener desde 25 hasta 40 o 50 pares de bases, tanto como lleguen al T_m deseado. El siguiente paso que hacer un BLAST con secuencias del GenBank para verificar el máximo de homología con *Plasmodium falciparum*. Después que comprobamos que estos tres factores se cumplían, entonces se procedía a ordenar la síntesis de nuevos cebadores.

Los oligonucleótidos diseñados para el ensayo x-MAP ASPE pasan por un proceso de extensión para detenerse en la base complementaria del extremo terminal 3' y fueron diseñadas de tal forma que la temperatura de hibridación estará entre 51-56°C. Se puede hacer uso de un programa de cómputo para la selección de una secuencia TAG que es básicamente la que se encuentra adherida a la micro esfera seleccionada para la detección que se incorpora en el extremo terminal 5'. En realidad nuestro el ensayo ASPE tiene un particular contenido de GC contribuye a la variabilidad observada. El Plasmodium tiene un genoma particularmente rico en AT, ser resolvió este problema incrementando el número de bases en la secuencia de la sonda para alcanzar la temperatura de hibridación a la que se someten a todas las sondas de diagnóstico es de 55⁰ C. Las sondas llegaron a tener un tamaño promedio entre 50-60 bp el costo en general es un poco más caro que un oligonucleótido cebador regular y varía según el método de purificación usado. De otro lado la concentración que se indicó para la síntesis variaba entre 0.50 D hasta 0.5 nmol y en promedio alcanzan para preparar unas 20,000 reacciones.

El diseño de los oligonucleótidos cebadores fue una pieza clave para la optimización del ensayo de minisequenciamiento, no siendo necesario hacer modificaciones ni mejoras en las secuencias ya que comprobamos que estas no ayudaban a incrementar la especificidad de la hibridación, pero si tuvimos mucho cuidado de que todos los oligonucleótidos cebadores de diagnóstico tuvieran un promedio de T_m para todas. Como no existe ningún software comercial disponible para evaluar a las sondas para ser utilizado en ensayos multiplexores, cada secuencia fue "comparada" contra la secuencia del genoma de *Plasmodium falciparum* usando la página web: (del <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>)

y así como la página web de la empresa sigma quien era el proveedor de los cebadores para confirmar que las sondas no presentaban horquillas o complementariedad del uno mismo en cada una.

Las sondas en sentido fueron las más elegidas; sin embargo optamos por sondas anti sentido para evitar SNPs superpuestos o adyacentes como en el caso de C50R y N51I en *Pfdhfr*. Una de las principales dificultades que tuvieron que superar fue la detección de Glicina en dos codones consecutivos A436G y A437G en *Pfdhps*, así mismo de C72S y K76T en el gen *Pfcrt* o de los SNPs S1034C y N1042D en el gen *Pfmdr1*, consideramos que en la exactitud de tales casos deben ser verificados en estudios futuros antes de proceder a multiplexar los ensayos.

Cabe resaltar que la síntesis de oligonucleótidos cebadores fue una dificultad que tuvimos que vencer por el tiempo que demoraba el proceso de compra, no menos de tres meses, lo que prolongaba mucho el tiempo entre la detección de una falla y la necesidad de mejorarla la orden del cebador, la llegada y nueva estandarización, que en promedio tomaba 6 meses que no son necesariamente de trabajo. Estos problemas no se presentan en países donde se cuenta con servicios de síntesis de cebadores.

Elección de reactivos para la extensión específica de alelo

Una ventaja del ensayo x-MAP ASPE es la elección de la enzima para la fase de extensión específica de alelo. Cabe resaltar que Luminex recomienda el uso de una enzima Taq ADN polimerasa de alta fidelidad para genotipificación. Sin embargo optamos por usar la misma Taq ADN Polimerasa recombinante de Invitrogen que es la misma usada para las amplificación de las secuencias objetivo. Tomamos esta decisión después de realizar pruebas y ver que los problemas de especificidad podrían ser resueltos realizando modificaciones en el diseño de los cebadores. Sin embargo, es probable que las dificultades observadas para obtener resultados de algunos polimorfismos se hayan podido resolver usando una enzima Taq específica para genotipificación, esta es una pregunta que futuros estudios podrían resolver.

Uso de dideoxinucleósidos trifosfato (ddNTPs) biotinilados

Con respecto al uso de los ddNTPs marcados con biotina, inicialmente se usaron los cuatro ddNTPs (A, C, G y T) biotinilados, y al verificar que las pruebas 1X eran muy precisas y que se podría reducir costos y número de reacciones usando solo C* junto con la secuencia TAG. Es así que decidimos usar la fórmula que requiere a dCTP-biotinilado, para desarrollar un ensayo debía ser económico y que así este pueda estar disponible y ser usado en la realidad de un país endémico de malaria. En la literatura hay diferentes ddCTP marcados con biotina sin embargo optamos por el de Invitrogen porque su importación hacia el Perú es más factible.

Condiciones de la reacción de extensión específica de cebadores

Las condiciones de ciclaje para estas reacciones de extensión fueron: un ciclo de denaturación inicial de 96°C por 2 minutos, seguido de un ciclo denaturación de 94°C, 30 segundos, hibridación 55°C, 1 minuto y extensión de 74°C por 2 minutos por un total de 35 ciclos y posteriormente las mezclas mantuvieron en un ciclo final a 4°C⁽⁸³⁾ (73). Estas condiciones fueron universales, es decir fue el único protocolo usado ya sea para un gen en un tubo o para cada una de las reacción de extensión para cada uno de los 4 genes en una reacción, con las mismas concentraciones de reactivos y temperaturas PCR por lo tanto concluimos que es factible que múltiples genes puedan analizarse en una sola reacción. Antes de llegar a esta conclusión y como parte del proceso de validación, usamos diferentes temperaturas de hibridación y no obtuvimos mejores resultados por lo tanto la lectura de las hibridaciones se realizó a una temperatura estándar de 55°C, nosotros optamos por esta al realizar varias pruebas con nuestros SNPs problemáticos (72 y 76) usando la temperatura de melting propia del cebador según el cálculo del software para diseño del mismo, sin embargo probamos unas veces hasta decidir que no podíamos buscar una temperatura para cada uno de los 5 fragmentos de PCR, además esta temperatura estaba en el rango de la temperatura que usamos para las reacción de secuenciamiento BDT. Estas observaciones agregan a las ventajas que nos brinda el ensayo de genotipificación diseñado, sobre todo por el amplio rango de tamaño de los

amplicones que usamos para el análisis, estos fueron desde 600bp hasta 1200 bp.

Hibridaciones y manipulación de microesferas

Las hibridaciones fueron más eficientes cuando se usó el “MaxQ 4450 Incubated Shaker – Thermo Scientific” ya que cumplía con el concepto del ensayo de trabajar con un sistema de “microesferas en suspensión” e incubadas a 37^o C. Observamos que se obtienen mejores resultados cuando se usan micro esferas frescas, por lo que sugerimos descongelar un lote recién llegado y usarlo según indica el fabricante en menos de 6 meses que es la vida media en refrigeración a 4^o C evitando ciclos de congelación y descongelamiento frecuentes.

Número de microesferas usadas

El ensayo que diseñamos es único por la reducida cantidad de micro esferas que logramos usar para obtener reacciones eficaces. En realidad, las instrucciones de Luminex son usar 2500 de cada una de las 100 micro esferas Flex-MAP escogidas. En nuestros experimentos nosotros pudimos obtener resultados muy precisos usando la décima parte de micro esferas, es decir ~ 250 micro esferas. Para incrementar la sensibilidad del diagnóstico preparamos reacciones por triplicado, para en caso de una falla en lecturas pudiéramos disponer de dos lecturas para poder promediarlas y obtener un valor de MFI para cada SNP en estudio.

Método de lavado empleado

Entre los métodos de lavado que disponíamos probamos dos métodos, tanto el método de centrifugación vs el uso de placas con filtro con uso de vacío. Pudimos concluir que aunque la centrifugación es más económica, es también menos práctica, demanda más tiempo para los lavados y es más tediosa. En cambio aunque más costoso, pero más práctico y más rápido el método de filtración por placa fue finalmente empleado para este ensayo

El ensayo propuesto tiene muchas ventajas, entre ellas: la asignación de las microesferas puede ser manual, basta con reasignar las secuencias TAG otro cebador y se puede seguir trabajando sin mayores problemas. Sin embargo, es

mejor es mejor tener un SNPs con esferas ubicadas en diferentes áreas del espectro Bioplex, se evitaron usar números secuenciales para evitar superposiciones que no seríamos capaces de interpretar al analizar los datos. Además por las dificultades para obtener las microesferas no nos quedaba otra alternativa que reasignarlas para poder usar a las que teníamos disponibles en el laboratorio.

Con respecto a la cantidad de ADN usado, tomamos en cuenta que la precisión que deseábamos alcanzar con el ensayo dependía de un excelente desempeño de la reacción en cadena de la polimerasa como de procedimientos de optimización de análisis que necesitábamos y que requeríamos como mínimo 50 ng del producto de PCR para obtener resultados precisos usando los ddNTPs marcados específicos para alelo y que requeríamos 100 ng como mínimo para las reacciones multiplex para identificar SNPs en cada uno de los genes. Y de formar muy especial para los ensayos múltiples con 44 sondas que requería de 100 ng a 1 µg de producto de cada fragmento de amplificación purificado.

Programas de recolección de datos: xPONENT® vs Bio-Plex Manager™ v6.0

El ensayo ASPE, es una prueba desarrollada en casa por los laboratorios NAMRU-6 y presenta varias diferencias en comparación con los ensayos y kits fabricados por Luminex corp. La empresa que fabrica las microesferas: por ejemplo, Luminex tiene su propio programa de recolección de datos el llamado xPONENT® , este provee un archivo de salida con resultados pero también requiere de incluir controles internos para realizar la corrida; una desventaja es que requiere que las lecturas de validez se decidan de forma manual. Nosotros usamos el programa Bio-Plex Manager™ v6.0 que venía incluido en el sistema operativo del lector Bioplex-100 Biorad™. Este es un sistema más amigable que nos ayuda a realizar las corridas y obtener resultados de forma rápida, tiene un kit de validación que debe correrse mensualmente así como un kit de calibración que debe correrse a diario y también después de cada 4 horas de corridas. Estos kits preparan al equipo para la lectura de forma automática lanzando alarmas de errores antes de proceder a la lectura, esta es una ventaja ya que no hay que ver por fallas en medio de una lectura y nos da parámetros con los que el usuario puede trabajar de forma independiente.

El entrenamiento en el manejo del equipo Bioplex-100 Biorad™ es sencillo, en nuestro caso este fue gradual aprender-haciendo, realizado en el laboratorio posterior a la recepción del equipo Bioplex-100 Biorad™. Una de las desventajas de usar un citómetro de flujo de este tipo es que el equipo requería de un ambiente dedicado de trabajo, libre de vibraciones y movimiento por lo que al ser movido por trabajos de construcción tuvo que ser calibrado por el ingeniero de campo, por lo tanto cada visita del servicio técnico representaba una oportunidad más de aprender más del equipo y una estrategia de entrenamiento. Contamos con asistencia técnica de BIORAD USA para aspecto de diseño del ensayo y operación del equipo. De otro lado recibimos asistencia técnica de la Dra. Sherry Dunbar y Dr. Stephen Angeloni de Luminex Corporation, para tratar aspectos de validación del ensayo. Afortunadamente a la fecha existen representantes de ventas en el Perú que proveen entrenamiento en el manejo del equipo y asistencia técnica en caso de requerir reparaciones.

OTRAS ESTRATEGIAS APLICADAS A LA INVESTIGACIÓN EN MALARIA: ESTRATEGIA OLA

Entre las tres estrategias, hay una que se ha aplicado con éxito a la investigación de la malaria, la LDR-FMA basada en la oligoligación, ha sido usada para tres diferentes e importantes aspectos de vigilancia, 1) diagnóstico de las 4 especies causantes de paludismo en humanos⁽⁴⁰⁾ 2) Genotipificación de SNPs en *Pdhfr*, *Pfdhps* y *Pfcr1*⁽⁹⁸⁾ y 3) el análisis de la proteína de enlace de Duffy de Pv, (Pvdbp)⁽⁹⁹⁾, aunque exigen el uso de ligasa y también de sondas marcadas con biotina todos fueron que fueron validados usando ya sea PCR en tiempo real, un método de análisis heurístico y al secuenciamiento respectivamente como las pruebas de oro para validación. El método para diagnóstico de especies de malaria basado en OLA ha sido adoptado por la OMS para diagnóstico de especies del paludismo.⁽¹⁰⁰⁾

LAS VENTAJAS DE LA ESTRATEGIA X-MAP ASPE VS OLA

Comparado con el LDR-FMA para detección de SNPs, el ensayo ASPE puede interrogar a un total de 21 sitios polimórficos en los 4 genes, 13 en *Pdhfr* incluyendo a A16V y C50R, que no fue incluido en la estrategia de la OLA, así mismo puede documentar 12 sitios polimórficos en el gen *Pfdhps* y es capaz de

detectar una infección mixta en A581G utilizando controles positivos apropiados para un total de 11 de los 12 SNPs estudiados. Por otra parte también pudimos identificar 8 sitios polimórficos en el gen *Pfcr1* así como 13 más en los dos fragmentos del gen *Pfmdr1*, incluyendo al SNP 142 prevalente en las muestras Peruanas.

Aunque fue posible usar la fluorescencia en unidades de MFI para validar el ensayo de forma muy rápida, sin embargo algunos SNPs requieren de algunos análisis más y son específicamente los SNPs que contienen al aminoácido Phe como *Pfdhps436* y *Pfmdr186*. Decidimos no presentar datos al respecto y sugerimos que más evaluaciones se realicen en áreas endémicas donde estos SNPs sean prevalentes, antes de considerar a estos SNPs como validados. Por esa razón nuestros resultados finales solo reportaron 44 oligonucleótidos cebadores de diagnóstico validados. Sin embargo, podríamos afirmar que el ensayo es 100% eficiente ya que en estos casos dificultosos podríamos utilizar el dinucleótido trifosfato complementario específico marcado con biotina para que el diagnóstico sea más rápido y no requiera análisis más elaborados, aunque esto encarecería el ensayo.

VALIDEZ Y PRECISIÓN DEL INSTRUMENTO

Esta plataforma universal en “array” es una poderosa herramienta que puede aplicarse a cualquier campo de la investigación científica y que requiere dos pasos esenciales para este objetivo, primero son las amplificaciones de PCR que deben ser optimizadas para un objetivo particular y en segundo lugar la optimización del ensayo de minisequenciamiento, que puede tomar tiempo básicamente en términos de diseño de las sondas de diagnóstico para lograr alcanzar una buena especificidad que es extremadamente importante al diseñar una prueba de diagnóstico.

Para estudios de asociación con marcadores SNP, muchos nuevos ensayos de genotipado deben desarrollarse rápidamente para cientos de muestras de la prueba. Por lo tanto, la facilidad de optimización e implementación de la nueva metodología son muy importantes. Con estos requisitos en mente, el ensayo de

extensión de cebadores son los más versátiles y más económicos de desarrollar.

(53)

VALIDACION CLINICA DEL ENSAYO

Los controles usados fueron esenciales para poder estandarizar y validar las reacciones de extensión específica de alelo, por esa razón usamos cepas de referencia de *P. falciparum* que teníamos en el laboratorio, al inicio algunos resultados fueron discordantes con datos de la literatura, lo que nos obligó a secuenciar cada una de las cepas para así determinar que ciertas clonas habían sido seleccionadas durante el proceso de cultivo continuo *in vitro*, específicamente la cepa 7G8 que considerábamos la referencia regional para América del Sur. Decidimos usar el mayor número de cepas para estandarizar un ensayo que pueda ser usado en las Américas o en cualquier otra área geográfica endémica de malaria.

De otro lado vimos que se obtuvieron resultados más precisos al utilizar muestras de pacientes también utilizamos muestras como los controles internos. Para controles nos aseguramos de usar estándar cepas (los cultivos de Pf nos aseguraban la obtención de resultados exactos). De esta forma tratamos de cubrir, en una mayor cantidad de codones posibles para la validación del ensayo. El control negativo/blanco, fue agua para PCR libre de ADN/RNAasas, para todas las amplificaciones, para las hibridaciones se usó agua sin previo tratamiento en época de la de esta nos daba un valor de PCR es la MFI de la micro esfera usada. No consideramos necesario usar muestras de ADN humano como controles negativos por no ser el objetivo de este análisis y porque los permisos del comité de ética no consideraban esta variable.

Por esa razón es que fueron escogidos para amplificar al material biológico disponible fue ADN extraído de sangre total anti coagulada con EDTA o bien de papeles de filtro Isocode Stixs y que habían estado congeladas por varios años a -20C. Cabe mencionar que nosotros tuvimos mucha dificultad para obtener amplificaciones del AL ULL y PH de donde proveían los papeles de filtro Isocode stixs, se trató de amplificar en dos o tres oportunidades antes de decidir extraer ADN fresco de algunos papeles de filtro disponibles y preparar más

amplificaciones para obtener la cantidad suficiente de templado para las reacciones de mini secuenciamiento que requerían de 500 ng a 1µg de ADN. Es cierto que los papeles de filtro son útiles para toma de muestras en zonas remotas como AL, PH y ULL sin embargo las dificultades observadas hacen que se evalúe esta estrategia para futuros estudios de genética sobre todo porque nuestra institución ya había documentado en el pasado las limitaciones del uso de los Isocode Stix ⁽¹⁰¹⁾. Es conveniente resaltar que este papel ya no está a la venta en la actualidad, pero si contamos con alternativas más eficientes para ese propósito.

SECUENCIA DE VALIDACIONES

Además, se usaron muestras con genotipos ya sea silvestres o mutantes en los codones en evaluación. Las validaciones fueron secuenciales. Primero en reacción en tubos separados para validar cada una de las sondas de diagnóstico en reacciones separadas una para detección del alelo silvestre y otra para detección del alelo mutante. Segundo, las reacciones dúplex permitieron la detección simultánea de los alelos silvestres y mutantes en un solo tubo.

En la siguiente fase, primero se procesaron las reacciones de estandarización de las mezclas para cada uno de los genes (multiplex 1X) de *Pfdhfr*, *Pfdhps*, *Pfcr1* o los dos fragmentos de *Pfmdr1* permitieron la detección simultánea de alelos en un gen en particular. Segundo, se procesaron las reacciones multiplex 5X permitieron la detección simultánea de todos los alelos en estudio y será la que se utilizara para la recolección de datos, es decir realizar el diagnóstico con las 44 sondas en una sola reacción en un solo tubo.

Según búsqueda bibliográfica este sería el primer ensayo de extensión de cebadores publicado en investigación de la malaria usando micro esferas y tecnología FlexMAP™. Como algunos otros grupos que han utilizado la tecnología de ensayo FlexMAP™, optimización fue el que demandó mucho de nuestro tiempo en trabajos de laboratorio, después se logró ejecutar unas 100 muestras por triplicado y fue posible completar este trabajo en una semana de trabajo de 8hr diarias, un total de 192 pozos puede analizarse en 6 horas de trabajo, ningún análisis de secuenciamiento de uso rutinario pueden prever

resultados 5 genes en el mismo período de tiempo. Procesamiento las 180 muestras que fueron seleccionadas para la validación tuvo 6 meses.

Una característica adicional del ensayo x-MAP ASPE es la precisión para detectar las infecciones múltiples, según lo demostrado por los resultados obtenidos para un SNP Ala581Gly en *Pfdhps* con MFIs similares para el tipo salvaje y el alelo mutante (IMF = 24.000) con un control negativo válido, esto no fue un artefacto como la secuencia reveló la presencia de ambos alelos en la misma posición. Esto nos dio una idea del radio alélico que deberíamos alcanzar para darle capacidad de discriminación al ensayo, ya que una resultado mixto nos reportaba 50% de cada alelo en un pozo determinado por lo tanto un RA=0.5 era nuestro punto de corte para mixto y no podría ser utilizado para diagnóstico.

ESTRATEGIA DE ANÁLISIS DE DATOS

El número total de muestras secuenciadas fue de 171, y aunque no se pudo documentar las 44 variables en estudio para cada una de las muestras se tomó la decisión final de incluirlas a todas con resultados parciales ya que al explorar las estrategias de análisis de datos, las variables polimórficas con muy baja prevalencia (540, 51 y 164) nos daban resultados de AUC con una baja sensibilidad o especificidad. Por lo tanto, el número de muestras analizado es 171.

Las razones por las que no pudimos documentar todas las variables fue por la pobre calidad de ADN obtenido o por la cantidad de ADN purificado requerido (100ng-1µg). Otra razón fue la ubicación de los SNPs, fue más difícil documentar SNPs localizados en los extremos de las secuencias de interés del gen *Pfdmr1*. Según literatura y de Luminex sabíamos que los Radios Alélicos eran la estrategia necesaria para poder determinar la capacidad diagnóstica de nuestro ensayo, sin embargo decidimos tomar recursos de validación de pruebas diagnósticas para establecer los valores de corte para los 11 SNPs polimórficos.

Partimos de la premisa que la sensibilidad estaba asegurada por las validaciones bioquímicas que usamos al inicio de la estandarización del ensayo y porque

durante el proceso de trabajo ya habíamos establecido valores de corte cualitativos habiendo observado una buena sensibilidad del ensayo.

Luminex usa tres parámetros para determinar corridas validas 1) MFI, 2) valores de los eventos detectados por los programas de cómputo en este caso x-PONENT 3) cantidad de esferas recuperadas luego de la corrida. Los parámetros que Luminex establece es que 1) los valores deben ser mayores de 200 MFI es decir ese es el límite de detección del blanco. 2) los eventos registrados como histogramas deben darnos valores que según usamos más esferas o queremos diagnosticar más TAGs entonces deben sumarse y llegar a más 300 – 1000 eventos registrados 3) el número de esferas registradas al final de las corridas debería ser de mínimo 100 por pozo analizado

Este proyecto se inició a finales del 2005 con el objetivo de desarrollar una prueba cualitativa de diagnóstico donde el punto final era determinar la proporción resultante de la detección entre los alelos de un determinado SNP. Este objetivo fue finalmente traducido en valores de Radio Alélico y los resultados preliminares presentados el 2007⁽¹⁰²⁾. Los experimentos de estandarización concluyeron después de agregar Pfm1 a nuestro panel de diagnóstico. Las validaciones se llevaron a cabo entre el 2010 y 2011. Posteriormente iniciamos los análisis de datos. Debemos resaltar que una fortaleza del ensayo que proponemos es la facilidad con la que se pueden analizar e interpretar los datos, un aspecto que la estrategia OLA no puede lograr hasta el día de hoy⁽¹⁰³⁾.

La mayor dificultad fue determinar el tipo de análisis que debíamos realizar. Según realizábamos nuestra búsqueda bibliográfica, encontramos que podríamos aplicar principios usados en ISO (International Organization for Standardization), estos fueron los conceptos de límite de detección (LOD) y el Limite del blanco (LOB)⁽¹⁰⁴⁾. De esta forma podríamos calcular diversos parámetros como coeficiente de variación entre alelos o entre placas y el uso de las desviaciones estándar para determinar un diagnóstico⁽¹⁰⁵⁾.

Pero cuando exploramos las características de los datos de MFI encontramos que la distribución de las variables incluyendo al blanco no tenían una “Distribución

Gaussiana” y que tampoco teníamos disponible una curva de calibración de donde extrapolar valores. Por lo que decidimos usar un procedimiento parcialmente paramétrico⁽¹⁰⁴⁾.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO NO PARAMÉTRICO

Las características de las muestras son similares a las de los blancos y el objetivo de la optimización del ensayo con una baja cantidad de micro esferas que al final demandaba usar grandes cantidades de ADN, habíamos sesgado el análisis para evitar encontrar bajos valores de fluorescencia, por esa razón no buscamos la detección de bajas cantidades de ADN. El tamaño total de las muestras es considerable, fueron aproximadamente 1000 registros, de estos 70 son blancos.

El artículo de Linnet y Kondratovich describe el concepto que usamos para el análisis estadístico de datos “Para una muestra de tamaño n , realizamos la distribución no paramétrica determinada por el percentil 95% de las mediciones de los blancos (obtenidos como como el valor de $[n(95/100) + 0.5]$ de las observaciones ordenadas) define el límite de los resultados que significativamente exceden al cero [límite del blanco (LoB)]” ⁽¹⁰⁴⁾. Este principio de uso para los blancos, y descartamos todos los valores de blancos superiores a 500 pues pueden haber valores que se generan por manipulación de las micro esferas las que al final se aglutinan y pueden generar valores de 500, 1000 o casi 20000 MFI. Al determinar el LoB podemos trabajar con los datos de las muestras usando el percentil 95%.

El siguiente paso fue promediar los datos, no usamos los valores de medias ni otro parámetro porque al igual que los blancos las muestras también tiene una distribución asimétrica.

Uso de los Blancos – distribución asimétrica

El número de blancos presentes en la base de datos final es de aproximadamente 70 valores, estos fueron preparados usando agua en lugar de ADN para las reacciones de hibridación; estos valores fueron colectados en días, horas, semanas diferentes por lo que representaban la variabilidad de los ensayos. Como concluye Armbruster, estamos de acuerdo en que se debería realizar una caracterización completa del desempeño analítico del ensayo para así poder

entender bien las ventajas y limitaciones que nos ofrece y los tres parámetros de límites de detección son excelentes para este propósito y posterior aplicación en áreas de laboratorio clínico. Además el ensayo de minisequenciamiento es una prueba desarrollada en un laboratorio investigación y que de ser transferida a un laboratorio regular de análisis clínicos deberá ser probada para realizar una “validación adicional” para objetivos de trabajo en laboratorio clínico con un mínimo de muestras y reactivos⁽¹⁰⁶⁾, la misma sugerencia aplica si fuera requerido de más validaciones para ser considerado una prueba de diagnóstico de biología molecular bajo acreditaciones internacionales como CLIA⁽¹⁰⁷⁾

Uso de los valores de Fluorescencia - Blanco

AL decidir usar como referencia al concepto del uso del blanco no fue necesario usar el parámetro de lectura “MFI menos la sustracción del valor del blanco” (MFI-Blanco) del que disponíamos, considerando que para calcular los valores de blanco requerimos de datos crudos sin procesamiento previo ⁽¹⁰⁶⁾. Además al no usar los valores de los blancos para que al realizar la sustracción evitaríamos generar valores negativos, que no son consistentes con el aspecto biológico del ensayo, ya que la prueba fue diseñada, así mismo consideramos que al no usar el total de microesferas recomendado por el fabricante no era necesario hacer todos estos cálculos. El fabricante no usa los blancos así que encontramos la estrategia para nosotros seguir el mismo principio.

Uso del número de microesferas

Este parámetro no fue usado para el análisis final al no haber sido considerado como una variable de análisis para la estandarización del ensayo. Además, no es factible porque en lugar de usar 2500 microesferas de cada una de las esferas incluidas en el ensayo, nosotros usamos una dilución 1/10, es decir la décima parte de lo recomendado por el fabricante y aunque todas las palcas fueron analizadas con ese valor pre-establecido de captación de 100 esferas, al no lograrlo estaríamos invalidando todos los datos recolectados. Estamos en desacuerdo con este parámetro y no lo usamos para el propósito de este reporte. Es necesario mencionar que si lo consideramos y que realizamos pruebas con 30 muestras que fueron procesadas con la cantidad de micro esferas que indica Luminex, sin embargo los análisis exploratorios que realizamos no dieron los

resultados esperados por el fabricante y que confirmamos que requerimos un excelente molde de ADN ya que al usar los 50ng indicados por Luminex no se logran los resultados esperados.

Valores de MFI y radios alélicos

Después de preparar las tablas con resultados de MFI correspondientes a cada uno de los 4 genes encontramos que estos valores no son los más adecuados para reportar resultados de un SNP, como vemos en los gráficos de barras, los valores de MFI son variables y representan no solo el valor diagnóstico sino también el ruido de cada microesfera. Cada microesfera es adquirida y el fabricante las envía con una hoja de control de calidad que indica del máximo valor de fluorescencia que este puede alcanzar. Además es difícil establecer visual o matemáticamente una proporción entre los alelos silvestre y mutante. Por esa razón es que optamos por una escala de proporciones usada para fines de trabajo de laboratorio, en la que una proporción de 1:10 en reacciones 1X era diagnóstico de un alelo, esta proporción se redujo a 1/5 o 1/4 al realizar el multiplexado de las 44 variables.

A diferencia de los valores de datos crudos, el valor de los RAs si representan a la proporción de los alelos presenten en un determinado SNP, son uniformes, descartamos la variaciones de los valores de datos crudos de MFI y además nos permitió calcular los valores de los RA en general para este ensayo.

Calculo de área bajo la curva (AUC)

Analizamos una muestra por triplicado, para disponer de un número par para poder realizar los promedios considerando que el lector asume que no hubo lectura y solo toma las lecturas válidas. Nosotros decidimos calcular el promedio de las dos primeras lecturas para generar la faltante. Luego se calcularon los Radios Alélicos (RA) y finalmente decidimos usar las curvas ROC (receiver operating characteristic) ⁽¹⁰⁸⁾, ⁽¹⁰⁹⁾.

Sabemos que los parámetros de desempeño de una prueba diagnóstica se representan por la sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo (VPP) y negativo (VPN). Las curvas ROC desarrolladas inicialmente con propósitos de

ingeniera ⁽¹¹⁰⁾, han sido usadas en la literatura médica desde la década de los 60s como una forma gráfica de representar a los parámetros de sensibilidad, especificidad los que son calculados para todos los posibles “valores de corte” que se puedan determinar matemáticamente.⁽¹¹¹⁾

Las 11 curvas ROC que obtuvimos del análisis con Stata ® 13 gráficamente representaron que el ensayo de minisequenciamiento x-MAP ASPE era capaz de diagnosticar la presencia de los alelos mutantes ya que visualmente ninguna estuvo cerca de la “línea de no detección (Línea ND)” representada por las diagonales de las gráficas ⁽¹¹²⁾. Todas las curvas están cercanas a la esquina izquierda por lo que su exactitud es gráficamente evidente. Estas curvas ROC representan un análisis no paramétrico ⁽¹¹³⁾, por lo que esperábamos que varias tuvieran forma de escaleras siendo las más representativas I164L y C50R en *Pfdhfr*, así mismo los dos SNPs en *Pfdhps* (437, 540) y el SNP 1246 en *Pfmdr1*.

Posteriormente calculamos los valores de corte para cada SNP, decidimos establecer como parámetro una Sensibilidad y Especificidad igual o mayor a 70%, en este límite encontramos a D1246Y, con un AUC de 0.96, sensibilidad de 81.82%, y especificidad de 70.11%. Este cálculo resulto de la baja prevalencia de muestras con el alelo polimórfico 1246Y y de 72 muestras que entraron para este cálculo. El caso de I164L es único, con AUC de 0.89, sensibilidad 100.00% y especificidad de 60.29%, que es menor de 70%, se debe a que se consideraron 72 muestras en el análisis de las cuales solo el 7% son mutantes.

No calculamos los VPP, ni VPN considerando que las muestras habían sido sometidas a manipulación estadísticas para eliminar valores similares a los blancos, promedios de valores disponibles para cada uno de los SNPs en particular y porque requería de trabajo manual que inicialmente no formaban parte de esta investigación.

Nuestra interpretación fue basada en el artículo de Zweig y Campbell ⁽¹¹³⁾ y estamos de acuerdo en que las ventajas encontradas son el uso de todos los datos para la confección de la curva los que son reflejados en cada punto de la gráfica y esta provee estimados libres de sesgo de sensibilidad, especificidad y

área ROC. Es cierto que las escaleras que representaban a algunos SNPs son problemáticas de interpretar y que requieren revisión más profunda para determinar el punto de corte. Nuestra base de datos no representaba muchos datos similares, así lo determinamos por revisión manual de cada curva ROC, finalmente es cierto que compara a los puntos observados en una determinada sensibilidad o especificidad por lo que pensamos que es mejor tener un gran número de muestras por analizar para que los puntos de corte sean lo más generalizable posible.

Por esa razón es que una validación con 30 muestras bajo las “condiciones ideales” sugeridas por el fabricante de las microesferas no nos brindó los “resultados ideales” esperados, la explicación es que esta muestra debió ser muy representativa en términos de mayor número de muestras mutante en lugar de dar valor a la distribución geográfica que fue el criterio de selección usado. (Salas C. datos no publicados)

GENOTIPOS ENCONTRADOS CON LA PRUEBA DE ORO

Los perfiles encontrados son semejantes a los hallados por Salas⁽²⁵⁾ y Bacon^(51, 87), quien son los autores que iniciaron los trabajos de genotipificación en muestras de Loreto y que luego fueron confirmados por análisis poblacionales por Griffin⁽⁴⁵⁾ MacCollum. En consecuencia demostramos la importancia de contar con esta herramienta de diagnóstico.

En general el ensayo tiene una alta sensibilidad y buena especificidad para *Pfdfr* y *Pfdhps* y fue posible diagnosticar no solo los SNPs polimórficos sino que además fue factible detectar a los genotipos presentes en estos genes, dobles y triples mutaciones esenciales para trabajos de epidemiología molecular y vigilancia de fármaco resistencia.

Encontramos dificultades para diagnosticar a los 4 SNPs en el gen *Pfcrt*, primero porque están ubicados uno después del otro muy cercano y nos demandó tiempo para poder encontrar a los oligonucleótidos cebadores de diagnóstico más adecuadas. Además influyó el hecho de que los SNPs de nuestro interés científico

- 1) c72S por determinar el diagnóstico de los genotipos presentes en el Perú ya

sea SMNT o CMNT 2) para poder brindar a la comunidad científica la posibilidad de diagnosticar al SNP K76T, de gran interés para poder vigilar el retorno de sensibilidad de *P. falciparum* previamente resistente a CQ, que sería muy útil en países Africanos como en Malawi^(88, 114) donde se viene vigilando el retorno de sensibilidad a esta droga desde que se demostró su resistencia in vivo hace más de 10 años.

En el caso de *Pfmdr1*, contábamos con suficientes controles para documentar la presencia de alelos silvestres y mutantes en ambos fragmentos de PCR, sin embargo encontramos dificultades para poder completar sets de muestras que tuvieran a las 12 variables necesarias. Nuestras mayores dificultades las enfrentamos al trabajar en la estandarización de diagnóstico de los SNPs N86Y y S1034C, N1042D y D1246Y. Cabe notar que los 3 SNPs ubicados en los extremos de las secuencias de interés demandaron más tiempo para poder identificarlos de forma precisa. Tomamos la decisión de usar reacciones de amplificación disponibles en el laboratorio, pero sin considerar que las de *Pfmdr1* habían sido diseñadas para poder cubrir 730 bp en un intento de usar los mismo oligonucleótidos cebadores para las reacciones de las amplificaciones para las reacciones de secuenciación. Además el molde de ADN necesario para obtener lecturas de MFI definidas y de nivel diagnóstico debía alcanzar concentraciones de 200 ng para las reacciones multiplex de 44 blancos, lo que hace difícil el trabajo de detección eficiente.

Para todos los puntos tratados anteriormente, este estudio demuestra el potencial del sistema Luminex LabMAP para análisis genéticos moleculares simultánea, rápidos y específicos de múltiples objetivos de ácido nucleico que se podría utilizar en estudios de vigilancia epidemiológica de alto rendimiento a gran escala.

El sistema de detección con micro esferas mejoró notablemente en 2010, cuando las antiguas x-TAG entraron en transición para dar paso a las micro esferas magnéticas, nosotros realizamos trabajos con estas y encontramos que los ensayos x-MAP pueden ser mejorados notablemente.

Por ejemplo las microesferas MagPlex® nos permiten escoger entre 500 esferas en lugar de las 100 que teníamos hasta antes del 2010. Adicionalmente, el fabricante sugiere su uso de BSA en el paso del marcado con estreptavidina-ficoritrina (SAPE), sin embargo nosotros no vimos que nuestros resultados se vieran afectadas por no usarlo.

El cambio de la secuencia anti-TAG para ser reasignada de una esfera Flex-MAP a una MagPlex® no represento ningún problemas; los lavados fueron más rápidos al usar una sistema de separación magnética de las esferas y dejamos de usar las placas Millipore para filtrar el sobrenadante de los lavados. Otra ventaja es que las MagPlex® se adquieren en una presentación 100 veces más concentradas lo que nos permitió trabajar con volúmenes más pequeños as fáciles de manipular.

Es necesario resaltar que el uso de SAPE es crítico para la coloración de la reacción por lo que es posible incrementar las concentraciones para hacerlas que la detección sea más eficiente y precisa con las Flex-MAP esferas, esto es relativo con MagPlex®, ya que puede generar un ruido de fondo que es preciso establecer bien antes de empezar a procesar numerosas muestras.

Todas estas discusiones tuvieron lugar antes de presentar este reporte final, y contamos con la gentil colaboración de la Dra Sherry A. Dunbar, Directora Científica de Ventas de la empresa Luminex, y todos los aspectos relacionados a un remplazo y adaptación de protocolos para poder transferir toda nuestra plataforma y usar las esferas MagPlex®.

CONCLUSIONES

1. El número de muestras analizado en este estudio (n=181) representó una limitación para la validación estadística del ensayo propuesto.
2. La metodología X-MAP permite la identificación rápida y simultánea de marcadores moleculares asociados a malaria fármaco-resistente causada por *P. falciparum* en áreas de baja transmisión de la enfermedad.
3. En comparación con el secuenciamiento, X-MAP brinda poderosas ventajas sobre todo en el aspecto de costo-efectividad y rapidez de obtención de resultados.
4. Este es una metodología muy poderosa para vigilancia pero debe ser aplicada con sumo cuidado en estudios de exploración del estado de la fármaco-resistencia.
5. Las curvas ROC preparadas para determinar punto de corte son buenas prediciendo los resultados de un SNP y ya en el campo se pueden usar para determinar la presencia o ausencia del alelo del codón en estudio.
6. Las curvas ROC que presentaron valores extremos se debe a la baja frecuencia de ciertos codones mutantes por ejemplo:
7. C50R y debe ser evaluado con cuidado cuando se pretende establecer este instrumento de biovigilancia y otros SNPs deben ser tratados con una cuidado si se van a usar en un área de alta transmisión de malaria como en África.

RECOMENDACIONES

1. Iniciar un programa piloto para validación del ensayo x-MAP con un mayor número de muestras polimórficas.
2. Evaluar la posibilidad de implementar esta metodología en áreas de baja transmisión de malaria.
3. Incrementar el tamaño de la muestra analizada de los codones con menos frecuencia para tener una mejor documentación de los valores ROC.



FUENTES DE INFORMACION

1. Organization WH. World Malaria Report 2014. 2014.
2. Wernsdorfer WH, Noedl H. Molecular markers for drug resistance in malaria: use in treatment, diagnosis and epidemiology. *Current opinion in infectious diseases*. 2003;16(6):553-8.
3. Singh B, Sung LK, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SSG, Cox-Singh J, et al. A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings. *The Lancet*.363(9414):1017-24.
4. Jongwutiwes S, Putaporntip C, Iwasaki T, Sata T, Kanbara H. Naturally Acquired Plasmodium knowlesi Malaria in Human, Thailand. *Emerging infectious diseases*. 2004;10(12):2211-3.
5. Tjitra E, Anstey NM, Sugiarto P, Warikar N, Kenangalem E, Karyana M, et al. Multidrug-Resistant Plasmodium vivax Associated with Severe and Fatal Malaria: A Prospective Study in Papua, Indonesia. *PLoS medicine*. 2008;5(6):e128.
6. Rahimi BA, Thakkestian A, White NJ, Sirivichayakul C, Dondorp AM, Chokejindachai W. Severe vivax malaria: a systematic review and meta-analysis of clinical studies since 1900. *Malaria journal*. 2014;13:481.
7. Roper MH, Torres RS, Goicochea CG, Andersen EM, Guarda JS, Calampa C, et al. The epidemiology of malaria in an epidemic area of the Peruvian Amazon. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2000;62(2):247-56.
8. PAHO/WHO DoDPaC. Practical Guide for in vivo Antimalarial Drug-Efficacy Studies in the Americas January 2003: RAVREDA-AMI, January 2003, 2003.
9. Ruebush TK, 2nd, Neyra D, Cabezas C. Modifying national malaria treatment policies in Peru. *Journal of public health policy*. 2004;25(3-4):328-45.
10. Ruebush TK, Levin A, Gonzaga V, Neyra D, Marquino W. Evaluation of a simple operational approach for monitoring resistance to antimalarial drugs in Peru. *Tropical medicine & international health : TM & IH*. 2003;8(10):910-6.
11. DGE MdSdP-. Boletín Epidemiológico 2013 (semana 52) 2013. Available from: <http://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/boletines/2013/52.pdf>.
12. Plowe CV. Vaccine-Resistant Malaria. *The New England journal of medicine*. 2015;373(21):2082-3.
13. Hoffman SL, Vekemans J, Richie TL, Duffy PE. The March Toward Malaria Vaccines. *American Journal of Preventive Medicine*.49(6):S319-S33.
14. Ruebush TK, 2nd, Zegarra J, Cairo J, Andersen EM, Green M, Pillai DR, et al. Chloroquine-resistant Plasmodium vivax malaria in Peru. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2003;69(5):548-52.
15. Thanh PV, Hong NV, Van NV, Louisa M, Baird K, Xa NX, et al. Confirmed Plasmodium vivax Resistance to Chloroquine in Central Vietnam. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015;59(12):7411-9.
16. Reed MB, Saliba KJ, Caruana SR, Kirk K, Cowman AF. Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in Plasmodium falciparum. *Nature*. 2000;403(6772):906-9.
17. Wongsrichanalai C, Pickard AL, Wernsdorfer WH, Meshnick SR. Epidemiology of drug-resistant malaria. *The Lancet infectious diseases*. 2002;2(4):209-18.
18. Fairhurst RM, Nayyar GM, Breman JG, Hallett R, Vennerstrom JL, Duong S, et al. Artemisinin-resistant malaria: research challenges, opportunities, and public health implications. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2012;87(2):231-41.
19. Talundzic E, Chenet SM, Goldman IF, Patel DS, Nelson JA, Plucinski MM, et al. Genetic Analysis and Species Specific Amplification of the Artemisinin Resistance-Associated Kelch Propeller Domain in P. falciparum and P. vivax. *PloS one*. 2015;10(8):e0136099.

20. Durand S, Marquino W, Cabezas C, Utz G, Fiestas V, Cairo J, et al. Unusual pattern of *Plasmodium falciparum* drug resistance in the northwestern Peruvian Amazon region. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2007;76(4):614-8.
21. Magill AJ, Zegarra J, Garcia C, Marquino W, Ruebush TK, 2nd. Efficacy of sulfadoxine-pyrimethamine and mefloquine for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in the Amazon basin of Peru. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2004;37(3):279-81.
22. Aramburú Guarda J, Ramal Asayag C, Witzig R. Malaria reemergence in the Peruvian Amazon region. *Emerging infectious diseases*. 1999;5(2):209-15.
23. Marquino W, MacArthur JR, Barat LM, Oblitas FE, Arrunategui M, Garavito G, et al. Efficacy of chloroquine, sulfadoxine-pyrimethamine, and mefloquine for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria on the north coast of Peru. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2003;68(1):120-3.
24. Marquino W, Huilca M, Calampa C, Falconi E, Cabezas C, Naupay R, et al. Efficacy of mefloquine and a mefloquine-artesunate combination therapy for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in the Amazon Basin of Peru. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2003;68(5):608-12.
25. Salas CJ. Marcadores Moleculares asociados a *Plasmodium falciparum* resistente a Sulfadoxina-Pirimetmina en las localidades de Caballococha y Padre Cocha, Region Loreto, Peru [Tesis para optar el Grado Academico de Magister en Bioquimica]2007.
26. World Health Organization. Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance: 2000-2010. Geneva: World Health Organization; 2010. 115 p. p.
27. Kublin JG, Dzinjalama FK, Kamwendo DD, Malkin EM, Cortese JF, Martino LM, et al. Molecular markers for failure of sulfadoxine-pyrimethamine and chlorproguanil-dapsone treatment of *Plasmodium falciparum* malaria. *The Journal of infectious diseases*. 2002;185(3):380-8.
28. Plowe CV. Monitoring antimalarial drug resistance: making the most of the tools at hand. *The Journal of experimental biology*. 2003;206(Pt 21):3745-52.
29. Fidock DA, Nomura T, Talley AK, Cooper RA, Dzekunov SM, Ferdig MT, et al. Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Molecular cell*. 2000;6(4):861-71.
30. WHO. Guidelines for the treatment of malaria 2015.
31. WHO. Estrategia Técnica Mundial contra la Malaria 2016-2030. 2015 Contract No.: ISBN 978 92 4 356499 9.
32. Plowe CV, Djimde A, Bouare M, Doumbo O, Wellems TE. Pyrimethamine and proguanil resistance-conferring mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase: polymerase chain reaction methods for surveillance in Africa. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1995;52(6):565-8; Wang P, Brooks DR, Sims PF, Hyde JE. A mutation-specific PCR system to detect sequence variation in the dihydropteroate synthetase gene of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and biochemical parasitology*. 1995;71(1):115-25.
33. Plowe CV, Cortese JF, Djimde A, Nwanyanwu OC, Watkins WM, Winstanley PA, et al. Mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase and epidemiologic patterns of pyrimethamine-sulfadoxine use and resistance. *The Journal of infectious diseases*. 1997;176(6):1590-6.
34. Foote SJ, Galatis D, Cowman AF. Amino acids in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum* involved in cycloguanil resistance differ from those involved in pyrimethamine resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87(8):3014-7; Cowman AF, Morry MJ, Biggs BA, Cross GA, Foote SJ. Amino acid changes linked to pyrimethamine resistance in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988;85(23):9109-13.
35. Wellems TE, Plowe CV. Chloroquine-resistant malaria. *The Journal of infectious diseases*. 2001;184(6):770-6.

36. Pillai DR, Hajar G, Montoya Y, Marouino W, Ruebush TK, 2nd, Wongsrichanalai C, et al. Lack of prediction of mefloquine and mefloquine-artesunate treatment outcome by mutations in the Plasmodium falciparum multidrug resistance 1 (pfmdr1) gene for P. falciparum malaria in Peru. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2003;68(1):107-10.
37. White NJ. Antimalarial drug resistance. *The Journal of clinical investigation*. 2004;113(8):1084-92.
38. Dharia NV, Plouffe D, Bopp SE, Gonzalez-Paez GE, Lucas C, Salas C, et al. Genome scanning of Amazonian Plasmodium falciparum shows subtelomeric instability and clindamycin-resistant parasites. *Genome research*. 2010;20(11):1534-44.
39. Dixon BR, Bussey JM, Parrington LJ, Parenteau M. Detection of Cyclospora cayetanensis oocysts in human fecal specimens by flow cytometry. *Journal of clinical microbiology*. 2005;43(5):2375-9.
40. McNamara DT, Kasehagen LJ, Grimberg BT, Cole-Tobian J, Collins WE, Zimmerman PA. Diagnosing infection levels of four human malaria parasite species by a polymerase chain reaction/ligase detection reaction fluorescent microsphere-based assay. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2006;74(3):413-21.
41. Cortese JF, Caraballo A, Contreras CE, Plowe CV. Origin and dissemination of Plasmodium falciparum drug-resistance mutations in South America. *The Journal of infectious diseases*. 2002;186(7):999-1006.
42. Urdaneta L, Plowe C, Goldman I, Lal AA. Point mutations in dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase genes of Plasmodium falciparum isolates from Venezuela. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1999;61(3):457-62.
43. Restrepo-Pineda E, Arango E, Maestre A, Do Rosario VE, Cravo P. Studies on antimalarial drug susceptibility in Colombia, in relation to Pfmdr1 and Pfcr. *Parasitology*. 2008;135(5):547-53.
44. Griffing SM, Viana GM, Mixson-Hayden T, Sridaran S, Alam MT, de Oliveira AM, et al. Historical shifts in Brazilian P. falciparum population structure and drug resistance alleles. *PloS one*. 2013;8(3):e58984.
45. Griffing SM, Mixson-Hayden T, Sridaran S, Alam MT, McCollum AM, Cabezas C, et al. South American Plasmodium falciparum after the malaria eradication era: clonal population expansion and survival of the fittest hybrids. *PloS one*. 2011;6(9):e23486.
46. McCollum AM, Poe AC, Hamel M, Huber C, Zhou Z, Shi YP, et al. Antifolate resistance in Plasmodium falciparum: multiple origins and identification of novel dhfr alleles. *The Journal of infectious diseases*. 2006;194(2):189-97; McCollum AM, Mueller K, Villegas L, Udhayakumar V, Escalante AA. Common origin and fixation of Plasmodium falciparum dhfr and dhps mutations associated with sulfadoxine-pyrimethamine resistance in a low-transmission area in South America. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007;51(6):2085-91.
47. Contreras CE, Cortese JF, Caraballo A, Plowe CV. Genetics of drug-resistant Plasmodium falciparum malaria in the Venezuelan state of Bolivar. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2002;67(4):400-5.
48. Vasconcelos KF, Plowe CV, Fontes CJ, Kyle D, Wirth DF, Pereira da Silva LH, et al. Mutations in Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase of isolates from the Amazon region of Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2000;95(5):721-8.
49. Kublin JG, Witzig RS, Shankar AH, Zurita JQ, Gilman RH, Guarda JA, et al. Molecular assays for surveillance of antifolate-resistant malaria. *Lancet*. 1998;351(9116):1629-30.
50. Tsuchihashi Z, Dracopoli NC. Progress in high throughput SNP genotyping methods. *Pharmacogenomics J*. 2002;2(2):103-10.

51. Bacon DJ, McCollum AM, Griffing SM, Salas C, Soberon V, Santolalla M, et al. Dynamics of malaria drug resistance patterns in the Amazon basin region following changes in Peruvian national treatment policy for uncomplicated malaria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009;53(5):2042-51.
 52. Shi MM. Enabling large-scale pharmacogenetic studies by high-throughput mutation detection and genotyping technologies. *Clinical chemistry*. 2001;47(2):164-72.
 53. Kwok PY, Chen X. Detection of single nucleotide polymorphisms. *Current issues in molecular biology*. 2003;5(2):43-60.
 54. Gut IG. Automation in genotyping of single nucleotide polymorphisms. *Human mutation*. 2001;17(6):475-92.
 55. Makridakis NM, Reichardt JK. Multiplex automated primer extension analysis: simultaneous genotyping of several polymorphisms. *BioTechniques*. 2001;31(6):1374-80.
 56. Doménech-Sánchez A, Vila J. Fundamento, tipos y aplicaciones de los arrays de ADN en la microbiología médica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2004;33(09):46-54.
 57. Landegren U, Nilsson M, Kwok PY. Reading bits of genetic information: methods for single-nucleotide polymorphism analysis. *Genome research*. 1998;8(8):769-76.
 58. Dunbar SA. Applications of Luminex xMAP technology for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2006;363(1-2):71-82.
 59. Kellar KL, Iannone MA. Multiplexed microsphere-based flow cytometric assays. *Experimental hematology*. 2002;30(11):1227-37.
 60. Corporation L. Luminex - Research Publications: Luminex corporation; 2015 [updated November 2015; cited 2015 November, 19th 2015]. Universities, pharmaceutical companies, biotechnology companies, clinical diagnostics laboratories, and government research institutions around the world use Luminex's xMAP and xTAG technologies. These technologies can be used to replace ELISA, western blotting, PCR, and microarrays. By utilizing xMAP or xTAG Technology, you can test for more biomarkers, use less sample, save time, save labor costs, and trust that the technology has been validated by thousands of other scientists.
- You can search this database of over 23,000 scientific publications from Luminex customers, collaborators, and scientists. See how your collaborators or competitors are utilizing Luminex technology to accelerate their research.
- We update the database on a monthly basis. If we missed a publication, or you are searching for an application you cannot find, please email us at publications@luminexcorp.com. Available from: <https://www.luminexcorp.com/publications/>.
61. da Silva TA, Fontes FL, Coutinho LG, de Souza FR, de Melo JT, de Souto JT, et al. SNPs in DNA repair genes associated to meningitis and host immune response. *Mutation research*. 2011;713(1-2):39-47.
 62. Sack U, Biereder B, Elouahidi T, Bauer K, Keller T, Trobs RB. Diagnostic value of blood inflammatory markers for detection of acute appendicitis in children. *BMC surgery*. 2006;6:15.
 63. Naciff JM, Richardson BD, Oliver KG, Jump ML, Torontali SM, Juhlin KD, et al. Design of a microsphere-based high-throughput gene expression assay to determine estrogenic potential. *Environmental health perspectives*. 2005;113(9):1164-71.
 64. Biagini RE, Schlottmann SA, Sammons DL, Smith JP, Snawder JC, Striley CA, et al. Method for simultaneous measurement of antibodies to 23 pneumococcal capsular polysaccharides. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2003;10(5):744-50.
 65. Johannisson A, Jonasson R, Dornfalk J, Jensen-Waern M. Simultaneous detection of porcine proinflammatory cytokines using multiplex flow cytometry by the xMAP

- technology. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2006;69(5):391-5.
66. Bandyopadhyay K, Kellar KL, Moura I, Casaquei Carollo MC, Graczyk TK, Slemenda S, et al. Rapid microsphere assay for identification of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* in stool and environmental samples. *Journal of clinical microbiology*. 2007;45(9):2835-40.
 67. Ocheretina O, Merveille YM, Mabou MM, Escuyer VE, Dunbar SA, Johnson WD, et al. Use of Luminex MagPlex magnetic microspheres for high-throughput spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Port-au-Prince, Haiti. *Journal of clinical microbiology*. 2013;51(7):2232-7.
 68. Cowan LS, Diem L, Brake MC, Crawford JT. Transfer of a *Mycobacterium tuberculosis* genotyping method, Spoligotyping, from a reverse line-blot hybridization, membrane-based assay to the Luminex multianalyte profiling system. *Journal of clinical microbiology*. 2004;42(1):474-7.
 69. Diaz MR, Dunbar SA, Jacobson JW. Multiplexed detection of fungal nucleic acid signatures. *Current protocols in cytometry / editorial board, J Paul Robinson, managing editor [et al]*. 2008;Chapter 13:Unit13 9.
 70. Gu AD, Lu LX, Xie YB, Chen LZ, Feng QS, Kang T, et al. Clinical values of multiple Epstein-Barr virus (EBV) serological biomarkers detected by xMAP technology. *Journal of translational medicine*. 2009;7:73.
 71. Gu AD, Mo HY, Xie YB, Peng RJ, Bei JX, Peng J, et al. Evaluation of a multianalyte profiling assay and an enzyme-linked immunosorbent assay for serological examination of Epstein-Barr virus-specific antibody responses in diagnosis of nasopharyngeal carcinoma. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2008;15(11):1684-8.
 72. Gu AD, Xie YB, Mo HY, Jia WH, Li MY, Li M, et al. Antibodies against Epstein-Barr virus gp78 antigen: a novel marker for serological diagnosis of nasopharyngeal carcinoma detected by xMAP technology. *The Journal of general virology*. 2008;89(Pt 5):1152-8.
 73. Lee WM, Grindle K, Pappas T, Marshall DJ, Moser MJ, Beaty EL, et al. High-throughput, sensitive, and accurate multiplex PCR-microsphere flow cytometry system for large-scale comprehensive detection of respiratory viruses. *Journal of clinical microbiology*. 2007;45(8):2626-34.
 74. Apostolidou S, Hadwin R, Burnell M, Jones A, Baff D, Pyndiah N, et al. DNA methylation analysis in liquid-based cytology for cervical cancer screening. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2009;125(12):2995-3002.
 75. Hindson BJ, Reid SM, Baker BR, Ebert K, Ferris NP, Tammero LF, et al. Diagnostic evaluation of multiplexed reverse transcription-PCR microsphere array assay for detection of foot-and-mouth and look-alike disease viruses. *Journal of clinical microbiology*. 2008;46(3):1081-9.
 76. Dunbar SA, Vander Zee CA, Oliver KG, Karem KL, Jacobson JW. Quantitative, multiplexed detection of bacterial pathogens: DNA and protein applications of the Luminex LabMAP system. *Journal of microbiological methods*. 2003;53(2):245-52.
 77. Wedemeyer N, Potter T. Flow cytometry: an 'old' tool for novel applications in medical genetics. *Clinical genetics*. 2001;60(1):1-8.
 78. Dunbar SA, Jacobson JW. Application of the luminex LabMAP in rapid screening for mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene: A pilot study. *Clinical chemistry*. 2000;46(9):1498-500.
 79. Chivers CE, Crozat E, Chu C, Moy VT, Sherratt DJ, Howarth M. A streptavidin variant with slower biotin dissociation and increased mechanostability. *Nature methods*. 2010;7(5):391-3.
 80. Marquino W, Ylquimiche L, Hermenegildo Y, Palacios AM, Falconi E, Cabezas C, et al. Efficacy and tolerability of artesunate plus sulfadoxine-pyrimethamine and sulfadoxine-pyrimethamine alone for the treatment of uncomplicated *Plasmodium*

- falciparum malaria in Peru. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2005;72(5):568-72.
81. Mehlotra RK, Fujioka H, Roepe PD, Janneh O, Ursos LMB, Jacobs-Lorena V, et al. Evolution of a unique *Plasmodium falciparum* chloroquine-resistance phenotype in association with *pfprt* polymorphism in Papua New Guinea and South America. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(22):12689-94.
 82. Wang P, Brooks DR, Sims PFG, Hyde JE. A mutation-specific PCR system to detect sequence variation in the dihydropteroate synthetase gene of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and biochemical parasitology*. 1995;71(1):115-25.
 83. Chen J, Iannone MA, Li MS, Taylor JD, Rivers P, Nelsen AJ, et al. A microsphere-based assay for multiplexed single nucleotide polymorphism analysis using single base chain extension. *Genome research*. 2000;10(4):549-57.
 84. Diamandis EP, Christopoulos TK. The biotin-(strept)avidin system: principles and applications in biotechnology. *Clinical chemistry*. 1991;37(5):625-36.
 85. Eastman RT, Fidock DA. Artemisinin-based combination therapies: a vital tool in efforts to eliminate malaria. *Nature reviews Microbiology*. 2009;7(12):864-74.
 86. Winzeler EA. Advances in parasite genomics: from sequences to regulatory networks. *PLoS pathogens*. 2009;5(10):e1000649; Winzeler EA. Malaria research in the post-genomic era. *Nature*. 2008;455(7214):751-6; Winzeler EA. Applied systems biology and malaria. *Nature reviews Microbiology*. 2006;4(2):145-51.
 87. Bacon DJ, Tang D, Salas C, Roncal N, Lucas C, Gerena L, et al. Effects of point mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase genes on clinical outcomes and in vitro susceptibility to sulfadoxine and pyrimethamine. *PloS one*. 2009;4(8):e6762.
 88. Laufer MK, Thesing PC, Eddington ND, Masonga R, Dzinjalama FK, Takala SL, et al. Return of chloroquine antimalarial efficacy in Malawi. *The New England journal of medicine*. 2006;355(19):1959-66.
 89. Frosch AE, Laufer MK, Mathanga DP, Takala-Harrison S, Skarbinski J, Claassen CW, et al. Return of widespread chloroquine-sensitive *Plasmodium falciparum* to Malawi. *The Journal of infectious diseases*. 2014;210(7):1110-4.
 90. Organization WH. Monitoring antimalarial drug resistance: a report of a consultation. 2003.
 91. Bloland PB. Drug Resistance in Malaria. World Health Organization. 2001;WHO/CDS/CSR/DRS/2001.4:1-27.
 92. Kellar KL, Douglass JP. Multiplexed microsphere-based flow cytometric immunoassays for human cytokines. *Journal of immunological methods*. 2003;279(1-2):277-85.
 93. Iannone MA, Taylor JD, Chen J, Li MS, Rivers P, Slentz-Kesler KA, et al. Multiplexed single nucleotide polymorphism genotyping by oligonucleotide ligation and flow cytometry. *Cytometry*. 2000;39(2):131-40.
 94. Cai H, White PS, Torney D, Deshpande A, Wang Z, Keller RA, et al. Flow cytometry-based minisequencing: a new platform for high-throughput single-nucleotide polymorphism scoring. *Genomics*. 2000;66(2):135-43.
 95. Ye F, Li MS, Taylor JD, Nguyen Q, Colton HM, Casey WM, et al. Fluorescent microsphere-based readout technology for multiplexed human single nucleotide polymorphism analysis and bacterial identification. *Human mutation*. 2001;17(4):305-16.
 96. Taylor JD, Briley D, Nguyen Q, Long K, Iannone MA, Li MS, et al. Flow cytometric platform for high-throughput single nucleotide polymorphism analysis. *BioTechniques*. 2001;30(3):661-6, 8-9.
 97. Bortolin S, Black M, Modi H, Boszko I, Kobler D, Fieldhouse D, et al. Analytical validation of the tag-it high-throughput microsphere-based universal array genotyping platform: application to the multiplex detection of a panel of

- thrombophilia-associated single-nucleotide polymorphisms. *Clinical chemistry*. 2004;50(11):2028-36.
98. Carnevale EP, Kouri D, DaRe JT, McNamara DT, Mueller I, Zimmerman PA. A multiplex ligase detection reaction-fluorescent microsphere assay for simultaneous detection of single nucleotide polymorphisms associated with *Plasmodium falciparum* drug resistance. *Journal of clinical microbiology*. 2007;45(3):752-61.
 99. Cole-Tobian JL, Zimmerman PA, King CL. High-throughput identification of the predominant malaria parasite clone in complex blood stage infections using a multi-SNP molecular haplotyping assay. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2007;76(1):12-9.
 100. Zimmerman PA. Nucleic Acid surveillance and malaria elimination. *Clinical chemistry*. 2015;61(6):789-91; Zimmerman PA, Howes RE. Malaria diagnosis for malaria elimination. *Current opinion in infectious diseases*. 2015;28(5):446-54.
 101. Zhong KJ, Salas CJ, Shafer R, Gubanov A, Gasser RA, Jr., Magill AJ, et al. Comparison of IsoCode STIX and FTA Gene Guard collection matrices as whole-blood storage and processing devices for diagnosis of malaria by PCR. *Journal of clinical microbiology*. 2001;39(3):1195-6.
 102. Salas CJ. Identification of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in *Plasmodium falciparum* dhfr, pfdhps and pfcr1 genes using a microsphere-based minisequencing assay. Conference poster presentation. US Naval Medical Research Detachment, 2007 2007. Report No.
 103. DaRe JT, Kouri DP, Zimmerman PA, Thomas PJ. Differentiating *Plasmodium falciparum* alleles by transforming Cartesian X,Y data to polar coordinates. *BMC genetics*. 2010;11:57.
 104. Linnet K, Kondratovich M. Partly nonparametric approach for determining the limit of detection. *Clinical chemistry*. 2004;50(4):732-40.
 105. Klee GG. Tolerance limits for short-term analytical bias and analytical imprecision derived from clinical assay specificity. *Clinical chemistry*. 1993;39(7):1514-8.
 106. Armbruster DA, Pry T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *The Clinical biochemist Reviews / Australian Association of Clinical Biochemists*. 2008;29 Suppl 1:S49-52.
 107. Halling KC, Schrijver I, Persons DL. Test verification and validation for molecular diagnostic assays. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2012;136(1):11-3.
 108. Hanley JA, McNeil BJ. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology*. 1982;143(1):29-36.
 109. Metz CE. Basic principles of ROC analysis. *Seminars in nuclear medicine*. 1978;8(4):283-98.
 110. Burgueno MJ, Garcia-Bastos JL, Gonzalez-Buitrago JM. [ROC curves in the evaluation of diagnostic tests]. *Medicina clinica*. 1995;104(17):661-70.
 111. Delacour H, Servonnet A, Perrot A, Vigezzi JF, Ramirez JM. [ROC (receiver operating characteristics) curve: principles and application in biology]. *Annales de biologie clinique*. 2005;63(2):145-54.
 112. Cerda J, Cifuentes L. Uso de curvas ROC en investigación clínica: Aspectos teórico-prácticos. *Revista chilena de infectología*. 2012;29:138-41.
 113. Zweig MH, Campbell G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clinical chemistry*. 1993;39(4):561-77.
 114. Laufer MK, Takala-Harrison S, Dzinjalama FK, Stine OC, Taylor TE, Plowe CV. Return of chloroquine-susceptible *falciparum* malaria in Malawi was a reexpansion of diverse susceptible parasites. *The Journal of infectious diseases*. 2010;202(5):801-8.
 115. Mehlotra RK, Fujioka H, Roepe PD, Janneh O, Ursos LM, Jacobs-Lorena V, et al. Evolution of a unique *Plasmodium falciparum* chloroquine-resistance phenotype in association with pfcr1 polymorphism in Papua New Guinea and South America.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2001;98(22):12689-94.
116. Pillai DR, Hajar G, Montoya Y, Marouino W, Ruebush TK, 2nd, Wongsrichanalai C, et al. Lack of prediction of mefloquine and mefloquine-artesunate treatment outcome by mutations in the Plasmodium falciparum multidrug resistance 1 (pfmdr1) gene for P. falciparum malaria in Peru. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2003;68(1):107-10.



ANEXOS

ANEXO N° 1: ABREVIATURAS

CQ : Cloroquina

SP : Sulfadoxina-Pirimetamina

AS : Artesunato

AS-MQ : Combinación Artesunato-Mefloquina

MQ : Mefloquina

P.falciparum. : *Plasmodium falciparum*

Pfcr1 : Gen del transportador de Cloroquina de *P. falciparum*

Pfdhfr : Gen dihidrofolato reductasa de *Plasmodium falciparum*

Pfdhps : Gen dihidropteroato sintasa de *Plasmodium falciparum*

Pfmdr1 : Gen de multiresistencia de *Plasmodium falciparum*

RFLP : Polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción

dNTPs : desoxirribonucleótidos trifosfato

ddNTPs : didesoxinucleótidos trifosfatados

SNPs : Polimorfismos de nucleótido simple

WHO/OMS: Organización Mundial de la Salud

PCR : Reacción en cadena de la polimerasa

bp: Pares de bases

MFI : Intensidad Media de fluorescencia

RA – RADIO ALELICO

ADN : acido desoxirribonucleico

ASPE : (Allelic Specific Primer Extension) – Reacción de extensión específica de alelo

ANEXO Nº 2: VARIABLES Y OPERACIONALIZACION DE VARIABLES

Tesis presentada por: Salas, C. (2015). **Diseño y validación de un ensayo x-MAP™ para la genotipificación simultanea de marcadores moleculares asociados con genes de fármaco resistencia en *Plasmodium falciparum*, Perú. 2000-2009**

Para optar el grado de Doctora en Bioquímica y Nutrición. Lima. Universidad de San Martín de Porres.

VARIABLE	DEFINICION	TIPO DE VARIABLE SEGÚN SU NATURALEZA	TIPO DE VARIABLE SEGÚN SU RELACION	INDICADOR O DEFINICION OPERATIVA	ESCALA DE MEDICION	INTRUMENTOS DE MEDICION
Genotipos : <ul style="list-style-type: none"> • Pfdhfr • Pfdhps • PfCRT • Pfmdr1 	Marcadores asociados o potencialmente asociados a fármaco-resistencia a antimalaricos	cualitativa	dependiente	Clasificación individual : <ul style="list-style-type: none"> • Alelo silvestre • Alelo mutante Clasificación grupal <ul style="list-style-type: none"> • genotipos según gen analizado 	nominal	Tabulación manual de datos obtenidos de Secuenciamiento
MFI (intensidad de fluorescencia media)		cuantitativa	independiente	Según datos de la escala. Blanco: < 300 Lectura valida : Mayor que el blanco Radio alélico del Genotipo silvestre vs Genotipo mutante > 1:5	ordinal	Hoja Excel con resultados fluorescencia obtenidos de Citómetro de Flujo BioPLEX.

ANEXO N° 3: Protocolo de Extracción de ADN a partir de muestras de sangre

Material

1. Kit de extracción de DNA QIAmp Mini kit
2. Minicolumnas de centrifugación
 - a. Tampón de extracción conteniendo agentes caotrópicos y detergente.
3. Tampón de lavado : Tris-EDTA y Etanol absoluto
4. H₂O libre de DNAsa y RNAasa

Método

Se procederá a la extracción de DNA a partir de sangre total, colectada con anticoagulante EDTA, que estuvo almacenada a -80°C .

1) Procedimiento de Lisis

- a) Pipetear 200 μL de sangre total en un microtubo de 1.5 mL.
- b) Agregar 20 μL de solución stock de proteasa QIAGEN y 200 μL de Buffer AL a la muestra.
- c) Mezclar inmediatamente por vortex durante 15 sec.
- d) NO se debe agregar proteasa QUIAGEN directamente al buffer AL.
- e) Incubar a 56°C durante 10 min. Vortex cada 2 min.
- f) Agregar 200 μL de etanol a la muestra y mezclar otra vez por vortex.

2) Unión del DNA

- a) Colocar la columna de centrifugación QIAamp® en el tubo colector de 2mL, (que vienen en el kit)
- b) Aplicar cuidadosamente la mezcla del paso 4 a la columna de centrifugación QIAamp® sin humedecer el borde del tubo, así se evita la contaminación cruzada.
- c) Centrifugar a 8000 RPM por 1 min.
- d) Colocar la columna de centrifugación QIAamp® en el tubo colector limpio de 2mL, (que viene en el kit). Descartar el tubo que contiene el filtrado.

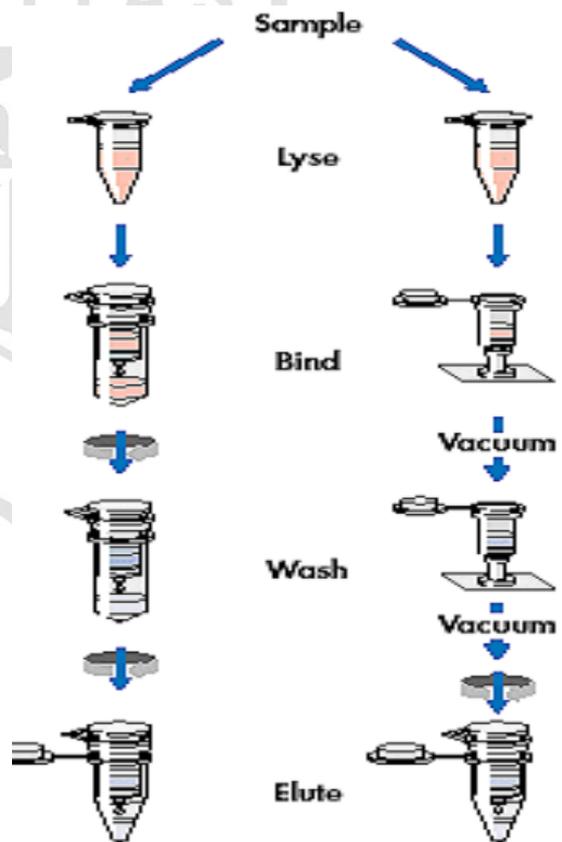
3) Lavado

- a) Abrir cuidadosamente columna de centrifugación QIAamp®, Agregar 500 μl de buffer AW1 y Centrifugar a 8000 rpm por 1 min.
- b) Colocar la columna de centrifugación QIAamp® en el tubo colector limpio de 2mL, (que viene en el kit). Descartar el tubo columna que contiene el filtrado.
- c) Abrir cuidadosamente la columna de centrifugación QIAamp® y agregar otros 500 μl de Buffer AW2. Centrifugar a 14,000 RPM por 3 min.
- d) Colocar la columna de centrifugación QIAmp en un tubo de micro

centrifuga de 1.5 mL. limpio. Descartar el tubo columna que contiene el filtrado.

4) Elusión

- a) Abrir cuidadosamente la columna de centrifugación QIAamp.
- b) Eluir el DNA con 200 μ l de buffer AE o bien agua destilada precalentada a 56°C. Si se tomó la decisión de eluir con buffer AE, en volúmenes que fueron desde 70 hasta 150 μ L para concentrar el ADN y poder aplicar un solo protocolo para todas las muestras.
- c) Incubar a 70°C por 5 min.
- d) Centrifugar a 8000 RPM por 1 min
- e) Tomar la columna y descartarla.
- f) Cerrar el tubo de micro centrifuga
- g) Almacenar en refrigeración a -20°C.



ADN genómico puro

ANEXO Nº 4: Preparación de oligonucleótidos cebadores

Este procedimiento operativo estándar se usará para la preparación de cebadores y sondas. Como ejemplo usaremos la preparación del cebador 186, usado en amplificaciones del gen *Pfdhps*.

El fabricante nos enviara notas u hojas de control de calidad con esta información:

Cantidad: 23.6 nmoles

Entonces calcularemos como llevar a nuestra solución de trabajo que será 50µM.

Concentración a llevar: $50 \text{ pmol}/\mu\text{L} = 50\mu\text{M} = 50 \times 10^{-12} \text{ moles}/\mu\text{L}$

1. Método Práctico:

- a. Agregar 100µL al tubo que contiene el primer seco.

$$\begin{aligned} 23.6 \times 10^{-9} \text{ moles} / 100\mu\text{L} &= 0.236 \text{ nmoles}/\mu\text{L} \\ 1\text{nmol} &= 1000\text{pmol} \end{aligned}$$

- b. Concentración final: 236µM, volumen final: 100 µL
- c. A partir de esa concentración se puede obtener la concentración necesitada, en nuestro caso es 50 µM, por ejemplo para 100 µL de primer a 50µM

$$\begin{aligned} C_i \times V_i &= C_f \times V_f \\ 236 \text{ uM} \times ? &= 50\text{uM} \times 100 \mu\text{L} \\ ? &= 21.19 \mu\text{L} \end{aligned}$$

2. Método Teórico :

Para obtener una concentración final de 50 uM a partir de todo el primer seco.

$$\frac{\text{Cantidad (moles)}}{\text{Volumen (L)}} = \frac{\text{Concentración (moles)}}{(\text{L})}$$

$$\frac{23.6 \times 10^{-9} \text{ moles}}{\text{volumen X}} = \frac{50 \times 10^{-12} \text{ moles}}{10^{-6} \text{ L}}$$

$$\frac{23.6 \times 10^{-9} \times 10^{-6} \text{ L}}{50 \times 10^{-12}} = \text{volumen}$$

$$0.472 \times 10^{-9} \times 10^{12} \times \mu\text{L} = \text{volumen}$$

$$0.472 \times 10^3 \times \mu\text{L} = \text{volumen}$$

$$472 \mu\text{L} = \text{volumen}$$

Al tubo que contiene el primer seco agrego 472 µL de DW para obtener una concentración final de 50 pmol/ µL

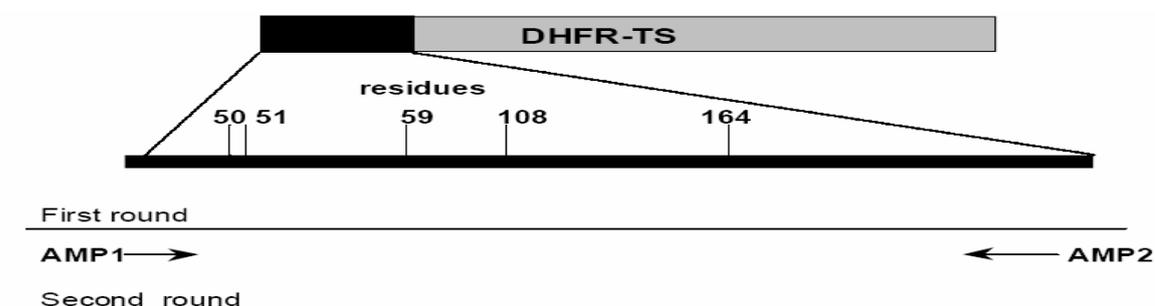
ANEXO Nº 5: Reacciones de amplificación de PCR

Se usaron cebadores sentido y antisentido para preparar reacciones de PCR y amplificar los genes *Pfdhfr*, *Pfdhps*, *Pfcrt* y *Pfmdr1* siguiendo los protocolos de Plowe y col (1995,1997) y Wang y col (1997). ^(32, 33) .

1. PCR para la amplificación de mutaciones en el gen *Pfdhfr*.

- Las reacciones de PCR se realizaron un volumen de reacción fue de 50 μ L conteniendo: 20 ng de ADN genómico, 5 μ L de Buffer PCR (1X), 1.5 mM de MgCl₂, 200 μ M de dNTPs mix, 1 μ M de oligonucleótidos AMP1 y AMP2, 1.5U de Taq DNA polimerasa. Las condiciones de la reacción fueron: denaturación inicial de 94°C por 3 minutos de denaturación, 45 ciclos de amplificación de: 94°C por 30 segundos (denaturación), 45°C por 45 segundos de hibridación oligonucleótidos), 72°C por 5 minutos (extensión) y una extensión final de 7 min.
- Se usaron 5 μ L del producto de la primera reacción, como molde para un PCR anidado-específico empleando los oligonucleótido cebador comunes de diagnóstico (SP1 o SP2), Se usaron reacciones con un volumen de 50 μ L en las que se utilizaron 200 μ M de dNTPs, 5 μ L de Buffer PCR (1X), 1.5 μ M o 2.5 μ M de MgCl₂, 1 μ M de cada oligonucleótido, 1.5U de Taq.

Figura: Gen *Pfdhfr*, posiciones de cebadores y codones polimórficos a estudiar

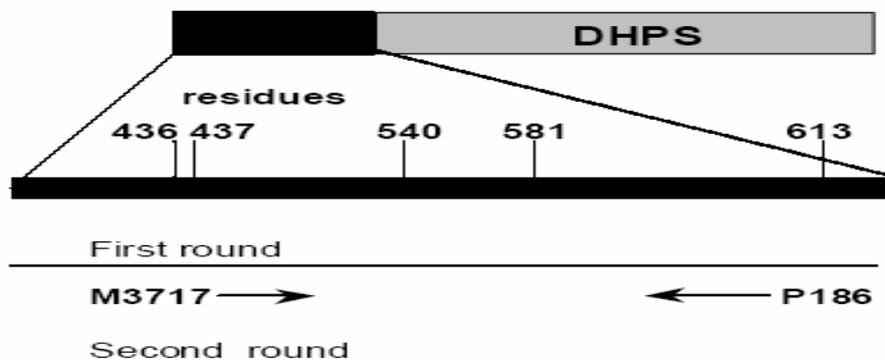


Referencia: Esquema tomado de Vasconcelos et al, Mem Inst Oswaldo Cruz. 2000 Sep-Oct; 95(5):721-8. 2000

2. PCR para la amplificación de mutaciones en el gen *Pfdhps*

- Se usaron 5µL de ADN genómico de *P. falciparum* para preparar reacciones de PCR anidado según descrito por Plowe et al. (48, 49). En la primera vuelta, una porción de 1150 bp. del dominio DHPS fue amplificado con un PCR en un volumen de reacción de 20µL, (4µM) de dNTPs, 5µL de Buffer PCR (1X), 0.325µM los oligonucleótidos cebadores M3717 y 186; 0.6U de Taq ADN Polimerasa. Las condiciones de amplificación fueron : denaturación a 95°C por 3 minutos, seguido de 45 ciclos de denaturación a 95°C por 30 segundos, hibridización a 54°C por 45 segundos y extensión de 72°C por 45 segundos, con una extensión final de 72°C por 3 minutos.
- El producto de la primera vuelta fue usado para la segunda vuelta, siguiendo la estrategia del PCR anidado-específico de alelo, en reacciones de múltiplex, es decir buscando la detección del alelo silvestre y el mutante en una amplificación

Figura: Gen *Pfdhps*, posiciones de cebadores y codones polimórficos a estudiar



Referencia: Esquema tomado de Vasconcelos et al., *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000 Sep-Oct; 95(5):721-8.

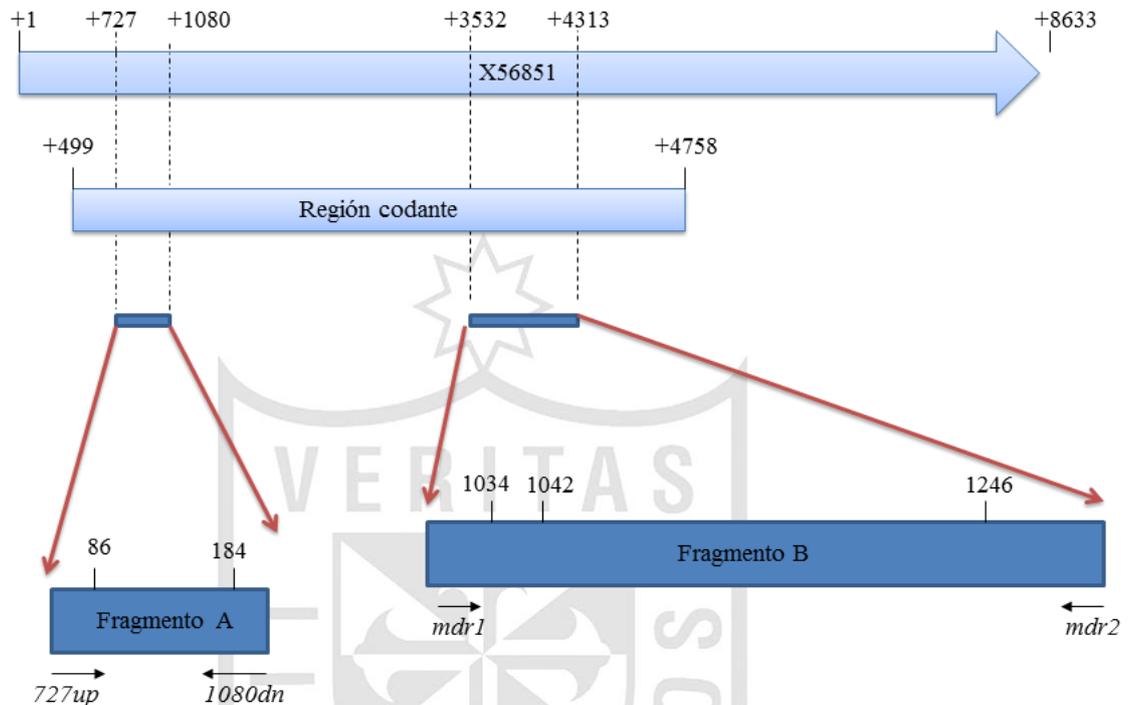
Referencia : Las secuencias fueron publicadas por Wang et al.: *Mol Biochem Parasitol*. 1995 Apr;71(1):115-25.

3. PCR para la amplificación de mutaciones en el gen *PfMDR1*

- Se amplificaron dos regiones polimórficas del gen *pfmdr1* con la PCR. En la Figura se observan las posiciones de los cebadores y de los codones polimórficos estudiados para este gen. Se utilizó el protocolo publicado por Mehlotra y colaboradores⁽¹¹⁵⁾ para amplificar fragmento A, mientras que el

protocolo publicado por Pillai y colaboradores⁽¹¹⁶⁾ fue utilizado para amplificar el fragmento B.

Figura: Gen *Pfmdr1*, posiciones de cebadores y codones polimórficos a estudiar



- Todas las reacciones de PCR se realizaron en el termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, California). Se utilizaron 5 L de ADN (10-25ng) de DNA genómico las 5 reacciones en volúmenes de de 50µl. Se incluyeron 5 controles positivos de cepas de referencia de *P. falciparum* (3D7, 7G8, D6, Dd2 y W2) y 1 blanco (agua destilada) para todas las reacciones de PCR. La especificidad de los productos amplificados por PCR fue confirmada visualmente mediante electroforesis en geles de agarosa
- Las concentraciones de los reactivos que se utilizaron para el PCR fueron 200µM de dNTPs (Invitrogen, USA), 1X PCR Buffer (20mM Tris-HCl y 50mM KCl), 3 µM MgCl₂, 1 U de Taq DNA Polimersaa recombinante (Invitrogen, USA) y 0.5µM de cebador sentido y antisentido para ADN. Las condiciones de la reacción fueron: denaturación inicial a 95 °C por 3 minutos; denaturación a 95 °C por 30 segundos, hibridización a 60 °C por

40 segundos, extensión a 72 °C por 45 segundos, por 40 ciclos; y una extensión final a 72 °C por 2 minutos.

a. Amplificación del fragmento A del gen *pfmdr1*

Las concentraciones de los reactivos que se utilizaron para el PCR fueron 200µM de dNTPs (Invitrogen, USA), 1X PCR Buffer (20mM Tris-HCl y 50mM KCl), 3 µM MgCl₂, 1 U de Taq DNA Polimerasa recombinante (Invitrogen, USA) y 0.5µM de cebador sentido y antisentido para ADN. Las condiciones de la reacción fueron: denaturación inicial a 95 °C por 3 minutos; denaturación a 95 °C por 30 segundos, hibridización a 60 °C por 40 segundos, extensión a 72 °C por 45 segundos, por 40 ciclos; y una extensión final a 72 °C por 2 minutos.

b. Amplificación del fragmento B del gen *pfmdr1*

Las concentraciones de los reactivos que se utilizaron para el PCR fueron 200µM de dNTPs, 1X PCR Buffer (20mM Tris-HCl y 50mM KCl), 2.5mM MgCl₂, 1U de Taq DNA polimerasa recombinante y 125nM del cebador sentido y antisentido. Los ciclos de la reacción de PCR fueron: denaturación inicial a 95 °C por 5 minutos; denaturación a 94 °C por 1 minuto, hibridización a 55 °C por 1 minuto, extensión a 72 °C por 1 minuto, por 35 ciclos; y una extensión final a 72 °C por 7 minutos.

Electroforesis - Identificación de los productos de amplificación

Los productos de amplificación para los fragmentos correspondientes a Pfdhfr, Pfdhps, Pfcrt y los fragmentos A y B del gen *pfmdr1* fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% usando buffer de corrida TAE 1X a 105mV. Se utilizó marcador de 123bp (Invitrogen, USA) para el Fragmento A del gen *pfmdr1* y C y D del *pfatp6*, mientras que se utilizó un marcador de 1kb (GeneRuler™, Fermentas) para el Fragmento B del gen *pfmdr1* y los fragmentos A y B del otro gen. Los geles fueron teñidos en una solución de 0.12ug/ml de bromuro de etidio post-electroforesis por un periodo de 15 minutos. Las bandas fueron observadas utilizando el equipo GelDoc EQ System - 2000 (Bio-Rad™, USA) y el programa de Quantity One v.4.0.3 (Bio-Rad™, USA).

ANEXO N° 6: Protocolo de electroforesis en geles de agarosa

Separación de los fragmentos de distinto tamaño de ADN en un gel de agarosa, en el que dichos fragmentos migraran a diferente velocidad según su peso molecular al ser sometidos a una corriente eléctrica.

Material:

1. Agarosa grado analítico (Biorad)
2. Tampón TAE, Solución stock concentrada (por litro) 50x:
 - Tris base 242g
 - Ácido acético glacial 57.1mL
 - EDTA (pH 8.0) 0.5M 100mL
3. Buffer de carga de muestra 6x:
 - Orange G 0.25%
 - Glicerol 30% en H₂O
4. Marcadores de peso molecular de 100 y 123 bp
5. Soluciones de Bromuro de etidio (10 mg/mL)

Método:

- La concentración del gel de agarosa depende del tamaño de los fragmentos de ADN a separar, siendo la concentración mínima el 0.7% (fragmentos grandes de varias Kb) y la máxima el 4% (fragmentos de 50-150 pb). Se pesa 1gr de agarosa por tanto por ciento y por 100 mL de volumen de gel.
- Mezclar la muestra con el tampón de carga, el volumen de muestra depende del tamaño de peine con el que se han hecho los pocillos en el gel de agarosa, normalmente es de 10-30 mL. De tampón de carga se añade 1/6 del volumen de muestra.
- Introducir el gel de agarosa en la cubeta de electroforesis con el tampón TAE y hacer pasar una corriente de 10 V/cm de gel. Se deja el tiempo necesario para que el frente migre hasta el final del gel. Después se tiñe el gel en las soluciones de etidio (10 mg/mL) durante 10 a 15 minutos, luego pasamos el gel a una cubeta de agua para retirar el exceso (2'), finalmente observamos las bandas con luz UV y se registra la imagen en el lector Geldoc® BIORAD

ANEXO N° 7: Protocolo de secuenciamiento usando BigDyeTerminator v3.1

1. Reacción de secuenciamiento: una reacción de BDT por cada oligonucleótido.

Reacción de 15 µL

3µL BDT v3.1

3µL 5X Buffer de secuenciamiento

1 µL oligonucleótido (5uM)

3 µL DW

5 µL of DNA - de producto de PCR purificado

96°C	50 seg.	} 30 ciclos
96°C	10 seg.	
50°C	5 seg.	
60°C	4 min.	
4°C	∞	

Aplicón	Tamaño	Cantidad de ADN requerido
Producto de PCR	100 - 200 bp	1 - 3 ng
	200 - 500 bp	3 - 10 ng
	500 - 1 000 bp	5 - 20 ng
	1 000 - 2 000 bp	10 - 40 ng
	> 2 000 bp	40 - 100 ng

2. Purificación de la reacción de Big Dye Terminator

Método: Precipitación por etanol /acetato de sodio

Reactivos:

- Merck Alcohol al 70%
- Buffer acetato de sodio – Cat# S-7899
- Etanol absoluto MERCK

Calcular número de pozos y preparar:

1. Preparar una mezcla de 3.0 µL de 3M acetato de , de sodio pH4.6 y62,5 µL de etanol 96% y 14.5 µL de agua, esto suma 80 µL
2. Agregar los 80 µL a 20 µL de reacción o proporción similar.
3. Mezclar 15 segundos, precipitar por un mínimo de 20 min.
4. Centrifugar 14,000 R.P.M. por 20 min.
5. Descartar el sobrenadante con pipeta
6. Agregar 200 µL de etanol 70%
7. Centrifugar a14000 R.P.M por 10 min.
8. Descartar el sobrenadante con pipeta
9. Secar a 90°C POR 1min. en un bloque caliente o termociclador.
10. Agregar 12 µL of Hi-Formamida.
11. Denaturar a 94° C por 5 min en un termociclador luego colocar inmediatamente en hielo por 2min.
12. Colocar en el secuenciador.

3. Análisis de secuencias, usar el Software Sequencher v4.7™

Referencia:

http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_041496.pd

f

ANEXO N° 8: Lista De 44 oligonucleótidos usados para ensayo X-MAP ASPE

Genes	Nombre	Secuencia 5' →3'
<i>Pfct</i>	N72 Ser 81	CTTTAATCTACACTTTCTAACAAATTTATTTATATTTTAAGTATTATTTATTTAAGTGTATC
	N72 Cis68	TCATAATCTCAACAATCTTTCTTTTTATTTATATTTTAAGTATTATTTATTTAAGTGTATG
	N74W -12	TACACTTTCTTTCTTTCTTTCTTTTTTAAGTATTATTTATTTAAGTGTATSTGTAATG
	N74 M-50	CAATATACCAATATCATCATTTACTTTTAAGTATTATTTATTTAAGTGTATSTGTAATT
	N75w -78	CTATCTATCTAACTATCTATATCAGTTTAAAGTTCTTTTAGCAAAAATTKTA
	N75-34	TCATTATATACATACCAATTCATTAAGTTCTTTTAGCAAAAATTKTWC
	76W_70	ATACC AATAA TCCAATTCATATCAAAGTTTAAAGTTCTTTTAGCAAAAATTT
	76M_10	ATC ATA CAT ACA TAC AAA TCT ACAA GTTTAAAGTTCTTTTAGCAAAAATTTG
<i>Pfdhfr</i>	16W44	TCATTTACCAATCTTTCTTTATACTTTTCGATATTTATGCCATATGTGC
	16M33	TCAATTACTTCACTTTAATCCTTTTTTCGATATTTATGCCATATGTGT
	50W6	TCAACAATCTTTTACAATCAAATCAAATAAAGGAGTATTACCATGGAAAT
	50M28	CTACAAACAACAAACATTATCAAAAATAAAGGAGTATTACCATGGAAAC
	51W80	CTAACTAACATAATCTAACTAACAAAGGAGTATTACCATGGAAATGTAA
	51M100	CTATCTTTAAACTACAATCTAACAAAGGAGTATTACCATGGAAATGTAT
	108S7	CAATTCATTTACCAATTTACCAATATGTTGTAGTTATGGGAAGAACAAG
	108N59	TCATCAATCAATCTTTTTCACTTTATGTTGTAGTTATGGGAAGAACAAC
	164w_37	CTTTTCATCTTTTCATCTTTCAATGGGAAATTAATTAATAAATGTTTTATTA
	164M-88	TTACTTCATTTCTATTTACAATCGGAAATTAATTAATAAATGTTTTATTT
	59w65	CTTTTCATCAATAATCTTACCTTTATTCACATATGTTGTAAGTGCACA
	108Tv.4	cta ctatacatctactatactttatgttgtagttatgggaagaacaac
	59m27	CTTTTCAAATCAACTCAACTTTATTCACATATGTTGTAAGTGCACG
<i>Pfdhps</i>	436Ser24	5'TCAATTACCTTTTCAATACAATACGTGTTATAGATATAGGTGGAGAATCCT
	436A_29	5'AATCTTACTACAATCCTTTCTTTTAGTGTTATAGATATAGGTGGAGAATCCG
	437w_23	TTCAATCATTCAAATCTCAACTTTTTTTGGATTAGGTATAACAAAAGGAC
	437m35	CAATTCATCATTCACTTTCTTTTGGATTAGGTATAACAAAAGGAG
	CD70-85	ATACTACATCATAATCAAACATCAGAGGAAATCCACATACAATGGATA
	CD71-18	TCAAATCTCAAATACTCAAATCAAGGAAATCCACATACAATGGATG
	261W-30	TTACCTTTATACCTTTCTTTTACCTATTTGATTTGGATTAGGATTTGC
	201 R-56	CAATTTACTCATATACATCACTTTAGTTTAAATAGATTGATCATGTTCTTCC
	233F-95	TACACTTTAAACTTACTACACTAATTGGATATTCAAGAAAAAGATTTATTG
	226f-67	TCATTTACTCAACAATTACAATCTATTGGATATTCAAGAAAAAGATTTATTT
	251F-93	CTTTCTATTTCATCTAAATACAACCTTATTGGATATTCAAGAAAAAGATTTATTA
<i>Pfmdr1</i>	_1242Asp_42	5'CTATCTTCATATTTCACTATAAACGATATTAATATATGTGATTATAACTTAAGAG
	_1034Cys_94	5'CTTTCTATCTTTCTACTCAATAATAATGCAGCTTTATGGGGATTCT
	F_Ser1034_53	5'TAATTATACATCTCATCTTCTACAATGCAGCTTTATGGGGATTCA
	R_Asp1042_1	5'CTTTAATCTCAATCAATACAATCCCAAACCAATAGGCAAAACTATC
	D42	CTATCTTCATATTTCACTATAAACTAGATGATATTAATATATGTGATTATAACTTAAGAG
	Y82	TACATACACTAATAACATACTCATTAGATGATATTAATATATGTGATTATAACTTAAGAT
	F_86N48	5'AAACAACCTTCACATCTCAATAATGTTTGGTGTAATATTAAGAACATGA
	F_86Tyr98	5'AATCATACTCAACTAATCATTCAAGGTGTAATATTAAGAACATGT
	F_142D_86	5'CTAATTACTAACATCACTAACAATTTATCAAGATGGACAATTTTCATGA
	R_142G_40	5'CTTTCTACATTATTCACAACATTACTTAATTTAGATCCAGGATTATTAC
	_184Phe_39	5'TACACAATCTTTTCATTACATCATGCCAGTTCTTTTTAGGTTTATT
	184Tyr49	TCA TCA ATCTTTCAATTTACTTACTATGCAGTTCCTTTTTAGGTTATA

ANEXO N° 9: Protocolo para extensión específica de producto (ASEP) e hibridación a microesferas de matriz universal™

MATERIALES

1. Oligonucleótidos iniciadores de PCR para cada blanco re suspendidos en agua libre de ADN/RNAsas. Los oligonucleótidos fueron reconstituidos a una concentración 50 μ M.
2. Oligonucleótidos iniciadores ASPE con modificación en extremo 5' terminales suspendidos en agua libre de ADN/RNAsas. Los oligonucleótidos fueron reconstituidos a una concentración 50 μ M.
3. ExoSAP-IT (USB Cat. No. 78200)
4. Taq DNA Polimerasa recombinante 10x Buffer, 50 mM MgCl₂ (Invitrogen Cat.)
5. dNTPs, cada uno a una concentración de 100 mM (Invitrogen Cat. No. 10297-018)
6. Biotina-14-dCTP a una concentración de 0.1 mM (Invitrogen Cat. No. 19518-018)
7. Buffer de hibridación 2X Tm– 0.4 M NaCl, 0.2 M Tris, 0.16% Triton X-100, pH 8.0
8. Buffer de hibridación 1X Tm– 0.2 M NaCl, 0.1 M Tris, 0.08% Triton X-100, pH 8.0
9. Estreptavidina R-ficoeritrina 1 mg/mL (Invitrogen)
10. Pipetas, tips, tubos de micro centrifuga, etc.
11. Muestras de ADNA genómico

PROCEDIMIENTOS

PURIFICACION DE PRODUCTOS DE PCR

Productos de PCR purificados usando el kit “QIAquick PCR Purification” usar de 5 -100 ng basados en las lecturas del gel post purificación.

Tratamiento de EXO SAP – opcional – realizar este paso cuando se observa un fondo muy alto en el control negativo ASPE de PCR.

Nota: no lo utilizamos ya que nuestro una alta cantidad de ADN para esta reacción.

1. Tratamiento ExoSAP-IT (mantener en hielo mientras se prepara la reacción)
2. Tratamiento de 7.5 μ L de cada reacción de PCR con ExoSAP-IT según el siguiente procedimiento:

Reacción de PCR	5.0 μ L
<u>ExoSAP-IT</u>	<u>2.0 μL</u>
Volumen	7.0 μ L

3. Los siguientes procedimientos deben realizarse en un termociclador.
4. Mezclar en incubar a 37°C por 30 minutos.
5. Inactivar ExoSAP-IT calendo la reacción to 80°C por 15 minutos.
6. Mantener lar reacciones tratadas a at 4°C.
7. Conservarla a to –20C si se usara en un día diferente.

REACCION MULTIPLEX ASPE

Cada 20 μL de esta reacción contiene:

- 1X buffer ASPE (20 mM Tris-HCl, pH 8.4; 50 mM KCl)
- 1.25 mM MgCl_2
- 25 nM each oligonucleótidos TAG-ASPE
- 0.75 U *Taq DNA polimerasa recombinante*
- 5 μM dATP, dTTP, dGTP
- 5 μM biotina-dCTP
- 5 μL reaccion de PCR tratada
- dH₂O (to 20 μL)

2X ASPE Master Mix (10 μL /reacción):

10X buffer ASPE	2 μL
50 mM MgCl_2	0.5 μL
20X mezcla de oligonucleótidos	
TAG-ASPE (500 nM c/u)	1 μL (diluir el stock 1 mM : 1:2000 para una mezcla 20X)
5 U/ μL Taq DNA Polimerasa	0.15 μL
20X dNTP mix (-dCTP) (100 μM c/u)	1 μL (diluir el stock 100 mM 1:1000 para una mezcla 20X)
400 μM biotina-dCTP	0.25 μL
dH ₂ O	<u>5.1</u> μL
	10 μL

Parámetros de ciclaje ASPE:

Un ciclo de denaturación inicial de 96°C por 2 minutos, denaturación de 94°C, 30 segundos, hibridación 55°C, 1 minuto y extensión de 74°C, 2 minutos por un total de 35 ciclos y un ciclo final a 4°C.

HOLD:	96°C, 2 minutos
CYCLE:	94°C, 30 segundos
	55°C, 1 minuto
	74°C, 2 minutos
	35 ciclos para todos los genes
HOLD:	4°C

ANEXO N° 10: Procedimiento de hibridación con microesferas FlexMAP™

Las microesferas deben protegerse de la exposición prolongada a la luz a lo largo de este procedimiento.

1. Llevar las microesferas seleccionadas a temperatura ambiente, 1 hora antes de trabajar
2. Seleccionar las microesferas FlexMAP™ apropiadas y resuspenderlas en el vórtex durante aproximadamente 1-3 minutos.
3. Combinar 250 microesferas de cada una de las seleccionadas por cada reacción.
4. Concentrar la mezcla de microesferas FlexMAP™ por centrifugación a 12,000 R.P.M., o $\geq 8000 \times g$ por 1-2 minutos.
5. Retirar el sobrenadante y resuspender a 100 de cada una de las microesferas del set por μL usando el buffer de hibridación $2X T_m$ en vórtex por unos 20 segundos.
6. Alicuotar $25 \mu\text{L}$ de la mezcla de microesferas FlexMAP™ y colocarlas en cada uno de los pozos de trabajo.
7. Agregar $25 \mu\text{L}$ de agua a cada una de los que serán los blancos de la reacción
8. Agregar $5 \mu\text{L}$ de la reacción ASPE a cada uno de los pozos donde se correrán las muestras problema.
9. Agregar $20 \mu\text{L}$ a cada una los pozos donde se correrán las muestras problema
10. Cubrir la placa para evitar evaporación y denaturar a 96°C por 90 segundos, usar un termociclador.
11. Hibridar a 37°C por 60 minutos, usando un mezclador-incubadora.
12. Colectar el taco de microesferas FlexMAP™ por centrifugación a 7,000 R.P.M. ($\geq 2250 \times g$) por 3 minutos y remover el sobrenadante.
13. Resuspender el pellet de microesferas FlexMAP™ en $1000 \mu\text{L}$ de buffer de hibridación $1X T_m$.
14. Colectar el taco de microesferas FlexMAP™ por centrifugación $\geq 2250 \times g$ por 3 minutos y remover el sobrenadante.
15. Repetir los pasos 11. y 12. por un total de dos lavados.
16. Resuspender las microesferas en $100 \mu\text{L}$ de buffer de hibridación $1X T_m$ que contenga $2 \mu\text{g/mL}$ de estreptavidina R-ficoeritrina.
17. Incubar a 37°C por 15 minutos.
18. Analizar $100 \mu\text{L}$ a 37°C en el lector Bioplex-100 Biorad™ siguiendo las indicaciones del manual de instrucciones.

Referencia: Cookbook, Luminex corp.

<http://info.luminexcorp.com/download-the-xmap-cookbook>

ANEXO N° 11: Lista de microesferas usadas

Luminex® FlexMAP™ Microspheres Product Information Sheet

Distributed by MiraiBio

800-624-6176

APPENDIX A

Bead	Anti-Tag (on the bead)	Tag (appended to primer)	Bead	Anti-Tag (on the bead)	Tag (appended to primer)
LUA-1	GATTTGATATTGATGATTAAG	CTTTAACTCAATCAATCAAAATC	LUA-51	ATTGTTGATGATTGATGAAATGA	TCATTTCAATCAATCAATCAAAATC
LUA-2	TGATTTGATGATGATTTGATTAAG	CTTTAACAATCAATCAATCAATCA	LUA-52	ATTGTGAAGTATAAAGATGATTTGA	TCAAATCACTTTAATCTTCAAAAT
LUA-3	GATTTGATGATTTGATTAAGGATGTA	TACACTTTAACAATCAATCAATCA	LUA-53	TGTAGAAATGATGATGATTAATTA	TAAATTAACAATCTTCAATCTTCA
LUA-4	GATTTGAAATGATTTGATTAAGGATGTA	TACAATTAACAATCAATCAATCAATC	LUA-54	ATGAAATGAAAGTGAATGAAAGGATGTA	CTTTTCAATCAATCTTCAATCTTCA
LUA-5	GATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	CAATCAATCAATCAATCAATCAATC	LUA-55	GTTAGTTATGATGATGATTAATTA	TATATACTTCAATCAATCAATCA
LUA-6	GATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	TCAATCAATCTTTAACAATCAATCA	LUA-56	AAAGTGAATGATTAATGATTAATTA	CAATTTAACAATCAATCAATCTT
LUA-7	ATTGTTGAAATGATTTGATTTGATTTG	CAATTTAACAATCAATCAATCAATC	LUA-57	GTAATGATTAAGATGATTAATTA	CAATTAACAATCTTTAACAATCA
LUA-8	GTAAGTAAATGATTTGATTTGATTTG	AATCTTTAACAATCAATCAATCAATC	LUA-58	GTAATGATTAATGATTAATTAATTA	CTAATTAACAATCAATCAATCA
LUA-9	GTAAGTAAATGATTTGATTTGATTTG	TAACTTTAACAATCAATCAATCAATC	LUA-59	AAAGTGAAGGATTTGATTTGATTTG	TCATCAATCAATCTTTAACAATCA
LUA-10	TGATGATTTGATTTGATTTGATTTG	ATCAATCAATCAATCAATCAATCAATC	LUA-60	ATGATGATTTGATTTGATTTGATTTG	AACTTAACAATCAATCAATCTT
LUA-11	GATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	TACAATCAATCAATCAATCAATCAATC	LUA-61	TGAAGTAAATGATTTGATTTGATTTG	AACTTAACAATCAATCAATCTT
LUA-12	AAAGTAAATGATTTGATTTGATTTG	TACAATCTTTAACAATCAATCAATC	LUA-62	ATTGATTTGATTTGATTTGATTTG	TCAAATCAATCTTCAATCAATCA
LUA-13	TGATGATTTGATTTGATTTGATTTG	CAATTAACAATCAATCTTCAATCAATC	LUA-63	TGATGATTTGATTTGATTTGATTTG	CTAATTAACAATCTTCAATCAATC
LUA-14	AAAGTAAATGATTTGATTTGATTTG	CTAATTAACAATCAATCTTCAATCAATC	LUA-64	GTAAGTAAATGATTTGATTTGATTTG	CTAATTAACAATCTTCAATCAATC
LUA-15	TGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	ATACTTTAACAATCTTCAATCAATC	LUA-65	AAAGTAAATGATTTGATTTGATTTG	CTTTTCAATCAATCTTCAATCTT
LUA-16	TGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	AACTTTAACAATCTTCAATCAATCAATC	LUA-66	GTAAGTAAATGATTTGATTTGATTTG	TAACTTAACAATCTTCAATCAATC
LUA-17	TGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	CTTTAACAATCTTCAATCAATCAATC	LUA-67	GATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	TCATTAACAATCTTCAATCAATC
LUA-18	TGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	TCAATTAACAATCTTCAATCAATCAATC	LUA-68	AAAGTAAATGATTTGATTTGATTTG	TCATTAACAATCTTCAATCTT
LUA-19	GATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	TCAATTAACAATCTTCAATCAATCAATC	LUA-69	GATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	CTAATTAACAATCTTCAATCAATC
LUA-20	GATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	CTTTAACAATCTTCAATCAATCAATC	LUA-70	TGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	ATACTTAACAATCTTCAATCAATC
LUA-21	TGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	AACTTTAACAATCTTCAATCAATCAATC	LUA-71	ATGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	ATCAATTAACAATCTTCAATCAATC
LUA-22	TGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	AACTTTAACAATCTTCAATCAATCAATC	LUA-72	GATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	TCATTAACAATCTTCAATCAATC
LUA-23	AAAGTAAATGATTTGATTTGATTTG	TTCAATTAACAATCTTCAATCAATCAATC	LUA-73	ATTGATTTGATTTGATTTGATTTG	ATCAATTAACAATCTTCAATCAATC
LUA-24	GATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	TCAATTAACAATCTTCAATCAATCAATC	LUA-74	TGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	TACAATTAACAATCTTCAATCAATC
LUA-25	TGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	CTTTAACAATCTTCAATCTTCAATCAATC	LUA-75	TGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	AACTTAACAATCTTCAATCTT
LUA-26	TGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	TTAATTAACAATCTTCAATCTTCAATCAATC	LUA-76	GATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	AACTTAACAATCTTCAATCAATC
LUA-27	AAAGTAAATGATTTGATTTGATTTG	CTTTAACAATCTTCAATCTTCAATCAATC	LUA-77	GTAATGATTTGATTTGATTTGATTTG	CAATTAACAATCTTCAATCAATC
LUA-28	TGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	CTAATTAACAATCTTCAATCTTCAATCAATC	LUA-78	TGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	CTAATTAACAATCTTCAATCAATC
LUA-29	AAAGTAAATGATTTGATTTGATTTG	AACTTAACAATCTTCAATCTTCAATCAATC	LUA-79	ATGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	TTCAATTAACAATCTTCAATCAATC
LUA-30	GTAATTAACAATGATTTGATTTGATTTG	TTAATTAACAATCTTCAATCTTCAATCAATC	LUA-80	GTAATTAACAATGATTTGATTTGATTTG	CTAATTAACAATCTTCAATCAATC
LUA-31	GATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	TTCAATTAACAATCTTCAATCTTCAATCAATC	LUA-81	ATTGATTTGATTTGATTTGATTTG	CTTTAACAATCTTCAATCTT
LUA-32	GTAATTAACAATGATTTGATTTGATTTG	ATTAATTAACAATCTTCAATCTTCAATCAATC	LUA-82	ATGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	TACAATTAACAATCTTCAATCAATC
LUA-33	AAAGTAAATGATTTGATTTGATTTG	TCAATTAACAATCTTCAATCTTCAATCAATC	LUA-83	TGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	ATACTTAACAATCTTCAATCAATC
LUA-34	ATGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	TCAATTAACAATCTTCAATCTTCAATCAATC	LUA-84	ATTGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	TCAATTAACAATCTTCAATCAATC
LUA-35	TGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	CAATTTAACAATCTTCAATCTTCAATCAATC	LUA-85	TGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	ATACTTAACAATCTTCAATCAATC
LUA-36	ATTGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	CAATTTAACAATCTTCAATCTTCAATCAATC	LUA-86	ATTGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	CTAATTAACAATCTTCAATCAATC
LUA-37	ATTGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	CTTTAACAATCTTCAATCTTCAATCAATC	LUA-87	TGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	AACTTAACAATCTTCAATCAATC
LUA-38	ATTGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	TCAATTAACAATCTTCAATCTTCAATCAATC	LUA-88	GATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	TTAATTAACAATCTTCAATCAATC
LUA-39	ATGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	TACAATTAACAATCTTCAATCTTCAATCAATC	LUA-89	ATGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	TACAATTAACAATCTTCAATCAATC
LUA-40	TAAATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	CTTTAACAATCTTCAATCTTCAATCAATC	LUA-90	TTGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	CTAATTAACAATCTTCAATCAATC
LUA-41	ATTGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	TTAATTAACAATCTTCAATCTTCAATCAATC	LUA-91	GTAATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	TTCAATTAACAATCTTCAATCAATC
LUA-42	GTTTATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	CTAATTTAACAATCTTCAATCTTCAATCAATC	LUA-92	GTAATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	CTAATTAACAATCTTCAATCAATC
LUA-43	TGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	CTTTAACAATCTTCAATCTTCAATCAATC	LUA-93	GTTTATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	CTTTAACAATCTTCAATCTT
LUA-44	GTAATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	TCAATTTAACAATCTTCAATCTTCAATCAATC	LUA-94	ATTAATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	CTTTAACAATCTTCAATCTT
LUA-45	TTGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	TCAATTTAACAATCTTCAATCTTCAATCAATC	LUA-95	TTGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	TACAATTTAACAATCTTCAATCAATC
LUA-46	TGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	TACAATTTAACAATCTTCAATCTTCAATCAATC	LUA-96	GTTTAAATTTGATTTGATTTGATTTG	ATACTTAACAATCTTCAATCAATC
LUA-47	ATTAATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	CTTCAATTTAACAATCTTCAATCTTCAATCAATC	LUA-97	ATGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	AACTTAACAATCTTCAATCAATC
LUA-48	ATTAATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	AAAATTTAACAATCTTCAATCTTCAATCAATC	LUA-98	TTGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	AACTTAACAATCTTCAATCAATC
LUA-49	GTAATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	TCAATTTAACAATCTTCAATCTTCAATCAATC	LUA-99	TGATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	AACTTAACAATCTTCAATCAATC
LUA-50	GTAATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	CAAATTTAACAATCTTCAATCTTCAATCAATC	LUA-100	GTTAATTTGATTTGATTTGATTTGATTTG	CTAATTTAACAATCTTCAATCAATC

ANEXO N° 12: Instrumento de recolección de datos

Hoja de Resultados - Citómetro de flujo Bioplex-100 Biorad™

File Name: C:\Documents and Settings:

Acquisition Date:

Reader Serial Number: LX10005039303

RP1 PMT (Volts): 649.82

RP1 Target: 15993

Plate ID:

Pozo	Tipo	Descripción	437w (5)	437m (6)	Total	% de esferas aglutinadas	Errores
A8	X1						
B8	X2						
C8	X3						
D8	X4						
E8	X5						
F8	X6						
G8	X7						
H8	X8						

**Las microesferas usadas se indican entre paréntesis*

Esta hoja se preparó para efectos didácticos, la salida corresponde a resultados del gen Pfdhps, codón 437, en trabajos de laboratorio las salidas corresponden a todos los codones de un gen.