



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA, BIOTECNOLOGÍA Y  
MATERIALES

**ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE  
AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA DE ADN MEDIADA POR ASA PARA EL  
DIAGNÓSTICO PRECOZ DE LA INFECCIÓN CONGÉNITA POR  
*TRYPANOSOMA CRUZI***

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

**CONSUELO ELENA COVARRUBIAS SEGOVIA**

PROFESOR GUÍA:  
MARÍA ORIANA SALAZAR AGUIRRE

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:  
ESTEBAN M. CORDERO VEAS  
BÁRBARA A. ANDREWS FARROW  
MARÍA ISABEL JERCIC LARA

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por:  
Instituto de Salud Pública

SANTIAGO DE CHILE  
2021

RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR  
AL TÍTULO DE INGENIERA CIVIL  
EN BIOTECNOLOGÍA  
POR: **CONSUELO ELENA COVARRUBIAS SEGOVIA**  
FECHA: 2021  
PROF. GUÍA: MARÍA ORIANA SALAZAR AGUIRRE

**ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE  
AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA DE ADN MEDIADA POR ASA PARA EL  
DIAGNÓSTICO PRECOZ DE LA INFECCIÓN CONGÉNITA POR  
*TRYPANOSOMA CRUZI***

*Trypanosoma cruzi* es un protozoo causante de la enfermedad de Chagas; esta prevalece en zonas rurales, afectando a casi un 2% de la población en el país. El parásito puede ser transmitido por infección congénita desde una madre chagásica al hijo o hija antes de su nacimiento. Debido a la migración de la población hacia zonas urbanas; esta vía de infección ha permitido el desplazamiento de la patología a zonas no endémicas, transformándose así, en un problema para la salud pública.

Actualmente, la enfermedad se detecta por medio de pruebas serológicas y moleculares; proceso de larga duración. En base a lo planteado y con el fin de facilitar el procedimiento, en búsqueda de métodos simples y de menor costo, el presente estudio tiene como objetivo estandarizar y validar la técnica de amplificación isotérmica de ADN mediada por asa, para el diagnóstico precoz de la enfermedad adquirida por transmisión congénita. Para esto se diseña un sistema de detección con un grupo de partidores que amplifican una región del gen rARN 18S; y como base metodológica se comparan con partidores publicados en la literatura. Estos se implementan en pruebas preliminares que evidencien el funcionamiento de la técnica con muestras control. Se realiza una comparación teórica y práctica con la reacción de PCR, método de diagnóstico estándar en Chile.

La amplificación mediada por asa (LAMP), es un método sencillo y rápido; utiliza 4 a 6 partidores para amplificar una región restringida de una secuencia blanco; se incuba a temperatura constante y el resultado puede ser observado inmediatamente después de finalizada la reacción por simple visualización. No necesita de equipamiento sofisticado para su funcionamiento, por lo que, se puede implementar en centros de salud primarios y laboratorios con infraestructura básica. Ha sido probada en la detección de patógenos con importancia médica y veterinaria, presentando un gran potencial como prueba de diagnóstico.

A partir de los ensayos realizados, se obtienen resultados discordantes, concluyendo así que la técnica no es reproducible con los partidores seleccionados para el estudio. Por consiguiente, no se logra estandarizar ni validar la técnica. Sin embargo, se evidencia el potencial y los beneficios de su posible aplicación, cuando se complete el estudio.

*Lo esencial,  
es invisible a los ojos.*

***A la Tito***

# Agradecimientos

Tantas, tantas cosas suceden a diario, algunas nos detienen, otras ni las vemos; y solo unas pocas nos despiertan. Hoy, como todos los días, agradezco a la vida por el presente; y más aún por este proceso que culmina, que reunió a tantas personas que me acompañaron en este caminar, amigos, amigas y familia. Quiero agradecer a los profesores, los aprendizajes, a María Isabel por creer en mí, y a Esteban por las enseñanzas.

Y sin más preámbulo...

Qué vivan los estudiantes, jardín de las alegrías. Son aves que no se asustan de animal ni policía, y no le asustan las balas ni el ladrar de la jauría. Caramba y zamba la cosa, ¡QUÉ VIVA LA ASTRONOMÍA! Qué vivan los estudiantes, que rugen como los vientos, cuando les meten al oído sotas o regimientos, pajaritos libertarios igual que los elementos. Caramba y zamba la cosa, ¡VIVAN LOS EXPERIMENTOS! Me gustan los estudiantes porque son la levadura, del pan que saldrá del horno con toda su sabrosura, para la boca del pobre que come con amargura. Caramba y zamba la cosa, ¡VIVA LA LITERATURA! Me gustan los estudiantes porque levantan el pecho, cuando les dicen harina, sabiéndose que es afrecho, y no hacen el sordomudo cuando se presenta el hecho. Caramba y zamba la cosa, el Código del Derecho. Me gustan los estudiantes que marchan sobre las ruinas; con las banderas en alto va toda la estudiantina. Son químicas y biólogas, profesoras e ingenieras. Caramba y zamba la cosa, ¡VIVAN LAS ESPECIALISTAS!. Me gustan los estudiantes, que con mucha elocuencia, a la bolsa negra sacra, le bajan las indulgencias. Porque, ¿hasta cuándo dura señores toda la penitencia? Caramba y zamba la cosa, ¡QUÉ VIVA TODA LA CIENCIA! Y va la literatura, viva la jurisprudencia, que haya ciencia para todos y plata para la ciencia, ¡VIVA LA PEDAGOGÍA, LA MÚSICA, LA DOCENCIA! ¡QUE VIVA LA REBELDÍA Y LA NO VIOLENCIA!

Y por último, gracias eternas a la Tito, que lo logró!

# Tabla de Contenido

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2. Cuerpo</b>	<b>4</b>
2.1. Marco Teórico . . . . .	4
2.1.1. <i>Trypanosoma cruzi</i> . . . . .	7
2.1.2. Insecto vector: Triatomino . . . . .	8
2.1.3. Genoma de <i>Trypanosoma cruzi</i> . . . . .	9
2.1.4. Enfermedad de Chagas . . . . .	9
2.1.5. Diagnóstico de Enfermedad de Chagas . . . . .	13
2.1.6. Técnica de Amplificación Isotérmica de ADN Mediada por Asa (LAMP) . . . . .	14
2.1.7. Aplicaciones de la técnica . . . . .	22
2.2. Materiales y Métodos . . . . .	25
2.2.1. Selección de la secuencia blanco . . . . .	25
2.2.2. Identificación de la secuencia consenso . . . . .	25
2.2.3. Diseño de partidores LAMP . . . . .	25
2.2.4. Extracción de material genético . . . . .	26
2.2.4.1. Materiales . . . . .	26
2.2.4.2. Metodología . . . . .	27
2.2.5. Reacción de LAMP . . . . .	27
2.2.5.1. Materiales . . . . .	27
2.2.5.2. Metodología . . . . .	28
2.2.6. Detección colorimétrica de amplificación por LAMP . . . . .	29
2.2.6.1. Materiales . . . . .	29
2.2.6.2. Metodología . . . . .	29
2.2.7. Preparación de controles: positivo, negativo y de reactivos. . . . .	30
2.2.7.1. Materiales . . . . .	30
2.2.7.2. Metodología . . . . .	30
2.2.8. Electroforesis en gel de agarosa . . . . .	31
2.2.8.1. Materiales . . . . .	31
2.2.8.2. Metodología . . . . .	31
2.2.9. Estandarización de la amplificación isotérmica mediada por asa, LAMP . . . . .	31
2.2.9.1. Materiales . . . . .	31
2.2.9.2. Metodología . . . . .	32
2.2.10. Análisis de sensibilidad y especificidad analítica . . . . .	32
2.2.11. Materiales . . . . .	32
2.2.12. Metodología . . . . .	33
2.2.13. Validación estadística . . . . .	34

2.2.14. Comparación teórica y económica de la técnica de LAMP y la reacción de PCR convencional, en laboratorios de baja complejidad . . . . .	36
2.3. Resultados . . . . .	38
2.3.1. Elección del marcador y diseño de partidores . . . . .	38
2.3.2. Pruebas iniciales con muestras control . . . . .	39
2.3.3. Evaluación de la implementación de la técnica de LAMP . . . . .	44
2.4. Discusión . . . . .	45
<b>3. Conclusiones</b>	<b>54</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>56</b>
<b>Anexo A. Marco Teórico</b>	<b>62</b>
A.1. Unidades Discretas de Tipificación . . . . .	62
A.2. Algoritmo de detección de infección por <i>Trypanosoma cruzi</i> en el recién nacido, hijo de madre con enfermedad de Chagas. . . . .	64
<b>Anexo B. Metodología</b>	<b>65</b>
B.1. Cálculo para la preparación de solución madre de cada partidor . . . . .	65
B.2. Cálculo para la preparación de la solución de trabajo y mezcla de partidores (Primer MIX) . . . . .	66
B.3. Cálculo de molaridad de reactivos del tampón con colorímetro . . . . .	68
<b>Anexo C. Resultados</b>	<b>70</b>
C.1. Gen representante de cada DTU . . . . .	70
C.2. Secuencia de partidores diseñados . . . . .	70
C.3. Análisis de partidores diseñados . . . . .	72
C.3.1. Identificación secuencia a amplificar, alineamiento manual . . . . .	72
C.3.2. Alineamiento de secuencias del gen rARN 18S, de diferente DTU y secuencia amplificada por cada grupo de partidores . . . . .	74
C.3.3. Alineamiento partidor LB, Grupo 4 . . . . .	80
C.4. Estimación económica . . . . .	81
<b>Anexo D. Discusión</b>	<b>83</b>
D.1. Cálculo total de muestras a analizar . . . . .	83

# Índice de Tablas

2.1.	Partidores utilizados en estudio "Detection of <i>Trypanosoma cruzi</i> and <i>T. rangeli</i> Infections from <i>Rhodnius pallencens</i> Bugs by Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)" [48]	25
2.2.	Componentes de la reacción de amplificación isotérmica [48] [50]	28
2.3.	Composición primer MIX [48]	28
2.4.	Composición del tampón de amplificación isotérmica (1X) [50]	28
2.5.	Componentes de la reacción con rojo fenol	30
2.6.	Rangos de concentraciones a variar de cada reactivo [56]	32
2.7.	Partidores utilizados en estudio "Direct molecular polifing of minicircle signatures and lineages of <i>Trypanosoma cruzi</i> bloodstream populations causing congenital Chagas disease" [54]	33
2.8.	Componentes de la reacción de amplificación [54]	34
2.9.	Composición primer MIX, reacción de PCR [54]	34
2.10.	Composición de tampón de amplificación 10X para PCR [55]	34
2.11.	Tabla de Contingencia 2x2 [57]	35
2.12.	Escala de concordancia [60]	36
2.13.	Alineamiento partidores publicados por Thekiso, 2010 [48].	38
2.14.	Secuencia de partidores, Grupo 4	38
2.15.	Comparación entre la reacción de PCR convencional y LAMP; aspectos técnicos, teóricos y prácticos [9]	44
2.16.	Costo Equipos para LAMP, PCR y Electroforesis	44
A.1.	Cepa con su DTU correspondiente y el hospedero/vector del que se aisló [18].	62
B.1.	Concentración partidores obtenidos por bibliografía [48].	65
B.2.	Concentración partidores diseñados en el programa PrimerExplorer [36].	65
B.3.	Volumen de reconstitución para la preparación de solución madre, 200 $\mu$ M; partidores obtenidos por bibliografía [48].	66
B.4.	Volumen de reconstitución para la preparación de solución madre, 200 $\mu$ M; partidores diseñados [36].	66
B.5.	Concentración solución de trabajo de cada partidor	66
B.6.	Concentración solución de trabajo	67
B.7.	Composición Primer MIX	67
B.8.	Masa de reactivos tampón con colorímetro	68
B.9.	Peso Molecular de reactivos [67]	68
B.10.	Concentración de reactivos tampón con colorímetro	69
C.1.	Gen, Unidad Discreta de Tipificación correspondiente [18].	70
C.2.	Secuencia de partidores, Grupo 1	70
C.3.	Secuencia de partidores, Grupo 2	70
C.4.	Secuencia de partidores, Grupo 3	71

C.5.	Secuencia de partidores, Grupo 4 . . . . .	71
C.6.	Secuencia de partidores, Grupo 5 . . . . .	71
C.7.	Secuencia a amplificar, partidores Grupo 1 . . . . .	72
C.8.	Secuencia a amplificar, partidores Grupo 2 . . . . .	72
C.9.	Secuencia a amplificar, partidores Grupo 3 . . . . .	73
C.10.	Secuencia a amplificar, partidores Grupo 4 . . . . .	73
C.11.	Secuencia a amplificar, partidores Grupo 5 . . . . .	73
C.12.	Alineamiento secuencia blanco de partidores publicados por Thekiso, 2010 [48], con secuencias del gen rARN 18S, TcI-TcVI. . . . .	74
C.13.	Alineamiento secuencia blanco de partidores diseñados, Grupo 1, con secuencias del gen rARN 18S, TcI-TcVI . . . . .	75
C.14.	Alineamiento secuencia blanco de partidores diseñados, Grupo 2, con secuencias del gen rARN 18S, TcI-TcVI . . . . .	76
C.15.	Alineamiento secuencia blanco de partidores diseñados, Grupo 3, con secuencias del gen rARN 18S, TcI-TcVI . . . . .	77
C.16.	Alineamiento secuencia blanco de partidores diseñados, Grupo 4, con secuencias del gen rARN 18S, TcI-TcVI . . . . .	78
C.17.	Alineamiento secuencia blanco de partidores diseñados, Grupo 5, con secuencias del gen rARN 18S, TcI-TcVI . . . . .	79
C.18.	Alineamiento partidior LB, partidores Grupo 4 . . . . .	80
C.19.	Estimación de costo por reacción LAMP . . . . .	81
C.20.	Estimación de costo Primer MIX 1X para LAMP, solución de trabajo 160 $\mu$ M partidores FIP, BIP y 20 $\mu$ M partidores F3 y B3 . . . . .	81
C.21.	Estimación de costo por reacción de PCR . . . . .	82
C.22.	Estimación de costo Primer MIX reacción de PCR, solución de trabajo 50 $\mu$ M . . . . .	82
C.23.	Estimación de costo Electroforesis . . . . .	82

# Índice de Ilustraciones

2.1.	Diagrama de las principales estructuras de un tripomastigote sanguíneo, reveladas por microscopía electrónica de transmisión [1]. . . . .	5
2.2.	Estadios morfológicos de tripanosomátidos. (a) Amastigote; (b) Choanomastigote; (c) Promastigote; (d) Opisthomastigote; (e) Epimastigote; (f) Tripomastigote. 1. núcleo; 2. cinetoplasto; 3. cinetosoma; 4. y 5. axonema y flagelo; 6. membrana ondulante; 7. bolsillo flagelar; 8. vacuola contráctil [1]. . . . .	6
2.3.	Esquema ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> [1]. . . . .	8
2.4.	Distribución de la Enfermedad de Chagas alrededor del mundo, 2018 [2]. . . . .	10
2.5.	Diagrama de nomenclatura y localización de partidores de la técnica de LAMP. Partidor FIP: F1c/F2; partidor BIP: B1c/B2 [36]. . . . .	16
2.6.	Diagrama de la amplificación primera hebra de ADN, mediante la técnica LAMP [9]. . . . .	16
2.7.	Diagrama desplazamiento y amplificación de ADN a partir del partidor F3, técnica LAMP [37]. . . . .	17
2.8.	Diagrama formación de la asa, técnica LAMP [37]. . . . .	17
2.9.	Diagrama alineamiento partidor BIP, formación de la asa e inicio de nuevos ciclos, técnica LAMP [37]. . . . .	17
2.10.	Diagrama etapa inicial técnica LAMP [32]. . . . .	18
2.11.	Diagrama etapa amplificación cíclica técnica LAMP [32]. . . . .	19
2.12.	Diagrama etapa elongación y reciclaje técnica LAMP [32]. . . . .	20
2.13.	Diagrama continuación etapa, elongación y reciclaje técnica LAMP [32]. . . . .	21
2.14.	Tubos de reacción LAMP, con rojo fenol. . . . .	39
2.15.	Electroforesis en gel de agarosa 2%. Pocillos 1, 2 y 3: reacción con tampón comercial; Pocillos 4, 5 y 6: reacción con rojo fenol (halocromo). Orden de muestras: control negativo (1 y 4), control de reactivos (2 y 5), control positivo (3 y 6). . . . .	39
2.16.	Electroforesis en gel de agarosa 2%, repetición reacción con tampón comercial. Pocillo 1: control negativo, Pocillo 2: control de reactivos, Pocillo 3: control positivo. . . . .	40
2.17.	Electroforesis en gel de agarosa 2%, curva de calibración con betaína 0; 0,2; 0,4; 0,6 y 0,8 M, reacción a 63 °C, partidores de Thekiso, 2010. Orden de muestras: control negativo (pocillos 1, 4, 7, 10, 13), control de reactivos (pocillos 2, 5, 8, 11, 14), control positivo (pocillos 3, 6, 9, 12, 15). . . . .	41
2.18.	Electroforesis en gel de agarosa 2%, curva de calibración con betaína 0; 0,2; 0,4; 0,6 y 0,8 M, reacción a 65 °C, partidores de Thekiso, 2010. Orden de muestras: control negativo (pocillos 1, 4, 7, 10, 13), control de reactivos (pocillos 2, 5, 8, 11, 14), control positivo (pocillos 3, 6, 9, 12, 15). . . . .	42

2.19.	Electroforesis en gel de agarosa 2%, curva de DMSO 0; 2,5; 5; 7,5 y 10%, 65 °C, partidores de Thekiso, 2010. Orden de muestras: control negativo (pocillos 1, 4, 7, 10, 13), control de reactivos (pocillos 2, 5, 8, 11, 14), control positivo (pocillos 3, 6, 9, 12, 15). . . . .	42
2.20.	Electroforesis en gel de agarosa, curva de calibración con betaína 0; 0,2; 0,4; 0,6 y 0,8 M, 65 °C, partidores diseñados. Orden de muestras: control negativo (pocillos 1, 4, 7, 10, 13), control de reactivos (pocillos 2, 5, 8, 11, 14), control positivo (pocillos 3, 6, 9, 12, 15). . . . .	43
2.21.	Electroforesis en gel de agarosa 2%, curva de DMSO 0; 2,5; 5; 7,5 y 10%, 65 °C, partidores diseñados. Orden de muestras: control negativo (pocillos 1, 4, 7, 10, 13), control de reactivos (pocillos 2, 5, 8, 11, 14), control positivo (pocillos 3, 6, 9, 12, 15). . . . .	43
A.1.	Algoritmo de diagnóstico enfermedad de chagas, recién nacido de madre infectada [30]. . . . .	64

# Capítulo 1

## Introducción

La enfermedad de Chagas es una infección parasitaria endémica en América Latina, causada por el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, de la clase *Kinetoplastea*, familia *Trypanosomatidae* [1]. La afección recibe su nombre en honor al científico brasileño Carlos Chagas, quien identificó el agente etiológico y describió la patología. Se estima que 6 a 7 millones de personas alrededor del mundo se encuentran infectadas con el parásito [2]. En Chile específicamente, se distribuye entre las regiones de Arica y Parinacota hasta la región de Libertador Bernardo O'Higgins, incluyendo la región Metropolitana [3].

El mal de Chagas es considerado una de las enfermedades tropicales más desatendidas [4], debido a su prevalencia en zonas rurales de bajos ingresos y al escaso financiamiento para la investigación y desarrollo de terapias eficientes y seguras. La enfermedad se desarrolla en dos fases: una aguda que se inicia con la inoculación del parásito y presenta una parasitemia elevada con sintomatología inespecífica, que se mantiene hasta 4 meses luego de la infección; y otra crónica, generalmente asintomática, en la que disminuye la concentración de parásitos en sangre. En la fase crónica sintomática se presenta una cardiopatía que puede llegar a ser severa. La gravedad de la enfermedad varía en cada paciente, siendo mortal a largo plazo. Los principales síntomas son: anemia, pérdida de fuerza y tono muscular, desorden nervioso e insuficiencia cardíaca [5].

El parásito posee diversas formas de transmisión, la principal es mediante un insecto vector hematófago, conocido popularmente en Chile como vinchuca; éste se caracteriza por vivir en zonas montañosas y lugares oscuros como grietas en paredes de casas de adobe. El parásito está presente en las deyecciones del triatomino, las que son depositadas en la piel del vertebrado durante la ingesta de sangre. Al entrar en contacto con la mucosa o zonas lesionadas del tejido, invade las células subyacentes y se reproduce activamente en su interior. Los parásitos intracelulares destruyen la célula infectada y se liberan al torrente sanguíneo propagando la infección. Otras formas de transmisión son: transfusión sanguínea o trasplante de órganos de pacientes infectados; consumo de alimentos contaminados, accidentes de laboratorios y por infección congénita.

La transmisión congénita de la enfermedad de Chagas se confirma cuando, en neonatos hijos de una madre infectada, se identifican parásitos circulantes y/o se detectan anticuerpos contra el microorganismo que no son de origen materno, descartando otras vías de transmisión. Usualmente los niños y niñas infectados que nacen de madres chagásicas no presentan sín-

tomas, por lo que se debe realizar un seguimiento durante sus primeros meses de vida. Esta vía de transmisión se presenta en áreas endémicas o bien en aquellas en donde la transmisión vectorial ha sido interrumpida, así como en zonas no endémicas, traspasando desde una generación a otra [6].

En menores de 5 años la enfermedad puede ser letal, no obstante, si se trata durante el primer año de vida se llega a la cura, por lo que es fundamental contar con un diagnóstico certero y rápido. Actualmente se utilizan técnicas parasitológicas, las que poseen una sensibilidad limitada debido a la baja circulación de parásitos en sangre. Es por esto que se emplean pruebas serológicas desde los 8 a 10 meses de vida, en donde los anticuerpos del neonato son detectables [7].

Las técnicas moleculares son una alternativa prometedora, debido a su elevada sensibilidad y especificidad. Actualmente en Chile, la reacción en cadena de polimerasa (PCR) [8], está incluida dentro del protocolo de diagnóstico, no obstante, requiere de un equipamiento sofisticado y de alto costo; los que generalmente no están disponibles en zonas rurales endémicas. Por otra parte, en el país la enfermedad es diagnosticada y/o confirmada por el Instituto de Salud Pública de Chile (ISP), en el Laboratorio de Parasitología, a través de pruebas serológicas y moleculares, lo que aumenta el tiempo de respuesta para la emisión de resultados, debido al traslado de las muestras de una región a otra.

Frente al establecimiento de la enfermedad a zonas no endémicas, a la prevalencia en zonas rurales con recursos limitados y a la urgencia en el diagnóstico de la enfermedad en niños y niñas recién nacidos con riesgo de contagio por infección congénita; se requiere un método accesible, que sea de menor costo, fácil implementación y resolución.

La técnica de amplificación isotérmica de ADN mediada por asa (LAMP), es un método molecular que se basa en la síntesis de ADN de ciclo automático utilizando la ADN polimerasa de *Bacillus stearothermophilus* (*Bst*), enzima que se caracteriza por una actividad de desplazamiento de cadena. Para su implementación se necesitan 4 a 6 partidores que permiten la amplificación de secuencias dianas en menos de una hora, mediante la formación de asas, a una temperatura constante; por lo que, no requiere de un equipo sofisticado para su implementación. El resultado de la reacción, se puede observar a simple vista, es específico y sensible en la detección de microorganismos [9].

La técnica de LAMP es una herramienta robusta para la detección de diferentes patógenos, existiendo múltiples ejemplos de su aplicación en infecciones producidas por bacterias, hongos, parásitos y virus de importancia médica y veterinaria [10]. En la actualidad, se comercializan kits de diagnóstico para SARS-CoV-2, *Trypanosoma brucei*, entre otros.

La presente investigación es patrocinada por el Instituto de Salud Pública, ISP, y busca cumplir los siguientes objetivos:

Objetivo general:

Estandarizar y validar la técnica de LAMP para el diagnóstico precoz de la infección congénita por *Trypanosoma cruzi*.

Objetivos específicos:

1. Diseñar un sistema de detección de *Trypanosoma cruzi* utilizando la técnica de LAMP.
2. Evaluar el funcionamiento de la técnica a través de pruebas básicas con muestras de control, como parte del proceso de estandarización.
3. Realizar pruebas clínicas preliminares para analizar parámetros de sensibilidad y especificidad analíticas y clínicas en comparación a la prueba de referencia, PCR.
4. Comparar la técnica con el método de diagnóstico estándar, reacción de PCR convencional, desde el punto de vista teórico y económico.

# Capítulo 2

## Cuerpo

### 2.1. Marco Teórico

La simbiosis es aquella relación que se establece entre dos organismos que viven en conjunto. Dentro de estas relaciones se encuentran: la Foresis, en la que dos individuos viajan en conjunto; el Mutualismo donde ambos se benefician; el Comensalismo en la que uno obtiene utilidades; y el Parasitismo, en la que uno de los participantes se ve perjudicado. En esta última, el parásito vive a expensas de otro ser vivo, generando un daño mecánico, por inducción de una respuesta inmune nociva y/o viviendo a expensas de la nutrición de su hospedero [1].

Los parásitos se clasifican en: ectoparásitos, los que viven en la superficie de otro ser vivo; y endoparásitos, que habitan dentro del hospedero. La mayoría de estos organismos no pueden completar su ciclo de vida sin establecer una relación parasitaria, al menos de forma temporal. De hecho, algunos poseen estados libres, fuera de cualquier hospedero y otros pueden convertirse en parásitos al entrar accidentalmente en otro ser vivo, los que se conocen como parásitos facultativos, por ejemplo, la ameba *Naegleria fowleri*[1].

Los parásitos poseen hospederos de especie restringida, exhibiendo diversos grados de especificidad, infectando a familias de especies o solo a una especie determinada. Este es susceptible a un parásito si es que no puede eliminarlo antes de que se vuelva estable, independiente de su estado infeccioso. No obstante, el hospedero puede ser resistente al microorganismo si su estado fisiológico impide el establecimiento y la supervivencia del parásito. Por lo que, si se encuentra en un huésped equivocado puede morir o volverse extremadamente patógeno, al ser incapaz de adaptarse a estas condiciones adversas.

Los hospederos se clasifican según el rol que cumplen en el ciclo de vida del parásito; pueden ser: definitivos, en el que se alcanza la madurez sexual; intermedio, donde el microorganismo se desarrolla, pero no se reproduce; y de transporte, el cual se utiliza como puente entre los hospederos intermedios y los definitivos. Por lo que, dependiendo de la estancia en cada uno de estos, los parásitos pueden ser permanentes o temporales.

Los parásitos que infectan al ser humano pertenecen al dominio *Eukaryota*, de los reinos *Protozoa* y *Metozoa* [11]. Dentro del reino de los protozoos se encuentra la clase *Kinetoplastea*; caracterizada por microorganismos que poseen un organelo denominado cinetoplasto, el cual contiene ADN circular, organizado en anillos concatenados (ADNk), localizados al interior de

la mitocondria. Dentro de esta clase se encuentra la familia *Trypanosomatidae*, conformada por protozoos flagelados, los que pueden ser monoxenos, es decir, parasitan a un solo hospedero artrópodo, o heteroxeno, que utilizan más de un hospedero para completar su ciclo de vida, uno de ellos generalmente, corresponde a un invertebrado hematófago y el otro a un vertebrado. El estadio más reconocido es el tripomastigote, característico de las especies de tripanosomas sanguíneos [1].

Los tripomastigotes poseen el cinetoplasto en el extremo posterior del cuerpo, junto con un flagelo que recorre la totalidad del parásito. En la base del flagelo se encuentra el bolsillo flagelar, región encargada del intercambio activo con el medio. En la figura 2.1, se observan las principales estructuras del tripomastigote sanguíneo.

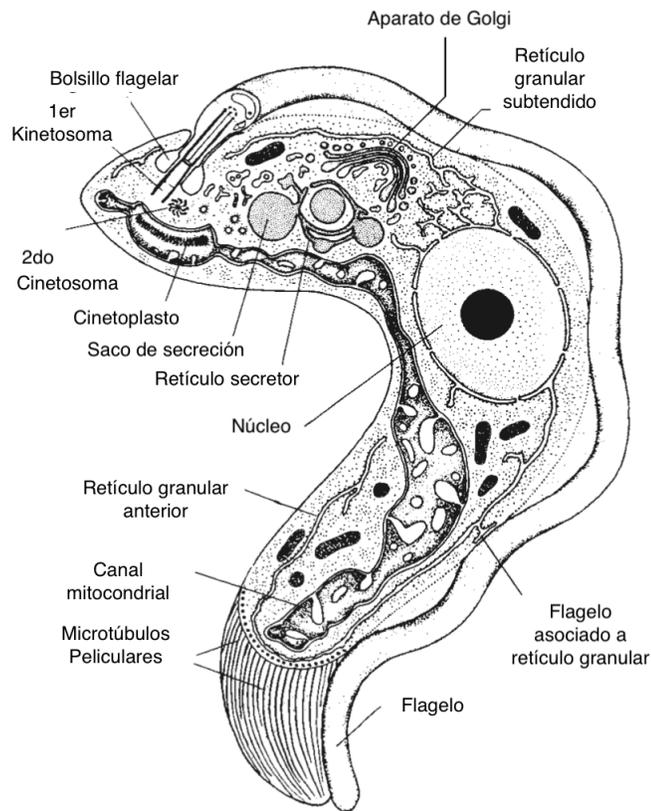


Figura 2.1: Diagrama de las principales estructuras de un tripomastigote sanguíneo, reveladas por microscopía electrónica de transmisión [1].

Otros estadios de tripanosomátidos difieren en la posición del cinetoplasto, del cinetosoma, el desarrollo de su flagelo y el tamaño de su bolsillo flagelar. Dentro de estos se encuentran: los amastigotes, forma esferoide con un flagelo corto; los promastigotes poseen un cuerpo más alargado y un flagelo extendido frente al organelo funcional; los epimastigotes, el cinetoplasto se ubica entre el núcleo y el extremo anterior; y por último los paramastigote que tienen el cinetoplasto junto al núcleo. En la figura 2.2 se muestra el diagrama de las estructuras caracterizadas anteriormente.

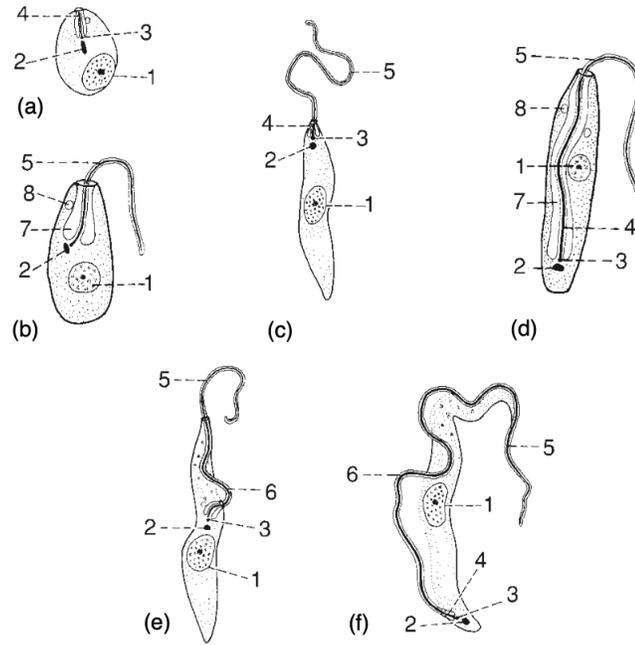


Figura 2.2: Estadios morfológicos de tripanosomátidos. (a) Amastigote; (b) Choanomastigote; (c) Promastigote; (d) Opisthomastigote; (e) Epimastigote; (f) Tripomastigote. 1. núcleo; 2. cinetoplasto; 3. cinetosoma; 4. y 5. axonema y flagelo; 6. membrana ondulante; 7. bolsillo flagelar; 8. vacuola contráctil [1].

El género *Trypanosoma* se divide en dos secciones dependiendo de las características del insecto vector: La Salivaria y la Stecoraria. La primera se extiende principalmente por África y predomina la especie *Trypanosoma brucei*. La segunda comprende América del Sur y Central, en donde se encuentran las especies *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli*.

La infección por las especies *T. brucei gambiense* y *T. brucei rhodesiense*, causan la tripanosomiasis africana humana conocida como enfermedad del sueño; transmitida por la mosca tsetse, perteneciente al género *Glossina* [4].

*T. rangeli* se desarrolla como epimastigote en el intestino grueso del insecto vector, donde puede llegar a medir entre 32 a más de 100  $\mu\text{m}$  de largo, su forma tripomastigote en cambio, posee una longitud entre 26 a 36  $\mu\text{m}$  de largo. Se diferencia de *T. cruzi* por el tamaño de su cinetoplasto, el que generalmente es diminuto y se ubica en la sección subterminal del microorganismo. Se multiplica por fisión binaria en la sangre de su hospedero vertebrado, no obstante, no se conoce su estado intracelular y no presenta patogenicidad en humanos, pero su presencia genera dificultades en el proceso de detección, debido a reacciones cruzadas en las pruebas de detección de *T. cruzi* [1].

Otro género dentro de la familia *Trypanosomatidae* es *Leishmania*. Estos parásitos son heteroxenos, es decir, se desarrollan como promastigotes en el intestino de la mosca de arena y completan su ciclo de vida en el tejido de un mamífero vertebrado, como amastigotes [1].

La enfermedad *leishmaniasis* es provocada por la infección de más de 20 especies de parásitos pertenecientes a este género; es considerada endémica en 98 países, afectando a 12 millones de personas en el mundo [12], y puede afectar a animales, por lo que se considera una zoonosis.

Tras su inoculación en la piel del hospedero, *Leishmania* infecta a las células fagocíticas. La evolución de la enfermedad depende de las condiciones ambientales, la distribución y biología del vector, aspectos sociales y económicos de las personas afectadas [4]. La enfermedad se puede desarrollar de tres formas clínicas: cutánea (LC), mucocutánea (MCL) y sistemática visceral (LV), siendo esta última la más destructiva, llegando a ser fatal si no es tratada [13].

### 2.1.1. *Trypanosoma cruzi*

*Trypanosoma cruzi* es un protozoo perteneciente al género *Trypanosoma*, es heteroxeno, utiliza dos hospederos para completar su ciclo de vida, un invertebrado hematófago y un vertebrado. La forma tripomastigote puede llegar a medir entre 16 a 20  $\mu\text{m}$  de largo. Presenta un metabolismo fermentativo anaeróbico parcial, es decir, degrada la glucosa parcialmente a anhídrido carbónico, excretando succinato y acetato. En el torrente sanguíneo consume oxígeno, mediante un ciclo de Krebs clásico y posee un sistema citocromo común.

En el intestino del insecto vector, *T. cruzi* se multiplica como epimastigote, los que al llegar al intestino posterior se diferencian a su forma infectiva, tripomastigote metacíclico; estos finalmente son eliminados en las deyecciones del invertebrado durante la ingesta de sangre. El parásito entra al hospedero a través de la mucosa o por heridas en la piel contaminada. En la infección temprana, los tripomastigotes, son abundantes en sangre y se reproducen en el citoplasma de las células nucleadas a las que penetran mediante invasión activa o por fagocitosis. En el interior de la célula infectada, pierden el flagelo y la membrana ondulada, y comienzan a multiplicarse por fisión binaria, produciendo amastigotes, los que se acumulan hasta provocar la lisis y muerte celular. Al salir al torrente sanguíneo se transforman en tripomastigotes, para esto, en el espacio intersticial pasan por formas intermedias como promastigotes y epimastigotes, las que se desarrollan y vuelven a la sangre como tripomastigotes, encargados de infectar otra célula. En la figura 2.3 se esquematiza el ciclo de vida del parásito.

El tripomastigote sanguíneo ingerido por el insecto hematófago, alcanzan el intestino medio y se transforma en epimastigote para multiplicarse activamente. Tripomastigotes metacíclicos aparecen en el recto luego de 10 días de la infección, estos son los que finalmente son expulsados en las heces. Al entrar al tejido subcutáneo se produce una inflamación local, luego de una o dos semanas se diseminan por los ganglios linfáticos. Frente a la acumulación de amastigotes se producen pseudoquistes en los tejidos, los que al estallar producen una parasitemia generalizada, en donde se invaden otros tejidos, tales como: muscular cardíaco, liso y esquelético; así como también pueden invadir el bazo, el hígado y el sistema linfático. Esta ruptura es acompañada por una respuesta inflamatoria con degradación y necrosis de tejidos.

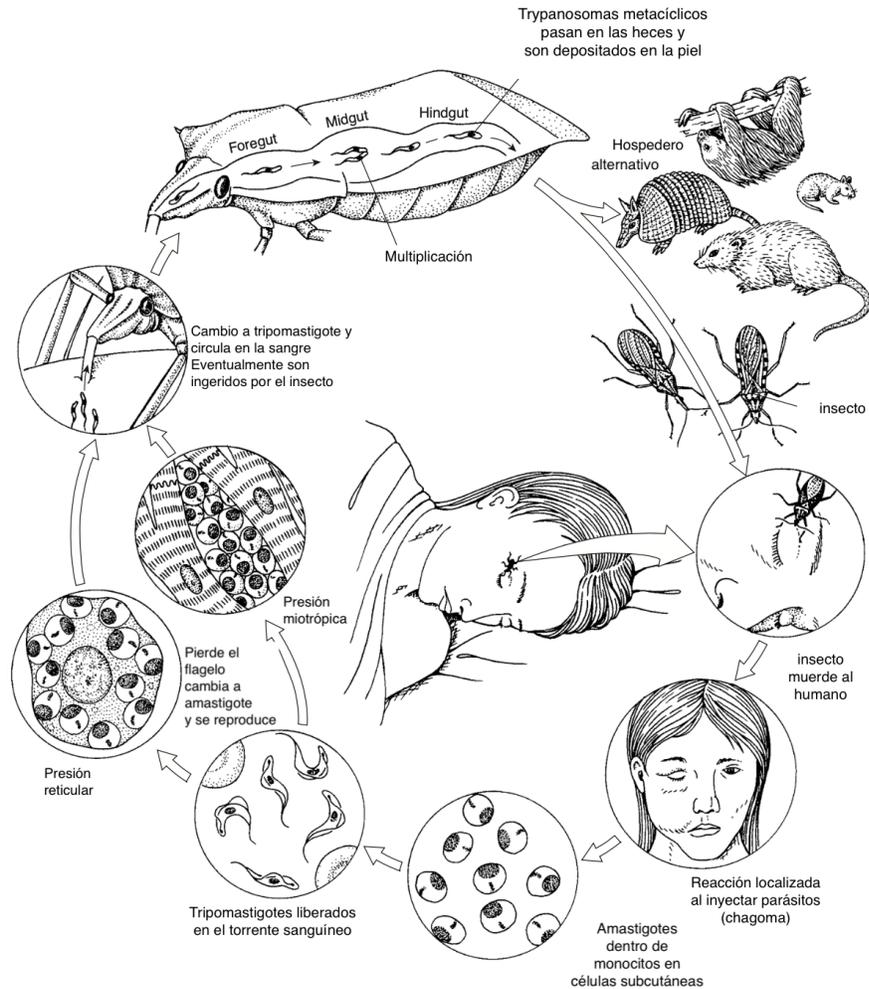


Figura 2.3: Esquema ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*[1].

### 2.1.2. Insecto vector: Triatomino

El insecto vector de *T. cruzi* es un triatomino perteneciente a la subfamilia *Triatominae*. Son invertebrados hematófagos, que se alimentan de la sangre de vertebrados. Suelen ser nocturnos y atacar zonas expuestas de la piel. Poseen una longitud de 34 mm aproximadamente, antenas segmentadas, una cabeza estrecha, sus ojos se ubican a los costados de esta; y poseen un tubo labial de tres segmentos los que se pliegan en reposo. Sus alas están en la parte superior del abdomen. Generalmente viven en grietas y entretechos, zonas oscuras y húmedas [1].

Existen más de 130 especies de triatominos en América, muchos de los cuales son potenciales vectores de *T. cruzi*. Las especies que juegan un rol importante desde el punto de vista epidemiológico son: *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata*, *Panstrongylus megistus* y *Triatoma brasiliensis* [14].

En Chile se describen tres especies de triatominos: *Triatoma infestans*, especie doméstica y las especies silvestres *Mepraia spinolai* y *Mepraia gajardoii*, ubicadas en el Norte Grande del país [15].

### 2.1.3. Genoma de *Trypanosoma cruzi*

Todos los miembros de la especie *T. cruzi* provienen de un ancestro común y son genéticamente heterogéneos [16]. Diversos conceptos han sido definidos para describir los linajes filogenéticos de este microorganismo. La producción de híbridos experimentales demostró que el parásito tiene la capacidad de realizar intercambio genético, pero no se logró explicar el mecanismo de recombinación. Sin embargo, la especie posee características clonales, tales como: falta de reproducción sexual, asociación aleatoria y división en grupos discretos [17].

El término Unidades Discretas de Tipificación (DTUs), describe un conjunto de cepas que están genéticamente ligadas entre sí, más que con cualquier otra, y pueden ser identificadas mediante marcadores moleculares o inmunológicos comunes. Esto no quiere decir que sean idénticos, sino que comparten un perfil determinado con un cierto grupo, por lo que, las cepas que conforman cada DTU se consideran familias de clones estrechamente relacionadas. Actualmente se han designado seis DTUs, TcI a TcVI [18]. En el Anexo A.1, tabla A.1, se presenta la distribución de algunas cepas de *T. cruzi* con su respectivo DTU.

El parásito es predominantemente diploide, se reproduce de forma asexual, por lo que no presenta eventos de recombinación al duplicarse. Bajo el modelo clonal, *T. cruzi* evoluciona a partir de la acumulación de mutaciones discretas [16]. La mayoría de los DTUs, son homocigotos, sin embargo, TcV y TcVI son heterocigotos, híbridos derivados de TcII y TcIII.

Existen dos modelos que explican la estructura poblacional: el primero de Westernberger, 2005 [19], postula el modelo de los dos híbridos, el cual explica la ocurrencia de un evento antiguo de hibridación entre TcI y TcII, produciendo los DTUs TcIII y TcIV, los que perdieron luego su heterocigocidad; y un segundo evento de hibridación más reciente entre TcII y TcIII del cual se obtienen TcV y TcVI. El segundo modelo propuesto por De Freitas, 2006 [20], se denomina de tres ancestros; este sugiere que TcIII y TcIV provienen de diferentes ancestros, los que poseen secuencias mitocondriales similares entre sí, distintas a las de TcI y TcII. Además, postula dos acontecimientos de intercambio genético entre TcII y TcIII produciendo TcV y TcVI que retienen el genoma mitocondrial de TcIII en ambos casos. Los modelos se distinguen por la procedencia de TcV y TcVI, es decir, o provienen de un evento único de hibridación, incorporando alelos de TcI adquiridos a través de TcIII o son progenie de dos eventos con exclusión del genoma de TcI.

Entre los marcadores moleculares más estudiados se destacan: análisis electroforéticos de isoenzimas o zimodemas; esquizodemas obtenidas a partir de perfiles de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción del kDNA (RFLP); polimorfismos detectados por técnicas de Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD); Low Stringency Single Primer PCR (LSSP-PCR); perfiles de microsatélites, genes de ARN ribosomal (rRNA) y mini exón [16].

### 2.1.4. Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas es una infección parasitaria crónica potencialmente mortal producida por *T. cruzi*. Se estima que posee una incidencia mundial de 180 mil casos al año y 7.100 muertes reportadas en el año 2016, con una tendencia estable desde el 2006. La enfermedad es considerada endémica en 21 países de América Latina, incluido Chile y debido a

los movimientos migratorios, se han detectado casos en Canadá y Estados Unidos [2]. Originalmente estaba confinada en zonas rurales, pero actualmente se ha desplazado a las grandes ciudades. En la figura 2.4 se muestra la distribución de la enfermedad alrededor del mundo, publicado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2018 [2].

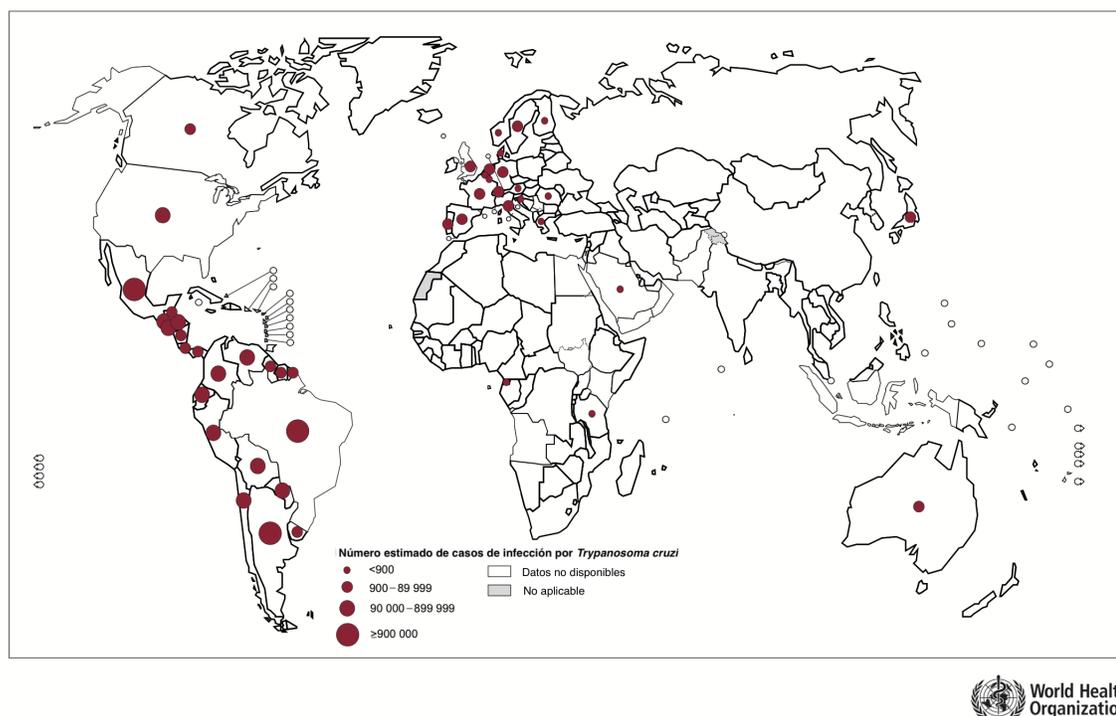


Figura 2.4: Distribución de la Enfermedad de Chagas alrededor del mundo, 2018 [2].

La enfermedad fue descrita por el científico brasileño Carlos Chagas (1879-1934), quien en el año 1909, identificó tripanosomas en forma de epimastigotes en un insecto vector perteneciente a la subfamilia *Triatominae*. Luego, en el año 1916, demostró que niños con fiebre aguda presentaban tripanosomas en sangre, así continuó su investigación describiendo las formas de vida del parásito y los insectos que los transmiten. Sin embargo, en Chile se evidencia la presencia de la enfermedad hace aproximadamente 9.000 años en el norte del país, en momias con una antigüedad entre 470 años A.C y 600 años D.C.; las primeras investigaciones que permitieron detectar la presencia de *T. cruzi* en las deyecciones de *T. infestans* en Chile, datan de 1921 [3].

En el año 2010 el ISP confirmó 1.200 casos de infección por *T. cruzi*, donde 1.168, es decir, un 98,5% fueron notificadas desde la región de Arica y Parinacota hasta la región Libertador Bernardo O'Higgins, incluida la región Metropolitana, zonas endémicas dentro del país [6].

El parásito afecta a un 0,7% de la población mayor de 15 años, con prevalencia de 1,5% en zonas rurales y un 0,6% en zonas urbanas. La región de Atacama se destaca por presentar una prevalencia del 4,7% en comparación con las otras regiones norteñas que registran entre un 1,3% a un 1,8%. Desde la región de Valparaíso hacia el sur se tiene entre un 0,7% a un 0,9%, datos recopilados por la Encuesta Nacional de la Salud (ENS) 2009-2010 [6]. En

cuanto a la mortalidad, esta ha disminuido en los últimos años, representando el 0,05 % de las muertes anuales, donde todas las personas afectadas son mayores de 40 años y de estos el 61,5 % son hombres [6].

La enfermedad se desarrolla en dos etapas, una aguda que se inicia con la inoculación del parásito y posee una duración de 2 a 4 meses. En la zona de entrada del parásito se produce una respuesta inflamatoria local que provoca un nódulo conocido como chagoma. En esta etapa, pseudoquistes pueden desarrollarse en los diferentes órganos del cuerpo, lo que varía la gravedad del paciente, no obstante, en niños menores de 5 años puede llegar a ser letal. Los factores que influyen en el desarrollo de la enfermedad son: la edad, carga genética, el sexo y la presencia de infecciones previas; aún así se desconoce cómo se relacionan entre sí. Los principales síntomas de la fase aguda son: anemia, pérdida de fuerza muscular, desorden nervioso e insuficiencia cardíaca. En Sudamérica es común la destrucción del esófago o del colon, generando pérdida del tono muscular del órgano, lo cual aumenta su diámetro y dificulta el paso de nutrientes; esto se conoce como megaesófago o megacolon [1].

En la etapa crónica, la concentración de parásitos disminuye, y esta se puede presentar con una total ausencia de síntomas o manifestar una sintomatología que incluye una cardiopatía severa, desarrollando complicaciones cardíacas y/o neurológicas [8].

En zonas rurales, con presencia del triatomino vector, el parásito puede ser transmitido a través del contacto con las deyecciones del insecto cargadas de tripomastigotes metacíclicos [21]; los que penetran activamente por las mucosas o lesiones de la piel. Del mismo modo, la infección se puede adquirir a través del consumo de alimentos contaminados con las deyecciones del insecto vector infectado. Adicionalmente, el parásito se puede transmitir por transfusión sanguínea o trasplante de órganos derivados de individuos infectados, vía que comenzó debido a la migración a las grandes ciudades [22].

*T. cruzi* posee la capacidad de atravesar la barrera placentaria, lo que puede provocar la infección del feto durante la gestación de una madre infectada [23]. Esta transmisión congénita se considera cuando se identifica la presencia de *T. cruzi* en la sangre de un recién nacido; o bien, si presenta anticuerpos específicos que no son de origen materno; descartándose otras vías de transmisión [7]. Si bien, la mayoría de los recién nacidos infectados nacen asintomáticos, en ausencia de tratamiento oportuno la enfermedad puede progresar a una fase crónica severa; no obstante, se logra la cura si es tratada en el primer año de vida, por lo que, un diagnóstico certero es fundamental.

Al igual que en la fase crónica adquirida de forma vectorial, la infección congénita se puede manifestar meses o años después. Los síntomas en niños o niñas son similares al síndrome de TORCH [24], el que representa un grupo de enfermedades infecciosas que pueden originar lesiones fetales y neonatales por transmisión vertical, tales como: toxoplasmosis, rubéola, citomegalovirus, virus herpes y sífilis; enfermedades que deben considerarse dentro del diagnóstico diferencial.

Las manifestaciones clínicas pueden presentar diferentes grados de compromiso, tales como: hipotonía muscular, fiebre y frecuentemente hepatoesplenomegalia asociada con un síndrome febril. En casos aislados se evidencian cuadros de insuficiencia cardíaca o meningoencefalitis

con crisis convulsivas. El tratamiento de la fase aguda congénita, puede evitar secuelas en el paciente y la muerte [5].

La transmisión congénita de la enfermedad de Chagas constituye un importante problema de salud pública, debido a que puede ocurrir en cada embarazo y traspasar generaciones, lo que facilita la propagación no controlada en áreas urbanas, tanto en países endémicos como no endémicos. Se estima que más de un millón de mujeres en edad fértil están infectadas en Latino América, con una incidencia de 8.000 casos al año, aproximadamente; distribuida en 21 países desde México a Argentina. No obstante, se han detectado casos en países donde no existe transmisión vectorial, por lo que, la transmisión congénita ha adquirido importancia epidemiológica. Actualmente, se estiman entre 60 a 315 casos en EE.UU y entre 20 a 184 en Europa [25].

La infección congénita suele ocurrir entre el 1 al 12 % de los embarazos de mujeres infectadas en Latino América, por ejemplo, en Argentina aproximadamente el 6 % de los embarazos presenta una transmisión materno fetal; en cambio, en Bolivia y en Paraguay puede alcanzar el 4 %; y en Brasil es cercano al 2 %. Las diferencias observadas son debidas al tipo de estudio epidemiológico y los métodos de diagnóstico utilizados en cada país [26].

Esta vía de transmisión varía de acuerdo a la presencia del insecto vector; en aquellos lugares considerados endémicos, la probabilidad de infección aumenta al doble, esto debido a la alta exposición a una carga parasitaria elevada, sin embargo, mujeres que viven en zonas con control vectorial presentan una mayor carga parasitaria, que aquellas que habitan lugares infestados [26]. Se ha observado, que existe una correlación directa entre la cantidad de parásitos en la sangre de la madre y el riesgo de infección transplacentaria; mientras mayor sea la cantidad de tripomastigotes circulantes, más probable es la transmisión del parásito al feto. Se estima que el 30 % de las mujeres con una concentración de parásitos elevada infectan al feto, en comparación a un 15 % de madres con una concentración moderada. Si la parasitemia materna es menor a 1 equivalente parasitario por mL, no se produce la transmisión congénita, esto también se observa en neonatos nacidos de embarazadas en fase crónica [27].

Si a la alta parasitemia materna, se suma la presencia del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), la probabilidad de infección congénita por *T. cruzi* aumenta drásticamente. Estudios muestran que el 100 % de los casos de mujeres embarazadas infectadas con *T. cruzi* y VIH transmitieron el parásito a sus hijos; estos resultados se repiten en mujeres con inmunosupresión [27].

Si bien la transmisión congénita no se puede prevenir, existe evidencia del nacimiento de infantes sanos, hijos e hijas de mujeres infectadas que fueron tratadas con fármacos antes del embarazo disminuyendo la parasitemia. Debido a que las mujeres durante el embarazo y en el período de lactancia no pueden recibir el tratamiento, es fundamental un diagnóstico oportuno para reducir las probabilidades de infección. Además, se recomienda realizar un seguimiento dentro del grupo familiar, tanto a menores como mujeres en edad fértil [25].

Adicionalmente, esta vía de transmisión se relaciona con las características de la madre, en cuanto a su estado genético, nutricional e inmunológico. Además de la eficiencia de la respuesta inmune específica efectuada por la placenta para evitar el paso del microorganismo;

y el polimorfismo del parásito, aunque no se conoce con certeza como esto se relaciona con una posible infección del neonato o el desarrollo de la enfermedad [28].

La implantación del embrión, la formación del corión y de la placenta depende de las células del trofoblasto. Al inicio del embarazo, el trofoblasto forma dos capas: una interna denominada citotrofoblasto y una externa, sincitiotrofoblasto; su proliferación ocasiona vellosidades coriónicas y espacios intervillosos, lo que favorece el intercambio de nutrientes entre la madre y el feto.

La transmisión congénita ocurre cuando los tripomastigotes invaden las células presentes en la placenta (células de Hofbauer); se reproducen como amastigotes y luego de la ruptura celular se transforman nuevamente en tripomastigotes, los que atraviesan el trofoblasto produciéndose así la infección del feto. Este proceso es imprescindible para la infección, ya que corresponde al pasaje a través de la barrera materno-fetal, un filtro selectivo que impide el paso de macromoléculas y microorganismos o agentes patógenos.

La respuesta inmune es mediada principalmente por interferón gamma ( $\text{IFN-}\gamma$ ), que activa monocitos y macrófagos, y estimula en conjunto la producción del factor de necrosis tumoral (TNF) y a su vez, la generación de óxido nítrico, lo cual causa la muerte del parásito [27]. Se ha observado que madres de infantes infectados por transmisión congénita, presentan un nivel decreciente de  $\text{TNF-}\alpha$  en plasma, un fenómeno similar se observa en la cantidad de linfocitos T, monocitos y células Natural Killer, NK [28].

Por otra parte, la placenta induce una respuesta proinflamatoria y secreta intermediarios reactivos de oxígeno y nitrógeno frente a la presencia de parásitos en el espacio intervilloso, esto es inducido por la secreción de mucinas, liberadas por *T. cruzi*, lo que provoca la secreción desmedida de citocinas  $\text{TNF-}\alpha$ , comprometiendo la viabilidad del recién nacido.

### 2.1.5. Diagnóstico de Enfermedad de Chagas

La OMS recomienda realizar dos pruebas para la detección de *T. cruzi*, y si los resultados no son concordantes, se aplica un tercer test confirmatorio. Las técnicas más utilizadas son: Inmunofluorescencia indirecta (IFI), hemoaglutinación indirecta (HAI) y enzimoimmunoanálisis (ELISA). Estas pruebas se basan en la detección de anticuerpos; son sensibles, pero presentan una especificidad limitada, debido a la reactividad cruzada con anticuerpos de pacientes frente a otros parásitos, como *Leishmania* y *T. rangeli* [18]. También se realizan pruebas moleculares, empleando la técnica de PCR, la que se considera específica para el diagnóstico, aunque no es tan efectiva en la fase crónica, ya que la concentración de parásitos en sangre disminuye, por lo que se utiliza como complemento a las pruebas serológicas. Finalmente, la prueba confirmatoria es el Western Blot, la que posee una alta sensibilidad y especificidad. Se puede utilizar el inmuno ensayo quimioluminiscente altamente sensible (CMIA), para la detección como prueba independiente, no obstante, ésta posee un alto costo y una logística compleja, lo que dificulta su uso; y al igual que con las otras pruebas, los resultados se deben confirmar con pruebas serológicas [25].

El diagnóstico en niños y niñas con infección congénita se basa principalmente en la detección del parásito por métodos microscópicos directos que requieren de una concentración celular

por centrifugación; para este proceso se necesita de un entrenamiento microscópico previo, es laborioso, posee una sensibilidad limitada, y es difícil establecer una calidad estándar [29]. Es por esto, que se emplean técnicas serológicas mediante la detección de anticuerpos específicos los que generalmente son detectables entre los 8 a 10 meses de vida, pero debido a la urgencia en el diagnóstico y cuando se tienen resultados no confirmatorios, se requiere un seguimiento en el tiempo. En el Anexo A.2, figura A.1 se presenta el protocolo de detección realizado en Chile, por el Laboratorio de Parasitología del ISP, entidad encargada del diagnóstico y/o confirmación de la enfermedad [30].

En Chile la vigilancia de enfermedad de Chagas se rige por el decreto 7 sobre notificación de enfermedades transmisibles de declaración obligatoria, D.S. N° 7, MINSAL [31]. Los laboratorios clínicos del Instituto de Salud Pública son los encargados de detectar y/o aislar los agentes microbiológicos, realizando el estudio de susceptibilidad, caracterización del agente u otros estudios complementarios, según corresponda; los resultados son informados al Ministerio de Salud y la Autoridad Sanitaria Regional correspondiente, a través del medio de comunicación más expedito posible. Desde el año 2014 es obligación el tamizaje en el primer control pre-natal a embarazadas residentes en zonas endémicas, en las regiones restantes se realiza anamnesis dirigida. Además, en el 2011 se incorporó la vigilancia de la enfermedad de Chagas transplacentaria y de casos asintomáticos en donantes de sangre.

La amplificación de los ácidos nucleicos de *T. cruzi* mediante PCR se ha utilizado para el diagnóstico de la infección congénita, ofreciendo mayor sensibilidad y especificidad que los métodos parasitológicos. También se ha implementado el PCR cuantitativo (qPCR), para un diagnóstico preciso y temprano. Si bien la técnica presenta una alta especificidad, una amplificación positiva puede ser resultante de la amplificación de restos de material genético del parásito materno, y no estar relacionada a la presencia del microorganismo vivo. De hecho, el PCR no está incluido como herramienta de diagnóstico en las guías latinoamericanas, con excepción de Chile.

Tanto el PCR como el qPCR, requieren de equipos sofisticados para su implementación, los que frecuentemente no se encuentran disponibles en maternidades o unidades de atención primaria de áreas endémicas. Frente a esto, otros métodos moleculares que pueden ser utilizados se basan en la amplificación isotérmica, método que flanquea las necesidades de equipos de PCR especializados y han demostrado su utilidad amplificando el ADN del parásito con éxito. Sin embargo, todas las técnicas moleculares requieren de la extracción y purificación de ADN de la muestra de sangre del paciente, buenas prácticas de laboratorio, operadores experimentados e infraestructura especializada [27].

### **2.1.6. Técnica de Amplificación Isotérmica de ADN Mediada por Asa (LAMP)**

La técnica de LAMP es una reacción de polimerización de ácidos nucleicos; la cual fue desarrollada por un equipo de científicos liderados por Notomi en el año 2000 [32]. Se crea como método alternativo a la reacción de PCR, para ser utilizada en laboratorios y centros de atención primaria que requieran de herramientas de diagnóstico rápidas, sensibles y precisas [9]. El método puede aplicarse para la detección de enfermedades y microorganismos presentes en productos alimenticios y muestras ambientales.

Es un método altamente eficiente, que puede producir con alta especificidad, entre  $10^9$  a  $10^{10}$  copias de la secuencia blanco a partir de unas pocas moléculas de ADN templado, en menos de una hora y a temperatura constante [32]. La técnica utiliza la enzima *Bst* ADN polimerasa y de 4 a 6 partidores que reconocen regiones específicas del templado.

La enzima *Bst* ADN polimerasa, es una proteína termoestable aislada del bacilo *Bacillus stearothermophilus*. Posee actividad polimerasa 5'-3', con capacidad de separar la doble hebra de ADN durante la síntesis de una nueva cadena, lo que se denomina actividad de desplazamiento (displacement) y carece de actividad correctora exonucleasa 3'-5'. Su temperatura de funcionamiento óptima está entre los 60 a 65 °C, y se desnaturaliza por sobre los 70 °C. La enzima es tolerante a la inhibición por impurezas como hemoglobina, sangre, mioglobina y muestras de ADN derivadas de tejidos [33].

La amplificación puede ser detectada en tiempo real por el aumento de la turbidez mediante el uso de un turbidímetro; o por electroforesis en gel de agarosa (punto final), el cual muestra un patrón en escalera, debido a las estructuras de diferente peso molecular amplificadas [34]. De forma alternativa a estos métodos convencionales, se utilizan colorantes que detectan en forma directa las reacciones positivas, tales como: el azul de hidroxinaftol y la calceína; reactivos utilizados generalmente para la observación a simple vista. El compuesto SYBR-Green en cambio, provoca un color verde amarillento al ser observado bajo iluminación ultravioleta (UV), por lo que necesita un equipo para la resolución [35].

Como producto de la elongación del ADN blanco, la enzima *Bst* ADN polimerasa libera hidrogenoides, cuya acumulación produce un cambio en la acidez del medio, lo que permite la visualización mediante el uso de indicadores de pH como el rojo fenol, rojo cresol, rojo neutro, entre otros [34] [9]. Adicionalmente, las reacciones positivas se pueden detectar por el apareamiento de un precipitado blanco al centrifugar el tubo, debido a la formación de pirofosfato de magnesio, como subproducto de la amplificación del material genético [34]. La simplicidad de los métodos para la detección de las reacciones positivas posibilita la implementación en laboratorios o centros de salud con equipamiento básico, sin necesidad de infraestructura especializada, resaltando su alto potencial de diagnóstico [35].

El principio de funcionamiento de la técnica de LAMP se basa en la producción de una gran cantidad de productos de amplificación, a partir del material genético original, cuya estructura alternada contiene una secuencia mutuamente complementaria. Esto se logra a partir de dos partidores con una región reverso complementaria a la molécula blanco en su extremo 5'; ubicado río abajo del sitio de unión del partidador de inicio.

La técnica canónica utiliza 4 partidores, dos externos que flanquean la región de interés, denominado F3 en sentido 5'-3', y B3 en sentido reverso, complementarios a F3c y B3c, en la secuencia blanco. Los otros partidores FIP (*forward inner primer*) y BIP (*backward inner primer*), están formados por la región reverso complementarias F1c/B1c; un espaciador de timina y F2/B2 complementaria a F2c/B2c en el templado, respectivamente. La disposición de los partidores se puede observar en la Figura 2.5.

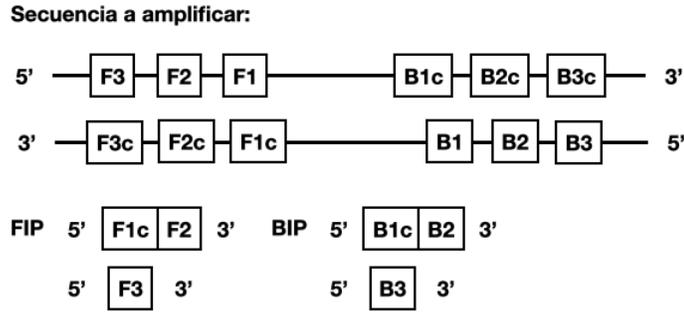


Figura 2.5: Diagrama de nomenclatura y localización de partidores de la técnica de LAMP. Partidor FIP: F1c/F2; partidor BIP: B1c/B2 [36].

Además se pueden incluir dos partidores extra, denominados LF (Loop primer F) y LB (Loop primer B), que contienen secuencias complementarias entre F1 y F2; B1 y B2, donde se forma la asa, aumentando así el número de puntos donde se inicia la síntesis de ADN, lo cual disminuye el tiempo necesario para la detección de los productos [9].

La amplificación diseñada por Notomi [32], se realiza a través de un ciclo automático, repitiendo la reacción de elongación de las nuevas hebras a partir de la estructura original. La reacción comienza con hibridación de la secuencia F2 del partidor FIP con la secuencia blanco, sintetizando de la primera cadena. La región F1c no es complementaria al templado, por lo que queda libre, como se muestra en la figura 2.6 [9].

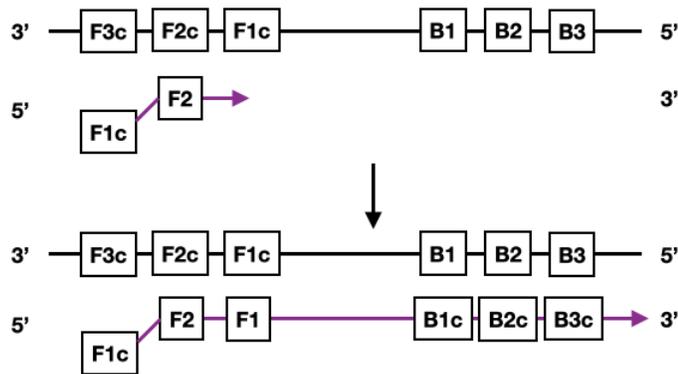


Figura 2.6: Diagrama de la amplificación primera hebra de ADN, mediante la técnica LAMP [9].

A continuación, en el espacio que queda entre la secuencia blanco y la región F1c de FIP, el partidor externo F3 se une y la enzima desplaza la cadena previamente sintetizada, iniciando una nueva polimerización, como se muestra en la figura 2.7. La cadena sintetizada en la primera reacción posee las secuencias complementarias F1c y F1, las que se alinean formando un asa, como se muestra en la figura 2.8, originando nuevos puntos de inicio para la reacción en sentido 5'-3'. El partidor BIP repite el proceso, es decir, se alinea la secuencia B2, la región

B1c queda libre, lo que permite el alineamiento del partidor B3 y el desplazamiento de la hebra sintetizada, figura 2.9.

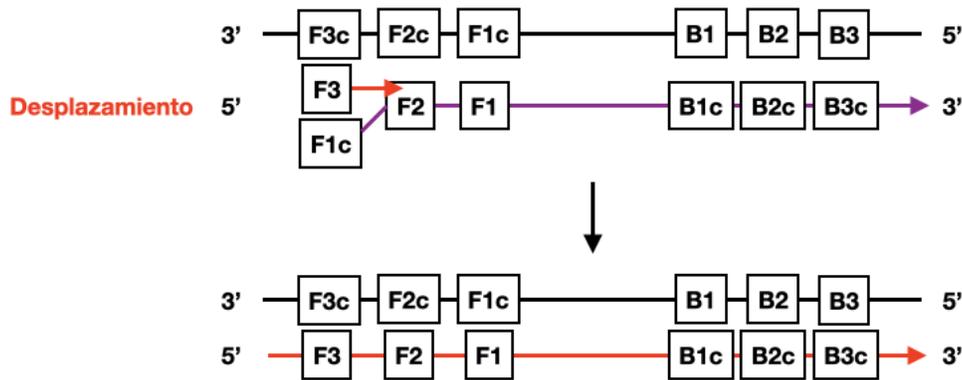


Figura 2.7: Diagrama desplazamiento y amplificación de ADN a partir del partidor F3, técnica LAMP [37].

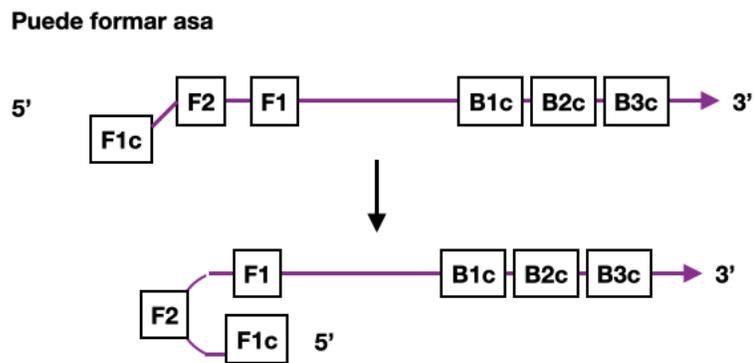


Figura 2.8: Diagrama formación de la asa, técnica LAMP [37].

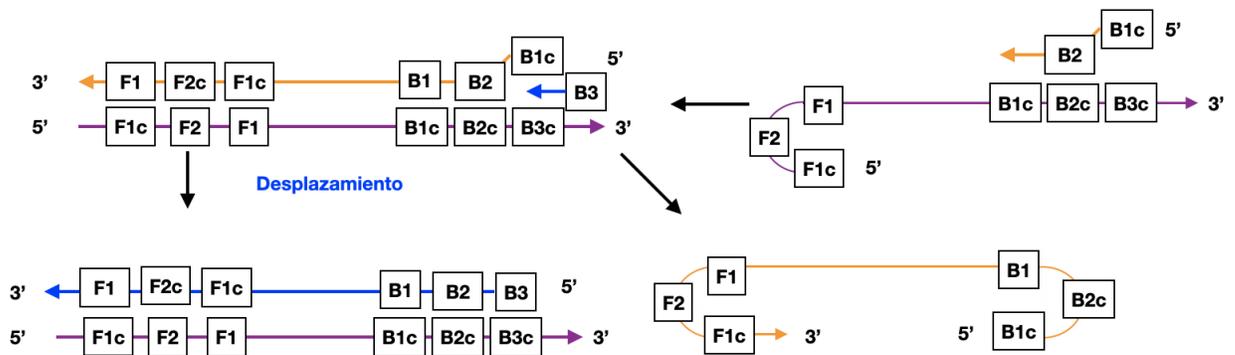


Figura 2.9: Diagrama alineamiento partidor BIP, formación de la asa e inicio de nuevos ciclos, técnica LAMP [37].

Las nuevas hebras sintetizadas se utilizan como blanco en los siguientes ciclos, como se muestra en la figura 2.9, en donde la secuencia sintetizada se amplifica mediante el partidor BIP y se repite el ciclo.

Los pasos descritos anteriormente corresponden a la etapa inicial de la técnica, en la que participan los partidores externos e internos, como se muestra en la figura 2.10. La técnica continúa con la etapa de amplificación cíclica, figura 2.11; en la que se amplifican nuevas hebras a partir de las asas. Finalmente, la tercera etapa de elongación y reciclo, las estructuras sintetizadas en los pasos anteriores se alargan y se reciclan, para nuevas reacciones, como se muestra en las figuras 2.12 y 2.13.

### A. Etapa inicial

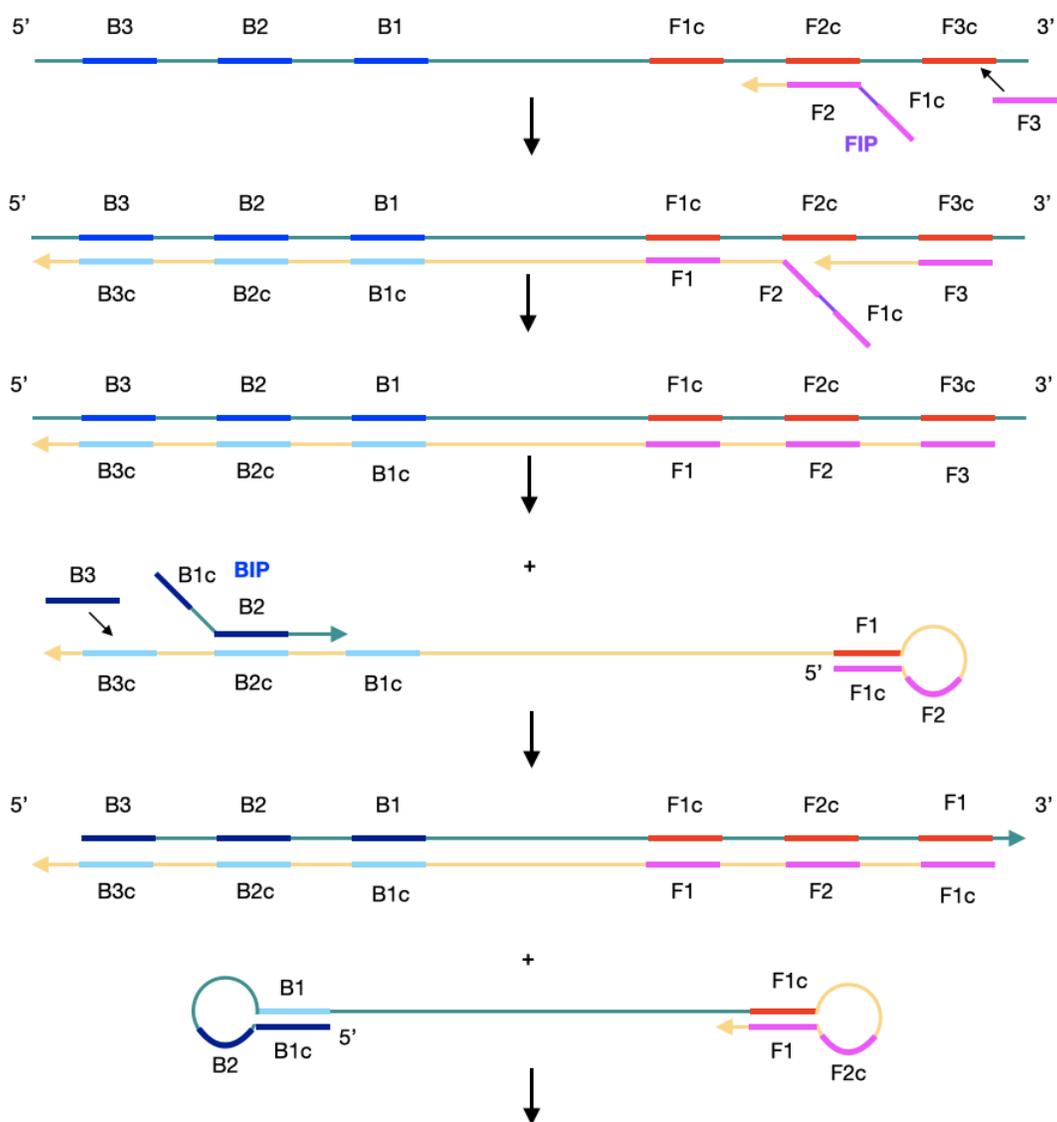


Figura 2.10: Diagrama etapa inicial técnica LAMP [32].

## B. Amplificación cíclica

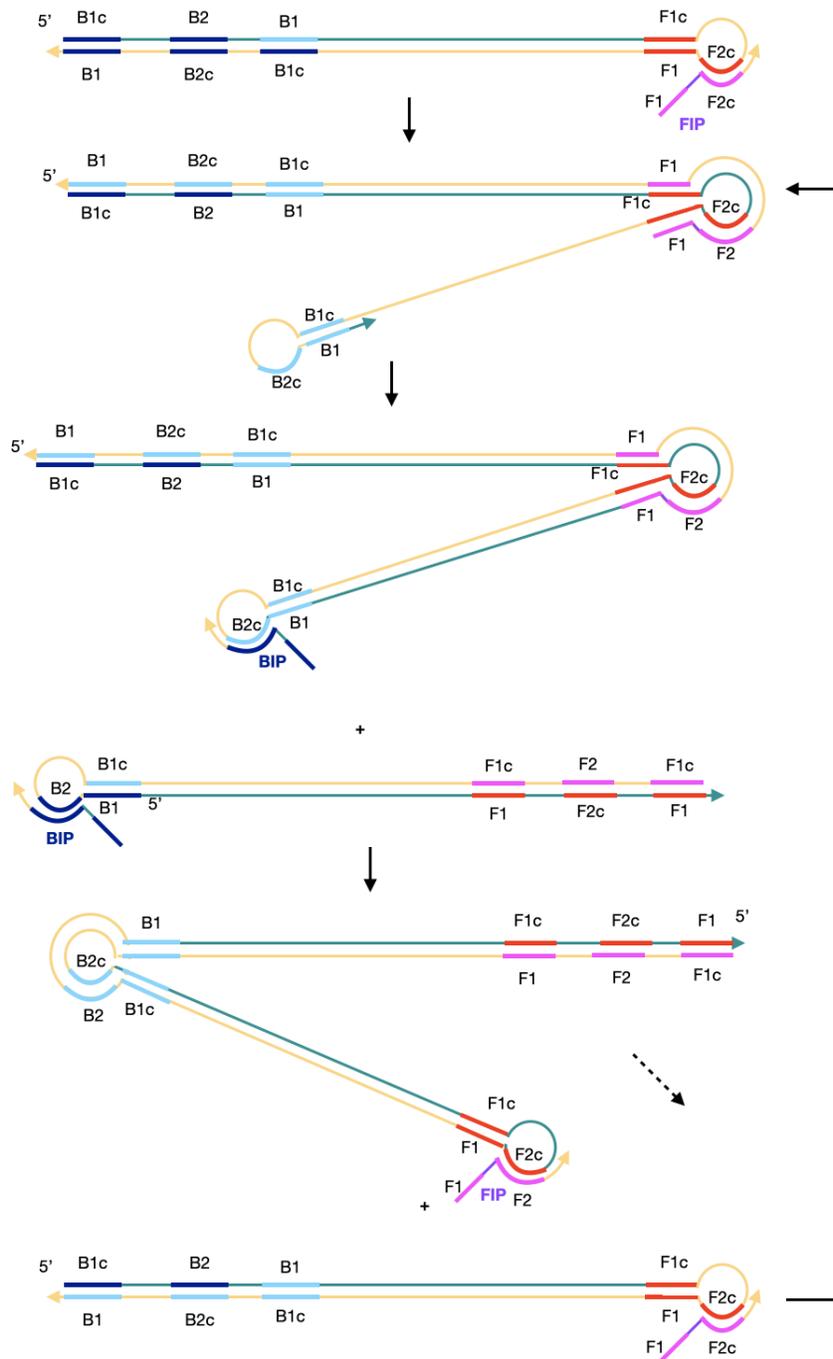


Figura 2.11: Diagrama etapa amplificación cíclica técnica LAMP [32].

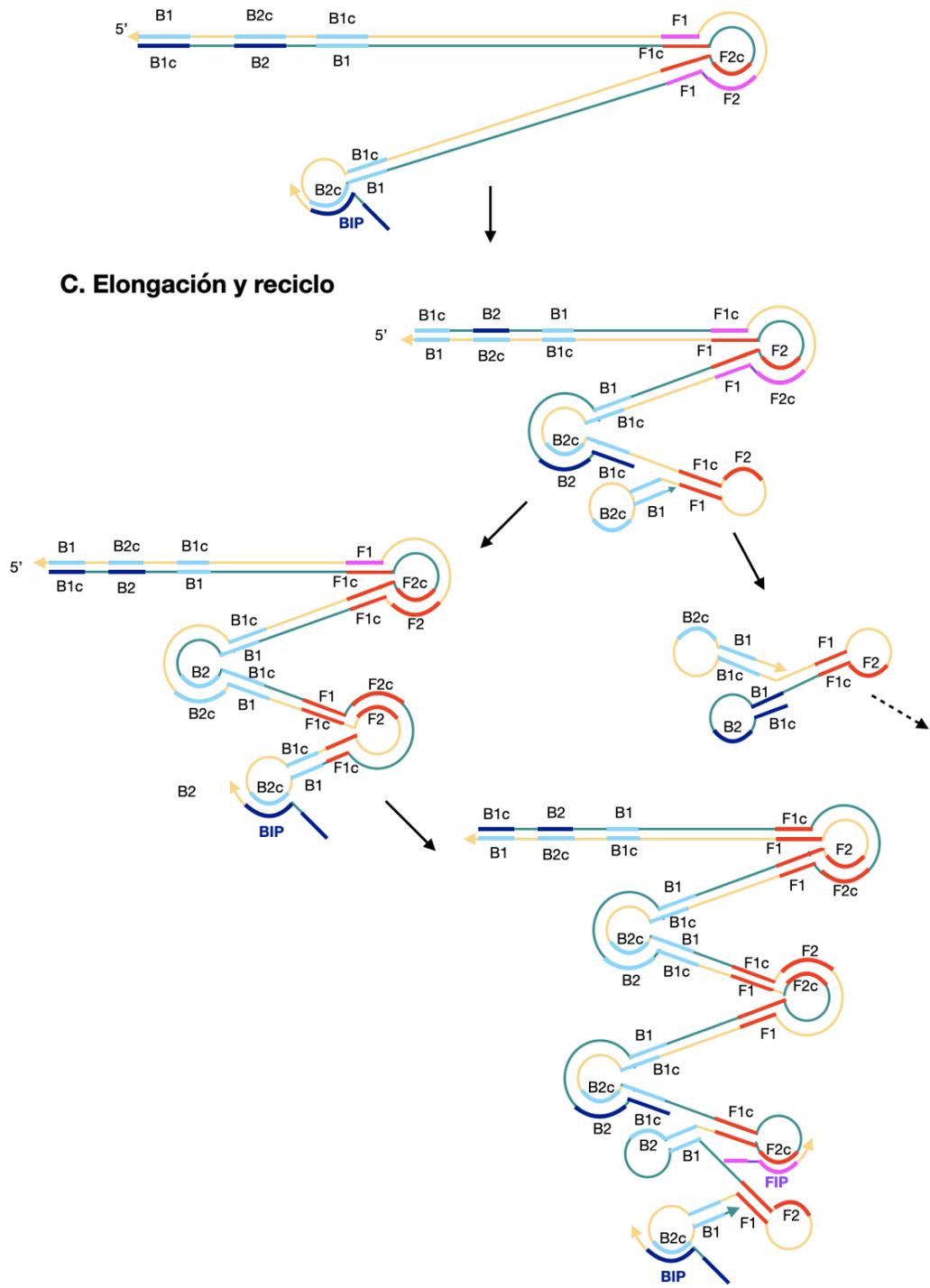


Figura 2.12: Diagrama etapa elongación y reciclo técnica LAMP [32].

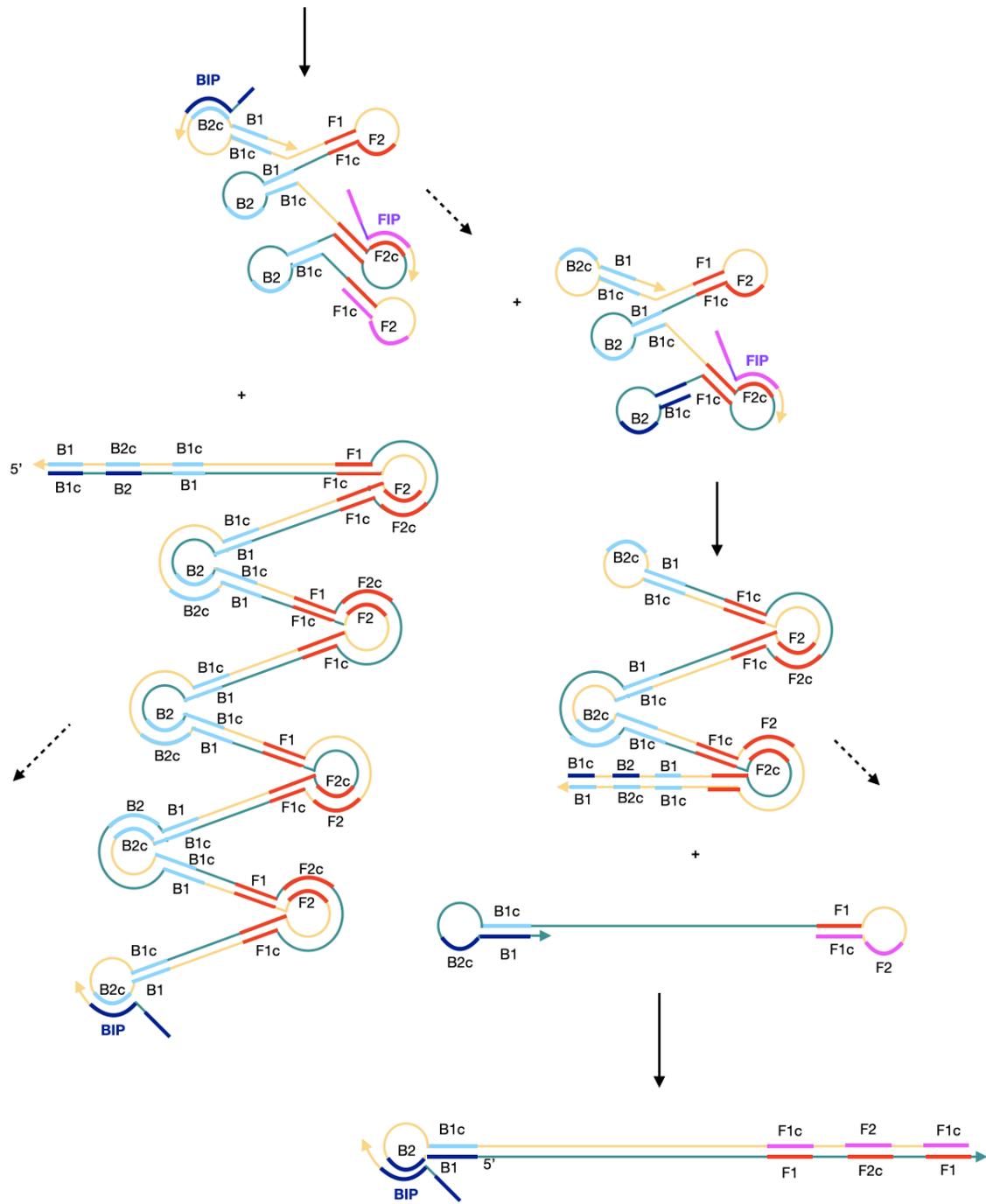


Figura 2.13: Diagrama continuación etapa, elongación y reciclo técnica LAMP [32].

## 2.1.7. Aplicaciones de la técnica

En las últimas décadas la técnica de LAMP se ha utilizado principalmente en la detección de patógenos de importancia médica y veterinaria causantes de diversas enfermedades. Conjuntamente se ha estudiado su aplicación en la identificación del sexo de embriones y de tumores malignos [9]; demostrando así su gran potencial como prueba diagnóstica.

Existen múltiples ejemplos de aplicaciones para la detección de patógenos. Uno de los primeros reportes describe la amplificación del material genético de *Escherichia coli*. Posteriormente se detalla su uso para el diagnóstico de periodontitis causada por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Otro ejemplo de interés es el uso en la identificación específica de complejos de *Mycobacterium tuberculosis*; además de otros patógenos como *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus anthracis*; *Salmonella typhi*, *Campylobacter jejuni* y *Helicobacter pylori* en muestras de alimentos contaminados. Asimismo ha presentado resultados prometedores en la detección de patógenos resistentes a drogas, como *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* [34].

Otras enfermedades de interés son las causadas por *Mycoplasma*, que comúnmente son diagnosticadas por medio de cultivo celulares o pruebas serológicas, las cuales requieren de un tiempo prolongado y poseen un alto valor económico. La detección de *Mycoplasma pneumoniae* mediante LAMP no presentó reactividad cruzada con otras bacterias causantes de infecciones respiratorias. Así mismo, se aplicó para la detección de especies de *Chlamydia* [38].

Generalmente los métodos utilizados para el diagnóstico de micosis son complejos y de alto costo; frente a esto se prueba la técnica para un amplio rango de hongos y levaduras, tales como: *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, infección por *Aspergillus*, especies de *Fonsecaea*, *Trichosporon asahii* y *Pneumocystis jirovecii*; mostrando alta eficiencia y sensibilidad de detección con una mínima cantidad de ADN [34].

La metodología de LAMP con transcripción reversa (RT-LAMP) es una reacción a temperatura constante de un solo paso para la detección de ARN. Al método convencional se le agrega una transcriptasa reversa para la síntesis de cDNA, el cual posteriormente es amplificado [34]. Esta es una herramienta muy útil para la detección de virus, como: virus del Dengue, influenza, Hepatitis C, Ébola, Zika, virus respiratorio sincicial, VIH, entre otros [34]. Además, se ha aplicado para la detección del virus del mosaico que infecta a diferentes plantas [38].

En el año 2016 la empresa de biotecnología, New England Biolabs; incorporó el uso de indicadores de pH para la detección de productos en reacciones de LAMP, patentando la prueba colorimétrica RT-LAMP que cambia de color de rosa a amarillo para indicar la amplificación del material genético [39]. Frente a la aparición de nuevos virus; en julio del año pasado se lanzó el kit de diagnóstico para SARS-Cov-2, causante del COVID-19, una infección respiratoria potencialmente mortal que afecta a la población mundial, siendo declarada pandemia el 2020. La detección de SARS-CoV-2 se basa en el protocolo publicado por Zhang [40] en febrero del 2020 y desde su publicación la prueba se ha comenzado a aplicar en pacientes contagiados con el virus. Por ejemplo, Huang [41] la utilizó para analizar 16 casos clínicos en China y recientemente se probó en 768 muestras [42], con una sensibilidad del 98 %.

Esta herramienta de transcripción reversa no solo se ha utilizado en pruebas de diagnóstico sino también en sistemas de biosensores, tecnología que mediante un chip mide la carga viral del VIH en una gota de sangre utilizando RT-LAMP [43].

Otras aplicaciones, han desarrollado nuevos enfoques para la detección de metástasis de tumores malignos, esto frente a la necesidad de disminuir los tiempos en obtener resultados en el análisis de muestras de biopsia para la realización de cirugías o tratamientos correspondientes. Un ejemplo es el uso de RT-LAMP para detectar el ARN mensajero de citoqueratina 19 (CK19) en pacientes con carcinoma; evidenciando una sensibilidad similar a la prueba de PCR anidada. En estos casos, el uso de LAMP se realiza en conjunto a la PCR para asegurar un diagnóstico temprano, evaluación de células tumorales con mutaciones y estadificación de la enfermedad. Otros ejemplos de usos de la técnica de LAMP incluyen aplicaciones en estudios de cáncer de cuello uterino y cáncer de estómago asociado a *Helicobacter pylori* [44].

En general la RT-LAMP incorpora una transcriptasa reversa, no obstante, se ha demostrado la amplificación del material genético solo con el uso de la enzima *Bst* ADN polimerasa [45]. Del mismo modo se han descrito otras enzimas como la *OmniAmp* ADN polimerasa, que ha presentado un rendimiento robusto a menor temperatura y un aumento en la actividad de transcripción reversa en comparación a la enzima convencional [34].

Actualmente, las infecciones parasitarias representan un problema de salud pública. Es de gran importancia la búsqueda de métodos más accesibles para la población, que puedan ser aplicados en centros de salud primarios. LAMP ha demostrado buenos resultados en la detección de protozoos como *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis*, así como los metazoos: *Necator americanus* y *Strongyloides stercoralis*, reafirmando su utilidad y aplicación para el diagnóstico de enfermedades parasitarias.

La técnica de LAMP ha sido utilizada satisfactoriamente para la detección de protozoos pertenecientes a la familia *Trypanosomatidae*, tales como *T. rangeli*, *T. brucei*, *T. cruzi* y *Leishmania* [33]. Actualmente, estas enfermedades se diagnostican por métodos serológicos y microscópicos en conjunto con técnicas moleculares, como PCR o qPCR. Sin embargo, existen diversos estudios publicados que han optimizado la técnica de LAMP para su aplicación en muestras clínicas [46].

Para la detección de *T. cruzi* se ha estandarizado la reacción, utilizando, generalmente como secuencia blanco, el marcador molecular rARN 18S empleando diferentes partidores. Además, se han probado grupos de partidores diseñados para la amplificación de genes provenientes de especies de *Leishmania*, comparando con *T. rangeli*, debido a la alta identidad entre los tres parásitos. En base a esta misma secuencia, se han diseñado sistemas más sensibles que qPCR [46].

En el año 2003 se publicó el primer ensayo de LAMP para la detección de ADN de tripanosomas africanos humanos [10], demostrando su potencial como herramienta de diagnóstico. Desde ese entonces los estudios para *T. brucei gambiense* reportan el uso de diferentes partidores, obteniendo una mayor sensibilidad al utilizar como gen el 5.8S rARN-ITS como templado. Actualmente, existe un kit comercial Loopamp de Eiken Chemical Co. Ltd. que

muestra la mayor sensibilidad y especificidad [47].

Las pruebas de detección para *Leishmania* se deben mejorar para que el tratamiento sea efectivo y evitar recaídas; por lo que, se necesita de un diagnóstico inmediato, veraz, exacto y confirmatorio. Se han estudiado biomarcadores para la implementación de LAMP que han permitido detectar mínimas cantidades del parásito a bajo costo, lo que facilita el seguimiento de pacientes sintomáticos y la identificación de personas asintomáticas [4].

Equinococosis es una zoonosis causada por la infección de las especies de parásitos *Echinococcus*. El diagnóstico de la enfermedad incluye métodos microscópicos, serológicos y moleculares, principalmente PCR y qPCR, que requieren una infraestructura y equipamiento sofisticado. Para sobrellevar estas dificultades se ha estandarizado la técnica utilizando diversos marcadores moleculares, con una alta sensibilidad [35]. Esto ha permitido identificar áreas contaminadas de alto riesgo de infección, aumentando así el control de la enfermedad.

La exitosa aplicación de la técnica en diversos microorganismos ha demostrado su simpleza, rapidez, sensibilidad y especificidad, convirtiéndola en una reacción altamente eficiente. Esto ha llevado a la ciencia a estudiar su implementación con más de una molécula blanco, lo cual se denomina múltiplex LAMP (mLAMP)[34]. Esto se realizó para la detección del virus dengue, para lo cual se utilizaron tres grupos de partidores, uno por cada serotipo, de esto se obtuvo un sistema sensible para los 3 genes sin reactividad cruzada [38].

La técnica mLAMP ha sido acoplada a métodos de detección que permitan diferenciar múltiples productos. Por ejemplo, la combinación de mLAMP con el ensayo de ELISA; permitió la identificación diferencial de *Taenia solidum*, *Taenia saginata* y *Taenia asiatica*. De la misma manera, el uso de la curva de fusión de los amplicones ha permitido la determinación simultánea de patógenos transmitidos en alimentos, tales como: especies de *Salmonella* y *Vibrio parahaemolyticus*, lo que evidenció su potencial para distinguir ambos microorganismos [34].

Adicionalmente se han desarrollado otras formas de la reacción, como LAMP electrónica (eLAMP), un sistema de simulación electrónica que proporciona pruebas sobre la compatibilidad de los partidores con la secuencia blanco, lo que ayuda a mejorar la eficiencia y estudiar el uso de partidores existentes para detectar mutaciones en el templado. Otra herramienta es iD-LAMP, el cual corresponde a un dispositivo integrado compuesto por micro-reactores incrustados en discos compactos para la determinación de ADN diana en tiempo real [34].

El método conocido como TB-LAMP, utilizado para el diagnóstico de pacientes con tuberculosis (TB) e involucra el uso de dos kits comerciales: Loopamp MTBC y el kit de extracción de ADN de procedimiento ultra rápido (PURE). Este sistema es recomendado por la OMS debido a su alta sensibilidad en comparación con la técnica microscópica estándar [44]. LAMP se utiliza también en el diagnóstico de enfermedades tropicales desatendidas como la malaria, destacando para este fin el kit comercial Loopamp MALARIA Pan/Pf Detection, el cual ha sido validado en pruebas clínicas de hospitales rurales en diversos países. Este kit posee una alta sensibilidad con respecto a las técnicas tradicionales y tiene la capacidad de diagnosticar pacientes asintomáticos [44].

## 2.2. Materiales y Métodos

### 2.2.1. Selección de la secuencia blanco

El diseño del sistema, se fundamentó en la elección de una secuencia blanco a amplificar, que cumpliera con los siguientes criterios:

- Corresponder a un marcador molecular conservado entre los diferentes DTUs de *T. cruzi*
- Presentar múltiples copias en el genoma
- Ser utilizada previamente en estudios para la aplicación de la técnica

A partir de lo anterior, se seleccionó como blanco el gen que codifica el rARN 18S; GenBank AF301912; sintetizando dos grupos de cuatro partidores cada uno que amplifican diferentes regiones de la secuencia. Un conjunto se diseñó con el programa PrimerExplorer [36] y el otro según las secuencias reportadas por Thekiso, 2010 [48], las que se presentan en la tabla 2.1.

Tabla 2.1: Partidores utilizados en estudio "Detection of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* Infections from *Rhodnius pallencens* Bugs by Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)" [48]

Tamaño blanco	Partidor	Secuencia
187 pb	FIP	5'-CGTGAGTTGAGGGAAGGCATGAGTTGTTGGCAGACTTCGGT-3'
	BIP	5'-GCATCCAGGAATGAAGGAGGGTTTCGTCTTGGTGCGGTCTA-3'
	F3	5'-CCGTGTGGCACTGTTTGT-3'
	B3	5'-TGAAGAATGCCTTCGCTGT-3'
	LF	5'-CATGTGAGATGCGAAGGG-3'
	LB	5'-CATGTGAGATGCGAAGGG-3'

Los partidores se alinearon de forma manual con la secuencia del gen, para corroborar la identidad de las secuencias de los partidores.

### 2.2.2. Identificación de la secuencia consenso

La secuencia del gen rARN 18S representante de cada DTU de *T. cruzi*, fue obtenida desde la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) y descargada en formato FASTA. Posteriormente se alinearon en el servidor Clustal Omega <<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>>, utilizando los parámetros por defecto. El resultado del alineamiento fue descargado en formato PDF.

### 2.2.3. Diseño de partidores LAMP

Los partidores de LAMP deben cumplir con ciertas consideraciones especiales, explicadas posteriormente, lo que dificulta su diseño manual; por esta razón, se recomienda el uso de herramientas computacionales disponibles. Uno de los programas más difundidos es PrimerExplorer de Eiken Chemical Co. Ltd. El servidor web, versión 5, <<http://primerexplorer.jp/lampv5e/index.html>>, tiene como límite máximo de análisis 2.000 pb, por lo que se debe asegurar que la secuencia de interés no exceda este tamaño. La secuencia del gen rARN 18S

tiene un tamaño de 2.241 pb, por lo cual se realizó un corte de la secuencia, conservando la mayor cantidad de información en común entre los diferentes DTUs.

El diseño de partidores se realizó utilizando los parámetros estándar que proporciona el programa [36], dentro de las que se destacan:

- a) La región amplificada por los partidores F2 y B2 varía entre 160 y 200 pb.
- b) La porción que forma la asa; desde el extremo 5' del partidador F2 al extremo 5' del partidador F1, varía entre 40 a 60 bases.
- c) La distancia entre los partidores F2 y F3, así como entre B2 y B3, no debe exceder de 60 bases.

La temperatura de melting ( $T_m$ ) de los partidores se define de acuerdo al porcentaje de GC de la secuencia blanco, si este es mayor a 60 %, la  $T_m$  de los partidores será menor a 68 °C, en cambio si la secuencia es rica en AT ( $GC < 45\%$ ), entonces, la  $T_m$  de los partidores será mayor a 60 °C [36].

PrimerExplorer entrega la secuencia de los cuatro partidores principales en sentido 5' a 3', en conjunto a su  $T_m$  respectiva. Para visualizar la región a amplificar se realizó un alineamiento manual, identificando las secuencias en sentido directo e inverso, como se muestra en la figura 2.5 y luego se alinearon con las secuencias del mismo gen de diferente DTU, con la herramienta Clustal Omega. El objetivo es encontrar aquellos partidores que amplifiquen una región altamente conservada, diferente a la de los partidores publicados. A partir de esto, el grupo seleccionado se sintetizaron en una escala de 200 nmol, empresa Merck Milipore.

En función de la secuencia de los partidores seleccionados, se diseñaron los partidores Loop, LF y LB, respectivamente, con el programa PrimerExplorer en base a la configuración por defecto [36].

## **2.2.4. Extracción de material genético**

### **2.2.4.1. Materiales**

- Agua libre de ARNasas y ADNasas, Invitrogen
- Etanol 70 %, Merck
- Kit de extracción QIAamp DNA Mini Kit, QIAGEN
- Tubo de microcentrífuga 1,5 y 2 mL
- Tubos de recolección, Axygen
- Muestra sanguínea
- Centrífuga Hettich, MIKRO 200
- Block térmico LabNet, AccuBlock D1200

### 2.2.4.2. Metodología

El material genético utilizado en el estudio se obtuvo mediante una extracción en columnas de silica, utilizando el Kit QIAamp DNA Mini de Qiagen [49]. En resumen, en un tubo de microcentrífuga de 2 mL se añadieron 20  $\mu\text{L}$  de proteínasa K, 200  $\mu\text{L}$  de muestra y 200  $\mu\text{L}$  de tampón AL del kit, la mezcla se homogeneizó en un vortex y se incubó en un bloque térmico a 56 °C por 15 minutos. A continuación se realizó una breve centrifugación y posteriormente se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de etanol, traspasando el contenido a la columna, la cual se centrifugó por un minuto a 8.000 rpm.

Se descartó el tubo colector, y el material retenido en la columna fue lavado añadiendo 500  $\mu\text{L}$  de tampón AW1, repitiéndose la centrifugación. Luego en un nuevo tubo colector, la columna se lavó nuevamente con el mismo volumen de tampón AW2, centrifugando por 3 minutos a 14.000 rpm. Antes de realizar la elución se descartó el tubo colector y se centrifugó una vez más para eliminar restos de etanol presente en las soluciones de lavado. Finalmente, la elución del material retenido en la matriz se realizó añadiendo 100  $\mu\text{L}$  de tampón AE (10 mM Tris-HCl, 0,5 mM EDTA, pH 9,0), el cual fue incubado por 5 minutos a temperatura ambiente. El eluato fue obtenido por centrifugación a 8.000 rpm por 1 minuto. El material extraído fue almacenado a -20 °C hasta su uso. Todo el proceso fue realizado al interior de un gabinete de bioseguridad, cumpliendo con las buenas prácticas de laboratorio.

## 2.2.5. Reacción de LAMP

### 2.2.5.1. Materiales

- Cloro
- Agua libre de ARNasas y ADNasas Invitrogen
- Desoxirribonucleótidos trifosfato: dATP, dTTP, dCTP, dGTP, 25 mM, Invitrogen
- Templado
- *Bst* ADN polimerasa, New England Biolabs, incluye ampón de Amplificación Isotérmica 10X y MgSO<sub>4</sub> 100 mM
- Tampón de Amplificación Isotérmica 10X, New England Biolabs
- Partidores Merck KGaA
- MgSO<sub>4</sub> 100 mM, Merck
- Centrífuga Eppendorf, 5430R
- Termociclador, Applied Biosystems 2720
- Microtubos para PCR de 0,2 mL, Axygen

### 2.2.5.2. Metodología

La amplificación de secuencias de ADN utilizando la técnica de LAMP se realizó utilizando la enzima *Bst* 2.0 WarmStart ADN polimerasa, siguiendo las recomendaciones del fabricante, New England Biolabs. La reacción se realizó en un volumen final de 25  $\mu\text{L}$ . La metodología base se muestra en las tablas 2.2, 2.3, 2.4 [48] [50].

Tabla 2.2: Componentes de la reacción de amplificación isotérmica [48] [50]

Reactivo	Volumen
Templado	2 $\mu\text{L}$
Primer MIX	1 $\mu\text{L}$
dNTPs 25 mM	1,4 $\mu\text{L}$
MgSO <sub>4</sub> 100 mM	1,5 $\mu\text{L}$
10X Tampón de amplificación isotérmica	2,5 $\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	15,6 $\mu\text{L}$
<i>Bst</i> ADN polimerasa (8 U/ $\mu\text{L}$ )	1 $\mu\text{L}$
Volumen Final	25 $\mu\text{L}$

La solución mezcla de partidores (Primer MIX) se compone de:

Tabla 2.3: Composición primer MIX [48]

Reactivo	Concentración
F3	5 pmol
B3	5 pmol
FIP	40 pmol
BIP	40 pmol

La solución de mezcla (Primer MIX), se preparó a través de una solución madre y una solución de trabajo; en los anexos B.1 y B.2 se presentan los procedimientos de dilución.

El tampón de amplificación isotérmica 1X, está ajustado a pH 8,8 y se compone de:

Tabla 2.4: Composición del tampón de amplificación isotérmica (1X) [50]

Reactivo	Concentración / Volumen
Tris-HCl	20 mM
KCl	50 mM
MgSO <sub>4</sub>	2 mM
[NH <sub>4</sub> ] <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10 mM
Tween 20	0,1 %

## 2.2.6. Detección colorimétrica de amplificación por LAMP

### 2.2.6.1. Materiales

- Cloro
- Agua libre de ARNasas y ADNasas
- *Bst* ADN polimerasa
- Desoxirribonucleótidos trifosfato: dATP, dTTP, dCTP, dGTP
- Partidores
- Templado
- Tween 20
- KCl, Merck
- KOH, Merck
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , Merck
- $\text{MgSO}_4$  100 mM
- Rojo fenol, Sigma
- Centrífuga
- Termociclador
- Microtubos para PCR de 0,2 mL, Axygen
- Balanza analítica, ScalTech SBA33

### 2.2.6.2. Metodología

El rojo fenol es un compuesto halocrómico que permite verificar la amplificación al detectar el cambio de pH de la reacción [51]. Debido a la alta actividad de la polimerasa el medio se acidifica, tornándose amarillo, esto a pH menor o igual a 6,8; en cambio a pH 8,2 o superior se mantiene un color rojo oscuro [52]; dentro del rango (6,8 - 8,2), presenta una coloración rojo anaranjada.

Para que el cambio de pH sea visible, se utilizó un tampón de reacción que no contenía tri(hidroximetil) aminometano (Tris), tal que la concentración final de este compuesto en la reacción fue la mínima posible [53]. Para esto se pesaron los reactivos y se disolvieron en 1 mL de agua libre de nucleasas; la masa y la concentración de cada uno de los reactivos se muestran en el anexo B.3. Finalmente se agregó un volumen de cada solución tal que su concentración final fuera idéntica a la del tampón comercial, tabla 2.4; además se adicionó Tween 20 (1 %), rojo fenol y se reguló el pH de la reacción con hidróxido de potasio hasta que la solución se tornó de color rojo, lo que indica un pH entre 8,8 y 9,0. La tabla 2.5 muestra los componentes de la reacción con el compuesto halocrómico. El volumen utilizado de KOH es despreciable comparado con los otros reactivos.

Tabla 2.5: Componentes de la reacción con rojo fenol

Reactivo	Volumen
Templado	2 $\mu\text{L}$
Primer MIX	1 $\mu\text{L}$
dNTPs 25 mM	1,4 $\mu\text{L}$
MgSO <sub>4</sub> 100 mM	1,5 $\mu\text{L}$
[NH <sub>4</sub> ] <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 100 mM	2,5 $\mu\text{L}$
KCl 200 mM	6,25 $\mu\text{L}$
Tween 20 (1%)	2,5 $\mu\text{L}$
Rojo fenol 2,5 mM	1 $\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	5,35 $\mu\text{L}$
<i>Bst</i> ADN polimerasa (8 U/ $\mu\text{L}$ )	1 $\mu\text{L}$
Volumen final	25 $\mu\text{L}$

El desarrollo de la técnica de LAMP consiste en: agregar los reactivos en el tubo de reacción, homogenizar, centrifugar el tubo por menos de un minuto y colocarlo en una placa térmica o baño termostático a 63 °C, para los partidores de bibliografía, y a 65 °C para los partidores diseñados, por una hora. La reacción se realizó con el tampón comercial y con el tampón preparado, se incubó en un termociclador a la temperatura indicada por una hora y se observaron los productos de la reacción mediante una electroforesis en gel de agarosa.

## 2.2.7. Preparación de controles: positivo, negativo y de reactivos.

### 2.2.7.1. Materiales

- Materiales para la extracción de ADN
- Sangre no infectada
- Muestra de cultivo

### 2.2.7.2. Metodología

Los controles positivos se prepararon a partir de muestras de sangre contaminadas artificialmente con parásitos obtenidos de un cultivo de *T. cruzi* (DTU TcI), proporcionados por el Laboratorio de Parasitología del ISP. La muestra base se ajustó a una concentración de 10<sup>6</sup> parásitos por mL de sangre. Luego, se realizó una dilución seriada desde una concentración de 10<sup>3</sup> hasta 10<sup>-3</sup> parásitos/mL de sangre. Las muestras fueron sometidas a una extracción manual de ADN utilizando los reactivos de QIAamp DNA Mini Kit de Qiagen, siguiendo el protocolo explicado anteriormente. Todas las reacciones de LAMP contaron con un control positivo, ADN extraído de la sangre infectada; un control negativo, correspondiente al material genético extraído de sangre sin infectar y un control de reactivos que no contiene ADN.

## 2.2.8. Electroforesis en gel de agarosa

### 2.2.8.1. Materiales

- Tampón TAE 50X (Tris Acetato + EDTA), Bio-Rad
- Agarosa Sigma
- Marcador de tamaño molecular 1 Kb Invitrogen
- Tampón de carga 6X Invitrogen
- GelRed 10.000x, Biotium
- Agua libre de ARNasas y ADNasas Invitrogen
- Muestra a analizar
- Cámara de electroforesis
- Horno microondas
- Transluminador Major Sciences

### 2.2.8.2. Metodología

El análisis de las reacciones de amplificación isotérmica, se realizó mediante la visualización de productos previa separación electroforética en geles de agarosa. Los geles se prepararon disolviendo 2 gr de agarosa en 100 mL de tampón TAE 1X de (Bio-Rad). La solución se llevó a ebullición en un horno microondas hasta obtener una solución translúcida a la cual se agregaron 10  $\mu\text{L}$  de GelRed 10.000X (Biotium). Una vez homogeneizada, la solución se depositó en el soporte en conjunto con la peineta para la formación de pocillos. Una vez gelificado, se retiró la peineta y se posicionó el gel a la cámara de electroforesis sumergido en buffer TAE 1X. Los productos a analizar se mezclaron en proporción 10  $\mu\text{L}$  de reacción y 2  $\mu\text{L}$  de tampón de carga 6X. Las mezclas se cargaron en los pocillos correspondientes y se procedió a la separación electroforética por 60 minutos a 100 V. Una vez finalizada la reacción, se visualizó el resultado bajo luz UV.

## 2.2.9. Estandarización de la amplificación isotérmica mediada por asa, LAMP

### 2.2.9.1. Materiales

- Betaína 5 M Sigma
- Dimetil Sulfoxido, DMSO Sigma
- Reactivos reacción de LAMP

### 2.2.9.2. Metodología

El proceso de estandarización consiste en definir las condiciones de mejor funcionamiento de la reacción. Para esto se estudia la cantidad necesaria de cada reactivo; variando la concentración dentro del rango presentado en la tabla 2.6, manteniendo el volumen final de reacción. Los resultados de las variaciones de los parámetros en la reacción se detectan por diferencias en la intensidad de las bandas en los geles de agarosa.

Tabla 2.6: Rangos de concentraciones a variar de cada reactivo [56]

Reactivo	Concentración
FIP / BIP	0,8 - 2,4 $\mu$ M
dNTPs	1 - 2 mM
Betaína	0 - 0,8 M
DMSO	0 - 10 % (v/v)
MgSO <sub>4</sub>	4 - 10 mM

Otros parámetros a ser optimizados corresponden al tiempo y la temperatura, para lo cual la reacción se incubó a 60, 63, 65, 67 °C y diferentes tiempos de reacción, por ejemplo a 30, 45, 60 y 90 minutos, los resultados de las reacciones se analizan según lo descrito anteriormente. Generalmente este proceso se realiza antes de estudiar la concentración de reactivos, pero por tiempo, solo se estudió la cantidad de betaína, en conjunto con dimetil sulfóxido (DMSO); hasta observar el funcionamiento esperado de la técnica, es decir, que el método sea específico, rápido, sensible y reproducible. En un inicio las pruebas preliminares se realizaron con los partidores obtenidos por bibliografía y luego se probaron los partidores diseñados.

### 2.2.10. Análisis de sensibilidad y especificidad analítica

#### 2.2.11. Materiales

- Cloro
- Agua libre de ARNasas y ADNasas
- Desoxirribonucleótidos trifosfato: dATP, dTTP, dCTP, dGTP
- Templado
- *Taq* ADN polimerasa, ThermoFisher: incluye tampón de amplificación 10X y MgCl<sub>2</sub> 50 mM
- Tampón de Amplificación 10X, ThermoFisher
- Partidores
- MgCl<sub>2</sub> 50 mM, Merck
- Centrífuga
- Termociclador
- Microtubos para PCR de 0,2 mL, Axygen
- Reactivos reacción de LAMP

## 2.2.12. Metodología

La sensibilidad analítica se define como la mínima concentración de ADN, en número de copias o unidades en masa, que el método consigue detectar de manera confiable, para esto se define el límite de detección, variando la concentración del analito, ADN templado, hasta un mínimo en que el método es capaz de detectar. Para determinar este parámetro se utilizan concentraciones decrecientes de ADN del parásito preparadas a través diluciones seriadas del control positivo, según lo descrito en sección 2.2.7 [53]. El resultado de amplificación por LAMP se compara con los obtenidos mediante la reacción de PCR, técnica estándar de diagnóstico para la enfermedad en Chile; este proceso no fue realizado por la contingencia actual.

La especificidad analítica de la técnica se refiere a la capacidad de detección sólo del material genético blanco y no de otras especies que pueden estar presentes en la muestra, principalmente ADN humano. La especificidad teórica fue evaluada *in silico*, por medio de la herramienta BLASTn disponible en: <[https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE\\_TYPE=BlastSearch](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch)> con la cual se realizó una búsqueda de similaridad entre los partidores y la base de datos correspondientes a secuencias de nucleótidos derivadas de *homo sapiens*. La validación experimental de la especificidad se realizó utilizando sangre humana no infectada como templado. Esto se evaluó de forma teórica, mediante un BLAST y de forma práctica, utilizando como control negativo sangre no infectada.

La reacción de PCR utilizada para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas se basa en el estudio publicado por Burgos, 2007 [54]; la cual amplifica una secuencia de 330 pb de una región variable del genoma del mini círculo cinetoplastido. La secuencia de los partidores utilizados se muestran en la tabla 2.7. Se prepara la solución mezcla de partidores (Primer-MIX), a partir de una solución de trabajo compuesto de 50  $\mu$ M de cada partidor, preparada siguiendo un procedimiento similar al presentado en los anexos B.1 y B.2. El proceso de amplificación se lleva a cabo en un termociclador por alrededor de dos horas y contempla los siguientes ciclos: un ciclo de desnaturación inicial a 94 °C por 3 minutos, seguido por 5 ciclos 68 °C por 45 segundos; 72 °C por 45 segundos, 94 °C por 45 segundos; 35 ciclos a 64 °C por 45 segundos; 72 °C por 45 segundos, 94 °C por 45 segundos; y un ciclo final de extensión a 72 °C por 10 minutos; los productos se analizan mediante una electroforesis en gel de agarosa. El protocolo se describe en las tablas 2.8, 2.9 y 2.10.

Tabla 2.7: Partidores utilizados en estudio "Direct molecular polifing of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease" [54]

Partidor	Secuencia
Forward	5'-AAATAATGTACGGGKAGATGCATGA-3'
Reverse	5'-GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAATATA-3'

Tabla 2.8: Componentes de la reacción de amplificación [54]

Reactivo	Volumen
Templado	5 $\mu\text{L}$
Primer MIX	1,5 $\mu\text{L}$
dNTPs 25 mM	0,3 $\mu\text{L}$
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	1,8 $\mu\text{L}$
Tampón de amplificación 10X	3 $\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	18,28 $\mu\text{L}$
<i>Taq</i> ADN polimerasa (5 U)	0,12 $\mu\text{L}$
Volumen final	30 $\mu\text{L}$

El primer MIX se compone de:

Tabla 2.9: Composición primer MIX, reacción de PCR [54]

Reactivo	Concentración
Partidor Forward	50 $\mu\text{M}$
Partidor Reverse	50 $\mu\text{M}$

El tampón de amplificación 10X, pH 8.4, para PCR se compone de:

Tabla 2.10: Composición de tampón de amplificación 10X para PCR [55]

Reactivo	Concentración
Tris-HCl	200 mM
KCl	500 mM

### 2.2.13. Validación estadística

Una vez estandarizada la técnica, se procede a realizar el proceso de validación, mediante la obtención de los parámetros de sensibilidad, especificidad y concordancia estadística. Estos se obtienen a través del contraste de los resultados obtenidos por la técnica de LAMP y mediante la reacción de estándar. Para ello se implementan la reacción isotérmica utilizando como templado ADN extraído de muestras sanguíneas de pacientes, menores de un año, hijos de madres chagásicas, previamente diagnosticados por el ISP. Este proceso no se realizó por la contingencia actual.

Se analiza un total de muestras  $N$ ; parámetro calculado a partir de un nivel de confianza del 95 %, de acuerdo a la ecuación 2.1. Los resultados del análisis, se tabulan en una tabla de Contingencia [57].

$$N = Z_{NC}^2 \cdot \frac{p \cdot (1 - p)}{e^2} \quad (2.1)$$

Donde  $p$  es la porción de la población infectada,  $(1-p)$  población sana,  $e$  el error máximo garantizado por el tamaño de muestra y  $Z_{NC}^2$  el valor de la desviación normal estandarizada

para el nivel de confianza.

Para una prueba diagnóstica dicotómica, la especificidad es la capacidad de detectar a un paciente sano, es decir, obtener un resultado negativo. En cambio, la sensibilidad es la probabilidad de que una persona con la enfermedad obtenga un resultado positivo [58]. La tabla 2.11 muestra el análisis a realizar, donde el verdadero positivo, son los casos positivos tanto para el estándar como para la técnica; el verdadero negativo, se detecta la muestra como negativa con ambas reacciones; falso positivo, es cuando el método estándar señala que es negativa, pero la técnica la detecta como positiva; el falso negativo es el caso contrario. El parámetro concordancia describe si los métodos empleados coinciden en sus resultados [58].

Tabla 2.11: Tabla de Contingencia 2x2 [57]

		PCR		
LAMP		Positivo	Negativo	Total
Positivo	Verdadero Positivo (VP)	Falsos Positivos (FP)	VP + FP	
Negativo	Falso Negativo (FN)	Verdadero Negativo (VN)	FN + VN	
Total	VP + FN	FP + VN		$N$

El valor de los parámetros de sensibilidad y especificidad se calculan como:

$$Sensibilidad \% = \frac{VP}{VP + FN} \cdot 100 \quad (2.2)$$

Es decir, la cantidad de muestras positivas coincidentes en ambas técnicas dividido por el total de muestras positivas determinadas por el método estándar.

$$Especificidad \% = \frac{VN}{FP + VN} \cdot 100 \quad (2.3)$$

Es decir, el cociente entre la cantidad de muestras negativas coincidentes en ambas técnicas y el total de muestras negativas según el patrón estándar.

Para el índice de concordancia se utiliza el coeficiente Kappa ( $\kappa$ ), que refleja la correspondencia entre los dos métodos. Este puede variar entre -1 y 1, mientras más cercano a 1, mayor es el grado de concordancia y por el contrario, cercano a -1, mayor el grado de discordancia, si ( $\kappa$ ) es igual a 0 implique la que concordancia observada es exclusivamente a causa del azar [59]. Este se calcula como:

$$\kappa = \frac{Po - Pe}{1 - Pe} \quad (2.4)$$

Donde  $Po$  es la porción de acuerdos observados,  $Pe$  los acuerdos esperados según independencia, es decir, acuerdos al azar.

$Po$  se calcula como:

$$Po = \frac{VP + VN}{N} \quad (2.5)$$

Para el cálculo de  $Pe$ , se asume independencia, si  $A$  corresponde al suceso donde la muestra es positiva por PCR y  $B$  es el evento donde la muestra es positiva por LAMP, entonces la

probabilidad de que con ambos test se obtenga un resultado positivo, se calcula como la multiplicación de la probabilidad de ambos eventos por separado.

La probabilidad del evento A es:

$$P(A) = \frac{VP + FN}{N} \quad (2.6)$$

La probabilidad del evento B es:

$$P(B) = \frac{VP + FP}{N} \quad (2.7)$$

Entonces la probabilidad de que ambos sean positivos es:

$$P(A \text{ y } B) = P(A) * P(B) = \frac{(VP + FN) \cdot (VP + FP)}{N^2} \quad (2.8)$$

Análogo para los casos en que ambas muestras se consideren negativas, donde C corresponde al evento cuando las muestras son negativas por PCR y D el suceso cuando son negativas por LAMP:

$$P(C \text{ y } D) = P(C) * P(D) = \frac{(FP + VN) \cdot (FN + VN)}{N^2} \quad (2.9)$$

Por lo tanto Pe se calcula como:

$$Pe = \frac{(VP + FN) \cdot (VP + FP) + (FP + VN) \cdot (FN + VN)}{N^2} \quad (2.10)$$

Los valores de  $\kappa$  se clasifican de acuerdo a la escala presentada en la tabla 2.12 [60].

Tabla 2.12: Escala de concordancia [60]

$\kappa$	Grado de concordancia
<0	Sin concordancia
0 - 0,2	Insignificante
0,21 - 0,4	Discreto
0,41 - 0,6	Moderno
0,61 - 0,8	Sustancial
0,8 - 1	Concordancia

#### 2.2.14. Comparación teórica y económica de la técnica de LAMP y la reacción de PCR convencional, en laboratorios de baja complejidad

La comparación de la implementación de la técnica de LAMP en laboratorios de baja complejidad, contempló aspectos técnicos y costos económicos, considerando la información teórica del funcionamiento de cada herramienta de diagnóstico.

La estimación económica de cada reacción incluyó el costo por reacción considerando el precio y el volumen de los reactivos utilizados; así como el método de resolución. Conjuntamente se

buscó el valor actual de los equipos necesarios. Los siguientes criterios fueron incluidos en el cálculo:

- No se consideró el costo de equipos básicos de laboratorio como: pipetas, centrífuga, entre otros.
- No se consideró el precio de insumos de laboratorio básicos como puntas, tubos, gradillas, etc.
- Se asumen condiciones de limpieza.
- No se consideró el consumo eléctrico
- Se calculó el costo de una electroforesis, método de resolución para más de una reacción.
- El método de resolución de LAMP fue basado en el indicador azul de hidroxinaftol, recomendado para la estandarización y validación de la técnica.
- Se consideró el uso del tampón comercial de cada enzima.
- No se consideró el costo adicional de agua libre de ADNasa y ARNasa utilizada en la preparación de soluciones.

El precio de los componentes y de los equipos necesarios para cada reacción se obtuvo utilizando como base las licitaciones realizadas por el ISP para la compra de unidades e insumos de laboratorio. Dependiendo de la presentación del reactivo se calculó el costo de la cantidad utilizada en una reacción, de acuerdo a la siguiente ecuación general:

$$\textit{Costo por reacción} = \frac{\textit{Costo total}}{\textit{Unidades}} \quad (2.11)$$



### 2.3.2. Pruebas iniciales con muestras control

Como prueba inicial se implementó la técnica con los partidores publicados, utilizando el tampón comercial de la enzima, de acuerdo a la tabla 2.2 y con el halocromo, tabla 2.5. El resultado de la amplificación de las muestras por LAMP utilizando el tampón preparado con halocromo se comporta como lo esperado para una reacción válida; es decir, se obtiene un cambio de color para el control positivo, y los controles negativo y de reactivos mantienen su coloración inicial. El resultado de la detección colorimétrica se muestra en la figura 2.14.



Figura 2.14: Tubos de reacción LAMP, con rojo fenol.

Para verificar que la ausencia del viraje de color en el control negativo no es producto de una amplificación débil (positivo débil), los productos de las reacciones con y sin halocromo fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa, el resultado se muestra en la figura 2.15.

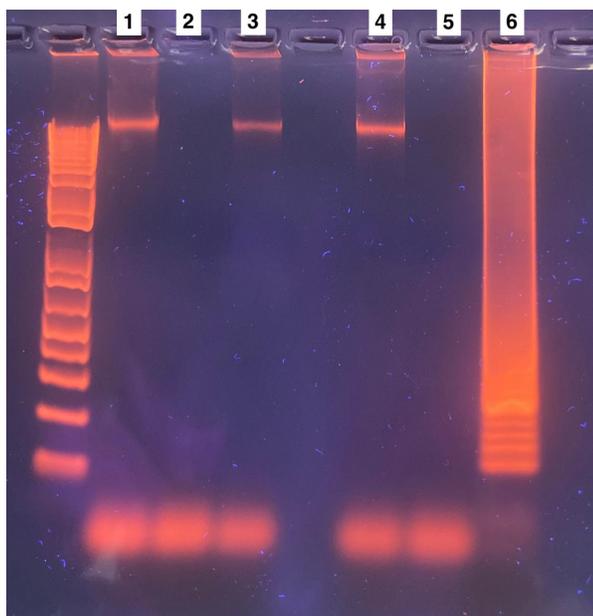


Figura 2.15: Electroforesis en gel de agarosa 2%. Pocillos 1, 2 y 3: reacción con tampón comercial; Pocillos 4, 5 y 6: reacción con rojo fenol (halocromo). Orden de muestras: control negativo (1 y 4), control de reactivos (2 y 5), control positivo (3 y 6).

La separación electroforética de los productos de amplificación mediante LAMP, muestra un perfil de migración que aparece como una banda continua fluorescente, (pocillo 6, figura 2.15); destacando algunas regiones donde se observa un patrón en escalera, que corresponden a secuencias de ADN amplificadas de diferente peso molecular [46].

En el control negativo correspondiente al material genético extraído de la muestra de sangre no infectada, correspondiente a ADN humano, se observa una banda de alto peso molecular, pocillos 1 y 4, figura 2.15. La ausencia de amplificación en este control demuestra la falta de interacción de los partidores con el material genético presente en la muestra, corroborando la especificidad de la reacción. El pocillo 3 en cambio, corresponde a una muestra control positivo que debería presentar un patrón similar al pocillo 6; esto muestra un error en la amplificación de la reacción con tampón comercial. Ante la ausencia de amplificación en este control se procedió a repetir la reacción, el resultado se muestra en la figura 2.16. Los pocillos 2 y 5, correspondientes al control de reactivos no presentaron amplificación indicando la ausencia de contaminación con material genético del parásito y/o productos de amplificación de reacciones anteriores.

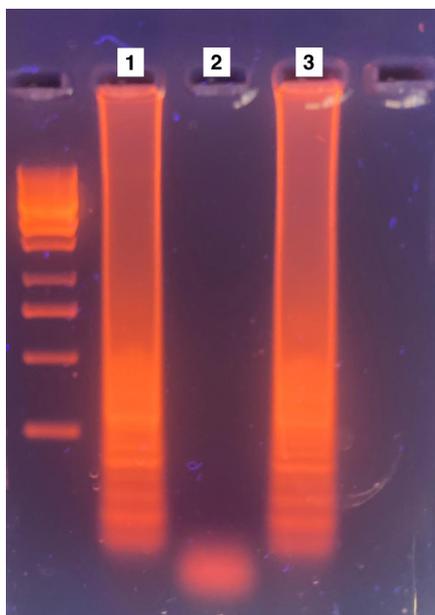


Figura 2.16: Electroforesis en gel de agarosa 2%, repetición reacción con tampón comercial. Pocillo 1: control negativo, Pocillo 2: control de reactivos, Pocillo 3: control positivo.

En la figura 2.16 se observó el funcionamiento adecuado del control positivo; no obstante, la muestra negativa presentó el patrón de amplificación.

Para evaluar una posible dimerización de partidores como causa del comportamiento des-  
acertado del control positivo y del negativo; y como parte del proceso de estandarización de la técnica; se realizó una curva de calibración de betaína entre 0 a 0,8 M de concentración, estableciendo 5 puntos con un intervalo de 0,2 M entre cada uno, manteniendo la temperatura de reacción a 63 °C.

En los tubos con 0, 0,2, 0,4 y 0,6 M de betaína se observó el correcto funcionamiento de la reacción, para la muestra con material genético del parásito. No obstante, el control de reactivos y el negativo presentaron una amplificación inespecífica, figura 2.17. La reacción en presencia de 0,8 M de betaína, pocillos 13 al 15, presentó una banda de alto peso molecular en el control negativo (pocillo 13) y la total ausencia de material genético en el control de reactivos (pocillo 14). No obstante la reacción mostró una completa inhibición por el resultado obtenido en la muestra positiva, pocillo 15. Se repitió la prueba a 65 °C, temperatura recomendada por el fabricante de la enzima. Procurando reducir el ruido de la reacción.

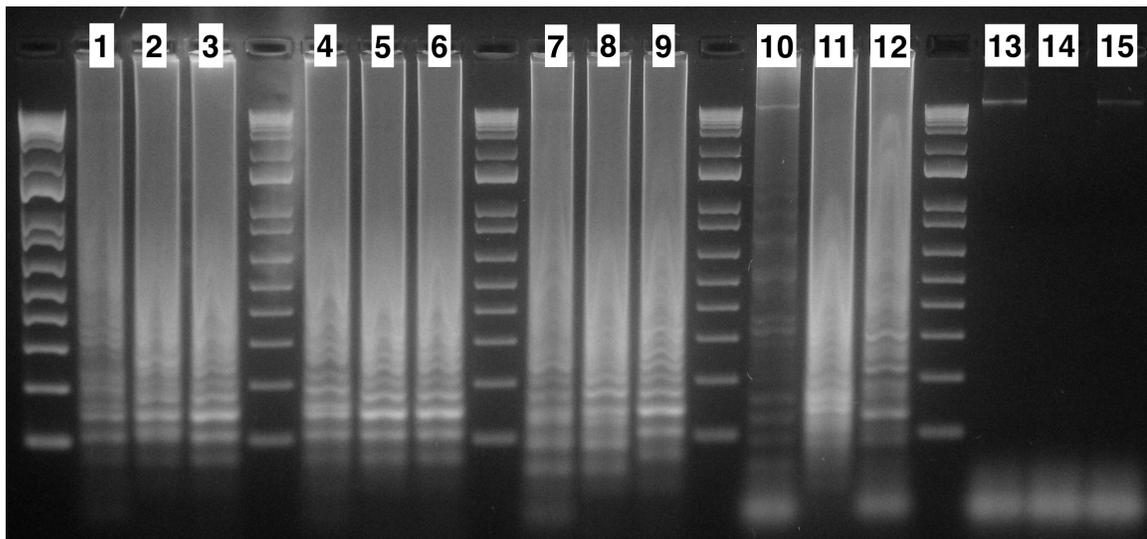


Figura 2.17: Electroforesis en gel de agarosa 2%, curva de calibración con betaína 0; 0,2; 0,4; 0,6 y 0,8 M, reacción a 63 °C, partidores de Thekiso, 2010. Orden de muestras: control negativo (pocillos 1, 4, 7, 10, 13), control de reactivos (pocillos 2, 5, 8, 11, 14), control positivo (pocillos 3, 6, 9, 12, 15).

Al repetir el ensayo, figura 2.18, se evidenció el mismo patrón de funcionamiento en los puntos en presencia de 0, 0,4 y 0,8 M de betaína. Sin embargo, en la reacción suplementada con 0,4 y 0,6 M; no se observaron bandas en el control de reactivos, de todas formas el control negativo, mostró una amplificación inespecífica.

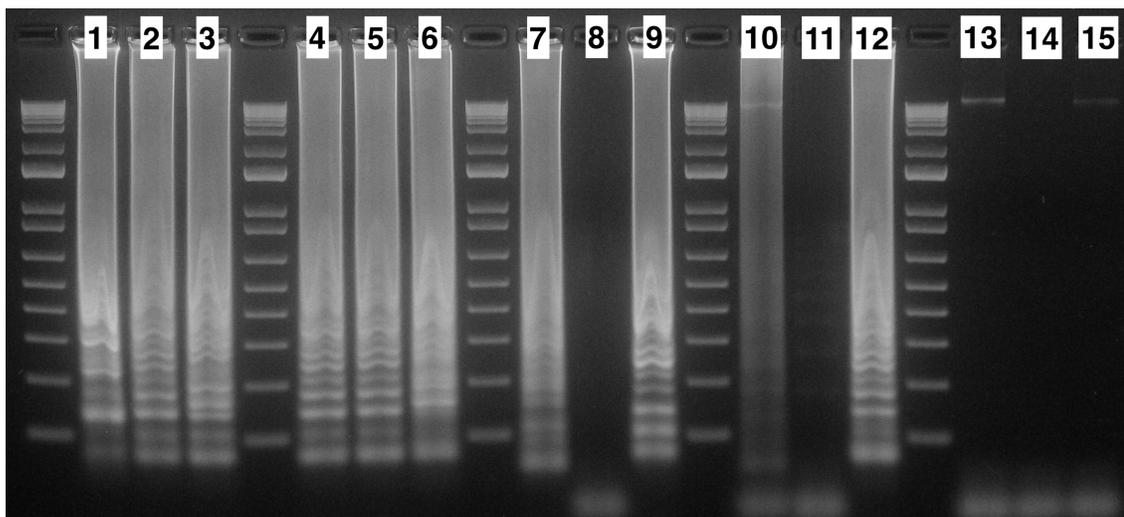


Figura 2.18: Electroforesis en gel de agarosa 2%, curva de calibración con betaína 0; 0,2; 0,4; 0,6 y 0,8 M, reacción a 65 °C, partidores de Thekiso, 2010. Orden de muestras: ontrol negativo (pocillos 1, 4, 7, 10, 13), control de reactivos (pocillos 2, 5, 8, 11, 14), control positivo (pocillos 3, 6, 9, 12, 15).

Con el objetivo de probar otras condiciones tal que se logre visualizar el correcto funcionamiento de la técnica. Se realizó una curva de calibración con DMSO, en una concentración final entre el 0 al 10% con respecto al volumen final de la reacción; en un intervalo de 2,5% entre cada punto, a 65 °C. De esto se vuelve a obtener un comportamiento discordante en la amplificación del templado y del material genético no infectado. No obstante, en la muestra con 7,5% se observó el resultado esperado; figura 2.19.

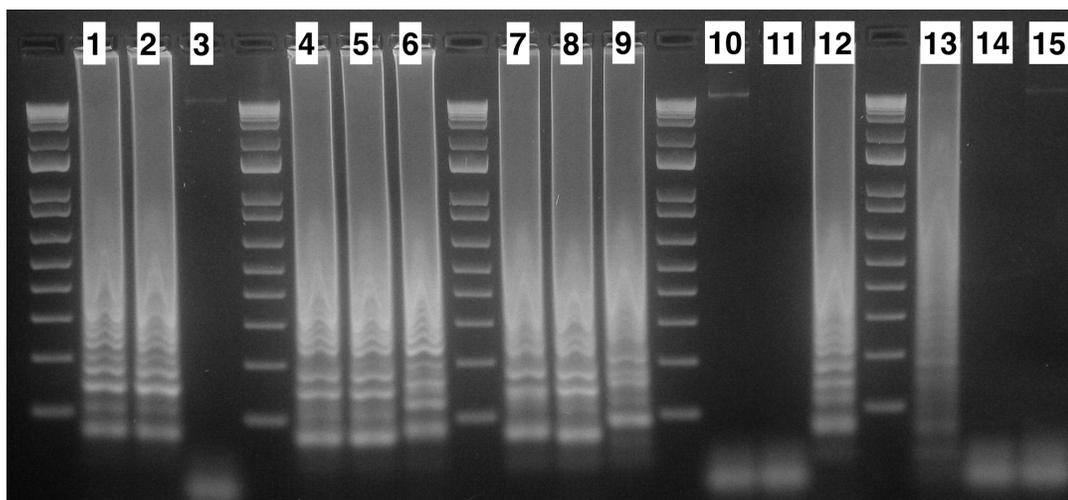


Figura 2.19: Electroforesis en gel de agarosa 2%, curva de DMSO 0; 2,5; 5; 7,5 y 10%, 65 °C, partidores de Thekiso, 2010. Orden de muestras: ontrol negativo (pocillos 1, 4, 7, 10, 13), control de reactivos (pocillos 2, 5, 8, 11, 14), control positivo (pocillos 3, 6, 9, 12, 15).

Las pruebas en presencia de aditivos se repitieron utilizando el conjunto de partidores diseñados. De ambas curvas se obtuvieron resultados discordantes. Si bien en el ensayo con

betaína, se observó un buen funcionamiento con 0,6 M (pocillos 10 al 12), sin embargo, la amplificación del control positivo fue ineficiente. Adicionalmente, nuevamente se observaron amplificaciones inespecíficas, en el control negativo y/o de reactivos en las otras concentraciones de aditivo realizadas; figura 2.20. Del mismo modo en la curva con DMSO, figura 2.21, la reacción en presencia de 7,5% de aditivo, mostró el resultado esperado, pero con una amplificación ineficiente en el control positivo. Con 2,5% se presentaron amplificaciones inespecíficas, y con 10% se nota una banda de alto peso molecular en el control negativo y positivo.

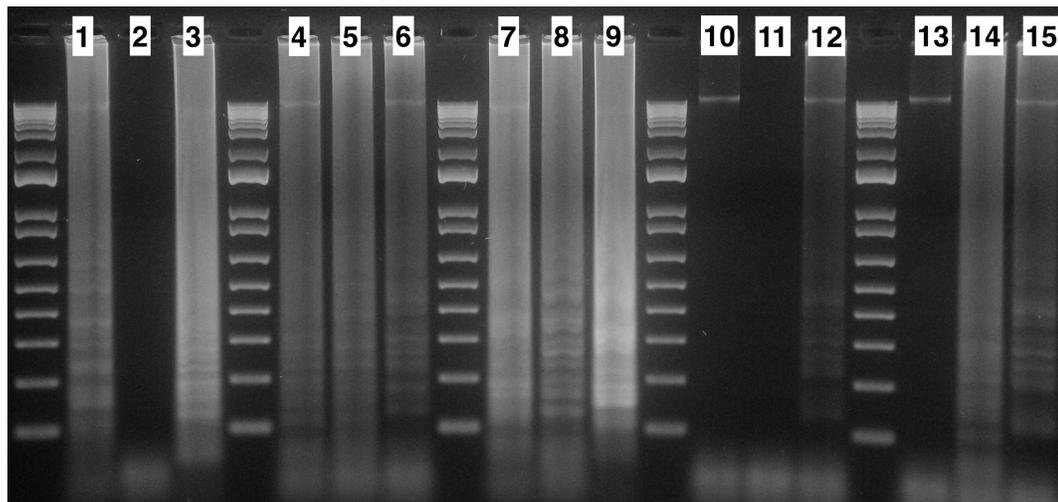


Figura 2.20: Electroforesis en gel de agarosa, curva de calibración con betaína 0; 0,2; 0,4; 0,6 y 0,8 M, 65 °C, partidores diseñados. Orden de muestras: control negativo (pocillos 1, 4, 7, 10, 13), control de reactivos (pocillos 2, 5, 8, 11, 14), control positivo (pocillos 3, 6, 9, 12, 15).

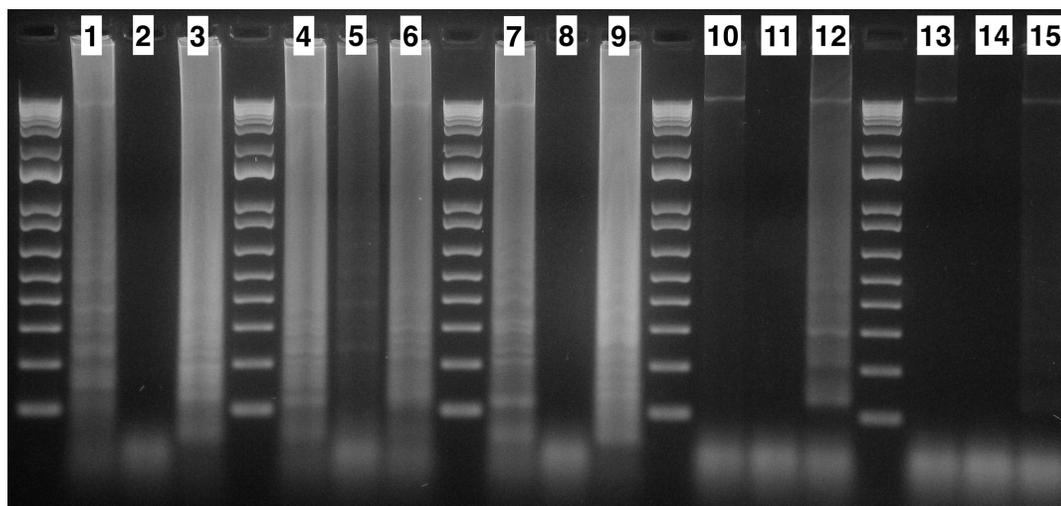


Figura 2.21: Electroforesis en gel de agarosa 2%, curva de DMSO 0; 2,5; 5; 7,5 y 10%, 65 °C, partidores diseñados. Orden de muestras: control negativo (pocillos 1, 4, 7, 10, 13), control de reactivos (pocillos 2, 5, 8, 11, 14), control positivo (pocillos 3, 6, 9, 12, 15).

### 2.3.3. Evaluación de la implementación de la técnica de LAMP

La tabla 2.15 corresponde a un cuadro comparativo realizado entre la reacción de PCR convencional, método estándar para el diagnóstico de la enfermedad, y la técnica de LAMP, tecnología en estudio. Esto contempla aspectos técnicos, teóricos y una estimación económica de los costos de cada reacción; el cálculo correspondiente se especifica en el anexo C.4.

Tabla 2.15: Comparación entre la reacción de PCR convencional y LAMP; aspectos técnicos, teóricos y prácticos [9]

Aspectos	PCR	LAMP
Descripción	Método enzimático, amplifica selectivamente una secuencia determinada en ciclos. Contempla tres pasos principales, desnaturalización, hibridación y extensión.	Método enzimático a temperatura constante mediada por asa. Amplificación y desplazamiento de nuevas secuencias que contienen múltiples sitios de inicio.
Enzima	<i>Taq</i> polimerasa, enzima termoestable, carece de actividad exonucleasa 3'-5', proviene de una bacteria <i>Thermus aquaticus</i>	<i>Bst</i> polimerasa, enzima termoestable con actividad helicasa y exonucleasa 5'-3', carece de actividad exonucleasa 3'-5'; proviene del bacilo <i>Bacillus stearothermophilus</i>
Termoestabilidad	Hasta 90 °C	Menor o igual a 70 °C
Insumos principales	Molécula blanco, dNTPs, enzima, 2 partidores, iones divalentes Mg <sup>+</sup> , tampón de reacción a cierto pH	Molécula blanco, dNTPs, enzima, partidores, iones divalentes Mg <sup>+</sup> , tampón a cierto pH,
Molécula blanco	ADN o ARN (RT-PCR)	ADN o ARN (RT-LAMP)
Cantidad de partidores	2	4 - 6
Diseño de partidores	Simple	Complejo
Equipo	Termociclador	Bloque térmico
Costo por reacción (CLP)	\$900	\$740
Método resolución	Electroforesis, costo \$11.500	Visual, resultado inmediato. Costo incluido en la reacción
Tiempo total	Aproximadamente 3 horas, reacción entre 60 y 90 minutos. Electroforesis 60 minutos	30 a 60 minutos
Cantidad de ADN amplificado	Aproximadamente 2 µgr	Entre 10 a 20 µgr aproximadamente
Límite de detección teórico	0,1 parásitos/mL [61]	1 parásito/reacción [46]
Aplicaciones	Diagnóstico, aislamiento de genes, estudios epidemiológicos y evolutivos, análisis de mutaciones, secuenciamiento de genomas	Diagnóstico y pruebas de detección de anomalías genéticas, contaminación de alimentos y muestras medio ambientales. Biosensores e integración en sistemas de microchips.
Sensibilidad a inhibidores	Si	No

Adicionalmente, en la tabla 2.16 se muestra el costo de los equipos necesarios para cada procedimiento.

Tabla 2.16: Costo Equipos para LAMP, PCR y Electroforesis

Equipo	Valor	Bibliografía
Termociclador	\$6.498.000	[62]
Bloque Térmico	\$250.000	[63]
Cámara Electroforesis	\$220.160	[62]
Transluminador	\$7.490.000	[62]

## 2.4. Discusión

La transmisión congénita del parásito *T. cruzi* ha provocado el apareamiento y/o aumento de casos de la enfermedad de Chagas en zonas no endémicas y, puesto que no existe una causa común de la infección del tejido placentario [25], el control de la infección presenta diversas dificultades. Dentro de los factores que favorecen la infección transplacentaria se encuentran: el estado de salud de la madre y su lugar de origen, la capacidad de invasión del parásito, el desarrollo del feto, el tratamiento recibido antes del embarazo y la parasitemia, entre otros [26]. Por lo tanto, la manera de controlar la transmisión es mediante el diagnóstico, enfocado en los siguientes grupos [25]:

- Adolescentes, previo a la iniciación de su vida sexual activa
- Mujeres en edad fértil
- Embarazadas
- Neonatos o infantes nacidos de madres infectadas
- Parientes mujeres e hijos e hijas infectadas

La detección oportuna de la infección, tanto en la madre como en el recién nacido, es crucial, puesto que si la mujer recibe un tratamiento previo al embarazo, disminuye la carga parasitaria; lo que baja el riesgo de infección del feto. Se debe tener en consideración que la madre no puede ser tratada durante el embarazo y en el período de lactancia. Por otra parte, si el recién nacido es diagnosticado a temprana edad, la enfermedad puede ser curada, evitando el desarrollo de una fase aguda severa o una fase crónica con consecuencias graves a avanzada edad [27].

Es crítico que el diagnóstico sea certero y rápido. Actualmente, se utilizan métodos que necesitan de personal calificado que monitoreen equipos sofisticados y de alto costo [7]. Además, generalmente para asegurar el resultado se deben repetir las pruebas, aumentando el período de tiempo para la confirmación del resultado, por consiguiente retrasando el inicio de la terapia de la enfermedad. Por otra parte, la infección prevalece en zonas de pocos recursos, debido a las características de la transmisión vectorial, por lo que, es fundamental la creación de sistemas de menor costo, y fácil acceso a la población.

Las cepas de *T. cruzi* se clasifican en DTUs, los que se distribuyen alrededor del mundo; no obstante no se asocia un polimorfismo del ADN con la ocurrencia de la infección congénita o la gravedad de la enfermedad [22]. De esta manera, el sistema de diagnóstico aquí presentado puede ser aplicado en zonas donde prevalezcan diferentes DTUs, debido a que en su diseño se consideraron las secuencias del gen blanco de todas las unidades discretas de tipificación.

En el trabajo práctico se utilizaron dos conjunto de partidores que amplifican regiones diferentes del rARN 18S. Se decide tomar como base un grupo de partidores publicados en el estudio “Detection of *T. cruzi* and *T. rangeli* infections from *Rhodnius pallescens* bugs by Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)” de Thekisoe, 2010; en conjunto con las condiciones óptimas de la reacción estandarizadas obtenidas en la investigación para la detección del parásito [48]. La secuencia blanco ARN ribosomal 18S, es un gen de copia múltiple,

lo que aumenta la sensibilidad del método (límite de detección), no obstante, disminuye la especificidad.

PrimerExplorer presenta un límite de tamaño de la secuencia máximo a analizar de 2.000 pb; teniendo en cuenta lo anterior, se alinearon las secuencias del gen de diferente DTU y se identificaron las zonas de mayor coincidencia para realizar un corte que permita el diseño de los partidores y represente a la mayor cantidad de polimorfismos posibles.

A partir del diseño del programa se seleccionó el grupo 4 de partidores. Considerando el alineamiento realizado, tabla C.16, la secuencia blanco es igual para todos los DTUs, es decir, cumple con el requisito esperado para el sistema. Cabe destacar que el diseño fue realizado en base a las condiciones estándar del programa, las cuales se pueden modificar para precisar el diseño de los partidores.

Una vez seleccionados los partidores, se procedió a realizar el diseño de las secuencias Loop en base a las condiciones estándar. El partidador Loop depende de la distancia que hay entre las regiones F1 y F2; la cual debe ser entre 40 a 60 pb, y en caso de ser muy cercana a 40 pb, el programa entregará un solo partidador (LB o LF) o ninguno de los dos.

Al observar la secuencia del partidador LB y LF publicados, tabla 2.13, se puede notar que son idénticas, por lo que, sólo el partidador LF se alinea, lo que quiere decir que existe un sólo partidador Loop. Lo mismo sucede en el diseño de los partidores correspondiente al grupo 4, en donde el programa entregó el partidador LB, tabla 2.14. Para obtener ambos partidores, se deben modificar las condiciones de diseño.

Los productos de amplificación mediante LAMP se pueden detectar por diferentes métodos, tales como: turbidez, electroforesis, fluorescencia, centrifugación y por cambio de color [9]; estos últimos permiten la visualización inmediata del resultado una vez finalizada la reacción. Para observar una alteración de color, se incluye un cromógeno, por ejemplo, azul de hidroxinaftol que cambia su coloración producto de la quelación de los iones de  $Mg^{++}$  debido a la incorporación de los dNTPs; o detectores de pH [53], entre estos se encuentran: el rojo fenol, rojo neutro o rojo cresol, compuestos utilizados en el Kit de Diagnóstico para SARS-Cov-2 mediante RT-LAMP de New England Biolabs [51].

Los halocromos son sustancias que alteran su color dependiendo del pH del medio en que se encuentren. Poseen un rango de viraje, por lo que, el cambio de color sólo se aprecia si se sobrepasan ciertos valores de pH. La presencia de sales destinadas a mantener el pH constante afecta la resolución del método, otorgando resultados falsos negativos o positivos. Es por esto que se necesita un tampón de reacción que permita observar el cambio de pH.

El tampón comercial asociado a la enzima *Bst* ADN polimerasa tiene como objetivo otorgar y mantener las condiciones óptimas de funcionamiento. Este contiene sales e tri(hidroximetil)aminometano [50], base fuerte, que mantiene el pH de la solución cercano a 8,8 durante todo el desarrollo de la reacción. La actividad enzimática de ADN polimerasa, provoca la acidificación del medio, debido a la liberación de hidrogeniones; lo que en etapas avanzadas, puede afectar la reacción de amplificación. No obstante, la presencia de una alta concentración de Tris-HCl no permite visualizar el viraje del halocromo, es por esto, que se necesita disminuir

la concentración de la base a la mínima posible en la solución final.

El utilizar el cambio de pH, como factor de detección, si bien disminuye los costos de la reacción; la correcta visualización depende de la acidez del medio, lo que a su vez está su-peditado a otros factores más allá de la amplificación del material genético. Además, puede afectar el funcionamiento de la enzima al no estar bajo sus condiciones óptimas. Por ende, se recomienda utilizar azul de hidroxinaftol como detector, el cual cambia de color frente a la quelación de iones de Magnesio debido a la liberación de pirofosfato, por lo que la en la coloración solo depende de la síntesis de ADN.

En el presente estudio se utilizó rojo fenol, halocromo que tiene un viraje entre un pH 6,8 y 8,2. Para esto se formuló un tampón de reacción desprovisto de Tris-HCl, tal que la reacción enzimática proceda en un ambiente con la menor cantidad de la base posible. Si bien el tampón de reacción está libre de este compuesto, existen fuentes que aportan trazas de esta sal, tales como: el tampón de almacenamiento de la enzima *Bst* ADN polimerasa (400  $\mu$ M) y la solución de elución de ADN del kit utilizado para la extracción del material genético (800  $\mu$ M). Considerando estos aportes, la amplificación se realizó en presencia de 1,2 mM de Tris-HCl.

Las pruebas iniciales tuvieron como finalidad probar el funcionamiento de los controles, de los reactivos, del halocromo, de la enzima en el tampón preparado y en el comercial. La reacción se llevó a cabo en un termociclador a 63 y a 65 °C, equipo que no es el esperado para la implementación de la técnica; se debe utilizar un baño termorregulado o un bloque térmico para su estandarización. Este primer ensayo se realizó con los partidores descritos en la referencia bibliográfica base[48]; cabe destacar que, la reacción con tampón comercial no contiene rojo fenol, por lo que, la detección de productos y la comparación de resultados se analiza mediante una separación electroforética en geles de agarosa.

Por otra parte, no se cuenta con tiras reactivas apropiadas para ajustar el pH con precisión de la reacción preparada en tampón suplementado con rojo fenol (entre 8,8 y 9,0), puesto que, para evitar la contaminación y desperdicio de los reactivos, solo se regula de acuerdo a la coloración de la solución, el cual se asume mayor a 8,0; como consecuencia de esto, el cambio de color observado en el control positivo puede no ser el esperado.

La figura 2.14 muestra una coloración amarilla en el tubo correspondiente al control positivo, en cambio, tanto el control negativo como el de reactivos mantuvieron su color rojo, lo que está acorde a lo esperado [51]. Sin embargo, debido a que el resultado visual depende del pH de la solución, se realizó una electroforesis como prueba confirmatoria, lo que buscaba descartar resultados del tipo positivo débil.

En un gel de agarosa, la amplificación positiva mediante LAMP en un gel de agarosa se observa como un patrón en escalera o como una banda continua fluorescente [46]. La separación electroforética del control positivo incubado en presencia de rojo fenol mostró un correcto funcionamiento, (figura 2.15), a juzgar por el resultado visual y a los estudios que evidencian la actividad enzimática en soluciones con un reducido tamponamiento [52] [53]. No obstante, no se amplificó el material genético en el control positivo de la reacción con tampón comercial, la supuesta inhibición de la enzima, no se debió a una contaminación de reactivo, puesto

que en la muestra sin templado no aparecieron bandas. Al repetir la prueba, se observó una amplificación tanto para la muestra con ADN de parásito y el control negativo, figura 2.16, lo que puede deberse a que el templado presente en la sangre no infectada está contaminado, es decir, contiene material genético de *T. cruzi* o bien la amplificación inespecífica se debe a una dimerización de los partidores facilitada por la presencia de ADN en el tubo de reacción.

En la figura 2.15 el control negativo utilizando el tampón preparado en el laboratorio, presentó un buen funcionamiento, es decir, se observó una banda discreta de alto peso molecular con lo que se comprueba que la sangre no estaba infectada antes de la extracción, sin embargo, no se descartó una posible dimerización de los partidores. Esto a su vez puede inhibir a la enzima, por lo que, es una posible causa por la que el control positivo no amplificó en el primer ensayo.

Para descartar los productos de amplificación producidos por la dimerización de partidores, y como parte del proceso de estandarización se realizó una curva de calibración de betaína. Este compuesto es un desnaturante que ayuda a la separación de secuencias de doble hebra, por lo que, la presencia de este aditivo debería suprimir las amplificaciones inespecíficas debidas a la dimerización de partidores.

De este ensayo no se obtuvieron los resultados esperados, dado que, si bien los puntos con concentración 0, 0,2, 0,4 y 0,6 M de betaína se amplificó el material genético presente en el control positivo, existen amplificaciones inespecíficas en las otras muestras. Pese a esto, en la reacción con 0,8 M del aditivo, figura 2.17, se evidenció una completa inhibición de la enzima y un correcto funcionamiento del control negativo y de reactivos.

Los mismos resultados discordantes se obtuvieron al realizar la prueba a 65 °C, por lo que, no se logró evitar la dimerización de partidores al adicionar betaína. Como alternativa, con el mismo propósito anterior; se realizó una curva con concentraciones variadas de DMSO. A partir de este ensayo, una concentración final de 7,5 % de DMSO presentó el resultado esperado, sin embargo, los otros puntos se repitieron el comportamiento inespecífico anterior. En concreto, con las curvas de calibración realizadas con los partidores de bibliografía, no se cuenta con un buen desempeño, por lo que, la técnica con los partidores de Thekisoe, 2010 [48], no es reproducible.

Las pruebas anteriores se repitieron con el segundo grupo de partidores. En la curva de betaína se observó un buen funcionamiento con 0,6 M de concentración final; sin embargo, con 0,2 y 0,4 M, se observó la amplificación del material genético en el control de reactivos y en el negativo. Por otra parte, no se observó una inhibición de la reacción con 0,8 M del aditivo. En la curva de DMSO, se evidenció el comportamiento esperado con 7,5 %, sin embargo, con 2,5 % se observaron amplificaciones inespecíficas y resultados discordantes en los otros puntos; por lo que, de igual manera que el método no es reproducible con los partidores diseñados.

En las figuras correspondientes a las curvas de calibración, existen puntos donde en el control de reactivos no se observaron bandas, esto comprueba que los reactivos no están contaminados. Dicho esto, al evidenciar una amplificación en la muestra, se verifica que los partidores hibridan entre sí, puesto que esta reacción no contiene templado. Así mismo, en los casos donde la enzima se ve inhibida, se nota una banda de alto peso molecular tanto en el control negativo, como en el positivo, que corresponde al material genético presente en el tubo.

A partir del alineamiento realizado tanto con los partidores de Thekiso, 2010; como los diseñados, tablas C.12 y C.16; se esperaba que los segundos presentaran un mejor comportamiento que los primeros. Dado que reconocen todos los polimorfismos de *T. cruzi*, en especial no muestran discordancia con DTU TcI, correspondiente al parásito cultivado utilizado para la muestra control. En cambio, los partidores de bibliografía no identifican todas las unidades, especialmente el partidador F3 y FIP. Sin embargo, con ninguno de los dos grupos se logró obtener un resultado reproducible.

Los aditivos que se emplean en reacciones de polimerización de ADN, tienen como finalidad aumentar la especificidad y fidelidad de los métodos. Por ejemplo, el DMSO y la betaína disminuyen la estructura secundaria del ADN, y la betaína mejorando la amplificación de fragmentos. Ambos tienen el mismo efecto en la técnica, es decir, favorecen el alineamiento de los partidores, manteniendo la temperatura de melting para todos por igual. En la literatura, generalmente se emplea betaína para LAMP y DMSO para PCR; optimizando el funcionamiento de ambas. Por lo que, al estar presentes en la reacción se espera que se disminuya la dimerización de partidores, y a su vez se favorezca su hibridación y la amplificación del templado. Por el contrario, con ambos aditivos no se observó alguna mejoría en el método. A partir de esto, se descartó una posible contaminación de los reactivos, por lo que, si bien no se tiene una causa concreta, es posible que exista una degradación del material genético que favorezca amplificaciones inespecíficas y/o inhiban a la enzima; o puede que existan fallas en la secuencia de los partidores provenientes de la síntesis.

El kit de diagnóstico está enfocado en detectar la presencia de material genético del parásito presente en muestras sanguíneas de pacientes, por esto, es fundamental verificar que los partidores no hibriden con secuencias de origen humano, esto es parte del diseño y se verifica mediante un alineamiento *in silico* utilizando la herramienta BLAST. En la práctica, se asume que el control negativo corresponde a ADN de humano.

De acuerdo con los resultados del primer ensayo se verificó la especificidad de la reacción, a pesar de esto se debe descartar la amplificación de material genético de otras especies que puedan estar presentes en la muestra de paciente, entre ellas parásitos que dificulten el proceso de diagnóstico como *Leishmania* o *T. rangeli*; lo cual es relevante sobre todo para aquellos lugares que presentan más de una enfermedad parasitaria.

La metodología de estandarización presentada, describe un proceso manual basada en la repetición la reacción, variando el parámetro en estudio, que corresponde a la concentración de un reactivo o la temperatura de incubación, entre otros. Al optimizar la técnica se busca el mejor funcionamiento con la mínima cantidad posible de cada uno de los componentes requeridos, obteniendo el resultado en el menor tiempo posible. Para esto se necesita un equipo que entregue la cinética de alineación de los partidores, lo que permite determinar el tiempo en donde el material genético se amplifica. Esto se realiza con un turbidímetro o un termociclador en tiempo real como equipo de resolución [48].

Si no se cuentan con estos equipos, se debe repetir la reacción para una cierta temperatura y observar el resultado a diferentes tiempos, por ejemplo, a 65 °C la reacción se detiene a los 30, 45, 60 y 90 minutos y se analiza la diferencia en el producto obtenido mediante electroforesis

en geles de agarosa.

Con el fin de validar la técnica se deben procesar un mínimo de 92 muestras, calculo presentado en el anexo D.1. Para obtener este parámetro se tomó como referencia la cantidad de muestras analizadas en el año 2019 por el Laboratorio de Parasitología, sección Biología Molecular del ISP, donde el 6,4% corresponden a pacientes menores de un año positivos para Chagas por la reacción de PCR.

El límite de detección depende del número de repeticiones de la secuencia blanco en el genoma del parásito. La reacción de PCR utilizada como referencia amplifica un gen de cinetoplasto, material genético que tiene mayor número de copias que el gen 18S utilizado para el diseño de LAMP. Por lo que, si bien LAMP es menos sensible que la PCR; esta es capaz de producir una mayor cantidad de moléculas a partir de una cantidad mínima de templado.

La especificidad del método permite diagnosticar correctamente a pacientes que resultan positivos por serología debido a la presencia de anticuerpos de la madre, pero que no necesariamente están infectados. Para un análisis molecular, si la madre presenta una alta parasitemia, es mayor el riesgo de infección congénita; de modo que, en el caso de que el menor no esté infectado, se necesita de una técnica más específica que detecte al patógeno en la sangre del menor. En cambio, si la madre está en una fase crónica de la enfermedad, la parasitemia es menor; por lo que, se prefiere una prueba más sensible.

Con el propósito de que el sistema sea implementable, la técnica se debe estandarizar y completar el proceso de validación. Además, para demostrar su eficacia, como herramienta de diagnóstico de la enfermedad por transmisión congénita, se recomienda realizar una evaluación posterior con muestras de infantes considerando su edad, la procedencia y la parasitemia de la madre.

Si bien los resultados obtenidos no fueron los esperados, la experiencia práctica demuestra las complicaciones para estandarizar la técnica; lo que requiere de ensayos con múltiples partidores, que cuenten con un análisis y diseño minucioso. La metodología no se completó debido a la falta de tiempo por la contingencia actual.

Las técnicas de amplificación isotérmica nacen desde la búsqueda de nuevos métodos sencillos, que no requieran equipos complejos, entreguen un resultado en menor tiempo y de forma eficiente [9]. Adicionalmente, la detección de enfermedades se hace cada vez más compleja, debido a la aparición de nuevas patologías y mutaciones en el genoma lo que hace urgente un diagnóstico rápido, sensible y específico.

Desde los años 90's se han desarrollado tecnologías a temperatura constante de alta sensibilidad y especificidad de detección. Estas herramientas se han expandido y diversificado en relación a la molécula blanco, desde ácidos nucleicos, proteínas, células, hasta moléculas pequeñas. En cuanto al formato de implementación, hay métodos que necesitan solo un tubo de reacción y otros que se han incorporado en sistemas de microchips, plataformas capilares y microfluídica; con un gran potencial en el desarrollo de biosensores, bioimagen y nanomedicina, y técnicas basadas en la detección y análisis de fenómenos biológicos.

La reacción de PCR duplica una molécula de ADN, obteniendo dos copias del material por cada ciclo de amplificación, lo cual se describe como una ecuación exponencial  $2^n$ , donde  $n$  es la cantidad de ciclos. A lo largo del tiempo, se ha diversificado la técnica, abordando diferentes estrategias que permitan precisar los resultados y variar su aplicación; lo que hace al método versátil para otros propósitos moleculares, como estudios de mutaciones, secuenciamiento de genomas, aislamiento de genes y análisis evolutivos y epigenéticos.

La reacción de PCR es robusta, los protocolos se diseñan de forma simple; no obstante, requiere de un equipamiento sofisticado y de alto costo, como se ejemplifica en la tabla 2.16, el cual debe ser monitoreado por personal calificado. En cambio, el método de LAMP se puede implementar en un bloque térmico o un baño termostático, equipos de bajo costo y fácil acceso para laboratorios y centros de salud primarios.

Para la implementación de ambas técnicas se debe extraer y purificar el material genético. La reacción de PCR es sensible a inhibidores, por lo que, el proceso requiere de mayor precisión. Por el contrario, la amplificación mediada por *asa* no se ve afectada por la presencia de contaminantes, tanto así que existen sistemas para la detección de VIH que utilizan el método a partir de una gota de sangre; este incluye un tampón de lisis para romper las células [43], lo que permite su incorporación en dispositivos de fácil transporte.

Los productos de PCR son analizados mediante una electroforesis en gel de agarosa, este proceso le entrega un costo extra a la reacción, valor presentado en la tabla 2.15 y aumenta el tiempo de resolución. En cambio, LAMP tiene como ventaja, la obtención de resultados de forma inmediata, al evidenciar un cambio de color o la presencia de un precipitado blanco. El uso de compuestos que cambien su coloración disminuye el costo de la reacción y permite un resultado rápido; sin embargo, si las condiciones no son adecuadas puede que el resultado sea subjetivo al observador.

La reacción de LAMP es sensible y específica debido al uso de 4 a 6 primers que amplifican una región restringida de la secuencia blanco. Si bien su principio de funcionamiento es más complejo, permite obtener una mayor cantidad de ADN amplificado. Por otra parte, es una técnica simple en cuanto a su metodología, dado se incubaba a temperatura constante, lo que la hace flexible y adaptable al equipamiento presente en el laboratorio. Para esto existen múltiples opciones, como un bloque térmico, estufa, baño seco, entre otros; vale decir, un instrumento que mantenga un tiempo determinado a una temperatura fija. Por otra parte, la técnica toma de un menor tiempo que la reacción PCR; el cual varía entre 30 a 60 minutos.

La diversidad de los métodos de resolución beneficia su aplicación, debido a que se pueden utilizar halocromos de bajo costo y fácil acceso. Otras metodologías permiten la visualización en tiempo real, lo que posibilita el estudio de la cinética de la reacción. Si bien, se utiliza la electroforesis para su resolución, no es recomendable ya que se necesita de una apertura del tubo, lo que es un riesgo de contaminación que puede traer falsos positivos en muestras control negativo. Se sugiere utilizar flujos laminares, con filtros o barreras contra aerosoles y pipetas exclusivas.

Para el correcto funcionamiento de la reacción se requiere de una acertada elección de la secuencia blanco, que permita el diseño correcto de los partidores. Esto es un proceso complejo, aunque existen programas computacionales que facilitan el trabajo, se necesita de un análisis de las secuencias. Por otra parte, el uso de más partidores aumenta la posibilidad de que estos hibriden entre sí, lo que puede provocar falsos positivos, y/o se impida la amplificación del templado.

La elección del gen a amplificar se centra en secuencias específicas y altamente repetidas para obtener una mayor sensibilidad y especificidad. Generalmente se utilizan secuencias ribosómicas nucleares como rARN 18S, 5.8S; ITS1, ITS2, genes mitocondriales y de cinetoplasto (ADNk) [10].

La técnica de LAMP es robusta como herramienta de diagnóstico, múltiples estudios demuestran su eficiencia en la detección de diferentes microorganismos. Si bien se siguen realizando pruebas para su aplicación en otros sistemas, es menos versátil que la reacción de PCR, puesto que los productos de amplificación no se asocian a un peso molecular específico, lo que dificulta su análisis posterior.

El costo por reacción de PCR es aproximadamente de \$900, en cambio el precio de una reacción de LAMP es de \$740. La diferencia económica radica en la menor cantidad de ADN utilizado y en el costo de la enzima *Bst*. El importe de cada método se estimó como la suma del precio de los reactivos en base a la cantidad utilizada para una reacción. Esto sin considerar el agua adicional utilizada para diluir.

Para calcular el costo de LAMP se consideró como método de resolución el compuesto azul de hidroxinaftol, por lo que, el uso de otro método puede disminuir el costo, como un indicador de pH, o aumentarlo si es que se utiliza un equipo adicional. Además, se consideró el uso del tampón comercial que viene incluido con la enzima; si es que se requiere de otro tampón esto afectaría en el precio final. Por otra parte, el valor de un gel de electroforesis no se dividió por la cantidad de muestras analizables en una reacción.

La estimación económica asumieron condiciones mínimas de limpieza y la presencia del instrumental básico para la implementación de ambas técnicas, es decir, presencia de tubos, pipeta, puntas y centrífuga, entre otros. Además, no se calculó el consumo eléctrico de los equipos.

Los avances en las aplicaciones de la técnica para la detección de *T. cruzi* se ha ido expandiendo; recientemente se publicó un estudio que implementa una prueba de diagnóstico *Tc* LAMP, *Trypanosoma cruzi* Loopamp kit [64], basado en el protocolo publicado por Besuschio en el año 2017 [65], el cual está diseñado para la amplificación de una secuencia satélite altamente repetitiva. El kit utiliza 5  $\mu$ L de ADN; la reacción se incubó por 40 minutos a 65 °C y 5 minutos a 80 °C. El trabajo demostró su potencial aplicación en pacientes infectados por transmisión congénita, en vista del 100 % de coincidencia con los resultados obtenidos por qPCR. Posteriormente, se evalúa en España con muestras clínicas, con una especificidad del 97 % [66].

En las dos investigaciones el kit es evaluado en pacientes por diferentes vías de transmisión, el número de muestras es solo representativo. Si bien el estudio publicado por Besuschio, 2020 [64], es aplicado en pacientes Sudamericanos, para que sea empleado en Chile se debe adecuar a la realidad del país. Resulta interesante su aplicación debido a la cantidad de ADN templado que utiliza, ya que es comparable con la reacción de PCR implementada en el país. Por otra parte, ambos trabajos son útiles como punto de contraste al sistema diseñado.

# Capítulo 3

## Conclusiones

A partir del presente estudio se diseñó un sistema de detección de *Trypanosoma cruzi* utilizando la técnica de LAMP, el cual identifica una región altamente conservada del gen de ARN ribosomal 18S entre los diferentes DTUs del material genético del parásito; por lo que, teóricamente es aplicable en zonas donde prevalezcan distintos polimorfismos del microorganismo.

La técnica de LAMP es un método sencillo, rápido, eficiente y de bajo costo en comparación con la reacción de PCR. Además requiere de una temperatura constante de incubación y el resultado se puede obtener por simple visualización; lo que permite su utilización en laboratorios con infraestructura básica y centros de salud primarios. En consecuencia, poner en funcionamiento el método de LAMP acerca el diagnóstico a zonas rurales, disminuyendo el tiempo y las consecuencias de la enfermedad en recién nacidos.

Las pruebas iniciales se realizaron con un grupo de partidores obtenidos por bibliografía (Thekiso, 2010)[48], que amplifican una región diferente del mismo gen; como base para el diseño del sistema, en conjunto con el protocolo óptimo de operación. De este ensayo se obtuvieron resultados discordantes, debido a la presencia de amplificaciones inespecíficas en el control negativo y la inhibición de la enzima en el control positivo; lo que hace alusión a una posible formación de dímeros de partidores. Sin embargo, la formación de estructuras secundarias no disminuyó en presencia de betaína o de DMSO, con ambos grupos de partidores, por consiguiente la reacción no es reproducible. Por lo que, no se realizan las pruebas clínicas necesarias para obtener los parámetros de sensibilidad y especificidad analítica y estadística.

Debido a los resultados obtenidos no se cumplió con el objetivo general del estudio. Para obtener las condiciones estándar de funcionamiento la técnica se deben probar diferentes grupos de partidores diseñados minuciosamente, ya que su estructura facilita la formación de partidores, lo cual dificulta el proceso de estandarización.

El sistema diseñado se puede optimizar analizando todas las condiciones de funcionamiento, en presencia de la mínima cantidad posible de cada uno de los reactivos requeridos, en el menor tiempo, en un baño termorregulado o un bloque térmico. En el caso de la sensibilidad, se puede utilizar una secuencia altamente repetida, como ADN satélite o ADNk. Para la especificidad, se sugiere comparar la identificación de material genético de especies que puedan estar presente en la muestra, en especial de parásitos que presenten similitudes con *T. cruzi*. En conclusión, para que sea implementable se debe completar el proceso de validación y es-

tandarización que definan parámetros de sensibilidad y especificidad analítica y estadística; con pruebas clínicas que respalden su aplicación.

# Bibliografía

- [1] ROBERTS L., JANOVY J. JR. Foundations of Parasitology. Eighth Edition. New York, McGraw Hill, 2009.
- [2] WORLD HEALTH ORGANIZATION Chagas disease (American trypanosomiasis) [en línea] <[https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab_1)> Última consulta: 11 de abril 2020
- [3] CHILE, MINISTERIO DE SALUD, INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA Vigilancia de Enfermedad de Chagas: 2014-2017, Componente vectorial
- [4] AVENDAÑO C., PATARROYO M. A. (2020) Loop-Mediated Isothermal Amplification as Point-of-Care Diagnosis for Neglected Parasitic Infections. *Int. J. Mol. Sci.* 21:7981.
- [5] CÓRDOVA L. 2007. Identificación y descripción molecular de cepas de *Trypanosoma cruzi* y su análisis filogenético mediante secuenciación del gen para citocromo B. Memoria para Médico Veterinario. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Escuela de Ciencias Veterinarias. 64p.
- [6] CHILE, MINISTERIO DE SALUD, SUBSECRETARIA DE SALUD PÚBLICA, DIVISIÓN DE PLANIFICACIÓN SANITARIA, DEPARTAMENTO DE EPIDEMIOLOGÍA Circular de Vigilancia de la Enfermedad de Chagas, Mayo 2011
- [7] CARLIER Y., TORRICO F., SOSA-ESTANI S., RUSSOMANDO G., LUQUETTI A. (2011) Congenital Chagas Disease Recommendations for Diagnosis, Treatment and Control of Newborns, Siblings and Pregnant Women. *PLoS Negl Trop Dis* 5(10)
- [8] CAÑADAS F. (2017) Diagnóstico Inmunológico de las Tripanosomosis. Trabajo de Fin de Grado Químico Farmacéutico. Madrid, Universidad Complutense, Facultad de Farmacia. 21p
- [9] LIRA R., DE LA CRUZ PÉREZ J.; MALDONADO A., ROJAS O. (2018) Sistemas de amplificación isotérmica para la detección molecular de los virus zika, dengue y chikungunya. *Mens. Bioquim.* 42 92-102
- [10] GARCÍA D., FERNÁNDEZ P., MURO A. (2021) LAMP in Neglected Tropical Diseases: A Focus on Parasites. *Diagnostics* 11, 521
- [11] MURRAY P., ROSENTHAL K., PFAÜER M. Microbiología Médica. 5ta Edición. Madrid, España, Elsevier, 2007
- [12] NZELU CO., KATO H., PETERS NC. (2019) Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): An advanced molecular point-of-care technique for the detection of *Leishmania* infection. *PLoS Negl Trop Dis* 13(11): 1-21
- [13] SWIWORARAT C., PHUMEE A., MUNGTHIN M., LEELAYOOVA S., SIRIYASATIEN P.

- (2015) Development of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) for simple detection of Leishmania infection. *Parasites & Vectors* 591: 1-8
- [14] WORLD HEALTH ORGANIZATION, DEPARTMENT OF FOOD SAFETY AND ZOOSES Multicriteria based ranking for risk management of food-borne parasites. Rome, Italy, Microbiological Risk Assessment Series No 23, 2014
- [15] CHILE, MINISTERIO DE SALUD Guía de Diagnóstico, Tratamiento y Prevención de la Enfermedad de Chagas, Agosto, 2010
- [16] MUÑOZ C., SOLARI A., APT W., ZULANTAY I. (2013) Caracterización de las Unidades Discretas de Tipificación de *Trypanosoma cruzi* según sus marcadores moleculares. *Ibero.Latinoam. Parasitol* 72(1): 5-21
- [17] GAUNT MW., FRAME IA., STOTHARD JR., CARRASCO HJ., TAYLOR MC., MENA SS., VEAZEY P., MILES GA., ACOSTA N., DE ARIAS AR., MILES MA. (2003) Mechanism of genetic exchange in American *trypanosomes*. *Nature* 421(6926): 936-939
- [18] ZINGALES B., ANDRADE SG., BRIONES MRS., CAMPBELL DA., CHIARI E., FERNANDES O., GUHL F., LAGES-SILVA E., MACEDO AM., MACHADO CR., MILES MA., ROMANHA AJ., STURM NR., TIBAYRENC M., SCHIJMAN AG. (2009) A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcIV. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104(7): 1051-1054
- [19] WESTERNBERGER SJ., BARNABE C., CAMPBELL DA., STURM NR. (2005) Two hybridization events define the population structures of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics* 171(2): 527-543
- [20] DE FREITAS JM., AUGUSTO-PINTO L., PIMENTA JR., BASTOS-RODRIGUES L., GONCALVES VF., TEIXEIRA SM., CHIARI E., JUNQUEIRA AC., FERNANDES O., MACEDO AM., MACHADO CR., PENA SD. (2006) Ancestral genomes, sex, and the population structures of *Trypanosoma cruzi*. *PloS Pathog* 2(3): e24
- [21] RENDELL VR., GILMAN RH., VALENCIA E., GALDOS-CARDENAS G., VERASTEGUI M., SANCHEZ L. (2015) *Trypanosoma cruzi* Infectec Pregnant Women without Vector exposure has higher parasitemia levels: Implications for Congenital Transmission risk. *PLoS ONE* 10(3): 1-9
- [22] PÉREZ MC., ALARCÓN M., ARAUJO S., GONCALVES L. (2012) Efecto la infección congénita por *Trypanosoma cruzi* sobre el desarrollo intrauterino y la respuesta inmune fetal-neonato. *Invest Clin* 52(2): 190-204
- [23] GUHL F. 2009. Enfermedad de Chagas: Realidad y perspectivas. *Biomed* 20: 228-234.
- [24] MASTROLONARDO V., RAMOS D., PARAVISINI I., MORALES J., CARRASCO H., LO HUANG S., LEMMA C. (2013) Tripanosomiasis en el embarazo. *Obstet Ginecol Venez.* 73(3): 149-156
- [25] CARLIER Y., ALTCHER J., ANGHEBEN A., FREILIJ H., LUQUETTI AO., SCHIJMAN AG., SEGOVIA M., WAGNER N., ALBAJAR P. (2019) Congenital Chagas disease: Updated recommendations or preventions, diagnosis, treatment, and follow-up of newborns and siblings, girls, women of childbearing age, and pregnant women. *PLoS Negl Trop Dis* 13(10): 7694.
- [26] CARLIER Y., SOSA-ESTANI S., LUQUETTI A., BUEKENS P. (2015) Congenital Chagas

- disease: an update. *Men Inst Oswaldo Cruz* 110(3): 363-368
- [27] BUSTOS P., MILDUBERGER N., VOLTA BJ., PERRONE AE., LAUCELLA SA., BUA J. (2019) *Trypanosoma cruzi* Infection at Maternal-Fetal Interface: Implications of Parasite Load in the Congenital Transmission and Challenges in the Diagnosis of Infected Newborns. *Frontiers in Microbiology* 10: 1250.
- [28] PERÉZ A., MARY C., ALARCÓN M., ARAUJO S., GONCALVES L. (2012) Efecto de la Infección congénita por *Trypanosoma cruzi* sobre el desarrollo intrauterino y la respuesta inmune fetal-neonatal. *Invest Clin* 53(2): 190-204
- [29] RIVERO R., BISIO M., VELÁZQUEZ EB., ESTAVIA MI., SCOLLO K., GONZÁLEZ NL., ALTCHER J., RUIZ AM (2017) Raid detective of *Trypanosoma cruzi* by colorimetric Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): A potential novel tool for the detection of Congenital Chagas Infection. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 89:26-287.
- [30] CHILE Ministerio de Salud. Norma Técnica General, Control y Prevención Nacional de la Enfermedad de Chagas, febrero 2014. 98p.
- [31] CHILE, MINISTERIO DE SALUD 2020. Reglamento sobre notificación de enfermedades transmisibles de declaración obligatoria y su vigilancia [en línea] <<https://www.bcn.cl/leychile/navegar?idNorma=1141549>> Última consulta: 5 de agosto 2020
- [32] NOTOMI T., OKAYAMA H., MASUBUCHI H., YONEKAWA T., WATANABE K., AMINO N., HASE T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acid Research*. 28(12)
- [33] THEKISOE O., KUBOSI N., NAMBOTA A., FUJISAKI K., SUGIMOTO C., IGARASHI I., YASUDA J., INOUE N. (2007) Species-specific Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) for diagnosis of trypanosomosis. *Acta Tropica* 102: 182-189
- [34] WONG Y. P., OTHAMAN S., LAU Y. L., CHEE H. Y. (2017) Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP): A Versatile Technique for Detection of Microorganisms. *J Appl Microbiol*.
- [35] XING-WEI NI, DONALD P. MCMANUS, ZHONG-ZI LOU, JI-FEI YANG, HONG-BIN YAN, LI LI, HONG-MIN LI, QUAN-YUAN LIU, CHUN-HUA LI, WAN-GUI SHI, YAN-LEI FAN, XU LIU, JIN-ZHONG CAI, MENG-TONG LEI, BAO-QUAN FU, YU-RONG YANG, WAN-ZHONG JIA. (2014) A comparison of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) with Other Surveillance Tools for *Echinococcus granulosus* Diagnosis in Canine Definitive Hosts. *PLoS Negl Trop Dis* 9(7).
- [36] LAMP PRIMER DESIGNING SOFTWARE PRIMER EXPLORER PrimerExplorer Operation Instructions. [en línea] <[https://primerexplorer.jp/e/v5\\_manual/index.html](https://primerexplorer.jp/e/v5_manual/index.html)> Última consulta: 11 de abril 2020
- [37] NEW ENGLAND BIOLABS (2015) Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Tutorial. [video] [en línea] < <https://www.youtube.com/watch?v=L5zi2P4lggw&app=desktop>> Última consulta: 11 de abril 2020
- [38] FU S., QU G., GUO S., MA L., ZHANG N., ZHANG S., GAO S., SHEN Z. (2011) Applications of Loop Mediated Isothermal DNA Amplification. *Appl Biochem Biotechnol*. 163: 845-850
- [39] JOHNSON M. Many Initiatives Turning to RT-LAMP as Alternative to PCR

- for Rapid COVID-19 Screening Assays. [en línea] Genomeweb, Agosto 13, 2020. <<https://international.neb.com/-/media/nebus/files/feature-articles/many-initiatives-turning-to-rt-lamp-as-alternative-to-pcr-for-rapid-covid-19-screening-assays.pdf?rev=6178d83ba1684d50981e4d32d357ae2c>> Última consulta: 18 de marzo 2020
- [40] ZHANG Y., ODIWUOR N., XIONG J., SUN J., NYARUABA R. O., WEI H., TANNER N. A. (2020) Rapid Molecular Detection of SARS-CoV-2 (COVID-19) Virus RNA Using Colorimetric LAMP. medRxiv.
- [41] HUANG W., LIM B., HSU C., XIONG D., WU W., YU Y., JIA H., WANG Y., ZENG Y., JI M., CHANG H., ZHAN X., WANG H., CIU Z. (2020) RT-LAMP for rapid diagnosis of coronavirus SARS-CoV-2. Microbial Biotechnology
- [42] LOAN V., HERBST K., BOERNER K., MEURER M., KREMER L., KIRRMAYER D., FREISTÄDTER A., PPAGIANNIDIS D., GALMOZZI C., STANIFER M., BOULANT S., KLEIN S., CHLANDA P., KHALID D., MIRANDA I., SCHINETZLER P., KRÄUSSLICH H. G., KNOP M., ANDERS S. (2020) A colorimetric RT-LAMP assay and LAMP-sequencing for detecting SARS-CoV-2 RNA in clinical samples. Sci.Transl. Med.
- [43] DAMHORST G. L., DUARTE-GUEVARA C., CHEN W., GHONGE T., CUNNINGHAM B., BASHIR R. (2015) Smartphone-Imaged HIV-1 Reverse-Transcription Loop Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) on a Chip from Whole Blood. Engineering 1(3): 324-355
- [44] MORI Y., NOTOMI T. (2019) Loop-Mediated isothermal amplification (LAMP): Expansion of its practical application as a tool to achieve universal health coverage. J. Infect Chemother.
- [45] TIAN B., ZARDÁN T., BÁLINT Á., DONOLATO M., FOGT M., SVEDLUND P., STÖMBERG M. (2016) Rapid Newcastle Disease Virus Detection Based on Loop-Mediated Isotherma Amplification and Optomagnetic Readout. ACS Sens. 1:1228-1234
- [46] NIKOLSKAIA O., THEKISOE O., DUMLER J.S., GRAB D. (2017) Loop-Mediated Isothermal Amplification for Detection of the 5.8S Ribosomal Ribonucleic Acid Internal Transcribed Spacer 2 Gene Found in *Trypanosoma brucei gambiense* Am. J. Trop. Med. Hyg. 96(2): 275-279
- [47] MITASHI P., HASKER E., NGOYI D. M., PYANA P.P., LEJON V., VAN DER VEKEN W., LUTUMBA P., BÜSCHER P., BOELAERT M., DEBORGGRAEVE S. (2013) Diagnostic accuracy of Loopamp *Trypanosoma brucei* detection kit for diagnosis of human African trypanosomiasis in clinical samples. PLoS Negl. Trop. Dis. 7, 2504
- [48] THEKISOE O., RODRIGUEZ C., RIVAS F., CORONEL-SERVIAN A., FUKUMOTO S., SUGIMOTO C., KAWAZU S., INOUE N. (2010) Detection of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* Infections from Rhodnius pallescens Bugs by Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP). Am. J. Trop. Med. Hyg. 82(5): 855-860.
- [49] QIAGEN EZ1 DNA Blood 350  $\mu$ L Kit [en línea] <<https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/genomic-dna/ez1-dna-blood-350-ul-kit/#orderinginformation>> Última consulta: 12 de agosto del 2020
- [50] NEW ENGLAND BIOLABS INC. Bst 2.0 Warm Start DNA polymerase [en línea] <<https://international.neb.com/products/m0538-bst-20-warmstart-dna-polymerase#>

- [Product%20Information\\_Properties%20&%20Usage](#)> Última consulta: 9 de agosto del 2020
- [51] NEW ENGLAND BIOLABS INC. SARS-CoV-2 Rapid Colorimetric LAMP Assay Kit [en línea] <<https://international.neb.com/products/e2019-sars-cov-2-rapid-colorimetric-lamp-assay-kit#Product%20Information>> Última consulta: 20 de enero 2021
- [52] POOLE C.B., LI Z., ALHASSAN A., GUELG D., DIESBURG S., TANNER N.A. (2017) Colorimetric test for diagnosis of filarial infection and vector surveillance using non-instrumented nucleic acid loop-mediated isothermal amplification (NINA-LAMP). PLoS ONE 12(2)
- [53] TANNER N.A., ZHANG Y., JR. EVANS T.C. (2015) Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes. BioTechniques 58:59-68
- [54] BURGOS J., ALTCHER J., BISIO M., DUFFY T., VALADARES H., SEIDENSTEIN M.E., PICCINALI R., FREITAS J., LEVIN M., MACCHI L., MACEDO A., FREILIJ H., SHIJMAN A. (2007) Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. International Journal for Parasitology 37: 1319-1327
- [55] THERMOFISHER *Taq* ADN polimerasa Platinum [en línea] <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/10966026#/10966026>> Última consulta: 15 de marzo 2021
- [56] NJIRU ZK, MIKOSZA ASJ., ARMSTRONG T., ENYARU JC., MDUNG'U JM. (2008) Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Method for rapid Detection of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. PLoS Negl Trop Dis 2(2): 147
- [57] Tablas de Contingencia [en línea] <<http://halweb.uc3m.es/esp/Personal/personas/jmmarin/esp/Categor/Tema2Cate.pdf>> Última consulta. 20 de julio del 2020
- [58] ALRMAN D.G., BLNAD J.M. (1994) Statistics Notes: Diagnostic test 1: sensitivity and specificity. BMJ 308: 1552
- [59] CERDA J., VILLAROE L. (2008) Evaluación de la concordancia Inter-observador en investigación pediátrica: Coeficiente Kappa. Chill Pediatr 79(1): 54-58
- [60] LANDIS J.R., KOCH G.G. (1997) The measurement of the observer agreement for categorical data. Biometrics 33: 159-174
- [61] DAVIES C., POMA R., MARINO R., MORA MC., RAMOS F., RAJAL V., BASOM-BÍO MA. (2014) Detección de *Trypanosoma cruzi* en tejido y sangre murina por PCR convencional y en tiempo real. Acta Bioquím Clín Latinoam. 48(4): 421-428
- [62] MERCADO PÚBLICO Ficha Licitación ID: 813-58-LQ19, ADQUISICIÓN DE EQUIPOS PARA ISP, Instituto de Salud Pública, ISP. [en línea] < <https://www.mercadopublico.cl/Procurement/Modules/RFB/DetailsAcquisition.aspx?qs=jJtM81+eNTfg3to570zrVg==>> Última consulta: 14 de marzo 2021
- [63] MERCADO PÚBLICO Ficha Licitación ID: 2705-41-L119, ADQUISICIÓN DE BAÑO DIGITAL PARA UNIVERSIDAD DEL BÍO BÍO SEDE CHILLÁN, Universidad del Bío-Bío Campus Chillán. [en línea] < <https://www.mercadopublico.cl/Procurement/Modules/RFB/DetailsAcquisition.aspx?qs=Z7blJCCRmxCqQqN9O4/5iyvffTnnZo5ziOQHY5BGKy/6x5xXztaHiVAKzB3ypNs8>> Última consulta: 14 de marzo 2021

- [64] BESUSCHIO S. A., PICADO A., MUÑOZ A., WEHRENDT D. P., FERNÁNDEZ M., BENATAR A. (2020) *Trypanosoma cruzi* loop-mediated isothermal amplification (*Trypanosoma cruzi* Loopamp) kit for detection of congenital, acute and Chagas disease reactivation. PLoS Negl Trop Dis. 14(8)
- [65] BESUSCHIO S. A., LLANO M., BENATAR AF., MONNERAT S., CRUZ I., PICADO A. (2017) Analytical sensitivity and specificity of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) kit prototype for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in human blood samples. PLoS Negl Trop Dis. 11(7)
- [66] FLORES M. D., ABRAS A., BALLART C., IBÁÑEZ I., PÉREZ P., GALLEGO M., MUÑOZ C., MOURE Z., SULLEIRO E., NIETO J., GARCÍA E., CRUZ I., PICADO A. (2021) Evaluation of the performance of Loopamp *Trypanosoma cruzi* Detection Kit for the diagnosis of Chagas in a non-endemic area, Spain. J Clin Microbiol.
- [67] PERRY, R. Perry's Chemical Engineers', Octava Edición. EE.UU, McGraw-Hill, 2008.
- [68] MERCADO PÚBLICO Ficha Licitación ID: 813-17-LQ19, Reactivos Lab Bio Molec y Ent. (Parasi), Instituto de Salud Pública, Cotizaciones ISP. [en línea] < <https://www.mercadopublico.cl/Procurement/Modules/RFB/DetailsAcquisition.aspx?qs=DKlrvmpwQ9LnE3PQsubngQ==> > Última consulta: 14 de marzo 2021
- [69] MERCADO PÚBLICO Ficha Licitación ID: 813-15-LQ16, ADQUISICIÓN DE REACTIVOS DPTO. LAB. BIOMÉDICO, Instituto de Salud Pública, ISP. [en línea] < <https://www.mercadopublico.cl/Procurement/Modules/RFB/DetailsAcquisition.aspx?qs=c+QGANRwvn5CFED/dQmxSw==> > Última consulta: 14 de marzo 2021
- [70] MERCADO PÚBLICO Ficha Licitación ID: 813-14-LQ16, REACTIVOS SECCIÓN GENÉTICA MOLECULAR, Instituto de Salud Pública, Cotizaciones ISP. [en línea] < <https://www.mercadopublico.cl/Procurement/Modules/RFB/DetailsAcquisition.aspx?qs=VKTzPcknxTiYAkNOP0pYjw==> > Última consulta: 14 de marzo 2021
- [71] SIGMA-ALDRICH Hydroxy naphthol blue disodium salt [en línea] < [https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/219916?lang=es&region=CL&cm\\_sp=Insite-\\_-caSrpResults\\_srpRecs\\_srpModel\\_azul%20de%20hidroxinaftol-\\_-srpRecs3-1](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/219916?lang=es&region=CL&cm_sp=Insite-_-caSrpResults_srpRecs_srpModel_azul%20de%20hidroxinaftol-_-srpRecs3-1) > Última consulta: 14 de marzo 2021

# Anexo A

## Marco Teórico

### A.1. Unidades Discretas de Tipificación

Tabla A.1: Cepa con su DTU correspondiente y el hospedero/vector del que se aisló [18].

Cepa	DTUs	País	Hospedero/vector
12 SF	TcII	Bahia, Brasil	<i>Homo sapiens</i>
21 SF	TcII	Bahia, Brasil	<i>Homo sapiens</i>
3663	TcIII	Amazonas, Brasil	<i>Panstrongylus geniculatus</i>
3869	TcIII	Amazonas, Brasil	<i>Homo sapiens</i>
4167	TcIV	Amazonas, Brasil	<i>Rhodnius brethesi</i>
4182	TcIII	Amazonas, Brasil	<i>Rhodnius brethesi</i>
92.80 cl2	TcV	Santa Cruz, Bolivia	<i>Homo sapiens</i>
92101601P cl1	TcI	Georgia, USA	<i>Didelphis marsupialis</i>
92199102R	TcIV	Georgia, USA	<i>Procyon lotor</i>
Bug2148 cl1	TcV	Brasil	<i>Triatoma infestans</i>
Bug2149 cl10	TcV	Brasil	<i>Triatoma infestans</i>
CA-1 cl10	TcI	Argentina	<i>Homo sapiens</i>
CanIII cl1	TcIV	Pará, Brasil	<i>Homo sapiens</i>
CL	TcVI	Brasil	<i>Triatoma infestans</i>
CL Brener	TcVI	Brasil	<i>Triatoma infestans</i>
CM17	TcIII	Meta, Colombia	<i>Dasytus sp.</i>
Colombiana	TcI	Colombia	<i>Homo sapiens</i>
Cuica cl1	TcI	Brasil	<i>Philander opossum</i>
Cutia cl1	TcI	Brasil	<i>Dasyprocta aguti</i>
Davis 9.90	TcI	Honduras	<i>Triatoma dimidiata</i>
Dm28cc	TcI	Venezuela	<i>Didelphis marsupialis</i>
Dm7	TcI	Colombia	<i>Didelphis marsupialis</i>
Dog Theisd	TcIV	Oklahoma, USA	<i>Canis familiaris</i>
Esmeraldo cl3	TcII	Bahia, Brasil	<i>Homo sapiens</i>
G	TcI	Amazonas, Brasil	<i>Didelphis sp.</i>
Gambá cl1	TcI	Brasil	<i>Didelphis azarae</i>

Cepa	DTUs	País	Hospedero/vector
IVV cl4	TcII	Chile	<i>Homo sapiens</i>
JEM C	TcI	Colombia	<i>Homo sapiens</i>
José	TcI	Basil	<i>Homo sapiens</i>
K-98	TcI	Argentina	<i>Homo sapiens</i>
M5631 cl5	TcIII	Brasil	<i>Dasypus novemcinctus</i>
M6241 cl6	TcIII	Brasil	<i>Homo sapiens</i>
MAS cl1	TcII	Brasil	<i>Homo sapiens</i>
MN cl2	TcV	Chile	<i>Homo sapiens</i>
NR cl3	TcV	Chile	<i>Homo sapiens</i>
P63 cl1	TcVI	Paraguay	<i>Triatoma infestans</i>
PALC	TcI	Colombia	<i>Rhodnius prolixus</i>
Peruvian	TcII	Perú	<i>Homo sapiens</i>
RA	TcVI	Argentina	<i>Homo sapiens</i>
Sc43 cl1	TcV	Bolivia	<i>Triatoma infestans</i>
SO3 cl5	TcV	Bolivia	<i>Triatoma infestans</i>
Sylvio X10 cl1	TcI	Brasil	<i>Homo sapiens</i>
Td11C	TcI	Colombia	<i>Triatoma dimidiata</i>
Tu18 cl1	TcII	Bolivia	<i>Triatoma infestans</i>
Tulahuen	TcVI	Chile	<i>Homo sapiens</i>
Tulahuen cl2	TcVI	Chile	<i>Homo sapiens</i>
X10/1	TcI	Brasil	<i>Homo sapiens</i>
X109/2	TcIII	Paraguay	<i>Canis familiaris</i>
Y	TcII	Brasil	<i>Homo sapiens</i>
YuYu	TcI	Brasil	<i>Triatoma infestans</i>

A.2. Algoritmo de detección de infección por *Trypanosoma cruzi* en el recién nacido, hijo de madre con enfermedad de Chagas.

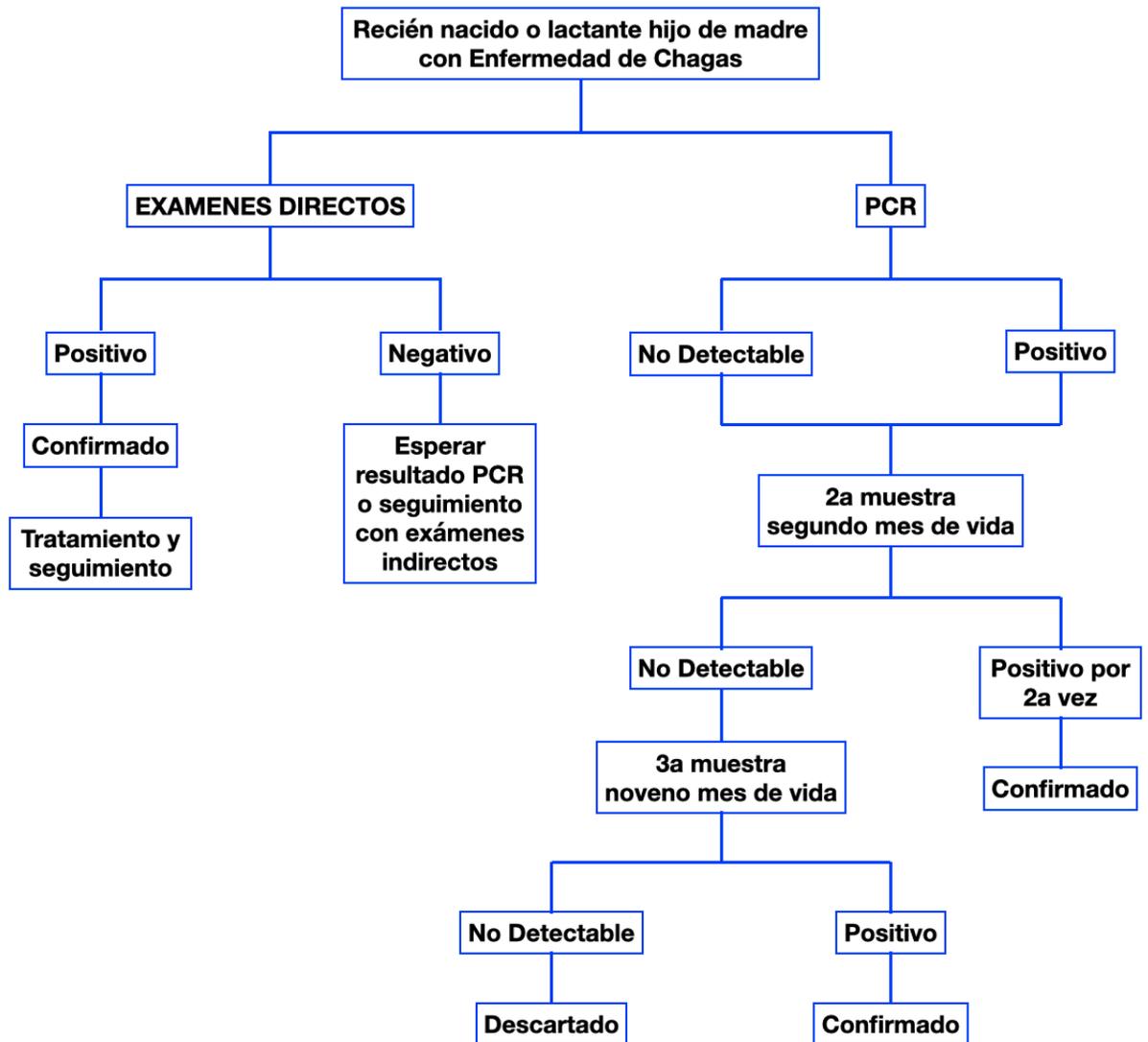


Figura A.1: Algoritmo de diagnóstico enfermedad de chagas, recién nacido de madre infectada [30].

# Anexo B

## Metodología

### B.1. Cálculo para la preparación de solución madre de cada partidador

Se tienen dos grupos de partidadores, los sintetizados a partir de bibliografía y los diseñados. Cada uno viene en una concentración como se indica en las tablas B.1 y B.2.

Tabla B.1: Concentración partidadores obtenidos por bibliografía [48].

Partidor	Concentración
FIP	66,9 nmol
BIP	57,9 nmol
F3	150,9 nmol
B3	136,1 nmol

Tabla B.2: Concentración partidadores diseñados en el programa PrimerExplorer [36].

Partidor	Concentración
FIP	72,5 nmol
BIP	95,3 nmol
F3	152,7 nmol
B3	171,5 nmol

Cada partidador se reconstituye a una concentración de 200  $\mu\text{M}$ . El volumen se calcula como:

$$V = \frac{C \cdot 10^{-9} \text{ [mol]}}{200 \cdot 10^{-6} \text{ [\frac{mol}{L}]}} \quad (\text{B.1})$$

Donde C es la concentración de cada partidador. Por ejemplo, para el partidador FIP, tabla B.1:

$$V = \frac{66,9 \cdot 10^{-9} \text{ [mol]}}{200 \cdot 10^{-6} \text{ [\frac{mol}{L}]}} \quad (\text{B.2})$$

$$V = 334,5 \mu\text{L} \quad (\text{B.3})$$

Para los otros partidores el cálculo es análogo, en las siguientes tablas se muestra el volumen de la solución stock para cada uno.

Tabla B.3: Volumen de reconstitución para la preparación de solución madre, 200  $\mu\text{M}$ ; partidores obtenidos por bibliografía [48].

Partidor	Volumen
FIP	334,5 $\mu\text{L}$
BIP	289,5 $\mu\text{L}$
F3	754,5 $\mu\text{L}$
B3	680,5 $\mu\text{L}$

Tabla B.4: Volumen de reconstitución para la preparación de solución madre, 200  $\mu\text{M}$ ; partidores diseñados [36].

Partidor	Volumen
FIP	362,5 $\mu\text{L}$
BIP	476,5 $\mu\text{L}$
F3	763,5 $\mu\text{L}$
B3	857,5 $\mu\text{L}$

## B.2. Cálculo para la preparación de la solución de trabajo y mezcla de partidores (Primer MIX)

De acuerdo descrito en la bibliografía la solución mezcla (Primer MIX), contiene cada uno de los partidores en la cantidad indicada en la tabla 2.3. La reacción de LAMP se suplementa con 1  $\mu\text{L}$  de la solución mezcla de partidores, utilizando esta información se calcula la concentración molar de cada uno. Por ejemplo, para el partidor FIP:

$$C = \frac{40 \cdot 10^{-12} [\text{mol}]}{1 \cdot 10^{-6} [\text{L}]} \quad (\text{B.4})$$

$$C = 40 \mu\text{M} \quad (\text{B.5})$$

Se prepara una solución de trabajo para cada partidor de volumen final 200  $\mu\text{L}$ , que este 4 veces concentrada, como se muestra en la tabla B.5.

Tabla B.5: Concentración solución de trabajo de cada partidor

Partidor	Concentración
FIP	160 $\mu\text{M}$
BIP	160 $\mu\text{M}$
F3	20 $\mu\text{M}$
B3	20 $\mu\text{M}$

Para preparar el Primer MIX se mezclan 50  $\mu\text{L}$  de cada solución de trabajo, obteniendo así la concentración requerida, como se muestra en la Tabla 2.3. El volumen necesario de cada

solución stock, se calcula utilizando la siguiente relación:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2 \quad (\text{B.6})$$

Donde C es concentración y V es volumen de solución, respectivamente.

Por ejemplo, el partidor FIP, está en una concentración de 200  $\mu\text{M}$ , y se quiere preparar 200  $\mu\text{L}$  de una solución con una concentración de 160  $\mu\text{M}$ , sustituyendo los valores de la ecuación B.6:

$$200 [\mu\text{M}] \cdot V_1 = 160 [\mu\text{M}] \cdot 200 [\mu\text{L}] \quad (\text{B.7})$$

Se obtiene que el volumen necesario de solución stock es:

$$V_1 = 160 \mu\text{L} \quad (\text{B.8})$$

Por lo tanto, la solución de trabajo contiene 160  $\mu\text{L}$  de solución de stock y 40  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas. En la tabla B.6 se muestran las cantidad de solución de stock y agua necesaria para preparar 200  $\mu\text{L}$  de la solución de trabajo de cada partidor.

Tabla B.6: Concentración solución de trabajo

Partidor	Volumen Solución Stock	Volumen de Agua
FIP	160 $\mu\text{L}$	40 $\mu\text{L}$
BIP	160 $\mu\text{L}$	40 $\mu\text{L}$
F3	20 $\mu\text{L}$	180 $\mu\text{L}$
B3	20 $\mu\text{L}$	180 $\mu\text{L}$

Por lo tanto, el Primer MIX se compone de:

Tabla B.7: Composición Primer MIX

Partidor	Volumen Solución Trabajo
FIP	50 $\mu\text{L}$
BIP	50 $\mu\text{L}$
F3	50 $\mu\text{L}$
B3	50 $\mu\text{L}$

### B.3. Cálculo de molaridad de reactivos del tampón con colorímetro

Para el tampón se pesan los reactivos presentados en la tabla B.8 y se disuelven en 1 mL de agua. Luego se calcula la concentración de cada solución mediante el peso molecular de cada compuesto, tabla B.9.

Tabla B.8: Masa de reactivos tampón con colorímetro

Reactivo	Masa
$[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$	13,4 mg
KCl	15 mg
KOH	43,3 mg
Rojo fenol	2,2 mg

Tabla B.9: Peso Molecular de reactivos [67]

Reactivo	Peso Molecular
$[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$	132,14 $\left[\frac{\text{gr}}{\text{mol}}\right]$
KCl	74,55 $\left[\frac{\text{gr}}{\text{mol}}\right]$
KOH	56,11 $\left[\frac{\text{gr}}{\text{mol}}\right]$
Rojo fenol	354,4 $\left[\frac{\text{gr}}{\text{mol}}\right]$

Primero se calcula la cantidad de sustancia relacionando la masa del compuesto con su masa molar, mediante la siguiente ecuación:

$$\text{moles} = \frac{\text{masa} [\text{gr}]}{\text{PM} \left[\frac{\text{gr}}{\text{mol}}\right]} \quad (\text{B.9})$$

Luego esto se divide por el volumen de disolución, obteniendo la concentración molar.

$$\text{Molaridad} [\text{M}] = \frac{\text{moles}}{\text{V} [\text{L}]} \quad (\text{B.10})$$

Por ejemplo, para el cloruro de potasio:

$$\text{Moles KCl} = \frac{15 \cdot 10^{-3} [\text{gr}]}{74,55 \left[\frac{\text{gr}}{\text{mol}}\right]} \quad (\text{B.11})$$

$$\text{Moles KCl} = 0,201 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \quad (\text{B.12})$$

$$[\text{KCl}] = \frac{0,201 \cdot 10^{-3} [\text{mol}]}{1 \cdot 10^{-3} [\text{L}]} \quad (\text{B.13})$$

$$[\text{KCl}] = 200 \text{ mM} \quad (\text{B.14})$$

En la tabla B.10 se muestra la concentración de cada uno de los reactivos.

Tabla B.10: Concentración de reactivos tampón con colorímetro

Reactivo	Peso Molecular
$[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$	100 mM
KCl	200 mM
KOH	770 mM
Rojo fenol	2,5 mM

# Anexo C

## Resultados

### C.1. Gen representante de cada DTU

Tabla C.1: Gen, Unidad Discreta de Tipificación correspondiente [18].

Cepa rARN 18S	DTUs	Código	Tamaño gen
CA-1	TcI	AF245381	2.246 pb
Esmeraldo cl3	TcII	AY785564	2.260 pb
M6241 cl6	TcIII	AY785578	2.250 pb
MT4167	TcIV	AF288661	2.221 pb
SO3 cl5	TcV	AY785579	2.250 pb
CLBR	TcVI	AF245383	2.240 pb

### C.2. Secuencia de partidores diseñados

Tabla C.2: Secuencia de partidores, Grupo 1

Tamaño blanco	Gen	Secuencia
222 pb	FIP	5'-CGTGAGTTGAGGGAAGGCATGAGTTGTTGGCAGACTTCGGT -3'
	BIP	5'-GTTTCGGGGGAGAACGTACTGGTGAAGAATGCCTTCGCTGT -3'
	F3	5'-CCGTGTGGCACTGTTTGT-3'
	B3	5'-CCCCACACTTTGGTTCTTGA-3'

Tabla C.3: Secuencia de partidores, Grupo 2

Tamaño blanco	Gen	Secuencia
224 pb	FIP	5'-GCGAGACGAGGAACGGGATGAGGGGAGTTTTTGGTCGTAGG -3'
	BIP	5'-CTCGTTTTTTTACGGCGAGGGCGCTTTCGCGTGAAGAAGTCA -3'
	F3	5'-GCAAACGATGACACCCATGA-3'
	B3	5'-CCCCCTGAGACTGTAACCTC-3'

Tabla C.4: Secuencia de partidores, Grupo 3

Tamaño blanco	Gen	Secuencia
242 pb	FIP	5'-CGCGGAAGGGATTGCTATCCTTTCCGTCAACGGACGAGA -3'
	BIP	5'-CCTTCTCTGCGGGATTCCCTTGTATTGAGGAGCATCACAGACC -3'
	F3	5'-GCTTTTGGTCCGGTGGAGTG-3'
	B3	5'-ATTGTAGTGCGCGTGTTCG-3'

Tabla C.5: Secuencia de partidores, Grupo 4

Tamaño blanco	Gen	Secuencia
212 pb	FIP	5'-CCGGCTTTCGCACGGAATGAAATGCCTTCACCGGCAGTA -3'
	BIP	5'-TACCCGGCGTCTTTTGACGAACCATGGCAGTCCACTACACG -3'
	F3	5'-GGACGTCCAGCGAATGAATG-3'
	B3	5'-TCGAACCCTAATCCCCCG-3'

Tabla C.6: Secuencia de partidores, Grupo 5

Tamaño blanco	Gen	Secuencia
228 pb	FIP	5'-CCACGTCTTGTGGTGCCATTTCCTACAGTCTCAGGGGGGAGTA-3'
	BIP	5'-CGGGGAACTTTACCAGATCCGGACCATTTCAGGGGATCGAGAA-3'
	F3	5'-ACTTCTTCACGCGAAAGCT-3'
	B3	5'-CTCCACCGACCAAAGCG-3'

## C.3. Análisis de partidores diseñados

### C.3.1. Identificación secuencia a amplificar, alineamiento manual

Grupo 1:

Tabla C.7: Secuencia a amplificar, partidores Grupo 1

Secuencia blanco	
1050 5'-	
GCCTTTGTGGGAAAT	F3
<u>CCGTGTGGCACTGTTTGT</u>	F2
<u>GTTGTTGGCAGACTTCGGT</u>	
CTTACCCTTCGCATCTCA	
F1c	B1c
CATGTGTCATGCCTTCCCTCAACTCACG	
GCATCCAGGAATGAAGGAGGGTAGTT	B2
CGGGGGAGAACGTACT	
GGTGCGTCAGAGGTGAAATTCTTAGACCGCACCAAGACGAACT	B3
<u>ACAGCGAAGGCATTCTTCA</u>	
AGGATACC	
TTCCTCAATCAAGAACCAAAAGTGTGGG	
GATCGAAGATGATTAGAGACCATTGTAGTCCACACTGCAAACG	
	-3' -1330
Partidores:	
FIP: 5'- CGTGAGTTGAGGGAAGGCATGA- <u>GTTGTTGGCAGACTTCGGT</u> -3'	
BIP: 5'- GTTCGGGGGAGAACGTACTGG-TGAAGAATGCCTTCGCTGT -3'	
F3: 5'- CCGTGTGGCACTGTTTGT -3'	
B3: 5'- CCCACACTTTGGTTCTTGA -3'	

Grupo 2:

Tabla C.8: Secuencia a amplificar, partidores Grupo 2

Secuencia blanco	
1260 5'-	
TTCCTCAATCAAGAACCAAAAGTGTGGGGATCGAAGATGATTAGAGACCATTGTAGTCCACACT	
<u>GCAAACG</u>	F1c
F3	F2
<u>ATGACACCCATGAATTGGGGAGTTTTTGGTTCGTAGG</u>	
CGTGGTCGGGTTTGATTATTTTTTTTCATCCCGT	
	B1c
<u>TCCTCGTCTCGCCAATGAATATTTAAATTTACGTGCATATTTCTTTTTGGTCC</u>	
<u>CTCGTTTTTTTACGGCGAG</u>	B2
	B3
GGCCTTTAACGGGAATATCCTCAGCACGTTATCTGACTTCTTCACGCGAAAGCTTTGAGGTTACAGTCTC	
<u>AGGGGGGAGTACGTTTCGCAAGAGTGAACTTAAAGAAATTGACGGAATGGCACCACAAGACGTGGAGCGT</u>	
	-3' -1540
Partidores:	
FIP: 5'- GCGAGACGAGGAACGGGATGA-GGGGAGTTTTTGGTTCGTAGG -3'	
BIP: 5'- CTCGTTTTTTTACGGCGAGGGC-GCTTTCGCGTGAAGAAGTCA 3'	
F3: 5'- GCAAACGATGACACCCATGA-3'	
B3: 5'- CCCCTGAGACTGTAACCTC -3'	

### Grupo 3:

Tabla C.9: Secuencia a amplificar, partidores Grupo 3

Secuencia blanco

1680- 5'-

TTCTTTCTCGATCCCCTGAATGGTGGTGCATGGCCGCTTTTGGTTCGGTGGAGTGATTTGTTTGGTTGATT  
F2 F3 F1c  
CCGTCAACGGACGAGATCCAAGCTGCCAGTAGGATTCAGAATTGCCCATAGGATAGCAATCCCTTCCGC  
B1c  
GGGTTTTACCCAAGGGGGGGCGGTATTGCTTTGTATCCTTCTCTGCGGGATTCTTGTTTTTGCGCAAGGT  
B2 B3  
GAGATTTTGGGCAACAGCAGGGTCTGTGATGCTCCTCAATGTTCTGGGCGACACGCGCACTACAATGTCAG  
-3' -1960

Partidores:

FIP:5'- CGCGGAAGGGATTGCTATCCT-TTCCGTCAACGGACGAGA -3'

BIP: 5'- CCTTCTCTGCGGGATTCTTGT-ATTGAGGAGCATCACAGACC -3'

F3: 5'- GCTTTTGGTTCGGTGGAGTG -3'

B3: 5'- ATTGTAGTGC GCGTGTGCG -3'

### Grupo 4:

Tabla C.10: Secuencia a amplificar, partidores Grupo 4

Secuencia blanco

140- 5'-

CGCCAAGCTAATACATGAACCAACCGGATGTTCTCTGTTCCGGCGGCAGGGCAACACCTGCTGCCATGGG  
F3 F2  
ACGTCCAGCGAATGAATGAAAGTAAAACCAATGCCTTACCGGCAGTAACACTCAGAAGTGTGATTCAA  
F1c B1c  
TTCATTCCGTGCGAAAGCCGGTTTTTTTACCCGGCGTCTTTTGACGAACAACCTGCCCTATCAGCCAGCGA  
B2 B3  
TGGCCGTGTAGTGGACTGCCATGGCGTTGACGGGAGCGGGGGATTAGGGTTTCGATTCCGGAGAGGGAGCC  
-3' -420

Partidores:

FIP:5'- CCGGCTTTCGCACGGAATGAA-ATGCCTTACCGGCAGTA -3'

BIP: 5'- TACCCGGCGTCTTTTGACGAAC-CATGGCAGTCCACTACAGC-3'

F3: 5'- GGACGTCCAGCGAATGAATG -3'

B3: 5'- TCGAACCCCTAATCCCCCG -3'

### Grupo 5:

Tabla C.11: Secuencia a amplificar, partidores Grupo 5

Secuencia blanco

1470- 5'-

GGCCTTTAACGGGAATATCCTCAGCACGTTATCTGACTTCTTCACGCGAAAGCTTTGAGGTTACAGTCTC  
F2 F3 F1c  
AGGGGGGAGTACGTTTCGCAAGAGTGAAACTTAAAGAAATTGACGGAATGGCACCACAAGACGTGGAGCGT  
B1c  
GCGGTTTAATTTGACTCAACCGGGGAACTTTACCAGATCCGGACAGGGTGAGGATTGACAGATTGAGTG  
B2 B3  
TTCTTTCTCGATCCCCTGAATGGTGGTGCATGGCCGCTTTTGGTTCGGTGGAGTGATTTGTTTGGTTGATT  
-3' -1750

Partidores:

FIP:5'- CCACGTCTTGTGGTGCCATTCC-TACAGTCTCAGGGGGGAGTA -3'

BIP: 5'- CGGGGAACCTTTACCAGATCCGG-ACCATTGAGGGGATCGAGAA -3'

F3: 5'- ACTTCTTCACGCGAAAGCT -3'

B3: 5'- CTCCACCGACCAAAAAGCG -3'

### C.3.2. Alineamiento de secuencias del gen rARN 18S, de diferente DTU y secuencia amplificada por cada grupo de partidores

Tabla C.12: Alineamiento secuencia blanco de partidores publicados por Thekiso, 2010 [48], con secuencias del gen rARN 18S, TeI-TcVI.

	5'	
TeI	—TTGGATGTTGTGTCTTGTGTGTGGCACTCGTCGCCTTTGTGGGAAATCCGTGTGGCAC	1073
TeII	TTTGGGACGTGTTTGTATGTGTGTGGCACTCGTCGCCTTTGTGGGAAATCCGTGTGGCAC	1078
TeIII	——TGGACGTGTTGTTGTTGTGTGTGGCACTCGTCGCCTTTGTGGGAAATCCGTGTGGCAC	1068
TeIV	————GGACGTGTTGTGTGGCACTCGTCGCCTTTGTGGGAAATCCGTGTGGCAC	1055
TeV	——TGGACGTGTTGTTGTTGTGTGTGGCACTCGTCGCCTTTGTGGGAAATCCGTGTGGCAC	1067
TeVI	TTTGGGACGTGTTTGTATGTGTGTGGCACTCGTCGCCTTTGTGGGAAATCCGTGTGGCAC	1077
blanco	————— CCGTGTGGCAC	11
	*****	
TeI	TTGTTTGGTGTGTTGTTGGCAGACTTCGGTCTTGCCTTCACACACGTTTCACATGTGTCATG	1133
TeII	TGTTTGTG—TTGTTGGCAGACTTCGGTCTTACCC——TTCGCATCTCACATGTGTCATG	1133
TeIII	TGTTTGTGTGTTGTTGGCAGACTTCGGTCTTGCCTC—CGCATATTTTCACATGTGTCATG	1127
TeIV	TGTTTGTG—TGTTGTTGGCAGACTTCGGTCTTGCCTT—CGCAT-ATTTTCACATGTGTCATG	1111
TeV	TGTTTGTGTGTTGTTGGCAGACTTCGGTCTTGCCTC—CGCATATTTTCACATGTGTCATG	1126
TeVI	TGTTTGTG—TTGTTGGCAGACTTCGGTCTTACCC——TTCGCATCTCACATGTGTCATG	1132
blanco	TGTTTGTG—TTGTTGGCAGACTTCGGTCTTACCC——TTCGCATCTCACATGTGTCATG	66
	* ** ***** ** * *****	
TeI	CCTTCCCTCAACTCACGGCATCCAGGAATGAAGGAGGGTAGTTCGGGGGAGAACGTACTG	1193
TeII	CCTTCCCTCAACTCACGGCATCCAGGAATGAAGGAGGGTAGTTCGGGGGAGAACGTACTG	1193
TeIII	CCTTCCCTCAACTCACGGCATCCAGGAATGAAGGAGGGTAGTTCGGGGGAGAACGTACTG	1187
TeIV	CCTTCCCTCAACTCACGGCATCCAGGAATGAAGGAGGGTAGTTCGGGGGAGAACGTACTG	1171
TeV	CCTTCCCTCAACTCACGGCATCCAGGAATGAAGGAGGGTAGTTCGGGGGAGAACGTACTG	1186
TeVI	CCTTCCCTCAACTCACGGCATCCAGGAATGAAGGAGGGTAGTTCGGGGGAGAACGTACTG	1192
blanco	CCTTCCCTCAACTCACGGCATCCAGGAATGAAGGAGGGTAGTTCGGGGGAGAACGTACTG	126
	*****	
TeI	GTGCGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGACCGCACCAAGACGAACTACAGCGAAGGCATTCTTCA	1254
TeII	GTGCGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGACCGCACCAAGACGAACTACAGCGAAGGCATTCTTCA	1254
TeIII	GTGCGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGACCGCACCAAGACGAACTACAGCGAAGGCATTCTTCA	1248
TeIV	GTGCGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGACCGCACCAAGACGAACTACAGCGAAGGCATTCTTCA	1232
TeV	GTGCGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGACCGCACCAAGACGAACTACAGCGAAGGCATTCTTCA	1247
TeVI	GTGCGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGACCGCACCAAGACGAACTACAGCGAAGGCATTCTTCA	1253
blanco	GTGCGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGACCGCACCAAGACGAACTACAGCGAAGGCATTCTTCA	187
	*****	

-3'

Grupo 1:

Tabla C.13: Alineamiento secuencia blanco de partidores diseñados, Grupo 1, con secuencias del gen rARN 18S, TeI-TeVI

	5'	
TeI	—TTGGATGTTGTGTCCTTGTGTGTGGCACTCGTCGCCTTTGTGGGAAATCCGTGTGGCAC	1073
TeII	TTTGGGACGTGTTTGTATGTGTGTGGCACTCGTCGCCTTTGTGGGAAATCCGTGTGGCAC	1078
TeIII	——TGGACGTGTTGTGTGTGGCACTCGTCGCCTTTGTGGGAAATCCGTGTGGCAC	1068
TeIV	—————GGACGTGTTGTGTGGCACTCGTCGCCTTTGTGGGAAATCCGTGTGGCAC	1055
TeV	——TGGACGTGTTGTGTGTGGCACTCGTCGCCTTTGTGGGAAATCCGTGTGGCAC	1067
TeVI	TTTGGGACGTGTTTGTATGTGTGTGGCACTCGTCGCCTTTGTGGGAAATCCGTGTGGCAC	1077
blanco	—————CCGTGTGGCAC	11
	*****	
TeI	TTGTTTGGTGTGTTGTTGGCAGACTTCGGTCTTGCCTTCACACACGTTTCACATGTGTCATG	1133
TeII	TGTTTGTG — TTGTTGGCAGACTTCGGTCTTACCC—— TTCGCATCTCACATGTGTCATG	1133
TeIII	TGTTTGTGTGTTGTTGGCAGACTTCGGTCTTGCCTC—CGCATATTTTCACATGTGTCATG	1127
TeIV	TGTTTGTG — TGTTGTTGGCAGACTTCGGTCTTGCCTT— CGCAT—ATTTTCACATGTGTCATG	1111
TeV	TGTTTGTGTGTTGTTGGCAGACTTCGGTCTTGCCTC—CGCATATTTTCACATGTGTCATG	1126
TeVI	TGTTTGTG — TTGTTGGCAGACTTCGGTCTTACCC—— TTCGCATCTCACATGTGTCATG	1132
blanco	TGTTTGTG— TTGTTGGCAGACTTCGGTCTTACCC—— TTCGCATCTCACATGTGTCATG	66
	* ** ***** ** * *****	
TeI	CCTTCCCTCAACTCACGGCATCCAGGAATGAAGGAGGGTAGTTCCGGGGGAGAACGTA	1193
TeII	CCTTCCCTCAACTCACGGCATCCAGGAATGAAGGAGGGTAGTTCCGGGGGAGAACGTA	1193
TeIII	CCTTCCCTCAACTCACGGCATCCAGGAATGAAGGAGGGTAGTTCCGGGGGAGAACGTA	1187
TeIV	CCTTCCCTCAACTCACGGCATCCAGGAATGAAGGAGGGTAGTTCCGGGGGAGAACGTA	1171
TeV	CCTTCCCTCAACTCACGGCATCCAGGAATGAAGGAGGGTAGTTCCGGGGGAGAACGTA	1186
TeVI	CCTTCCCTCAACTCACGGCATCCAGGAATGAAGGAGGGTAGTTCCGGGGGAGAACGTA	1192
blanco	CCTTCCCTCAACTCACGGCATCCAGGAATGAAGGAGGGTAGTTCCGGGGGAGAACGTA	126
	*****	
TeI	GTGCGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGACCGCACCAAGACGAACTACAGCGAAGGCATTCTTC	1253
TeII	GTGCGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGACCGCACCAAGACGAACTACAGCGAAGGCATTCTTC	1253
TeIII	GTGCGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGACCGCACCAAGACGAACTACAGCGAAGGCATTCTTC	1247
TeIV	GTGCGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGACCGCACCAAGACGAACTACAGCGAAGGCATTCTTC	1231
TeV	GTGCGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGACCGCACCAAGACGAACTACAGCGAAGGCATTCTTC	1246
TeVI	GTGCGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGACCGCACCAAGACGAACTACAGCGAAGGCATTCTTC	1252
blanco	GTGCGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGACCGCACCAAGACGAACTACAGCGAAGGCATTCTTC	186
	*****	
TeI	AAGGATACCTTCCTCAATCAAGAACCAAAGTGTGGGGATCGAAGATGATTAGAGACCATT	1313
TeII	AAGGATACCTTCCTCAATCAAGAACCAAAGTGTGGGGATCGAAGATGATTAGAGACCATT	1313
TeIII	AAGGATACCTTCCTCAATCAAGAACCAAAGTGTGGGGATCGAAGATGATTAGAGACCATT	1307
TeIV	AAGGATACCTTCCTCAATCAAGAACCAAAGTGTGGGGATCGAAGATGATTAGAGACCATT	1291
TeV	AAGGATACCTTCCTCAATCAAGAACCAAAGTGTGGGGATCGAAGATGATTAGAGACCATT	1306
TeVI	AAGGATACCTTCCTCAATCAAGAACCAAAGTGTGGGGATCGAAGATGATTAGAGACCATT	1312
blanco	AAGGATACCTTCCTCAATCAAGAACCAAAGTGTGGG———	222
	*****	

Grupo 2:

Tabla C.14: Alineamiento secuencia blanco de partidores diseñados, Grupo 2, con secuencias del gen rARN 18S, TeI-TeVI

	5'	
TeI	AAGGATACCTTCCTCAATCAAGAACCAAAGTGTGGGGATCGAAGATGATTAGAGACCATT	1313
TeII	AAGGATACCTTCCTCAATCAAGAACCAAAGTGTGGGGATCGAAGATGATTAGAGACCATT	1313
TeIII	AAGGATACCTTCCTCAATCAAGAACCAAAGTGTGGGGATCGAAGATGATTAGAGACCATT	1307
TeIV	AAGGATACCTTCCTCAATCAAGAACCAAAGTGTGGGGATCGAAGATGATTAGAGACCATT	1291
TeV	AAGGATACCTTCCTCAATCAAGAACCAAAGTGTGGGGATCGAAGATGATTAGAGACCATT	1306
TeVI	AAGGATACCTTCCTCAATCAAGAACCAAAGTGTGGGGATCGAAGATGATTAGAGACCATT	1312
blanco	—————TTCCTCAATCAAGAACCAAAGTGTGGGGATCGAAGATGATTAGAGACCATT *****	51
TeI	GTAGTCCACACTGCAAACGATGACACCCATGAATTGGGGAGTTTTTGGTTCGTAGGCGTGG	1373
TeII	GTAGTCCACACTGCAAACGATGACACCCATGAATTGGGGAGTTTTTGGTTCGTAGGCGTGG	1373
TeIII	GTAGTCCACACTGCAAACGATGACACCCATGAATTGGGGAGT-TTTGGTTCGTAGGCGTGG	1366
TeIV	GTAGTCCACACTGCAAACGATGACACCCATGAATTGGGGAGTTTTTGGTTCGTAGGCGTGG	1351
TeV	GTAGTCCACACTGCAAACGATGACACCCATGAATTGGGGAGTTTTTGGTTCGTAGGCGTGG	1366
TeVI	GTAGTCCACACTGCAAACGATGACACCCATGAATTGGGGAGTTTTTGGTTCGTAGGCGTGG	1372
blanco	GTAGTCCACACTGCAAACGATGACACCCATGAATTGGGGAGTTTTTGGTTCGTAGGCGTGG *****	111
TeI	TCGGGCTTGATTATATTTATTTTCATCCCGTTCCTCGTCTCGCCAATGAATATATTAAT	1433
TeII	TCGGGTTTGATTATTTT-TTTTCATCCCGTTCCTCGTCTCGCCAATGAATATTAAT— AAT	1430
TeIII	TCGGGCTTGATTATAT-TTTTCATCCCGTTCCTCGTCTCGCCAATGAATATTAAT—AT	1422
TeIV	TCGGGCTTGATTATAT-TTTTCATCCCGTTCCTCGTCTCGCCAATGAATATTAAT—AT	1407
TeV	TCGGGCTTGATTATAT-TTTTCATCCCGTTCCTCGTCTCGCCAATGAATATTAAT—AT	1422
TeVI	TCGGGTTTGATTATTTT-TTTTCATCCCGTTCCTCGTCTCGCCAATGAATATTAAT—AAT	1429
blanco	TCGGGTTTGATTATTTT-TTTTCATCCCGTTCCTCGTCTCGCCAATGAATATTAAT—AAT ***** * ***** *	168
TeI	TTACGTGCATATTCTTTTTGGTCTTCGTTTTTTTTTACGGCGAGGGACCTTTAACGGGAAT	1493
TeII	TTACGTGCATATTCTTTTTGGTCTTC—GTTTTTTTTACGGCGAGGGCCTTTAACGGGAAT	1488
TeIII	TTACGTGCATATTCTTTTTGGTCTTC—GTTT— TTACGGCGAGGGCCTTTAACGGGAAT	1478
TeIV	TTACGTGCATATTCTTTTTGGTCTTC—GTTTTTTTTACGGCGAGGGCCTTTAACGGGAAT	1465
TeV	TTACGTGCATATTCTTTTTGGTCTTC—GTTT— TTACGGCGAGGGCCTTTAACGGGAAT	1478
TeVI	TTACGTGCATATTCTTTTTGGTCTTC—GTTTTTTTTACGACGAGGGCCTTTAACGGGAAT	1487
blanco	TTACGTGCATATTCTTTTTGGTCTTC—GTTTTTTTTACGGCGAGGGCCTTTAACGGGAAT ***** ** ** ***** ***** *****	226
TeI	ATCCTCAGCACGTTATCTGACTTCTTCACGCGAAAGCTTTGAGGTTACAGTCTCAGGGGG	1553
TeII	ATCCTCAGCACGTTATCTGACTTCTTCACGCGAAAGCTTTGAGGTTACAGTCTCAGGGGG	1548
TeIII	ATCCTCAGCACGTTATCTGACTTCTTCACGCGAAAGCTTTGAGGTTACAGTCTCAGGGGG	1538
TeIV	ATCCTCAGCACGTTATCTGACTTCTTCACGCGAAAGCTTTGAGGTTACAGTCTCAGGGGG	1525
TeV	ATCCTCAGCACGTTATCTGACTTCTTCACGCGAAAGCTTTGAGGTTACAGTCTCAGGGGG	1538
TeVI	ATCCTCAGCACGTTATCTGACTTCTTCACGCGAAAGCTTTGAGGTTACAGTCTCAGGGGG	1547
blanco	ATCCTCAGCACGTTATCTGACTTCTTCACGCGAAAGCTTTGAGGTTACAGTCTCAGGGGG *****_3'	286

Grupo 3:

Tabla C.15: Alineamiento secuencia blanco de partidores diseñados, Grupo 3, con secuencias del gen rARN 18S, TeI-TeVI

	5'	
TeI	TGACAGATTGAGTGTTCTTTCTCGATCCCCCTGAATGGTGGTGCATGGCCGCTTTTGGTCCG	1733
TeII	TGACAGATTGAGTGTTCTTTCTCGATCCCCCTGAATGGTGGTGCATGGCCGCTTTTGGTCCG	1728
TeIII	TGACAGATTGAGTGTTCTTTCTCGATCCCCCTGAATGGTGGTGCATGGCCGCTTTTGGTCCG	1718
TeIV	TGACAGATTGAGTGTTCTTTCTCGATCCCCCTGAATGGTGGTGCATGGCCGCTTTTGGTCCG	1705
TeV	TGACAGATTGAGTGTTCTTTCTCGATCCCCCTGAATGGTGGTGCATGGCCGCTTTTGGTCCG	1718
TeVI	TGACAGATTGAGTGTTCTTTCTCGATCCCCCTGAATGGTGGTGCATGGCCGCTTTTGGTCCG	1727
blanco	-----GCTTTTGGTCCG	11
	*****	
TeI	GTGGAGTGATTTGTTTGGTTGATTCCCGTCAACGGACGAGATCCAAGCTGCCCAGTAGGAT	1793
TeII	GTGGAGTGATTTGTTTGGTTGATTCCCGTCAACGGACGAGATCCAAGCTGCCCAGTAGGAT	1788
TeIII	GTGGAGTGATTTGTTTGGTTGATTCCCGTCAACGGACGAGATCCAAGCTGCCCAGTAGGAT	1778
TeIV	GTGGAGTGATTTGTTTGGTTGATTCCCGTCAACGGACGAGATCCAAGCTGCCCAGTAGGAT	1765
TeV	GTGGAGTGATTTGTTTGGTTGATTCCCGTCAACGGACGAGATCCAAGCTGCCCAGTAGGAT	1778
TeVI	GTGGAGTGATTTGTTTGGTTGATTCCCGTCAACGGACGAGATCCAAGCTGCCCAGTAGGAT	1787
blanco	GTGGAGTGATTTGTTTGGTTGATTCCCGTCAACGGACGAGATCCAAGCTGCCCAGTAGGAT	71
	*****	
TeI	TCAGAATTGCCCATAGGATAGCAATCCCTTCCGCGGGTTTTACCCAAGGGGGGGCGGTAT	1853
TeII	TCAGAATTGCCCATAGGATAGCAATCCCTTCCGCGGGTTTTACCCAAGGGGGGGCGGTAT	1848
TeIII	TCAGAATTGCCCATAGGATAGCAATCCCTTCCGCGGGTTTTACCCAAGGGGGGGCGGTAT	1838
TeIV	TCAGAATTGCCCATAGGATAGCAATCCCTTCCGCGGGTTTTACCCAAGGGGGGGCGGTAT	1825
TeV	TCAGAATTGCCCATAGGATAGCAATCCCTTCCGCGGGTTTTACCCAAGGGGGGGCGGTAT	1838
TeVI	TCAGAATTGCCCATAGGATAGCAATCCCTTCCGCGGGTTTTACCCAAGGGGGGGCGGTAT	1847
blanco	TCAGAATTGCCCATAGGATAGCAATCCCTTCCGCGGGTTTTACCCAAGGGGGGGCGGTAT	131
	*****	
TeI	TCGCTTGATCCTTCTCTGCGGGATTCCCTTGTTTTGCGCAAGGTGAGATTTTGGGCAACA	1913
TeII	TCGCTTGATCCTTCTCTGCGGGATTCCCTTGTTTTGCGCAAGGTGAGATTTTGGGCAACA	1908
TeIII	TCGCTTGATCCTTCTCTGCGGGATTCCCTTGTTTTGCGCAAGGTGAGATTTTGGGCAACA	1898
TeIV	TCGCTTGATCCTTCTCTGCGGGATTCCCTTGTTTTGCGCAAGGTGAGATTTTGGGCAACA	1885
TeV	TCGCTTGATCCTTCTCTGCGGGATTCCCTTGTTTTGCGCAAGGTGAGATTTTGGGCAACA	1898
TeVI	TCGCTTGATCCTTCTCTGCGGGATTCCCTTGTTTTGCGCAAGGTGAGATTTTGGGCAACA	1907
blanco	TCGCTTGATCCTTCTCTGCGGGATTCCCTTGTTTTGCGCAAGGTGAGATTTTGGGCAACA	191
	*****	
TeI	GCAGGTCGTGATGCTCCTCAATGTTCTGGGCGACACGCGCACTACAATGTCAGTGAGAA	1973
TeII	GCAGGTCGTGATGCTCCTCAATGTTCTGGGCGACACGCGCACTACAATGTCAGTGAGAA	1968
TeIII	GCAGGTCGTGATGCTCCTCAATGTTCTGGGCGACACGCGCACTACAATGTCAGTGAGAA	1958
TeIV	GCAGGTCGTGATGCTCCTCAATGTTCTGGGCGACACGCGCACTACAATGTCAGTGAGAA	1945
TeV	GCAGGTCGTGATGCTCCTCAATGTTCTGGGCGACACGCGCACTACAATGTCAGTGAGAA	1958
TeVI	GCAGGTCGTGATGCTCCTCAATGTTCTGGGCGACACGCGCACTACAATGTCAGTGAGAA	1967
blanco	GCAGGTCGTGATGCTCCTCAATGTTCTGGGCGACACGCGCACTACAATGTCAG-----	245
	*****	

-3'

Grupo 4:

Tabla C.16: Alineamiento secuencia blanco de partidores diseñados, Grupo 4, con secuencias del gen rARN 18S, TeI-TeVI

	5'-	
TeI	TCCGGCGGCAGGGCA— ACCTGCTGCCATGGGACGTCCAGCGAATGAATGAAAGTAAAAC	238
TeII	TCCGGCGGCAGGGCAACACCTGCTGCCATGGGACGTCCAGCGAATGAATGAAAGTAAAAC	239
TeIII	TCCGGCGGCAGGGCA— ACCTGCTGCCATGGGACGTCCAGCGAATGAATGAAAGTAAAAC	237
TeIV	TCCGGCGGCAGGGCA— ACCTGCTGCCATGGGACGTCCAGCGAATGAATGAAAGTAAAAC	236
TeV	TCCGGCGGCAGGGCA— ACCTGCTGCCATGGGACGTCCAGCGAATGAATGAAAGTAAAAC	237
TeVI	TCCGGCGGCAGGGCAACACCTGCTGCCATGGGACGTCCAGCGAATGAATGAAAGTAAAAC	240
blanco	—GGACGTCCAGCGAATGAATGAAAGTAAAAC *****	30
TeI	CAATGCCTTCACCGGGCAGTAACACTCAGAAGTGTTGATTCAATTCATTCCGTGCGAAAG	298
TeII	CAATGCCTTCAC—CGGCAGTAACACTCAGAAGTGTTGATTCAATTCATTCCGTGCGAAAG	298
TeIII	CAATGCCTTCAC—CGGCAGTAACACTCAGAAGTGTTGATTCAATTCATTCCGTGCGAAAG	296
TeIV	CAATGCCTTCAC—CGGCAGTAACACTCAGAAGTGTTGATTCAATTCATTCCGTGCGAAAG	295
TeV	CAATGCCTTCAC—CGGCAGTAACACTCAGAAGTGTTGATTCAATTCATTCCGTGCGAAAG	296
TeVI	CAATGCCTTCAC—CGGCAGTAACACTCAGAAGTGTTGATTCAATTCATTCCGTGCGAAAG	299
blanco	CAATGCCTTCAC—CGGCAGTAACACTCAGAAGTGTTGATTCAATTCATTCCGTGCGAAAG *****	89
TeI	CCGGGTTTTTTATCCGGCGTCTTTTGACGAACAACCTGCCCTATCAGCCAGCGATGGCCGT	358
TeII	CCGGGTTTTTTACCCGGCGTCTTTTGACGAACAACCTGCCCTATCAGCCAGCGATGGCCGT	358
TeIII	CCGGGTTTTTTACCCGGCGTCTTTTGACGAACAACCTGCCCTATCAGCCAGCGATGGCCGT	356
TeIV	CCGGGTTTTTTATCCGGCGTCTTTTGACGAACAACCTGCCCTATCAGCCAGCGATGGCCGT	355
TeV	CCGGGTTTTTTACCCGGCGTCTTTTGACGAACAACCTGCCCTATCAGCCAGCGATGGCCGT	356
TeVI	CCGGGTTTTTTACCCGGCGTCTTTTGACGAACAACCTGCCCTATCAGCCAGCGATGGCCGT	359
blanco	CCGGGTTTTTTACCCGGCGTCTTTTGACGAACAACCTGCCCTATCAGCCAGCGATGGCCGT *****	149
TeI	GTAGTGACTGCCATGGCGTTGACGGGAGCGGGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGA	418
TeII	GTAGTGACTGCCATGGCGTTGACGGGAGCGGGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGA	418
TeIII	GTAGTGACTGCCATGGCGTTGACGGGAGCGGGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGA	416
TeIV	GTAGTGACTGCCATGGCGTTGACGGGAGCGGGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGA	415
TeV	GTAGTGACTGCCATGGCGTTGACGGGAGCGGGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGA	416
TeVI	GTAGTGACTGCCATGGCGTTGACGGGAGCGGGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGA	419
blanco	GTAGTGACTGCCATGGCGTTGACGGGAGCGGGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGA *****	209
TeI	GCCTGAGAAATAGCTACCACTTCTACGGAGGGCAGCAGGCGCGCAAATTGCCAATGTCA	478
TeII	GCCTGAGAAATAGCTACCACTTCTACGGAGGGCAGCAGGCGCGCAAATTGCCAATGTCA	478
TeIII	GCCTGAGAAATAGCTACCACTTCTACGGAGGGCAGCAGGCGCGCAAATTGCCAATGTCA	476
TeIV	GCCTGAGAAATAGCTACCACTTCTACGGAGGGCAGCAGGCGCGCAAATTGCCAATGTCA	475
TeV	GCCTGAGAAATAGCTACCACTTCTACGGAGGGCAGCAGGCGCGCAAATTGCCAATGTCA	476
TeVI	GCCTGAGAAATAGCTACCACTTCTACGGAGGGCAGCAGGCGCGCAAATTGCCAATGTCA	479
blanco	GCC— *****	212

-3'

Grupo 5:

Tabla C.17: Alineamiento secuencia blanco de partidores diseñados, Grupo 5, con secuencias del gen rARN 18S, TeI-TeVI

	5'	
TeI	ATCCTCAGCACGTTATCTGACTTCTTCACGCGAAAGCTTTGAGGTTACAGTCTCAGGGGG	1553
TeII	ATCCTCAGCACGTTATCTGACTTCTTCACGCGAAAGCTTTGAGGTTACAGTCTCAGGGGG	1548
TeIII	ATCCTCAGCACGTTATCTGACTTCTTCACGCGAAAGCTTTGAGGTTACAGTCTCAGGGGG	1538
TeIV	ATCCTCAGCACGTTATCTGACTTCTTCACGCGAAAGCTTTGAGGTTACAGTCTCAGGGGG	1525
TeV	ATCCTCAGCACGTTATCTGACTTCTTCACGCGAAAGCTTTGAGGTTACAGTCTCAGGGGG	1538
TeVI	ATCCTCAGCACGTTATCTGACTTCTTCACGCGAAAGCTTTGAGGTTACAGTCTCAGGGGG	1547
blanco	————— ACTTCTTCACGCGAAAGCTTTGAGGTTACAGTCTCAGGGGG *****	41
TeI	GAGTACGTTTCGCAAGAGTGAAGCTTAAAGAAATTGACGGAATGGCACCACAAGACGTGGA	1613
TeII	GAGTACGTTTCGCAAGAGTGAAGCTTAAAGAAATTGACGGAATGGCACCACAAGACGTGGA	1608
TeIII	GAGTACGTTTCGCAAGAGTGAAGCTTAAAGAAATTGACGGAATGGCACCACAAGACGTGGA	1598
TeIV	GAGTACGTTTCGCAAGAGTGAAGCTTAAAGAAATTGACGGAATGGCACCACAAGACGTGGA	1585
TeV	GAGTACGTTTCGCAAGAGTGAAGCTTAAAGAAATTGACGGAATGGCACCACAAGACGTGGA	1598
TeVI	GAGTACGTTTCGCAAGAGTGAAGCTTAAAGAAATTGACGGAATGGCACCACAAGACGTGGA	1607
blanco	GAGTACGTTTCGCAAGAGTGAAGCTTAAAGAAATTGACGGAATGGCACCACAAGACGTGGA *****	101
TeI	GCGTGCGGTTTAATTTGACTCAACACGGGGAACTTTACCAGATCCGGACAGGGTGAGGAT	1673
TeII	GCGTGCGGTTTAATTTGACTCAACACGGGGAACTTTACCAGATCCGGACAGGGTGAGGAT	1668
TeIII	GCGTGCGGTTTAATTTGACTCAACACGGGGAACTTTACCAGATCCGGACAGGGTGAGGAT	1658
TeIV	GCGTGCGGTTTAATTTGACTCAACACGGGGAACTTTACCAGATCCGGACAGGGTGAGGAT	1645
TeV	GCGTGCGGTTTAATTTGACTCAACACGGGGAACTTTACCAGATCCGGACAGGGTGAGGAT	1658
TeVI	GCGTGCGGTTTAATTTGACTCAACACGGGGAACTTTACCAGATCCGGACAGGGTGAGGAT	1667
blanco	GCGTGCGGTTTAATTTGACTCAACACGGGGAACTTTACCAGATCCGGACAGGGTGAGGAT *****	161
TeI	TGACAGATTGAGTGTTCTTTCTCGATCCCCTGAATGGTGGTGCATGGCCGCTTTTGGTTCG	1733
TeII	TGACAGATTGAGTGTTCTTTCTCGATCCCCTGAATGGTGGTGCATGGCCGCTTTTGGTTCG	1728
TeIII	TGACAGATTGAGTGTTCTTTCTCGATCCCCTGAATGGTGGTGCATGGCCGCTTTTGGTTCG	1718
TeIV	TGACAGATTGAGTGTTCTTTCTCGATCCCCTGAATGGTGGTGCATGGCCGCTTTTGGTTCG	1705
TeV	TGACAGATTGAGTGTTCTTTCTCGATCCCCTGAATGGTGGTGCATGGCCGCTTTTGGTTCG	1718
TeVI	TGACAGATTGAGTGTTCTTTCTCGATCCCCTGAATGGTGGTGCATGGCCGCTTTTGGTTCG	1727
blanco	TGACAGATTGAGTGTTCTTTCTCGATCCCCTGAATGGTGGTGCATGGCCGCTTTTGGTTCG *****	221
TeI	GTGGAGTGATTTGTTTGGTTGATTCCGTCAACGGACGAGATCCAAGCTGCCAGTAGGAT	1793
TeII	GTGGAGTGATTTGTTTGGTTGATTCCGTCAACGGACGAGATCCAAGCTGCCAGTAGGAT	1788
TeIII	GTGGAGTGATTTGTTTGGTTGATTCCGTCAACGGACGAGATCCAAGCTGCCAGTAGGAT	1778
TeIV	GTGGAGTGATTTGTTTGGTTGATTCCGTCAACGGACGAGATCCAAGCTGCCAGTAGGAT	1765
TeV	GTGGAGTGATTTGTTTGGTTGATTCCGTCAACGGACGAGATCCAAGCTGCCAGTAGGAT	1778
TeVI	GTGGAGTGATTTGTTTGGTTGATTCCGTCAACGGACGAGATCCAAGCTGCCAGTAGGAT	1787
blanco	GTGGAG————— *****	227



## C.4. Estimación económica

Tabla C.19: Estimación de costo por reacción LAMP

Reactivo	Especificaciones	Costo	Cantidad Utilizada	Costo por Reacción	Información Adicional	Bibliografía
<i>Bst</i> ADN polimerasa	1600 U + tampón, 200 reacciones \$959 por base,	\$93.555	1 reacción	\$468	-	[50]
Partidores	4 partidores, 118 bases en total, Primer MIX 200 $\mu$ L	\$7.654	1 $\mu$ L	\$38	Tabla C.20 Cálculo costo Primer MIX	[69]
dNTPs	100 mM, 4X 25 mM, Volumen 1 mL	\$352.811	1,4 $\mu$ L	\$123	-	[68]
Betaína Azul de Hidroxinaftol	1,5 mL, 5 M 100 gr	\$23.905 \$177.000	2 $\mu$ L 1 $\mu$ L	\$ 32 \$0,02	0,4 M Disolución 1,86 mg en 1mL, 3 mM	[68] [71]
Agua	Agua libre de ADNasa y ARNasas, 1L	\$12.434	15,6 $\mu$ L	\$0,2	-	[68]
ADN	Kit de extracción Qiagen, Volumen de elución 100 $\mu$ L	\$4.031	2 $\mu$ L	\$81	Costo Kit \$1.007.681, 250 reacciones	[68]
<b>COSTO TOTAL</b>				<b>\$742</b>		

Tabla C.20: Estimación de costo Primer MIX 1X para LAMP, solución de trabajo 160  $\mu$ M partidores FIP, BIP y 20  $\mu$ M partidores F3 y B3

Partidor	Largo	Costo	Volumen Solución madre	Volumen utilizado Solución Trabajo	Precio Solución Trabajo	Volumen Primer MIX	Costo Primer MIX
FIP	39	\$37.401	362,5 $\mu$ L	160 $\mu$ L	\$16.508	50 $\mu$ L	\$4.127
BIP	41	\$39.319	476,5 $\mu$ L	160 $\mu$ L	\$13.203	50 $\mu$ L	\$3.301
F3	20	\$19.180	763,5 $\mu$ L	20 $\mu$ L	\$502	50 $\mu$ L	\$126
B3	18	\$17.262	857,5 $\mu$ L	20 $\mu$ L	\$403	50 $\mu$ L	\$101
<b>TOTAL</b>	<b>118</b>	<b>\$113.162</b>				<b>TOTAL</b>	<b>\$7.654</b>

Tabla C.21: Estimación de costo por reacción de PCR

Reactivo	Especificaciones	Costo	Cantidad Utilizada	Costo por Reacción	Información Adicional	Bibliografía
<i>Taq</i> ADN polimerasa	300 reacciones + tampón; 5 U/ $\mu$ L, 60 $\mu$ L	\$292.225	1 reacción	\$584	Se utilizan 0,12 $\mu$ L, 0,6 U/reacción	[68]
Partidores	\$959 por base, 4 partidores, 52 bases en total	\$1.247	1,5 $\mu$ L	\$19	Tabla C.22 Costo Primer MIX	[69]
Kit dNTPs	100 mM, 4X 25mM, 1 mL	\$352.811	0,3 $\mu$ L	\$106	-	[68]
Agua	Agua libre de ADNasa y ARNasas, 1L	\$12.434	18,28 $\mu$ L	\$0,2	-	[68]
ADN	Costo por reacción, Kit de extracción Qiagen, Volumen de elución 100 $\mu$ L	\$4.031	5 $\mu$ L	\$202	Kit de extracción \$1.007.681, 250 reacciones	[68]
<b>COSTO TOTAL</b>				<b>\$911</b>		

Tabla C.22: Estimación de costo Primer MIX reacción de PCR, solución de trabajo 50  $\mu$ M

Partidor	Largo	Costo	Volumen Solución madre 200 $\mu$ M	Volumen utilizado Solución Trabajo	Precio Solución Trabajo	Volumen utilizado Primer MIX	Costo Primer MIX
Forward	26	\$24.934	1 mL	50 $\mu$ L	\$1.247	50 $\mu$ L	\$623
Reverse	26	\$24.934	1 mL	50 $\mu$ L	\$1.247	50 $\mu$ L	\$623
<b>TOTAL</b>	<b>52</b>	<b>\$49.868</b>				<b>TOTAL</b>	<b>\$1.247</b>

Tabla C.23: Estimación de costo Electroforesis

Insumo	Especificaciones	Costo	Cantidad Utilizada	Costo por Reacción	Información Adicional	Bibliografía
Tampón TAE	50X, 1 L	\$73.700	50 mL	\$3.685	Diluye 1X Disolución	[68]
Agarosa	100 gr	\$327.000	2 gr	\$6.540	tampón TAE 1X, 2% p/v, 100 mL	[70]
GelRed	1 mL	\$26.509	10 $\mu$ L	\$265	2 $\mu$ L por 100 mL	[68]
Tampón de carga	6X, 5mL	\$13.800	2 $\mu$ L	\$6	-	[68]
Agua	Agua libre de DNasa y ARNasas, 1L	\$12.434	950 mL	\$1.036	-	[68]
Ladder	100 $\mu$ L	\$51.789	2 $\mu$ L	\$11.812		[68]
<b>COSTO TOTAL</b>				<b>\$11.531</b>		

# Anexo D

## Discusión

### D.1. Cálculo total de muestras a analizar

Para calcular la cantidad de muestras a analizar para el análisis estadístico se toma como precedente que en el año 2019 el ISP analizó 2051 muestras sanguíneas de menores de un año, de los cuales 1919 resultaron positivos para pruebas Serológicas y 132 de ellos por PCR, lo que corresponde a un 6,4% del universo de niños y niñas. A partir de esto se calcula el número de muestras totales, con un error máximo garantizado del 5% y un nivel de confianza del 95%.

$$N = Z_{NC}^2 \cdot \frac{p \cdot (1 - p)}{e^2} \quad (\text{D.1})$$

$$N = 1,96^2 \cdot \frac{0,064 \cdot (1 - 0,064)}{0,05^2} \quad (\text{D.2})$$

$$N = 92 \quad (\text{D.3})$$