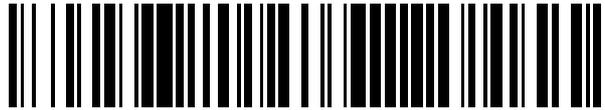


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 542 407**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2008 E 12180394 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2015 EP 2527475**

54 Título: **Cebadores para detectar Plasmodium**

30 Prioridad:

28.05.2007 JP 2007140525

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

05.08.2015

73 Titular/es:

**EHIME UNIVERSITY (50.0%)
10-13 Dogo-Himata
Matsuyama-shi Ehime 790-8577, JP y
OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**TSUBOI, TAKAFUMI y
HAN, EUN-TAEK**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 542 407 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Cebadores para detectar *Plasmodium*.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un conjunto de cebadores que puede detectar/identificar de manera exacta y rápida parásitos de malaria de una o más especies de *Plasmodium* en zonas endémicas de malaria, a un procedimiento para detectar e identificar los mismos y a un kit de detección de los mismos.

10

Antecedentes de la técnica

En muchos países en los que son endémicos parásitos de la malaria, el diagnóstico rápido y exacto de parásitos de la malaria presenta desafíos. De las cuatro especies de *Plasmodium*, *P. falciparum*, que puede ser mortal, debe identificarse inmediatamente y distinguirse de las otras especies de *Plasmodium* que producen la enfermedad en seres humanos (Moody, A., Clin. Microbiol. Rev. 15 (2002): 66-78).

15

Además, en la mayoría de las zonas endémicas de malaria aparecen infecciones que implican dos o más de estas especies; estas infecciones mixtas a menudo discurren sin reconocerse o subestimadas (Zimmerman, P.A., et al., Trends Parasitol. 20 (2004): 440-447). No poder detectar una infección mixta podría dar como resultado un tratamiento inadecuado, y puede dar como resultado una enfermedad grave (Mayxay, M., et al., Trends Parasitol. 20 (2004): 233-240). Hay, por tanto, una urgente necesidad de desarrollar procedimientos de diagnóstico de la malaria que puedan funcionar en zonas endémicas de manera fácil, rápida, altamente sensible y específica de especie.

20

Actualmente, el procedimiento de diagnóstico fácil para la malaria es el examen microscópico de frotis de sangre. Dada una alta densidad de parásitos, tal microscopía presenta una sensibilidad y especificidad relativamente altas y proporciona una determinación de la especie y del estadio de desarrollo. Sin embargo, en zonas endémicas en las que la densidad de parásitos es generalmente baja, este procedimiento es laborioso, requiere expertos bien entrenados y puede dar como resultado que se retrase la terapia.

25

30

Para mejorar la velocidad y precisión del diagnóstico de la malaria en regiones en las que no está disponible el diagnóstico de laboratorio convencional, los investigadores han desarrollado pruebas de diagnóstico rápidas (RDT) para la malaria basadas en inmunorreacción (Moody, A. Clin. Microbiol. Rev. 15 (2002): 66-78; Ndao, M., et al., J. Clin. Microbiol. 42 (2004): 2694-2700). Sin embargo, la sensibilidad varía entre productos (Murray, C. K., et al., Trop. Med. Int. Health. 8 (2003): 876-883), y sólo está disponible un producto específico de especie para *P. falciparum*. Se requieren tiempos de observación muy largos y considerable experiencia para el diagnóstico correcto mediante microscopía en varias circunstancias: cuando la parasitemia es baja, durante una infección mixta, tras tratamiento farmacológico y durante la fase crónica de la infección. Por tanto, esta situación puede conducir a resultados falsos negativos o a un diagnóstico de especie no fiable (Coleman, R., et al., Thailand. Malar. J. 14 (2006): 121).

35

40

Posteriormente, se desarrollaron procedimientos de biología molecular basados en amplificación del ADN, tales como PCR anidada y PCR cuantitativa en tiempo real, para el diagnóstico de la malaria. En comparación con la microscopía, estos procedimientos han demostrado superior sensibilidad y mayor especificidad para infecciones mixtas (Kimura, K., et al., Parasitol. Int. 46 (1997): 91-95; Perandin, F., et al., J. Clin. Microbiol. 42 (2004): 1214-1219; Rougemont, M., et al., J. Clin. Microbiol. 42 (2004): 5636-5643; Singh, B., et al., Am. J. Trop. Med. Hyg. 60 (1999): 687-692; Singh, B., et al., Lancet. 363 (2004): 1017-1024; Snounou, G., et al., Mol. Biochem. Parasitol. 58 (1993): 283-292; Snounou, G., et al., Mol. Biochem. Parasitol. 61 (1993): 315-320). Sin embargo, el largo tiempo de respuesta, alto coste y disponibilidad sólo en laboratorios bien equipados hacen que esta tecnología de PCR sea inadecuada para el diagnóstico rutinario en laboratorios hospitalarios y en clínicas *in situ* de zonas endémicas (Hanscheid, T., y Grobusch, M. P., Trends Parasitol. 18 (2002): 395-398).

50

Con respecto a la detección de la malaria, los ejemplos 8 y 10 en el documento de patente 1 dan a conocer un procedimiento de extracción de ácidos nucleicos de muestras de sangre y de realización de PCR anidada para detectar cuatro especies de *Plasmodium*. El ejemplo 8 da a conocer cada secuencia de cebador directo y cebador inverso, que son diferentes de las secuencias de cebadores de la presente invención (documento de patente 1).

55

La publicación de patente de los documentos de patente 2 y 4 da a conocer procedimientos para detectar una o múltiples especies de infección por malaria basándose en un procedimiento de fase sólida o PCR anidada, en el que se utilizan uno o una pluralidad de múltiples tipos de cebadores para detectar clínicamente *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* o *P. ovale*. Sin embargo, esos cebadores presentan secuencias de cebadores diferentes a los de la presente invención.

60

La publicación de patente de los documentos de patente 3 da a conocer un procedimiento para detectar *P. falciparum* y/o *P. vivax*, en el que se unen cebadores específicos para *P. falciparum* y/o *P. vivax* a un marcador o soportes sólidos. Sin embargo, estas secuencias de cebadores específicos son diferentes de las secuencias oligonucleotídicas de los conjuntos de cebadores de la presente invención.

65

Se hace referencia asimismo al documento no de patente de la técnica anterior Rubio J.M. et al; Am. J. Trop. Med. Hyg. 60 (1999): 183-187.

5 Recientemente, se desarrolló una técnica novedosa, fácil y altamente sensible denominada amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) (Notomi, T., *et al.*, Nucleic Acids Res. 28 (2000): e63; documento WO 2000/28082).

LAMP es un procedimiento de amplificación de ácido nucleico que se basa en la síntesis de ADN por desplazamiento de hebra de ciclo automático realizada mediante la ADN polimerasa *Bst*. Los productos amplificados son estructuras de tallo-bucle con varias secuencias repetidas de la diana, y presentan múltiples bucles.

10 El principal mérito de este procedimiento es que no se requiere desnaturalización del molde de ADN (Nagamine, K., *et al.*, Clin. Chem. 47 (2001): 1742-1743), y por tanto la reacción de LAMP puede realizarse en condiciones isotérmicas (que oscilan entre 60 y 65°C). LAMP requiere sólo una enzima y cuatro tipos de cebadores que reconocen seis regiones diana distintas. El procedimiento produce una gran cantidad de producto amplificado, dando como resultado una detección más fácil, tal como detección mediante juicio visual de la turbidez o fluorescencia de la mezcla de reacción (Mori, Y., *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 289 (2001): 150-154). Se conocen LAMP en las que se utiliza una sustancia fluorescente tal como fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), X-rodamina (ROX) o similar para medir los valores de polarización de fluorescencia de la mezcla de reacción, y LAMP en las que se utiliza SYBR Green 2, un colorante verde, como intercalador (publicación de patente japonesa no examinada n.º 2002-272475 y documento WO 2002/103053).

20 Varios investigadores han notificado procedimientos de LAMP para la identificación rápida de *Plasmodium*, *Trypanosoma*, *Babesia*, *Fusarium*, *Listeria* y *Legionella*, y han recomendado la utilidad del ensayo de LAMP (Ikadai, H., *et al.*, J. Clin. Microbiol. 42 (2004): 2465-2469; Kuboki, N., *et al.*, J. Clin. Microbiol. 41 (2003): 5517-5524; Thekiso, O., *et al.*, Mol. Biochem. Parasitol. 122 (2002): 223-236; publicación de patente japonesa no examinada n.º 2005-245257, publicación de patente japonesa no examinada n.º 2007-61061, publicación de patente japonesa no examinada n.º 2003-219878 y Poon, L., *et al.*, Clin. Chem. 52 (2006): 303-306).

30 Poon *et al.* estimaron que el coste de realizar un ensayo de LAMP es aproximadamente una décima parte de la PCR normal para la detección de *P. falciparum* (Poon, L., *et al.*, Clin. Chem. 52 (2006): 303-306). La mayor reducción en coste y tiempo proviene de una preparación de muestras sencilla sin extracción previa del ADN (Iwasaki, M., *et al.*, Genome Lett. 2 (2003): 119-126).

35 Para la preparación de las muestras, era suficiente simplemente calentar la sangre infectada a 99°C durante 10 minutos para preparar un molde de ADN para LAMP (Poon, L., *et al.*, Clin. Chem. 52 (2006): 303-306). Sin embargo, hasta la fecha, sólo se ha validado LAMP para la detección de parásitos de la malaria en diagnóstico clínico en pacientes con *P. falciparum* agudos (Poon, L., *et al.*, Clin. Chem. 52 (2006): 303-306). Aunque *P. falciparum* es la causa más importante de enfermedad grave, su distribución geográfica se solapa con la de la infección por *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*, y por tanto sería deseable un procedimiento que permitiese la rápida detección e identificación de las cuatro especies que infectan a seres humanos.

45 En los últimos años, en zonas endémicas de malaria, el desarrollo de cepas resistentes a fármacos ha sido un problema importante para lograr un tratamiento apropiado de la malaria. El personal médico en ejercicio o los médicos de hospital desean procedimientos de diferenciación rápidos y altamente sensibles para obtener información sobre si un paciente con fiebre está infectado por un parásito de la malaria particular o múltiples especies de parásitos de la malaria, para de ese modo tratar apropiadamente a dicho paciente de malaria con fiebre.

[Documento de patente 1] Documento WO2006/88895

50 [Documento de patente 2] Publicación de patente japonesa no examinada n.º 1994-261758

[Documento de patente 3] Publicación de patente japonesa no examinada n.º 1993-227998

[Documento de patente 4] Publicación de patente japonesa no examinada n.º 2003-250564

[Documento no de patente 1] Poon, L., *et al.*, Clin. Chem. 52 (2006): 303-306.

55 Descripción de la invención

Problemas que van a solucionarse mediante la invención

60 Para solucionar los problemas mencionados anteriormente, se desea el desarrollo de procedimientos fáciles y rápidos para la detección e identificación de las cuatro especies de parásitos de la malaria del género *Plasmodium* (particularmente, la presencia de infecciones mixtas), que son diferentes de procedimientos conocidos tales como procedimientos de microscopía o mediados por reacción de PCR.

65 Un objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento de detección e identificación rápido y altamente sensible para detectar y especificar clínicamente *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* o *P. ovale* utilizando LAMP. Además, según el procedimiento de detección e identificación de parásitos de la malaria de la presente invención, utilizando muestras de sangre obtenidas en clínicas en zonas endémicas de malaria, se proporcionan un

conjunto de cebadores para detectar las cuatro especies de parásitos de la malaria del género *Plasmodium*, en el que el conjunto de cebadores se ha evaluado a través de la comparación de microscopía y LAMP; un procedimiento de detección para las cuatro especies de parásitos de la malaria del género *Plasmodium* utilizando el conjunto de cebadores; un procedimiento de identificación; y un kit de detección.

Por tanto, un objetivo de la presente invención es solucionar los problemas mencionados anteriormente y proporcionar un procedimiento de detección/identificación rápido y fácil para determinar la presencia o ausencia de más de una de las 4 especies específicas de parásitos de la malaria en muestras humanas, lo que puede contribuir a la atención médica en zonas endémicas de malaria, y además proporcionar un sistema de apoyo de medición antimalaria y un sistema de medición de tratamiento/prevención a la infección por malaria.

Medios para solucionar los problemas

Los presentes inventores, con el objetivo de solucionar tales problemas, concibieron la utilización de un procedimiento de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), que es una reacción de amplificación génica isotérmica: (documento WO 00/28082). Sin embargo, en general, las secuencias de ácido nucleico de genes de parásitos de la malaria difieren enormemente de las de otros organismos, que son ricas en contenido en AT. Por tanto, el software de diseño de cebadores existente no podía encontrar conjuntos de cebadores óptimos, exigiendo un procedimiento repetitivo de ensayo y error con dificultades en el diseño de cada tipo de cebador. Finalmente, entre las muchas combinaciones de conjuntos de cebadores sintéticos, se encontraron conjuntos de cebadores particularmente útiles que presentaban tanto alta sensibilidad como alta especificidad. Por tanto, se encontró que la utilización de conjuntos de cebadores específicos de género que pueden detectar las cuatro especies que infectan a seres humanos de parásitos de *Plasmodium* al mismo tiempo y conjuntos de cebadores específicos cada uno para las cuatro especies de parásitos (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*) permite una detección/identificación fácil y rápida de la presencia o ausencia de tales infecciones.

También se encontró que estos resultados pueden utilizarse eficazmente para que un sistema de soporte de medidas contra la malaria y el sistema de medidas/tratamiento de la infección por malaria puedan utilizarse eficazmente.

Es decir, la presente invención puede proporcionar lo siguiente tal como se describe en los puntos 1 a 27 a continuación.

Punto 1. Un procedimiento para detectar o identificar una infección con uno o más de *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* y *Plasmodium ovale* en una muestra; comprendiendo el procedimiento las siguientes etapas (a) a (c):

- a) extraer ADN de la muestra;
- b) amplificar una región particular de una secuencia de gen de ARNr 18S de *Plasmodium* haciendo reaccionar el ADN extraído en la etapa (a) en una mezcla de reacción que contiene una ADN polimerasa de desplazamiento de hebra y un conjunto de cebadores específicos de secuencia; y
- c) detectar o identificar la presencia o ausencia de un producto amplificado del género *Plasmodium* de más de uno de entre *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* y *Plasmodium ovale*, amplificado en la etapa (b);

siendo el conjunto de cebadores específicos de secuencia más de uno de entre un conjunto de cebadores que comprende un conjunto de oligonucleótidos que contiene secuencias de ácido nucleico representadas por SEC ID nº: 7 a 12 para amplificar una región particular de una secuencia de gen de ARNr 18S de *Plasmodium falciparum*, un conjunto de cebadores que comprende un conjunto de oligonucleótidos que contiene secuencias de ácido nucleico representadas por SEC ID nº: 13 a 18, SEC ID nº: 31 a 36 o SEC ID nº: 37 a 42 para amplificar una región particular de una secuencia de gen de ARNr 18S de *Plasmodium vivax*, un conjunto de cebadores que comprende un conjunto de oligonucleótidos que contiene secuencias de ácido nucleico representadas por SEC ID nº: 19 a 24 para amplificar una región particular de una secuencia de gen de ARNr 18S de *Plasmodium malariae* y un conjunto de cebadores que comprende un conjunto de oligonucleótidos que contiene secuencias de ácido nucleico representadas por SEC ID nº: 25 a 30 para amplificar una región particular de una secuencia de gen de ARNr 18S de *Plasmodium ovale*.

Punto 2. Un procedimiento de detección o identificación según el punto 1, en el que la extracción del ADN de la muestra se lleva a cabo sometiendo a ebullición la muestra que contiene el ADN, y realizando centrifugación.

Punto 3. Un procedimiento de detección o identificación según el punto 2, en el que el tiempo de ebullición es de desde varios minutos hasta diez y varios minutos.

Punto 4. Un procedimiento de detección o identificación según uno cualquiera de los puntos 1 a 3, en el que, en la

etapa (b) de amplificar una región particular de una secuencia de gen de ARNr 18S de *Plasmodium*, la reacción de amplificación del ADN se realiza a aproximadamente 60°C durante aproximadamente 1 hora utilizando un baño de agua a temperatura constante o un amplificador especialmente diseñado para LAMP.

5 Punto 5. Un procedimiento de detección o identificación según uno cualquiera de los puntos 1 a 4, en el que, en la etapa (c), se detecta o se identifica la presencia o ausencia de un producto de amplificación de más de una de entre *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* y *Plasmodium ovale* utilizando observación visual o un turbidímetro en tiempo real.

10 Punto 6. Un procedimiento de detección o identificación según uno cualquiera de los puntos 1 a 5, que se realiza en una zona endémica de malaria.

15 Punto 7. Un procedimiento de detección o identificación según uno cualquiera de los puntos 1 a 6, en el que se detectan o se identifican infecciones con más de una de entre *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* y *Plasmodium ovale* simultáneamente.

20 Punto 8. Un kit de detección para más de una de entre *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*; que comprende más de uno de un conjunto de cebadores seleccionado de los conjuntos de cebadores definidos el punto 1, una ADN polimerasa de desplazamiento de hebra, dNTP y un tampón de reacción.

Punto 9. Un kit de detección según el punto 8, en el que el kit de detección detecta más de una de entre *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*, simultáneamente.

25 La utilización de uno de los cebadores o conjunto de cebadores de los puntos (1) a (5) anteriores para LAMP permite la hibridación de una región particular del gen de ARNr 18S del género *Plasmodium*, un gen de ARNr 18S de *P. falciparum*, un gen de ARNr 18S de *P. vivax*, un gen de ARNr 18S de *P. malariae* o un gen de ARNr 18S de *P. ovale*. La amplificación de esto en las condiciones de amplificación del procedimiento LAMP permite la amplificación de una región génica específica. La presencia o ausencia de un producto de amplificación de este tipo se analiza mediante electroforesis o un procedimiento de detección fácil. En un procedimiento de este tipo, pueden detectarse y diferenciarse simultáneamente o por separado infecciones por el género específico *Plasmodium* y cada una de las
30 cuatro especies de parásitos de la malaria.

35 Cuando se utiliza el procedimiento de detección de la presente invención para muestras específicas (por ejemplo, sangre humana), pueden aislarse muestras de ADN de las muestras, con estas muestras de ADN, se hicieron reaccionar uno cualquiera de los conjuntos de cebadores del punto (1) al punto (5) para la amplificación, confirmando de ese modo la presencia o ausencia de cualquier producto de ADN amplificado. De tal modo, puede detectarse simultáneamente o por separado cualquiera del género *Plasmodium* o las cuatro especies de parásitos de la malaria: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* o *P. ovale*.

40 **Efectos de la invención**

45 La presente invención permite la utilización de un conjunto de cebadores para LAMP, en la que el conjunto de cebadores comprende un conjunto de oligonucleótidos que contiene las secuencias de ácido nucleico de SEC ID n°: 1 a 6, 7 a 12, 13 a 18 (31 a 36 o 37 a 42), 19 a 24 o 25 a 30; y permite la amplificación simultánea o separada de una región particular de los genes de ARNr 18S de cada una de las cuatro especies de parásitos de la malaria en seres humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* o *P. ovale*; permitiendo de ese modo la detección o diferenciación simultánea o separada de la presencia o ausencia de más de una de las cuatro especies de parásitos de la malaria en seres humanos.

50 El procedimiento para detectar o diferenciar la presencia o ausencia de más de una de las cuatro especies de parásitos de la malaria en seres humanos de la presente invención comprende: amplificar muestras de ADN obtenidas a partir de muestras mediante LAMP (amplificación génica isotérmica) utilizando un conjunto de cebadores que comprende el conjunto de oligonucleótidos que contiene las secuencias de ácido nucleico de 7 a 12, 13 a 18 (31 a 36 o 37 a 42), 19 a 24 o 25 a 30; y analizar la presencia o ausencia de cualquier producto de
55 amplificación. Un procedimiento de detección o diferenciación de este tipo permite una detección o diferenciación fácil, rápida y fiable de la presencia o ausencia de más de una de las cuatro especies de parásitos de la malaria: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* o *P. ovale* simultáneamente o por separado. La presente invención también proporciona un kit para la detección o identificación simultánea o separada de más de una las cuatro especies de parásitos de la malaria.

60 El desarrollo de cepas resistentes a fármacos se ha convertido en un problema importante para tratar apropiadamente la malaria. El procedimiento para diferenciar simultáneamente las cuatro especies de parásitos de la malaria: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale* de la presente invención proporciona al personal médico en ejercicio o médicos de hospital, en regiones endémicas de malaria, una información rápida y altamente sensible de
65 si un paciente con fiebre está infectado por un parásito de la malaria particular o múltiples parásitos de la malaria, permitiendo un tratamiento rápido y apropiado para un paciente de malaria con fiebre.

La utilización del procedimiento de detección/identificación de las cuatro especies de parásitos de la malaria de la presente invención hace posible monitorizar los efectos terapéuticos de la administración del agente terapéutico para la malaria a pacientes infectados por malaria.

5 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra las ubicaciones de dianas de LAMP y sitios de cebado para el género *Plasmodium* (A) y cuatro especies de *Plasmodium* (B), y las secuencias de nucleótidos de genes de ARNr 18S. (A) Las ubicaciones de los sitios de cebado para el conjunto de cebadores específicos del género de *Plasmodium* en la secuencia de referencia (n.º de registro de GenBank M19173.1) se indican mediante flechas. (B) Alineación de secuencias parcial de los genes de ARNr 18S de cuatro parásitos de la malaria en seres humanos, *P. falciparum* (Pf; n.º de registro de GenBank M19173.1), *P. vivax* (Pv; n.º de registro de GenBank U03079), *P. malariae* (Pm; n.º de registro de GenBank M54897) y *P. ovale* (Po; n.º de registro de GenBank L48986), junto con los sitios de hibridación de cebadores específicos de especie.

La figura 2 es un diagrama esquemático del sistema de soporte de medidas contra la malaria utilizando LAMP.

Mejor modo de poner en práctica la invención

Se explican en detalle a continuación formas de realización preferidas de la presente invención.

La presente invención es un sistema de detección fácil y altamente fiable para el examen de parásitos de la malaria rutinario, tanto en hospitales como en laboratorios, o en clínicas de malaria en zonas endémicas. Por ejemplo, cualquiera de las cuatro especies de parásitos de la malaria: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* o *P. ovale* son determinadas cuando están presentes en muestras de sangre humana mediante un procedimiento de amplificación génica isotérmica que emplea LAMP utilizando cebadores oligonucleotídicos específicos para cada una de las cuatro especies de parásitos de la malaria. Específicamente, la invención se basa en un procedimiento que comprende las etapas de seleccionar como diana una región particular de la secuencia de gen de ARNr 18S de *P. falciparum*, la secuencia de gen de ARNr 18S de *P. vivax*, la secuencia de gen de ARNr 18S de *P. malariae*, o la secuencia de gen de ARNr 18S de *P. ovale*; amplificar la región particular de la secuencia de gen de ARNr 18S de *P. falciparum*, la secuencia de gen de ARNr 18S de *P. vivax*, la secuencia de gen de ARNr 18S de *P. malariae* o la secuencia de gen de ARNr 18S de *P. ovale* utilizando el conjunto de cebadores del punto 1; y analizar la presencia o ausencia de cualquier producto de amplificación.

El procedimiento de detección/identificación de la presente invención puede aplicarse a parásitos de la malaria presentes en sangre humana que está infectada por parásitos de la malaria.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “muestra” puede incluir una de las cuatro especies específicas de parásitos de la malaria: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* o *P. ovale*, lo que implica muestras de sangre humana que van a seleccionarse como diana mediante el procedimiento de detección/identificación de la presente invención. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “detección” implica, por ejemplo, determinar si los parásitos de la malaria presentes en una muestra de sangre son parásitos de la malaria de una especie de *Plasmodium* específica, y algunas veces se utiliza como sinónimo para su determinación.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “identificación” implica algunas veces distinguir entre especies de *Plasmodium* específicas tales como *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* o *P. ovale* y las otras especies de *Plasmodium*; y detectar simultáneamente o por separado; en muestras en las que está presente al menos una especie de especies de *Plasmodium*. Sin embargo, el término “identificación” implica generalmente identificar un parásito de la malaria particular que va a detectarse entre los múltiples parásitos de la malaria. Por tanto, el término “identificación” incluye la detección de infecciones por parásitos de la malaria individuales e infecciones por parásitos de la malaria múltiples.

El procedimiento LAMP utilizado en la presente invención en un procedimiento de amplificación génica en el que, a diferencia de la PCR, no se requiere termorregulación (ciclo térmico) en las etapas de amplificación, se utiliza una clase de ADN polimerasa y se amplifican genes a una temperatura constante (temperatura isotérmica) (documento WO 2000/28082 y Notomi, T., *et al.*, Nucleic Acids Res. 28 (2000): e63).

La ADN polimerasa anterior puede ser cualquier enzima sintética de ácido nucleico dependiente de molde que procese la actividad de desplazamiento de hebra. Tales enzimas incluyen ADN polimerasa *Bst* (fragmento grande), ADN polimerasa *Bca* (exo-), el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *Escherichia coli*, ADN polimerasa *Vent* (Exo-) (ADN polimerasa *Vent* sin actividad exonucleasa), ADN polimerasa *DeepVent* (Exo-) (ADN polimerasa *DeepVent* sin exonucleasa), ADN polimerasa *KOD* y similares.

Se utiliza preferiblemente ADN polimerasa *Bst* (fragmento grande). Cuando se utiliza esta enzima, la reacción se realiza preferiblemente a aproximadamente 65°C, que es una temperatura óptima para la reacción enzimática.

Puede detectarse un producto amplificado del procedimiento LAMP mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, puede detectarse utilizando un oligonucleótido marcado que reconoce específicamente la secuencia génica amplificada; o la mezcla de reacción puede someterse directamente a electroforesis en agarosa tras la finalización de la reacción para lograr una detección fácil. El procedimiento LAMP produce un marcador de tamaño molecular de múltiples bandas que presenta diferentes longitudes de bases.

Además, la suspensión blanca provocada por la acumulación de pirofosfato de magnesio como subproducto de amplificación puede detectarse a simple vista o con un turbidímetro (Mori, Y., *et al.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 289 (2001): 150-154).

Alternativamente, la amplificación simplemente puede inspeccionarse a simple vista utilizando SYBR Green I (producto de Applied Biosystems), que se vuelve verde en presencia de ADN amplificado. Sin embargo, los resultados de SYBR Green I concordaban con los deducidos a partir de un turbidímetro en tiempo real (Parida, M., *et al.*, J. Clin. Microbiol. 43 (2005): 2895-2903 y publicación de patente japonesa no examinada n.º 2001-242169). Puesto que el ensayo de turbidez puede llevarse a cabo en un sistema cerrado, el riesgo de contaminación es inferior que para la electroforesis en gel de agarosa. Esto es un mérito adicional de LAMP en utilización clínica (Enosawa, M., *et al.* J. Clin. Microbiol. 41 (2003): 4359-4365; Seki, M., *et al.*, J. Clin. Microbiol. 43 (2005): 1581-1586; Poon, L., *et al.*, Clin. Chem. 52 (2006): 303-306).

Por tanto, el diagnóstico por LAMP, en principio, no requiere reactivos caros para la extracción del ADN, un turbidímetro, un termociclador o un técnico experto. El molde puede prepararse mediante tratamiento térmico directo de muestras de sangre, sin extracciones de ADN caras y que requieren mucho tiempo utilizando un kit comercial. (<http://loopamp.eiken.co.jp>).

Por ejemplo, en el campo en zonas endémicas de malaria, sólo llevar a ebullición y separar una cantidad muy pequeña de sangre de la punta del dedo de un sujeto permite la preparación de una muestra de ADN deseada suficiente para la reacción de LAMP.

Además, LAMP requiere sólo un incubador sencillo, tal como un bloque de calor o un baño de agua que proporciona 60°C constantes, lo que hace que sea más económica y práctica que PCR anidada o PCR en tiempo real.

Cada conjunto de cebadores específicos de género común para el gen de ARNr 18S de *P. vivax*, el gen de ARNr 18S de *P. malariae* y el gen de ARNr 18S de *P. ovale*, seleccionan como diana regiones particulares de cada gen de ARNr 18S. Los conjuntos de cebadores están diseñados para presentar un total de 4 clases de cebador como un conjunto, en el que dos son bucles que forman 2 clases de cebadores internos: (FIP(F1c-F2) y BIP(B1-B2c)), y los otros dos son 2 clases de cebadores externos (F3, B3c). Regiones particulares de cada gen amplificado oscilan entre aproximadamente 70 y 500 pares de bases de longitud.

Los cebadores internos amplifican la secuencia de ácido nucleico de la región diana, y se caracterizan por incluir: (a) como primer segmento, una secuencia de ácido nucleico que se hibrida con el gen diana y funciona como cebador; y (b) como segundo segmento, una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a la secuencia de ácido nucleico en 3' del primer segmento, y posiciones en el lado 5' del primer segmento.

Además, la utilización de cebadores en bucle (LPB, LPF) que presentan una secuencia complementaria a la parte de hebra sencilla del bucle del extremo 5' terminal de la estructura en forma de mancuernas, en la que la estructura en forma de mancuernas funciona como origen de la reacción de amplificación, puede amentar el número de orígenes en la síntesis de ADN. Por tanto, la utilización de cebadores en bucle puede aumentar la eficacia de amplificación, y acortar el tiempo requerido para la amplificación hasta de aproximadamente un tercio a la mitad. Los cebadores externos reconocen la secuencia de ácido nucleico del extremo 3' terminal de la región diana, y presentan una secuencia de ácido nucleico que funciona como origen para la síntesis.

Los inventores intentaron diseñar cada cebador interno ((FIP(F1c-F2), BIP(B1-B2c)), cebador externo (F3, B3c) y cebador en bucle (LPB, LPF) utilizando el software de diseño de LAMP, PrimerExplorer V3 (<http://primerexplorer.jp/e/>) producto de Fujitsu Limited), basándose en una secuencia de ácido nucleico específica de género de los genes de ARNr 18S común para las cuatro especies de parásitos de la malaria en seres humanos, y cada secuencia de ácido nucleico específica de especie de los genes de ARNr 18S de *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*. Sin embargo, en general, las secuencias de ácido nucleico de genes de parásitos de la malaria difieren enormemente de las de otros organismos, que son ricas en contenido en AT. Por tanto, el software de diseño de cebadores existente no podía encontrar conjuntos de cebadores óptimos, exigiendo un procedimiento de ensayo y error repetitivo, y provocando dificultades en el diseño de cada tipo de cebador. Finalmente, entre muchas combinaciones de tales conjuntos de cebadores sintetizados, se encontraron conjuntos de cebadores utilizables altos tanto en sensibilidad como especificidad. Por tanto, los inventores han diseñado satisfactoriamente un cebador específico de género que puede detectar las cuatro especies de parásitos de la malaria infecciosos en seres humanos al mismo tiempo, y cebadores específicos para cada una de las cuatro especies de parásitos de la malaria (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*) a partir de cada gen de ARNr 18S.

Una vez que se determina la secuencia de ácido nucleico de un oligonucleótido cebador, el oligonucleótido puede sintetizarse por medios conocidos, por ejemplo, mediante un sintetizador de ADN automático producido por PerkinElmer, Inc.

5 Según la presente invención, los ejemplos de conjuntos de cebadores específicos para cada uno del gen de ARNr 18S de parásitos de la malaria de *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale* incluyen, por ejemplo, siete conjuntos de cebadores tal como sigue, conjuntos de cebadores para el género *Plasmodium* y las cuatro especies de parásitos de la malaria:

10 un conjunto de cebadores para *P. falciparum* [F3 (SEC ID n°: 7), B3c (SEC ID n°: 8), FIP(F1c-F2) (SEC ID n°: 9), BIP(B1-B2c) (SEC ID n°: 10), LPF (SEC ID n°: 11), LPB (SEC ID n°: 12)];

15 un conjunto de cebadores para *P. vivax* [F3 (SEC ID n°: 13), B3c (SEC ID n°: 14), FIP(F1c-F2) (SEC ID n°: 15), BIP(B1-B2c) (SEC ID n°: 16), LPF (SEC ID n°: 17), LPB (SEC ID n°: 18)]; [PvFIP-9 (F1c+F2) (SEC ID n°: 31), PvBIP-9(B1+B2c) (SEC ID n°: 32), PvF3-9 (SEC ID n°: 33), PvB3c-9 (SEC ID n°: 34), PvLPF-9 (SEC ID n°: 35), PvLPB-9 (SEC ID n°: 36)]; o [PvFIP-7(F1c+F2) (SEC ID n°: 37), PvBIP-7(B1+B2c) (SEC ID n°: 38), PvF3-7(SEC ID n°: 39), PvB3c-7 (SEC ID n°: 40), PvLPF-7 (SEC ID n°: 41), PvLPB-7 (SEC ID n°: 42)];

20 un conjunto de cebadores para *P. malariae* [F3 (SEC ID n°: 19), B3c (SEC ID n°: 20), FIP(F1c-F2) (SEC ID n°: 21), BIP(B1-B2c) (SEC ID n°: 22), LPF (SEC ID n°: 23), LPB (SEC ID n°: 24)];

y un conjunto de cebadores para *P. ovale* [F3(SEC ID n°: 25), B3c (SEC ID n°: 26), FIP(F1c-F2) (SEC ID n°: 27), BIP(B1-B2c) (SEC ID n°: 28), LPF(SEC ID n°: 29), LPB (SEC ID n°: 30)].

25 En la presente memoria, cada cebador específico para el género *Plasmodium*, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale* son cebadores que pueden amplificar específicamente una región particular de cada región particular de cada gen de ARNr 18S de *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*.

30 Los ejemplos de secuencias caracterizadas por las cuatro especies de parásitos de la malaria sometidas a detección/identificación utilizando LAMP de la presente invención incluyen las secuencias de genes de ARNr 18S de *P. falciparum* (*P. falciparum*: n.º de registro de GenBank M19173.1, M19173.2, M19172), *P. vivax* (*P. vivax*: n.º de registro de GenBank U03079, U03080, X13926), *P. malariae* (*P. malariae*: n.º de registro de GenBank M54897) y *P. ovale* (*P. ovale*: n.º de registro de GenBank L48986, L48987) depositadas en GenBank.

35 La detección o identificación de más de una de las cuatro especies de parásitos de la malaria presentes en la muestra se realiza mediante amplificación génica isotérmica generalmente en el intervalo de 60 a 65°C durante de 15 minutos a 1 hora, utilizando al menos un conjunto de los cinco conjuntos de cebadores mencionados anteriormente, siguiendo el procedimiento de LAMP. Es decir, se aísla el ADN recogido de muestras tales como muestras de sangre y similares mediante un procedimiento conocido, y se amplifica este ADN utilizando dicho conjunto de cebadores. La presencia del producto de ADN amplificado puede detectarse fácilmente mediante LAMP, o mediante un procedimiento general de electroforesis.

45 La detección fácil mencionada anteriormente incluye: 1) inspección visual de la mezcla de reacción de amplificación para detectar turbidez blanca (documento WO 2001/83817); 2) un procedimiento para medir los valores de polarización de fluorescencia de la mezcla de reacción utilizando una sustancia fluorescente tal como fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), X-rodamina (ROX) o similares (publicación de patente japonesa no examinada n.º 2002-272475), que utiliza un fluorómetro continuo tal como un ABI Prism 7700 (producto de Applied Biosystems) y similares, permitiendo la confirmación de la amplificación o el análisis cinético; y 3) inspección visual utilizando SYBR Green 2, que utiliza un colorante verde fluorescente como intercalador (documento WO 2002/103053).
50 Mediante cualquiera de estos procedimientos, puede inspeccionarse la presencia o ausencia de cualquier producto de amplificación (presencia o ausencia del gen de ARNr 18S diana) a simple vista.

Según la presente invención, puede proporcionarse un kit de detección de parásitos de la malaria que puede detectar cualquiera de *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* o *P. ovale* simultáneamente o por separado.

55 El kit de detección de parásitos de la malaria anterior puede preempaquetarse con diversos tipos de reactivos necesarios para detectar ácido nucleico amplificado utilizando el conjunto de cebadores de la presente invención. Específicamente, se proporcionan como un kit diversos tipos de oligonucleótidos necesarios para los cebadores o cebadores en bucle de la presente invención, cuatro especies de dNTP como sustratos para la síntesis de ácido nucleico, una ácido nucleico sintasa dependiente de molde con actividad de desplazamiento de hebra, un tampón o una sal para proporcionar condiciones preferibles para la reacción enzimática, un agente protector para estabilizar enzimas o moldes y, cuando se indique, reactivo(s) necesario(s) para detectar un producto de reacción.

65 Ejemplo de referencia de componentes de kit:

Se proporcionan

(1) una mezcla de reacción que contiene un conjunto de cebadores para el género *Plasmodium* [F3 (SEC ID n°: 1), B3c (SEC ID n°: 2), FIP (FIC-F2) (SEC ID n°: 3), BIP(B1-B2c) (SEC ID n°: 4), LPF (SEC ID n°: 5), LPB (SEC ID n°: 6)];

(2) un reactivo para la detección visual de la fluorescencia;

(3) una disolución de mezcla enzimática (incluyendo ADN polimerasa *Bst*);

(4) un control positivo (para el género *Plasmodium*); y

(5) agua destilada.

La tasa de portadores para el género *Plasmodium* que provoca malaria en una zona endémica de malaria se expresa como un porcentaje obtenido dividiendo el número de sujetos positivos para el género *Plasmodium* entre el número de sujetos de la prueba de detección del género *Plasmodium* y multiplicando el cociente resultante por 100. En el sistema de soporte de medidas contra la malaria de la presente solicitud, por ejemplo, un procedimiento de detección del género *Plasmodium* utilizando LAMP puede utilizarse de manera particularmente preferible en zonas endémicas de malaria. En un sujeto que ha residido en una zona endémica de malaria durante un largo periodo y ha adquirido inmunidad (resistencia) frente a la malaria, el número de parásitos en la sangre del sujeto es tan pequeño como de aproximadamente una centésima a aproximadamente una milésima del de un paciente con fiebre malárica. La detección microscópica de un número tan pequeño de parásitos de este tipo con alta sensibilidad es muy difícil. Además, tras la infección por malaria y el periodo latente, en los estadios tempranos del periodo en el que se desarrolla la fiebre debido a la aparición de parásitos de la malaria en la sangre, el número de parásitos es pequeño y por tanto la detección microscópica de los parásitos es extremadamente difícil. La detección microscópica con alta sensibilidad es también muy difícil cuando ya se ha administrado un agente terapéutico para la malaria y el número de parásitos en la sangre del sujeto se ha reducido notablemente por los efectos del agente terapéutico.

En muchas zonas endémicas de malaria, no existen o no se proporcionan extractores de ADN satisfactorios. En la preparación del ADN para la PCR, cuando no puede obtenerse ADN altamente puro utilizando un kit de extracción, la PCR no puede realizarse porque la PCR no se produce debido al inhibidor de las enzimas de amplificación del ADN para la PCR, que está presente en la sangre.

En el procedimiento de detección de las especies de *Plasmodium* utilizado en el sistema de soporte de medidas contra la malaria de la presente invención, la muestra de ADN puede obtenerse fácilmente, por ejemplo, recogiendo una cantidad muy pequeña de sangre de la punta del dedo del sujeto, sometiendo a ebullición la sangre en agua en ebullición durante 10 minutos y centrifugando la sangre a 10000 rpm durante 1 minuto para obtener el sobrenadante, que puede utilizarse como ADN. Por tanto, el procedimiento en el que se detecta el género *Plasmodium* en una muestra utilizando el conjunto de cebadores de detección del género *Plasmodium* de la presente invención, que puede amplificar una región específica de la secuencia del gen de ARNr 18S de *Plasmodium*, puede utilizarse ventajosamente en zonas endémicas de malaria. Además, cuando la investigación se realiza no sólo sobre sujetos en una zona endémica de malaria, sino también sobre la tasa de mosquitos recogidos en una zona endémica que portan parásitos de la malaria para obtener datos importantes para la predicción de la epidemia de malaria basándose en la investigación sobre mosquitos que portan parásitos de la malaria, puesto que el ADN para su utilización en el procedimiento de la presente invención puede extraerse más fácilmente a partir de mosquitos que el ADN para PCR, la frecuencia de la detección de las especies de *Plasmodium* en muestras, obtenidas utilizando cada uno de los conjuntos de cebadores de detección de las especies *Plasmodium* de la presente invención, que puede amplificar una región específica de la secuencia de gen de ARNr 18S de las especies de *Plasmodium*, puede almacenarse en un dispositivo de almacenamiento como una información para la predicción de la epidemia de malaria en la base de datos de medidas de salud pública de prevención de la infección por malaria.

El procedimiento para detectar o identificar más de una de las cuatro especies de parásitos de la malaria según la presente invención es más sencillo, menos caro, más fácil de hacerse funcionar y presenta mayor sensibilidad y mayor especificidad que la microscopía y PCR, y por tanto puede utilizarse lo más preferiblemente en zonas endémicas.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran la presente invención con mayor detalle, pero no se pretende que limiten el alcance de la presente invención.

Ejemplo 1

Materiales y procedimientos:

Se recogieron sesenta y ocho muestras que eran positivas para parásitos de la malaria mediante microscopía de

pacientes que habían visitado clínicas de malaria en Mae Sod y Mae Kasa, noroeste de Tailandia. Además, se recogieron 53 muestras que eran negativas mediante microscopía de residentes en una zona endémica de malaria de Kanchanaburi, oeste de Tailandia.

- 5 Se sometieron a prueba las muestras de sangre mediante microscopía y LAMP. Cada prueba se llevó a cabo por investigadores independientes (microscopía en el Armed Forces Research Institute of Medical Sciences, Tailandia, y LAMP en la Ehime University, Japón), de manera ciega con respecto al origen de las muestras y los resultados de laboratorio, y finalmente se compararon y analizaron los resultados de prueba.

10 Microscopía:

Se examinaron frotis de sangre periférica espesa con un aumento de 1.000 x por expertos en microscopía con gran experiencia en la identificación de parásitos de la malaria. Se contó la densidad de parásitos por 500 leucocitos y después se calculó como el número de parásitos por microlitro suponiendo un recuento de leucocitos de 7.000/μl. Se consideró que la película espesa inicial era negativa si no se observaron parásitos tras contar 500 leucocitos.

15 Extracción de ADN:

Se preparó el molde de ADN para LAMP tal como se describe en Plowe, C., *et al.* (Am. J. Trop. Med. Hyg. (1995) Vol. 52: 565-568). Se transfirieron de veinticinco a cincuenta microlitros de sangre humana como un único punto y se secaron sobre papel de filtro. Se cortó un único punto de sangre de cada papel de filtro, después se incubó durante 4 horas a temperatura ambiente y/o durante la noche a 4°C en 1 ml del 0,5% de saponina en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se lavó el papel de filtro durante 30 minutos en PBS a 4°C y se transfirió a nuevos tubos que contenían 200 μl del 5% de Chelex-100 (Bio-Rad, Hercules, CA), y se agitó con vórtex durante 30 segundos. Se incubó la mezcla a 56°C durante 15 minutos, se agitó con vórtex durante 30 segundos y se calentó a 100°C durante 15 minutos para eluir el ADN, se agitó con vórtex y se centrifugó (10.000 x g durante 5 minutos). O bien se utilizó el sobrenadante inmediatamente tras la reacción, o bien se almacenó en alícuotas a -20°C.

30 Condiciones de LAMP:

Se utilizaron conjuntos de cebadores de LAMP para *P. falciparum* descritos en Poon *et al.* (documento no de patente 1). Se intentaron diseñar los conjuntos de cebadores de LAMP restantes específicos de género y específicos de especie de *Plasmodium* utilizando el software de diseño de cebadores de LAMP PrimerExplorer V3 (<http://primerexplorer.jp/e/>; fabricado por Fujitsu Ltd.). Sin embargo, las secuencias de nucleótidos de los genes de parásitos de la malaria son generalmente muy diferentes de las de organismos de otras especies y presentan un alto contenido en AT; por tanto, fue imposible hallar conjuntos de cebadores óptimos utilizando el software de diseño de cebadores anterior. Por consiguiente, se necesitaron muchos ensayos y errores, encontrando dificultades en el diseño de los cebadores. Sin embargo, finalmente pudieron encontrarse conjuntos de cebadores que presentaban una sensibilidad y especificidad suficientes para su utilización práctica entre los conjuntos de cebadores sintetizados con numerosas combinaciones. Por tanto, se diseñaron satisfactoriamente un conjunto de cebadores específico del género que puede detectar las cuatro especies del género *Plasmodium* que infectan a seres humanos a la vez, y conjuntos de cebadores específicos cada uno a cada una de las cuatro especies de parásitos de la malaria (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*) basándose en las secuencias de nucleótidos específicas de género y de especie de los genes de ARNr 18S.

Tras diseñarse las secuencias de nucleótidos de los oligonucleótidos tal como anteriormente, se sintetizaron cebadores mediante un procedimiento conocido, por ejemplo, utilizando un sintetizador de ADN automatizado, fabricado por Perkin-Elmer.

50 La ubicación y secuencia de nucleótidos de cada cebador se muestran en la figura 1.

Más específicamente, se utilizaron conjuntos de cebadores para el género *Plasmodium* y conjuntos de cebadores para las cuatro especies de *Plasmodium* respectivas:

55 conjuntos de cebadores para el género *Plasmodium* [(F3 (SEC ID nº: 1), B3c (SEC ID nº: 2), FIP(F1c-F2) (SEC ID nº: 3), BIP (B1-B2c)(SEC ID nº: 4), LPF (SEC ID nº: 5), LPB (SEC ID nº: 6)];

60 conjuntos de cebadores para *P. falciparum* [F3 (SEC ID nº: 7), B3c (SEC ID nº: 8), FIP(F1c-F2) (SEC ID nº: 9), BIP(B1-B2c) (SEC ID nº: 10), LPF (SEC ID nº: 11), LPB (SEC ID nº: 12)];

conjuntos de cebadores para *P. vivax* [F3 (SEC ID nº: 13), B3c (SEC ID nº: 14), FIP(F1c-F2) (SEC ID nº: 15), BIP(B1-B2c) (SEC ID nº: 16), LPF (SEC ID nº: 17), y LPB (SEC ID nº: 18)];

65 conjuntos de cebadores para *P. malariae* [F3 (SEC ID nº: 19), B3c (SEC ID nº: 20), FIP(F1c-F2) (SEC ID nº: 21), BIP(B1-B2c) (SEC ID nº: 22), LPF (SEC ID nº: 23), LPB (SEC ID nº: 24)];

conjuntos de cebadores para *P. ovale* [F3 (SEC ID n°: 25), B3c (SEC ID n°: 26), FIP(Flc-F2) (SEC ID n°: 27), BIP(B1-B2c) (SEC ID n°: 28), LPF (SEC ID n°: 29), LPB (SEC ID n°: 30)].

5 Se realizó la reacción de LAMP con un kit de amplificación de ADN Loopamp (Eiken Chemical Co., Ltd., Tokio, Japón).

10 Las mezclas de reacción (25 µl) contenían de 1,6 a 2,4 µM de cada uno de FIP y BIP, 0,2 µM de cada uno de F3 y B3c, 0,8 µM de cada uno de LPF y LPB, 2 x mezcla de reacción (12,5 µl), ADN polimerasa de Bst (1 µl) y de 1 a 2 µl de muestra de ADN (correspondiente a aproximadamente de 0,125 a 0,5 µl de sangre).

15 Se realizó la reacción de LAMP a 60°C durante 100 minutos, después se inactivó la enzima a 80°C durante 2 minutos.

15 Análisis de productos de LAMP:

La reacción de LAMP provoca turbidez en el tubo de reacción, proporcional a la cantidad de ADN amplificado. Por tanto, se observó la turbidez a simple vista. Para confirmar la sensibilidad de LAMP, también se monitorizó la turbidez mediante un turbidímetro en tiempo real Loopamp (RT-160C, Eiken Chemical Co., Tokio, Japón).

20 Para confirmación adicional, se sometieron 5 µl de producto de LAMP a electroforesis a 100 V en un gel de agarosa al 3%, seguido por tinción con bromuro de etidio, utilizando un marcador de peso molecular de ADN MassRuler™ (Fermentas Inc., Hanover, MD). Se evaluó la especificidad de LAMP mediante digestión con enzimas de restricción del producto amplificado.

25 Basándose en los mapas de enzimas de restricción de las secuencias diana de cada producto de LAMP, se seleccionó la enzima de restricción Ddel para el análisis con enzimas de restricción de los productos de LAMP específicos del género *Plasmodium*, HpyCH4V para *P. falciparum*, *P. vivax* y *P. malariae*, y la enzima de restricción AluI para *P. ovale*. Tras digestión durante la noche a 37°C, se analizaron los productos digeridos mediante electroforesis en gel de agarosa.

30 Umbral de diagnóstico de resultados de LAMP:

35 Se monitorizó la formación de productos de reacción de LAMP utilizando un turbidímetro en tiempo real Loopamp. La mayoría de las muestras positivas sometidas a prueba múltiples veces mostraron positividad en el plazo de 1 hora. Por tanto, una muestra que presentaba una turbidez superior o igual al valor umbral mediante turbidímetro en el plazo de 1 hora se consideró positiva.

Secuenciación y ADN de plásmido de control positivo:

40 Para la evaluación de la sensibilidad, se construyeron plásmidos que contenían la región diana del gen de ARNr 18S para la reacción de LAMP para cada especie. Se amplificó la secuencia de ADN diana con dos cebadores de LAMP (F3 y B3c) mediante PCR, después se clonó en el vector de clonación pCR® 2.1-TOPO TA (Invitrogen, Carlsbad, CA).

45 Se determinaron las secuencias de nucleótidos utilizando un secuenciador de ADN automatizado (ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems).

Sensibilidad y especificidad analíticas de LAMP:

50 Para establecer el número de copias mínimo (límite de detección inferior) de secuencia génica diana detectable mediante LAMP, se utilizaron ADN de plásmido de control positivo como moldes. Se construyó la curva patrón para LAMP utilizando diluciones en serie de 10 veces de ADN de plásmido (10^6 para 1 copia) en agua estéril. Para cada patrón, se trazó el número de copias frente al tiempo umbral. Se analizaron los gráficos resultantes mediante regresión lineal y se analizó la significación estadística de los valores de χ^2 mediante ANOVA (Free Statistics and Forecasting Software v1.1.21: <http://www.wessa.net/rwaspkendall.wasp>). Se consideró que probabilidades inferiores a 0,05 eran estadísticamente significativas. Se evaluó la especificidad de LAMP específica del género y de la especie con cada ADN de plásmido de control y ADN genómico de *P. falciparum* (ADNg) purificado a partir de la cepa NF54, ADNg de *P. vivax* a partir de la cepa Sal-I, ADNg de *P. malariae* a partir de la cepa Uganda, y ADNg de *P. ovale* de tipo CDC a partir de la cepa CDC.

60 Resultados de sensibilidad y especificidad analíticas de LAMP específica del género *Plasmodium* y de la especie:

65 La sensibilidad de LAMP para el género *Plasmodium* y cuatro especies de parásito de la malaria, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*, fue de 10 copias para *P. malariae* y *P. ovale*, y de 100 copias para el género *Plasmodium*, *P. falciparum* y *P. vivax*.

Se confirmó adicionalmente la especificidad de cada reacción de LAMP mediante digestión con enzimas de restricción de productos de LAMP. Los tamaños de los productos de digestión resultantes concordaban bien con los tamaños predichos.

5 Sensibilidad y especificidad clínicas:

Se calcularon la sensibilidad y especificidad clínicas de LAMP de *Plasmodium* con 121 muestras de sangre completa con microscopía como procedimiento patrón de referencia. Se calculó la sensibilidad como (número de auténticos positivos)/(número de auténticos positivos + número de falsos negativos), y se calculó la especificidad como (número de auténticos negativos)/(número de auténticos negativos + número de falsos positivos).

Sensibilidad y especificidad clínicas: comparación de microscopía y LAMP:

Los resultados de microscopía y LAMP se facilitan en la tabla 2.

De entre 68 pacientes que eran positivos para parásito de la malaria mediante microscopía, a 12 pacientes se les diagnosticó infección por *P. falciparum*, a 34 infección por *P. vivax*, a 12 infección por *P. malariae*, a 5 infección por *P. ovale* y a 5 infección mixta por *P. falciparum* y *P. vivax*. Las 53 muestras restantes fueron negativas mediante microscopía.

LAMP utilizando el conjunto de cebadores específicos del género detectó parásitos de la malaria en 67 muestras de 68 muestras positivas mediante microscopía (sensibilidad del 98,5%). De entre las 53 muestras que eran negativas mediante microscopía, LAMP específica del género detectó parásitos de la malaria en 3 muestras (especificidad del 94,3%).

Las 3 muestras positivas mediante LAMP pero negativas mediante microscopía volvieron a someterse a prueba mediante LAMP.

Las tres muestras fueron de nuevo positivas mediante LAMP específica del género; a una se le diagnosticó *P. falciparum* y a las otras dos *P. vivax* mediante LAMP específica de la especie.

Por tanto, se supone que la LAMP es más sensible que la microscopía y puede reducir el diagnóstico de falsos negativos, que pueden causar clínicamente omisiones, al menor grado posible.

Las 12 muestras que eran positivas para *P. falciparum* mediante microscopía también fueron positivas para *P. falciparum* mediante LAMP específica de la especie. De entre 34 muestras positivas para *P. vivax* mediante microscopía, a 2 muestras se les diagnosticó infección por *P. ovale*, y a 1 infección mixta por *P. falciparum* y *P. vivax*, mediante LAMP. De entre 12 muestras positivas para *P. malariae*, a 1 muestra se le diagnosticó *P. ovale* y a 1 muestra *P. malariae* y *P. vivax* mixta.

Los resultados anteriores indican que el nuevo procedimiento de diagnóstico de la malaria mediante LAMP desarrollado por los presentes inventores presenta una mayor sensibilidad y mayor especificidad que la microscopía, y es un procedimiento ventajoso para detectar las cuatro especies de parásitos de la malaria en seres humanos.

El tiempo de detección promedio mediante LAMP fue tal como sigue.

LAMP específica del género: $25,7 \pm 4,9$ minutos (media \pm DE; de 19,4 a 52,9 minutos);
 LAMP específica de *P. falciparum*: $31,7 \pm 4,8$ minutos (de 25,8 a 44,9 minutos);
 LAMP específica de *P. malariae*: $30,6 \pm 5,2$ minutos (de 25,4 a 46,9 minutos);
 LAMP específica de *P. vivax*: $34,8 \pm 4,8$ minutos (de 30,5 a 46,6 minutos); y
 LAMP específica de *P. ovale*: $36,1 \pm 6,8$ minutos (de 29,9 a 49,8 minutos).

Estos resultados muestran que la LAMP puede realizar el diagnóstico en un periodo de tiempo que es notablemente más corto que el tiempo de amplificación de PCR anidada.

Ejemplo 2

Los conjuntos de cebadores para detectar el género *Plasmodium* y las especies de *Plasmodium* según la presente invención, y el procedimiento para detectar o identificar el género *Plasmodium*, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale* por separado o simultáneamente utilizando los conjuntos de cebadores, se sometieron a pruebas comparativas con PCR y microscopía en una clínica de malaria en Mae Sod, noroeste de Tailandia, en la que la malaria es endémica.

También se realizó una comparación entre el procedimiento anterior llevado a cabo utilizando equipo especialmente diseñado para LAMP, y el procedimiento anterior llevado a cabo mediante un procedimiento que puede realizarse rápida y fácilmente en una zona endémica de malaria.

Se utilizaron dieciocho muestras que eran positivas para parásitos de la malaria mediante microscopía (el porcentaje de parasitemia: del 0,04% al 0,31%); y se excluyó una muestra que parecía ser un error técnico del ejemplo con antelación.

5 Se utilizó un procedimiento de ebullición para extraer ADN de muestras de pacientes para la detección e identificación rápida y fácil de parásitos de la malaria en una zona endémica de malaria, según la presente invención (pueden detectarse simultáneamente el género *Plasmodium*, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*). Específicamente, se añadieron 50 µl de agua destilada (D.W.) a 50 µl de una muestra de sangre, y se sometió la mezcla resultante a ebullición a 99°C durante 5 minutos, seguido por centrifugación (5415D, producido por Eppendorf; 16.000 x g) obteniendo un sobrenadante.

15 Posteriormente, se añadieron 2 µl del sobrenadante obtenido anteriormente que contenía ADN a 23 µl de una mezcla de reacción que contenía 1 µl de ADN polimerasa de Bst (Epicentre Biotechnologies), 12,5 µl de 2 x mezcla de reacción, de 1,6 a 2,4 µM de FIP y BIP en los conjuntos de cebadores obtenidos en el ejemplo 1, 0,2 µM de F3 y B3c en los conjuntos de cebadores obtenidos en el ejemplo 1, y 0,8 µM de LPF y LPB en los conjuntos de cebadores obtenidos en el ejemplo 1, y se hicieron reaccionar a 60°C durante aproximadamente 60 minutos en un baño de agua a temperatura constante (Thermominder SM-05R, producido por TAITEC) que puede contener 96 x 2 (total 192) tubos.

20 Se observó directamente de manera visual la presencia o ausencia de turbidez en el producto de reacción para detectar la presencia o ausencia de infección por el género *Plasmodium* e identificar cuál de *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* o *P. ovale* provocaba la infección.

25 Por separado, se hizo reaccionar la mezcla de reacción que contenía ADN extraído de cada una de las muestras anteriores a 60°C durante aproximadamente 60 minutos utilizando un turbidímetro en tiempo real Loopamp (LA-320C, producido por Eiken Chemical Co., Ltd.) para monitorizar la formación del producto de reacción en tiempo real.

30 Además, para comparación con PCR con respecto al diagnóstico de la especie de malaria, se realizó una PCR anidada con las mismas muestras. Puesto que se requieren condiciones estrictas para una reacción de PCR, la reacción de PCR puede inhibirse cuando se utiliza tal cual ADN extraído de una muestra clínica mediante el procedimiento de ebullición. Por tanto, se llevó sangre secada sobre papel de filtro obtenida en la clínica de malaria a un laboratorio bien equipado en Bangkok, y se extrajo ADN utilizando un kit de extracción de ADN (QIAamp DNA Mini Kit, producido por QIAGEN) y se sometió a PCR. En la PCR anidada, se realizaron dos ciclos de PCR cada uno durante 2 horas, para un total de 4 horas. Posteriormente, se sometió la muestra obtenida a electroforesis en gel de agarosa y se tiñó con fluorescencia, y se realizó la detección durante un total de 5 horas.

40 Como resultado, de las 18 muestras que eran positivas para parásitos de la malaria mediante microscopía, en la detección de la presencia o ausencia de infección por el género *Plasmodium* utilizando los cebadores para el género *Plasmodium*, 18 fueron positivas cuando se sometieron a prueba las muestras utilizando el turbidímetro en tiempo real Loopamp especialmente diseñado para LAMP, y 18 también fueron positivas cuando se sometieron a prueba las muestras haciendo reaccionar en un baño de agua a temperatura constante mediante observación visual. Los resultados de las dos pruebas concordaron al 100%.

45 La tabla 1 compara los resultados de prueba para microscopía, PCR anidada y LAMP para el diagnóstico de especies de malaria utilizando cebadores específicos de la especie de *Plasmodium*; y los resultados utilizando un amplificador especialmente diseñado para LAMP, con los resultados de la observación visual tras la reacción en un baño de agua a temperatura constante.

50

Tabla 1

Muestra (porcentaje de parasitemia)		PCR	LAMP	
			Amplificador especialmente diseñado	Baño de agua a temperatura constante + observación visual
Pf (0,12-0,28%)	+	3 (N.D.2)	5	5
Pv (0,04-0,31%)	+	12	11	11
Pv + Po (0,08, 0,04%)	Pv+	1	1	1
	Po-	1	1	1

55 Tal como resulta evidente en la tabla 1, con respecto a *P. falciparum*, sólo se sometieron 3 muestras a PCR. En la tabla, Pf indica *P. falciparum*, Pv indica *P. vivax* y Po indica *P. ovale*.

Como resultado, en una muestra diagnosticada mediante microscopía como que estaba infectada tanto por *P. vivax* como por *P. ovale*, tanto PCR como LAMP (tanto la prueba utilizando un amplificador especialmente diseñado para

LAMP, como la prueba utilizando observación visual tras la reacción en un baño de agua a temperatura constante) detectaron *P. vivax*, pero no *P. ovale*, lo que indica que el diagnóstico con microscopía era un error.

Es decir, en la prueba comparativa, 17 de los 18 resultados de reacción de LAMP correspondían con los resultados de microscopía (acuerdo del 94%). Esto significa que los resultados de reacción de LAMP concordaban al 100% con los resultados de microscopía, si se excluye el resultado de reacción anteriormente mencionado que no concordaba con el resultado de microscopía. Estos resultados revelan que los conjuntos de cebadores para detectar el género *Plasmodium* y las especies de *Plasmodium* según la presente invención, y el procedimiento para detectar o identificar el género *Plasmodium*, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale* por separado o simultáneamente utilizando estos cebadores, concordaban al 100% con los diagnósticos de microscopía en la detección e identificación de infección por parásitos de *Plasmodium*; y los resultados de prueba utilizando un amplificador especialmente diseñado para LAMP concordaban al 100% con los resultados de observación visual tras la reacción en el baño de agua a temperatura constante. En los diagnósticos de la especie de malaria, los conjuntos de cebadores y el procedimiento concordaban al 100%, y lograron una sensibilidad equivalente a PCR.

Se demostró que, para los conjuntos de cebadores para detectar el género *Plasmodium* y las especies de *Plasmodium* según la presente invención, y el procedimiento para detectar o identificar el género *Plasmodium*, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale* por separado o simultáneamente utilizando los conjuntos de cebadores, especialmente en una zona endémica de malaria, puede extraerse ADN mediante un procedimiento de ebullición, que es rápido, sencillo y económico, y llevarse a cabo una reacción de amplificación de ADN utilizando un baño de agua a temperatura constante de modo que puede tratarse de manera económica un gran número de muestras.

Los conjuntos de cebadores para detectar el género *Plasmodium* y las especies de *Plasmodium* según la presente invención y el procedimiento para detectar o identificar el género *Plasmodium*, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale* por separado o simultáneamente utilizando los conjuntos de cebadores, pueden aplicarse de manera más rápida y fácil que la microscopía, y presentan una sensibilidad equivalente a PCR. Por tanto, los conjuntos de cebadores y el procedimiento pueden aplicarse ventajosamente en el sitio, especialmente en una zona endémica de malaria, para el diagnóstico de detección e identificación rápida y sencillo del género y las especies de *Plasmodium* simultáneamente, en un gran número de muestras.

Ejemplo 3

Según la presente invención, a partir de los resultados de prueba obtenidos en el sitio (en una clínica) en una zona endémica de malaria en un corto periodo de tiempo, pueden recetarse mefloquina y artesunato para su administración a los cinco pacientes diagnosticados y que se identifica que están infectados por *P. falciparum* en el ejemplo 2, basándose en la información sobre agentes terapéuticos para la malaria y la prioridad de los mismos en la información sobre agentes terapéuticos para la malaria almacenada en la "base de datos de guía de tratamiento". Igualmente, pueden recetarse cloroquina y primaquina para su administración a los 13 pacientes diagnosticados y que se identifican que están infectados por *P. vivax*. Por tanto, puede ponerse en funcionamiento un sistema de soporte de medidas contra la malaria que puede, en una zona endémica de malaria, detectar de manera rápida y fiable la presencia o ausencia de infección por parásitos de *Plasmodium* y proporcionar tratamiento para la malaria.

Ejemplo 4

Tal como se describió anteriormente, una detección sencilla y fácil del género *Plasmodium* (en particular, la presencia o ausencia de infección mixta) es importante en zonas endémicas de malaria.

Los presentes inventores realizaron una investigación adicional sobre cebadores que pueden detectar especies de *Plasmodium*.

Como resultado, los inventores hallaron que dos tipos de conjuntos de cebadores (Pv-7 y Pv-9; Pv-7 se representa por las SEC ID n°: 37 a 42 y Pv-9 se representa por las SEC ID n°: 31 a 36) que son útiles para el diagnóstico de *P. vivax* permiten un diagnóstico más rápido de *P. vivax*.

Cuando se utilizaron los dos tipos de conjuntos de cebadores, se demostró que estos conjuntos de cebadores no reaccionaban con ninguno de los ADN de *P. falciparum*, *P. malariae* y *P. ovale*.

La utilización de los dos tipos de conjuntos de cebadores (Pv-7 y Pv-9) útiles para el diagnóstico de *P. vivax* logró un diagnóstico más rápido (Pv-7: 27 minutos; Pv-9: 24 minutos) que el conjunto de cebadores anteriormente hallado para el diagnóstico de *P. vivax* (31 minutos). En particular, la utilización del conjunto de cebadores Pv-9 logró el diagnóstico más rápido.

La solicitud proporciona además las siguientes formas de realización:

1A. Un conjunto de cebadores para detectar el género *Plasmodium*, que comprende un conjunto de oligonucleótidos que contienen secuencias de ácido nucleico representadas por SEC ID n°: 1 a 6, pudiendo el conjunto de cebadores

amplificar una región particular de una secuencia de gen de ARNr 18S de *Plasmodium*.

5 2A. Un conjunto de cebadores para detectar *Plasmodium vivax*, que comprende un conjunto de oligonucleótidos que contienen secuencias de ácido nucleico representadas por SEC ID nº: 13 a 18, pudiendo el conjunto de cebadores amplificar una región particular de una secuencia de gen de ARNr 18S de *Plasmodium vivax*.

10 3A. Un conjunto de cebadores para detectar *Plasmodium malariae*, que comprende un conjunto de oligonucleótidos que contienen secuencias de ácido nucleico representadas por SEC ID nº: 19 a 24, pudiendo el conjunto de cebadores amplificar una región particular de una secuencia de gen de ARNr 18S de *Plasmodium malariae*.

4A. Un conjunto de cebadores para detectar *Plasmodium ovale*, que comprende un conjunto de oligonucleótidos que contienen secuencias de ácido nucleico representadas por SEC ID nº: 25 a 30, pudiendo el conjunto de cebadores detectar una región particular de una secuencia de gen de ARNr 18S de *Plasmodium ovale*.

15 5A. Un conjunto de cebadores para detectar el género *Plasmodium*, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* o *P. ovale*, que comprende un conjunto de cebadores oligonucleotídicos que contienen cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de las reivindicaciones 1A a 4A y secuencias de ácido nucleico representadas por SEC ID nº: 7 a 12, pudiendo el conjunto de cebadores amplificar regiones particulares de un gen de ARNr 18S del género *Plasmodium* y diversas especies de *Plasmodium* incluyendo una región particular de una secuencia de gen de ARNr 18S de *Plasmodium falciparum*.

20

25 6A. Un procedimiento para detectar el género *Plasmodium* presente en una muestra, seleccionando el procedimiento como diana una región particular de la secuencia de gen de ARNr 18S del género *Plasmodium*, y que comprende amplificar selectivamente la región particular de la secuencia de gen de ARNr 18S del género *Plasmodium* mediante LAMP utilizando un conjunto de cebadores según la reivindicación 1A, y confirmar la presencia o ausencia de un producto amplificado.

30 7A. Un procedimiento para detectar *Plasmodium vivax* presente en una muestra, seleccionando el procedimiento como diana una región particular de una secuencia de gen de ARNr 18S de *Plasmodium vivax*, y que comprende amplificar selectivamente la región particular de la secuencia de gen de ARNr 18S de *Plasmodium vivax* mediante LAMP utilizando un conjunto de cebadores según la reivindicación 2A, y confirmar la presencia o ausencia de un producto amplificado.

35 8A. Un procedimiento para detectar *Plasmodium malariae* presente en una muestra, seleccionando el procedimiento como diana una región particular de una secuencia de gen de ARNr 18S de *Plasmodium malariae*, y que comprende amplificar la región particular de la secuencia de gen de ARNr 18S de *Plasmodium malariae* mediante LAMP utilizando un conjunto de cebadores según la reivindicación 3A, y confirmar la presencia o ausencia de un producto amplificado.

40 9A. Un procedimiento para detectar *Plasmodium ovale* presente en una muestra, seleccionando el procedimiento como diana una región particular de una secuencia de gen de ARNr 18S de *Plasmodium ovale*, y que comprende amplificar selectivamente la región particular de la secuencia de gen de ARNr 18S de *Plasmodium ovale* mediante LAMP utilizando un conjunto de cebadores según la reivindicación 4A, y confirmar la presencia o ausencia de un producto amplificado.

45

50 10A. Un procedimiento para detectar el género *Plasmodium*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* o *Plasmodium ovale* presente en una muestra, seleccionando el procedimiento como diana una región particular de una secuencia de gen de ARNr 18S del género *Plasmodium*, una secuencia de gen de ARNr 18S del género *Plasmodium falciparum*, una secuencia de gen de ARNr 18S del *Plasmodium vivax*, una secuencia de gen de ARNr 18S del *Plasmodium malariae* o una secuencia de gen de ARNr 18S del *Plasmodium ovale*; y comprendiendo el procedimiento amplificar selectivamente la región particular de la secuencia de gen de ARNr 18S del género *Plasmodium*, la secuencia de gen de ARNr 18S de *P. falciparum*, la secuencia de gen de ARNr 18S de *P. vivax*, la secuencia de gen de ARNr 18S de *P. malariae* o la secuencia de gen de ARNr 18S de *P. ovale* respectivamente; mediante LAMP utilizando un conjunto de cebadores según la reivindicación 5A; y confirmar la presencia o ausencia de un producto amplificado.

55

11A. Un procedimiento de detección según la reivindicación 10A, en el que el género *Plasmodium*, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* o *P. ovale* se detectan simultáneamente o por separado.

60 12A. Un procedimiento para identificar el género *Plasmodium*, que comprende aislar una muestra de ADN a partir de una muestra, realizar amplificación mediante LAMP de una región particular de la secuencia de gen de ARNr 18S del género *Plasmodium* a partir de la muestra de ADN utilizando un conjunto de cebadores según la reivindicación 1A, y confirmar la presencia o ausencia de un producto amplificado.

65 13A. Un procedimiento para identificar *Plasmodium vivax*, que comprende aislar una muestra de ADN a partir de una muestra, realizar amplificación mediante LAMP de una región particular de una secuencia de gen de ARNr 18S de

Plasmodium vivax a partir de la muestra de ADN utilizando un conjunto de cebadores según la reivindicación 2A, y confirmar la presencia o ausencia de un producto amplificado.

5 14A. Un procedimiento para identificar *Plasmodium malariae*, que comprende aislar una muestra de ADN a partir de una muestra, realizar amplificación mediante LAMP de una región particular de una secuencia de gen de ARNr 18S de *P. malariae* a partir de la muestra de ADN utilizando un conjunto de cebadores según la reivindicación 3A, y confirmar la presencia o ausencia de un producto amplificado.

10 15A. Un procedimiento para identificar *Plasmodium ovale*, que comprende aislar una muestra de ADN a partir de una muestra, realizar amplificación mediante LAMP de una región particular de una secuencia de gen de ARNr 18S de *P. ovale* a partir de la muestra de ADN utilizando un conjunto de cebadores según la reivindicación 4A, y confirmar la presencia o ausencia de un producto amplificado.

15 16A. Un procedimiento para identificar el género *Plasmodium*, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, o *P. ovale*, que comprende aislar una muestra de ADN a partir de una muestra, realizar amplificación mediante LAMP de una región particular de secuencias de gen de ARNr 18S del género *Plasmodium*, una secuencia de gen de ARNr 18S de *P. falciparum*, una secuencia de gen de ARNr 18S de *P. vivax*, una secuencia de gen de ARNr 18S de *P. malariae* o una secuencia de gen de ARNr 18S de *P. ovale*, a partir de la muestra de ADN utilizando un conjunto de cebadores según la reivindicación 5A; y confirmar la presencia o ausencia de un producto amplificado.

20 17A. Un procedimiento de identificación según la reivindicación 16A, en el que la identificación de cualquiera del género *Plasmodium*, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* o *P. ovale* se realiza simultáneamente o por separado.

25 18A. Un kit de detección para el género *Plasmodium*, *P. falciparum*, *P. vivax*; *P. malariae* o *P. ovale*; que comprende al menos un conjunto de cebadores de cualquiera de la reivindicación 1A a 5A, una ADN polimerasa de desplazamiento de hebra, dNTP y un tampón de reacción.

30 19A. Un kit de detección según la reivindicación 18A, detectando el kit de detección el género *Plasmodium*, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* o *P. ovale*, simultáneamente o por separado.

20A. Un sistema de soporte de medidas contra la malaria que comprende:

35 unos medios para introducir y almacenar información de pacientes infectados por malaria incluyendo el número de positivos para los parásitos del género *Plasmodium* que provocan malaria en una zona endémica de malaria, y la tasa de portadores en la zona;

40 una base de datos de guía de medidas de salud pública de prevención de la infección por malaria que especifica medidas de salud pública para la zona endémica de malaria basándose en la información de pacientes infectados por malaria, base de datos en la que se ha introducido información de selección de medidas de salud pública para una zona infectada por parásitos de la malaria que debe introducirse junto con la prioridad de medida que indica a cuál de las medidas de salud pública se le debe dar prioridad en la selección;

45 una sección de extracción de medidas de salud pública que extrae medidas de salud pública para la zona endémica infectada por malaria y la prioridad de la misma de la base de datos de guía de medidas de salud pública de prevención de la infección por malaria, según información de pacientes infectados por malaria sobre parásitos de la malaria en un sujeto; y

50 una sección de visualización de medidas de salud pública que presenta visualmente las medidas de salud pública extraídas en la sección de extracción de medidas de salud pública, junto con la prioridad de las mismas.

55 21A. Un sistema de soporte de medidas contra la malaria según la reivindicación 20A, en el que la información de pacientes infectados por malaria sobre parásitos de la malaria en la zona endémica de malaria se obtiene identificando la presencia o ausencia de infección por el género *Plasmodium* utilizando un conjunto de cebadores según la reivindicación 1A y/o un procedimiento de detección según la reivindicación 6A, o el kit de detección del género *Plasmodium* según la reivindicación 19A.

22A. Un sistema de soporte de medidas contra la malaria que comprende:

60 unos medios para introducir y almacenar información de agentes terapéuticos para la malaria para especificar un agente terapéutico para la malaria que actúa sobre la infección por una o una pluralidad de cuatro especies de parásitos de la malaria;

65 unos medios de introducción de información de pacientes para introducir y almacenar información de pacientes incluyendo información sobre el patógeno de infección por malaria en un paciente con fiebre en una zona endémica de malaria;

unos medios de introducción de información de pacientes para introducir y almacenar información de pacientes incluyendo información sobre el patógeno de infección por malaria en un paciente con fiebre en una zona no endémica de malaria;

5 una base de datos de guía de tratamiento en la que, según índices de eficacia frente a parásitos de la malaria detectados en un sujeto, se introduce información de selección de agentes terapéuticos para la malaria junto con una prioridad que indica a qué agente terapéutico para la malaria se le debe dar prioridad en la selección para su utilización frente a los parásitos de la malaria;

10 una sección de extracción de agentes terapéuticos para la malaria que extrae, según la información sobre el patógeno de infección por malaria en el sujeto, agentes terapéuticos para la malaria que deben administrarse y la prioridad de los mismos, de la base de datos de guía de tratamiento; y

15 una sección de visualización de agentes terapéuticos para la malaria que presenta visualmente los agentes terapéuticos para la malaria extraídos en la sección de extracción de agentes terapéuticos para la malaria anterior, junto con la prioridad de los mismos.

20 23A. Un sistema de soporte de medidas contra la malaria según la reivindicación 22A, en el que la información sobre el patógeno de infección por malaria en un paciente con fiebre se obtiene identificando la infección por una o una pluralidad de cuatro especies de parásitos de la malaria utilizando un conjunto de cebadores según cualquiera de las reivindicaciones 2A a 5A y/o un procedimiento para identificar el género *Plasmodium*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* o *Plasmodium ovale* según cualquiera de las reivindicaciones 13A a 17A, o un kit de detección según la reivindicación 18A o 19A.

25 24A. Un sistema de soporte de medidas contra la malaria en el que se llevan a cabo en combinación una medida de salud pública referente a una medida contra la malaria y una medida de tratamiento de parásito de la malaria referente a una medida contra la malaria;

30 comprendiendo la medida de salud pública:

unos medios para introducir y almacenar información de pacientes infectados por malaria incluyendo el número de positivos para el género *Plasmodium* que provocan malaria en una zona endémica de malaria, y la tasa de portadores en la zona;

35 una base de datos de guía de medidas de salud pública de prevención de la infección por malaria que especifica medidas de salud pública para la zona endémica de malaria basándose en la información de pacientes infectados por malaria, base de datos en la que se ha introducido información de selección de medidas de salud pública para una zona infectada por parásitos de la malaria que debe introducirse junto con una prioridad de medidas que indica a cuál de las medidas de salud pública se le debe dar prioridad en la selección;

40 una sección de extracción de medidas de salud pública que extrae medidas de salud pública para la zona endémica infectada por malaria y la prioridad de las mismas, a partir de la base de datos de guía de medidas de salud pública de prevención de la infección por malaria según información de pacientes infectados por malaria sobre parásitos de la malaria en el sujeto; y

45 una sección de visualización de medidas de salud pública que presenta visualmente las medidas de salud pública extraídas en la sección de extracción de medidas de salud pública, junto con la prioridad de las mismas; y

50 comprendiendo la medida de tratamiento de parásito de la malaria:

unos medios para introducir y almacenar información de agentes terapéuticos para la malaria para especificar un agente terapéutico para la malaria que actúa sobre la infección por una o una pluralidad de cuatro especies de parásitos de la malaria;

55 unos medios de introducción de información de pacientes para introducir y almacenar información de pacientes incluyendo información sobre el patógeno de infección por malaria en un paciente con fiebre en la zona endémica de malaria;

60 unos medios de introducción de información de pacientes para introducir y almacenar información de pacientes incluyendo información sobre el patógeno de infección por malaria en un paciente con fiebre en una zona no endémica de malaria;

65 una base de datos de guía de tratamiento en la que, según índices de eficacia frente a parásitos de la malaria detectados en una muestra, se introduce información de selección de agentes terapéuticos para la malaria junto con una prioridad que indica a qué agente terapéutico para la malaria se le debe dar prioridad en la selección

para su utilización frente a los parásitos de la malaria;

una sección de extracción de agentes terapéuticos para la malaria que extrae, según la información sobre el patógeno de infección por malaria en el sujeto, agentes terapéuticos para la malaria que deben administrarse y la prioridad de los mismos, a partir de la base de datos de guía de tratamiento; y

una sección de visualización de agentes terapéuticos para la malaria que presenta visualmente los agentes terapéuticos para la malaria extraídos en la sección de extracción de agentes terapéuticos para la malaria anterior, junto con la prioridad de los mismos.

25A. Un sistema de soporte de medidas contra la malaria según la reivindicación 24A, en el que la información de pacientes infectados por malaria sobre parásitos de la malaria en la zona endémica de malaria se obtiene identificando la presencia o ausencia de infección por el género *Plasmodium* utilizando un conjunto de cebadores según la reivindicación 1A y/o un procedimiento de detección según la reivindicación 6A, o el kit de detección del género *Plasmodium* según la reivindicación 19A; y/o se obtiene información sobre el patógeno de infección por malaria en un paciente con fiebre identificando la infección por una o una pluralidad de cuatro especies de parásitos de la malaria utilizando un conjunto de cebadores según cualquiera de las reivindicaciones 2A a 5A y/o un procedimiento para identificar el género *Plasmodium*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* o *Plasmodium ovale* según cualquiera de las reivindicaciones 13A a 17A, o un kit de detección según la reivindicación 18A o 19A.

26A. Un sistema de medidas de prevención de la infección por malaria para personas que planean viajar a una zona endémica de malaria, comprendiendo el sistema:

unos medios para obtener el estado de la implementación de medidas de salud pública en la zona endémica de malaria, información sobre los patógenos de infección por malaria en la zona endémica, y el estado del tratamiento de pacientes infectados, a partir del sistema de soporte de medidas contra la malaria según la reivindicación 24A;

unos medios para seleccionar un agente profiláctico/terapéutico para la malaria a partir de una base de datos de guía de tratamiento para parásitos de la malaria; y

unos medios para administrar el agente seleccionado antes de viajar.

27A. Un sistema de medidas de prevención/tratamiento de la infección por malaria para personas que vuelven de una zona endémica de malaria, comprendiendo el sistema:

unos medios para obtener el estado de la implementación de medidas de salud pública en la zona endémica de malaria, información sobre los patógenos de infección por malaria en la zona endémica, y el estado del tratamiento de pacientes infectados;

unos medios para seleccionar un agente profiláctico/terapéutico para la malaria a partir de una base de datos de guía de tratamiento para parásitos de la malaria; y

unos medios para administrar el agente seleccionado tras volver de la zona endémica de malaria, según el punto 24.

28A. Un sistema de medidas de prevención/tratamiento de la infección por malaria según la reivindicación 27A, en el que, cuando una persona que vuelve de la zona endémica de malaria presenta fiebre, se realiza una identificación de *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* o *Plasmodium ovale* para seleccionar y administrar un agente terapéutico para la malaria al que se le debe dar prioridad en la selección.

Aplicabilidad industrial

El procedimiento para detectar/identificar más de una de las cuatro especies de parásitos de la malaria utilizando LAMP desarrollado por los presentes inventores presenta una mayor sensibilidad y mayor especificidad que la microscopía, y puede detectar/identificar los parásitos de *Plasmodium* en muestras más fácilmente y en un periodo de tiempo más corto que PCR. Además, puesto que el procedimiento es económico, es muy útil para el diagnóstico clínico de la malaria y la actividad de control en zonas endémicas de malaria con pocas instalaciones.

Texto libre de la lista de secuencias

Se alinearon las secuencias de ARNr de 18S de cuatro especies de *Plasmodium*, *P. falciparum* (n.º de registro de GenBank M19172), *P. vivax* (n.º de registro de GenBank U03079 o X13926), *P. malariae* (n.º de registro de GenBank M54897) y *P. ovale* (n.º de registro de GenBank L48987), para su comparación.

Listado de secuencias

<110> EHIME UNIVERSITY, OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.

- 5 <120> Cebadores para detectar *Plasmodium*
 <130> P08-38
- 10 <150> \201 JP2007-140525
 <151> \201 28-05-2007
 <160> 42
 <170> PatentIn versión 3.4
- 15 <210> 1
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 20 <220>
 <223> Cebador para detectar el género *Plasmodium* (F3)
 <400> 1
- 25 gtatcaatcg agtttctgac c 21
- <210> 2
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 30 <220>
 <223> Cebador para detectar el género *Plasmodium* (B3c)
 <400> 2
- 35 cttgtcacta cctctctct 20
- 40 <210> 3
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 45 <220>
 <223> Cebador para detectar el género *Plasmodium* (FIP(F1c-F2))
 <400> 3
- 50 tcgaactcta attccccggt acctatcagc tttgatggt aggg 45
- <210> 4
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 55 <220>
 <223> Cebador para detectar el género *Plasmodium* (BIP(B1-B2c))
- 60 <400> 4
- cggagagga gcctgagaaa tagaattggg taatttacgc g 41
- 65 <210> 5
 <211> 20
 <212> ADN

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Cebador para detectar el género <i>Plasmodium</i> (LPF)	
	<400> 5	
	cgtcatagcc atgttaggcc	20
10	<210> 6	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador para detectar el género <i>Plasmodium</i> (LPB)	
	<400> 6	
20	agctaccaca tctaaggaag gcag	24
	<210> 7	
	<211> 24	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador para detectar <i>Plasmodium falciparum</i> (F3)	
30	<400> 7	
	tgtaattgga atgataggaa tta	24
	<210> 8	
35	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Cebador para detectar <i>Plasmodium falciparum</i> (B3c)	
	<400> 8	
45	gaaaacctta tttgaacaa agc	23
	<210> 9	
	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Cebador para detectar <i>Plasmodium falciparum</i> (FIP(F1 c-F2))	
	<400> 9	
55	agctggaatt accgcggtg ggttcctaga gaaacaattg g	41
	<210> 10	
	<211> 45	
60	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador para detectar <i>Plasmodium falciparum</i> (BIP(BI-B2c))	
65	<400> 10	

ES 2 542 407 T3

	tggtgcagtt aaaacgttgc tagcccaaac cagtttaaat gaaac	45
5	<210> 11 <211> 16 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador para detectar <i>Plasmodium falciparum</i> (LPF)	
	<400> 11	
15	gcaccagact tgcct	16
20	<210> 12 <211> 15 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador para detectar <i>Plasmodium falciparum</i> (LPB)	
	<400> 12	
25	ttgaatatta aagaa	15
30	<210> 13 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Cebador para detectar <i>Plasmodium vivax</i> (F3)	
	<400> 13	
40	ggaatgatgg gaattaaaa cct	23
45	<210> 14 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador para detectar <i>Plasmodium vivax</i> (B3c)	
	<400> 14	
50	acgaagtatc agttatgtgg at	22
55	<210> 15 <211> 42 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador para detectar <i>Plasmodium vivax</i> (FIP(F1c-F2))	
60	<400> 15	
	ctattggagc tggaaftacc gctcccaaaa ctcaattgga gg	42
65	<210> 16 <211> 41 <212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Cebador para detectar <i>Plasmodium vivax</i> (BIP(B1-B2c))	
	<400> 16	
	aattgttgca gttaaaacgc tcgtaagcta gaagcgttgc t	41
10	<210> 17	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador para detectar <i>Plasmodium vivax</i> (LPF)	
	<400> 17	
20	gctgctggca ccagactt	18
	<210> 18	
	<211> 20	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador para detectar <i>Plasmodium vivax</i> (LPB)	
30	<400> 18	
	agttgaattt caaagaatcg	20
	<210> 19	
35	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Cebador para detectar <i>Plasmodium malariae</i> (F3)	
	<400> 19	
	caaggccaaa ttttggtt	18
45	<210> 20	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Cebador para detectar <i>Plasmodium malariae</i> (B3c)	
	<400> 20	
55	cggttattct taactaca	19
	<210> 21	
	<211> 42	
60	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador para detectar <i>Plasmodium malariae</i> (FIP(F1c-F2))	
65	<400> 21	

	tattggagct ggaattaccg cgatgatggg aatttaaacc ct	42
5	<210> 22 <211> 45 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador para detectar <i>Plasmodium malariae</i> (BIP(B1-B2c)) <400> 22	
15	aattgttga gtaaaacgc ctatgtata aatatacaaa gcatt	45
20	<210> 23 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Cebador para detectar <i>Plasmodium malariae</i> (LPF) <400> 23	
30	gccctccaat tgccttctg	19
35	<210> 24 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Cebador para detectar <i>Plasmodium malariae</i> (LPB) <400> 24	
45	tcgtagtga attcaagga atca	24
50	<210> 25 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Cebador para detectar <i>Plasmodium ovale</i> (F3) <400> 25	
60	ggaatgatgg gaatttaaaa cc	22
65	<210> 26 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador para detectar <i>Plasmodium ovale</i> (B3c) <400> 26	
	gaatgcaaag aacagatagc t	21
	<210> 27 <211> 43 <212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Cebador para detectar <i>Plasmodium ovale</i> (FIP(F1c-F2))	
	<400> 27	
	tattggagct ggaattaccg cgttcccaaa attcaattgg agg	43
10	<210> 28	
	<211> 47	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador para detectar <i>Plasmodium ovale</i> (BIP(B1-B2c))	
	<400> 28	
20	gttgcagtta aaacgctcgt agtgattgt ctaagcatct tatagca	47
	<210> 29	
	<211> 18	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador para detectar <i>Plasmodium ovale</i> (LPF)	
30	<400> 29	
	tgctggcacc agacttc	18
	<210> 30	
35	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Cebador para detectar <i>Plasmodium ovale</i> (LPB)	
	<400> 30	
	tgaatttcaa agaatcaa	18
45	<210> 31	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Cebador para detectar <i>Plasmodium vivax</i> (PvFIP-9 (F1c+F2))	
	<400> 31	
55	cgctattgga gctggaatac tcaattggag ggc	33
	<210> 32	
	<211> 39	
60	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador para detectar <i>Plasmodium vivax</i> (PvBIP-9 (B1+B2c))	
65	<400> 32	

	aattgttgca gttaaaacga ttaagctaga agcgttgct	39
5	<210> 33 <211> 16 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador para detectar <i>Plasmodium vivax</i> (PvF3-9) <400> 33	
15	tttaaacct tcccaa	16
20	<210> 34 <211> 17 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Cebador para detectar <i>Plasmodium vivax</i> (PvB3c-9) <400> 34	
30	aagtatcagt tatgtgg	17
35	<210> 35 <211> 15 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Cebador para detectar <i>Plasmodium vivax</i> (PvLPF-9) <400> 35	
45	gctggcacca gactt	15
50	<210> 36 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Cebador para detectar <i>Plasmodium vivax</i> (PvLPB-9) <400> 36	
60	ctcgtagttg aattcaaag	20
65	<210> 37 <211> 32 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador para detectar <i>Plasmodium vivax</i> (PvFIP-7 (F1c+F2)) <400> 37	
	ctggaattac cgcggtcct tccc aaaact ca	32
	<210> 38 <211> 39 <212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador para detectar <i>Plasmodium vivax</i> (PvBIP-7 (BI+B2c))	
5	<400> 38	
	ccaatagcgt atattaaaat tgttgctaga agcgttgct	39
10	<210> 39	
	<211> 16	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador para detectar <i>Plasmodium vivax</i> (PvF3-7)	
	<400> 39	
20	tggaatgatg ggaatt	16
	<210> 40	
	<211> 18	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador para detectar <i>Plasmodium vivax</i> (PvB3c-7)	
30	<400> 40	
	gtatcagtta tgtggatt	18
	<210> 41	
35	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Cebador para detectar <i>Plasmodium vivax</i> (PvLPF-7)	
	<400> 41	
45	accagacttg ccctccaat	19
	<210> 42	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Cebador para detectar <i>Plasmodium vivax</i> (PvLPB-7)	
	<400> 42	
55	gcagttaaaa cgctcgtagt tga	23

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para detectar o identificar una infección con más de una de entre *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* y *Plasmodium ovale* en una muestra; comprendiendo el procedimiento las siguientes etapas (a) a (c):
- 5 a) extraer ADN de la muestra;
- 10 b) amplificar una región particular de una secuencia de gen de ARNr 18S de *Plasmodium* haciendo reaccionar el ADN extraído en la etapa (a) en una mezcla de reacción que contiene una ADN polimerasa de desplazamiento de hebra y un conjunto de cebadores específicos de secuencia; y
- 15 c) detectar o identificar la presencia o ausencia de un producto amplificado de más de una de entre *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* y *Plasmodium ovale*, amplificado en la etapa (b), siendo el conjunto de cebadores específicos de secuencia más de uno de entre:
- 20 un conjunto de cebadores que comprende un conjunto de oligonucleótidos que contiene secuencias de ácido nucleico representadas por SEC ID nº: 7 a 12 para amplificar una región particular de una secuencia de gen de ARNr 18S de *Plasmodium falciparum*,
- 25 un conjunto de cebadores que comprende un conjunto de oligonucleótidos que contiene secuencias de ácido nucleico representadas por SEC ID nº: 13 a 18, SEC ID nº: 31 a 36 o SEC ID nº: 37 a 42 para amplificar una región particular de una secuencia de gen de ARNr 18S de *Plasmodium vivax*,
- 30 un conjunto de cebadores que comprende un conjunto de oligonucleótidos que contiene secuencias de ácido nucleico representadas por SEC ID nº: 19 a 24 para amplificar una región particular de una secuencia de gen de ARNr 18S de *Plasmodium malariae*, y
- un conjunto de cebadores que comprende un conjunto de oligonucleótidos que contiene secuencias de ácido nucleico representadas por SEC ID nº: 25 a 30 para amplificar una región particular de una secuencia de gen de ARNr 18S de *Plasmodium ovale*.
2. Procedimiento de detección o identificación según la reivindicación 1, en el que la extracción del ADN de la muestra se lleva a cabo sometiendo a ebullición la muestra que contiene el ADN, y realizando una centrifugación.
- 35 3. Procedimiento de detección o identificación según la reivindicación 2, en el que el tiempo de ebullición es de varios minutos a diez y varios minutos.
- 40 4. Procedimiento de detección o identificación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que, en la etapa (b) de amplificación de una región particular de una secuencia de gen de ARNr 18S de *Plasmodium*, la reacción de amplificación del ADN se realiza a aproximadamente 60°C durante aproximadamente 1 hora utilizando un baño de agua a temperatura constante o un amplificador especialmente diseñado para LAMP.
- 45 5. Procedimiento de detección o identificación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que, en la etapa (c), se detecta o se identifica la presencia o ausencia de un producto de amplificación de más de una de entre *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* y *Plasmodium ovale* utilizando observación visual o un turbidímetro en tiempo real.
- 50 6. Procedimiento de detección o identificación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que se realiza en una zona endémica de malaria.
7. Procedimiento de detección o identificación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que se detectan o se identifican infecciones con más de una de entre *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* y *Plasmodium ovale* simultáneamente.
- 55 8. Kit de detección para más de una de entre *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*; que comprende más de uno de un conjunto de cebadores seleccionado de entre los conjuntos de cebadores definidos en la reivindicación 1, una ADN polimerasa de desplazamiento de hebra, dNTP y un tampón de reacción.
- 60 9. Kit de detección según la reivindicación 8, en el que el kit de detección detecta más de una de entre *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*.

Fig. 2

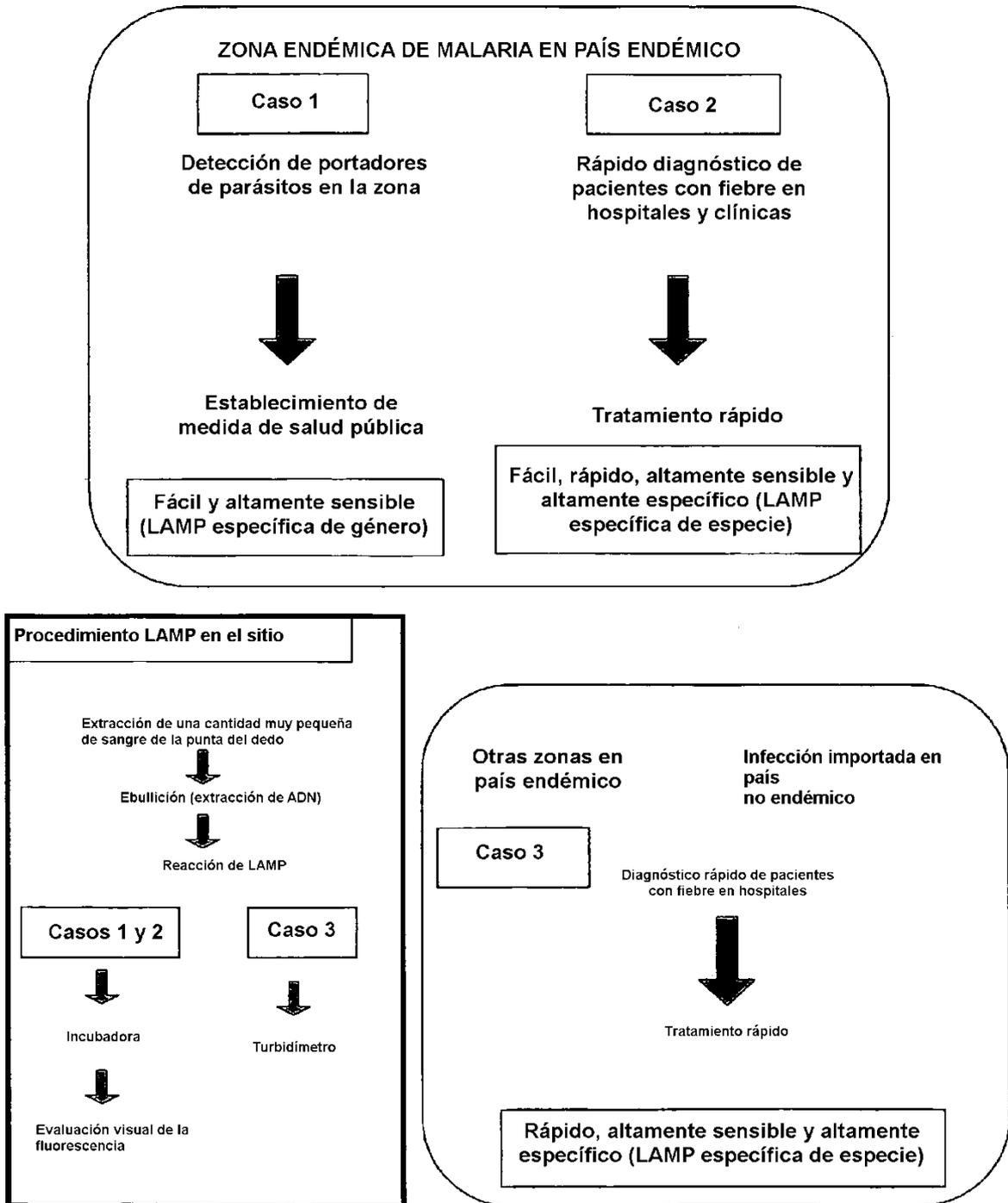


Fig. 3

