

**DIAGNÓSTICO DE MALARIA GESTACIONAL POR REACCION EN CADENA DE LA
POLIMERASA EN TIEMPO REAL Y CUANTITATIVA**

YURANY PATRICIA BLANQUICETH MELENDEZ

ASESOR:

MAURICIO CORREDOR RODRIGUEZ, Biólogo, MSc, PhD

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

MEDELLÍN

2013

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a los profesores Mauricio Corredor y Oscar Murillo por haberme brindado la oportunidad de formarme y haber depositado su confianza en mi trabajo.

A la profesora Amanda Maestre y al profesor Jaime Carmona, a los estudiantes Olga María Agudelo, María Isabel Arroyo del grupo salud y comunidad por su colaboración con las muestras y aportes en todas las fases de la elaboración de este trabajo.

Al pregrado de Biología de la Universidad de Antioquia por la formación académica brindada.

Al grupo de Inmunovirología por brindarme el espacio y los equipos del laboratorio para el desarrollo de mi trabajo de investigación.

Al CONADI de la Universidad Cooperativa de Colombia por financiar una parte de este proyecto.

Al Dr. Luis Payan por su colaboración en la toma y envío de muestras de Tumaco.

A Carolina Montoya y Wbeimar Aguilar por capacitarme en las técnicas de PCR convencional y qPCR.

A los grupos: Genética y Sociedad, Gebiomic y Salud Comunidad.

A mis amigas de la U, Moni y Leydy por brindarme su amistad y compartir muy buenos momentos.

A mis amigos del laboratorio: Dani, Lanie, Kim, Camilo, Jhannyer, Gerónimo y Andrés por acompañarme durante todo este proceso y facilitar mi estadía allí.

A Adrián, mi amor, gracias porque cada día me inspiras a ser una mejor persona y por ser mi gran apoyo durante todos estos años que hemos compartido juntos.

A mi familia que es mi más grande tesoro, gracias, porque todos mis logros se los debo a ustedes.

TABLA DE CONTENIDO	Página
AGRADECIMIENTOS	1
LISTA DE TABLAS	6
LISTA DE FIGURA	7
LISTA DE GRAFICAS	8
RESUMEN	10
MARCO TEÓRICO	11
La malaria	11
Clínica	13
Epidemiología de la malaria	13
Epidemiología de la malaria gestacional	16
Malaria gestacional y placentaria	18
Complicaciones por malaria durante la gestación	20
Tratamiento de la malaria durante el embarazo	20
Diagnostico por gota gruesa	21
Diagnostico por PCR convencional	21
Diagnostico por PCR en tiempo real	22

FORMULACION DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	23
OBJETIVO GENERAL	25
OBJETIVOS ESPECIFICOS	25
METODOLOGÍA	25
Tipo de estudio	25
Área de estudio	25
Población de estudio	27
Muestras para el estudio	27
Criterios de inclusión y exclusión	27
Recolección de las muestras	31
Análisis de gota gruesa	32
Extracción de ADN	32
Diseño de oligonucleotidos	32
PCR convencional	34
Clonación de genes para cuantificar ADN del parasito presente en las muestras	35
Obtención de transformantes	35
Selección de colonias transformantes de <i>E.coli</i> BL21 y purificación del plásmido	36

Pureza y concentración del ADN plásmidico	36
Curvas de calibración para qPCR	37
PCR en tiempo real (qPCR)	37
Determinación de la parasitemía por medio de las curvas estándar	37
Análisis estadístico	38
Consideraciones éticas	39
RESULTADOS	39
Muestras y población de estudio	39
Gota gruesa	40
PCR convencional	44
Obtención de transformantes	48
Clonación	49
PCR en tiempo real	50
Determinación de la parasitemia por medio de las curvas estándar	55
Análisis de EPIDAT	58
Análisis de PRISM	59
DISCUSIÓN	61

CONCLUSIONES	64
RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS	65
BIBLIOGRAFÍA	66
ANEXOS	73

LISTA DE TABLAS	Página
Tabla 1. Estimación de la OMS del número de casos de malaria y las muertes en 2010	14
Tabla 2. Casos de malaria por especie parasitaria según departamento de procedencia	16
Tabla 3. Estudios de malaria gestacional en América Latina, 1993-2004	17
Tabla 4. Caracterización de los pacientes del estudio	27
Tabla 5. Lista de oligonucleótidos utilizados en este estudio	33
Tabla 6. Resultados del análisis de gota gruesa	41
Tabla 7. Resultados de PCR convencional	45
Tabla 8. Cuantificación de las parasitemias analizadas por qPCR	55
Tabla 9. Resultados de EPIDAT	59

LISTA DE FIGURAS	Página
Figura 1. Ciclo de vida de <i>Plasmodium spp</i>	12
Figura 2. Distribución de los casos de malaria por municipio y especie parasitaria	15
Figura 3. Activación del sistema inmune: un mediador crítico de los resultados adversos fetales en malaria placentaria	19
Figura 4. Potenciales mecanismos patogénicos que afectan la placenta causando bajo peso al nacer	19
Figura 5. Departamentos en los que se realizó el estudio	26
Figura 6. Gel de PCR convencional correspondiente a 2 muestras positivas para <i>P. vivax</i>	47
Figura 7. Gel de PCR convencional correspondiente a 9 muestras positivas para <i>P. falciparum</i>	48
Figura 8. Colonias de <i>E. coli</i> transformadas con el plásmido pJET 1.2/blunt + fragmento 103 pb 18S rRNA	48
Figura 9. Gel de PCR para verificar fragmento clonado de <i>P. falciparum</i>	49
Figura 10. Gel de PCR para verificar fragmento clonado de <i>P. vivax</i>	50

LISTA DE GRAFICAS	Página
Grafica 1. Población de estudio	40
Grafica 2. Densidad parasitaria diagnosticada por gota gruesa	44
Grafica 3. Perfiles de amplificación por qPCR, para 4 muestras de Puerto Libertador positivas para <i>P. falciparum</i>	51
Grafica 4. Perfiles de amplificación para 4 muestras de Tumaco positivas para <i>P. falciparum</i>	51
Grafica 5. Perfiles de amplificación para 3 muestras de Turbo positivas para <i>P.falciparum</i>	52
Grafica 6. Curva estándar para cuantificación de ADN de <i>P. falciparum</i>	52
Grafica 7. Perfiles de amplificación para 4 muestras de Puerto Libertador positivas para <i>P. vivax</i>	53
Grafica 8. Perfil de amplificación para la muestra de Tumaco positiva para <i>P. vivax</i>	53
Grafica 9. Perfil de amplificación para la muestras de Turbo positiva para <i>P. vivax</i> .	54
Grafica 10. Curva estándar para cuantificación de ADN de <i>P. vivax</i>	54
Grafica 11. Densidad parasitaria determinada por qPCR	58
Grafica 12. Comparación de las parasitemias obtenidas por gota gruesa entre gestantes y no gestantes	60
Grafica 13. Comparación de las parasitemias obtenidas por qPCR entre gestantes y no gestantes	60

RESUMEN

La malaria gestacional es una enfermedad que afecta a madres y fetos, siendo de complejo diagnóstico y de cuidado en el tratamiento, esta infección es frecuente en algunas zonas de Colombia como Antioquia, Córdoba y Nariño, por tal motivo este trabajo analiza 64 pacientes entre gestantes y no gestantes con y sin malaria de estas regiones; mediante técnicas microscópicas y moleculares; y la implementación con nuevos oligonucleótidos y una nueva región 18S clonada y usada para estandarizar la cuantificación.

El estudio demostró una mayor sensibilidad y especificidad de las pruebas moleculares con relación a la técnica de gota gruesa; además de la determinación de la parasitemia por qPCR; se destacó el diagnóstico de dos casos de infección con *P. falciparum*, y una infección mixta (*P. falciparum* - *P. vivax*) no identificadas por gota gruesa y el eficiente funcionamiento de los nuevos oligonucleótidos implementados. No es posible afirmar que gota gruesa es menos sensible que las pruebas moleculares, pero si es claro que con las pruebas moleculares se observa una excelente detección del parásito.

Es así, que este estudio, pretende implementar la qPCR para el diagnóstico de malaria gestacional en zonas endémicas, evaluando sus ventajas con relación a la técnica de gota gruesa y PCR convencional.

Palabras claves: malaria gestacional, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, gota gruesa, PCR en tiempo real cuantitativo.

MARCO TEÓRICO

La malaria

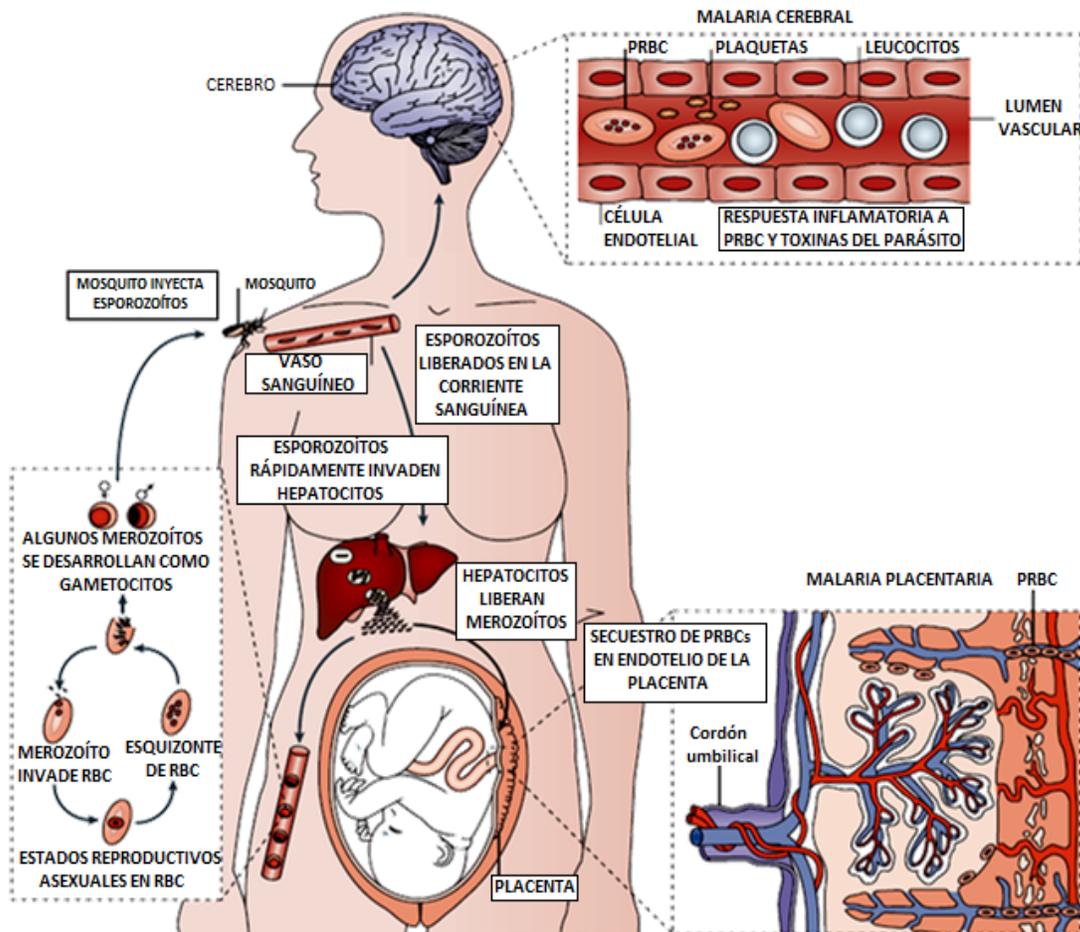
La malaria es una patología causada por algunas especies del parásito unicelular del género *Plasmodium*. Esta infección, representa un gran problema de salud pública en Colombia (OPS, 2010) y el mundo, debido a que es una de las enfermedades tropicales transmitida por vectores que causa mayor morbilidad y mortalidad (Pasapera *et al*, 2007).

La malaria en humanos puede ser causada por 5 especies: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* o *P. knowlesi* (Garcia *et al*, 2008). La malaria se inicia a partir de la picadura de un mosquito *Anopheles* hembra infectado, la cual inyecta los esporozoítos en el tejido subcutáneo del hospedero vertebrado y en menor porcentaje de casos directamente en el torrente sanguíneo; desde allí los esporozoítos viajan hasta el hígado, donde permanecen de 9 a 16 días. Existen evidencias de que los esporozoítos atraviesan varios hepatocitos antes de la invasión y el posterior desarrollo parasitario (Mota *et al*, 2001). Dentro del hepatocito, los esporozoítos se transformarán en decenas en miles de merozoítos, los cuales invadirán a los eritrocitos que se liberen desde el hígado. La enfermedad se inicia con la multiplicación asexual de los parásitos dentro de los hematíes (Payá y Carreras, 2002).

El ciclo asexual tiene una duración variable según el tipo de *Plasmodium*. Así en el *P. falciparum* es de 36-48 horas, en el *P. vivax* y en el *P. ovale* de 48 horas y de 72 horas para el *P. malariae*. Tras un ciclo en el interior de los hematíes, el *Plasmodium* producirá 20 merozoítos por cada parásito maduro y cada uno de estos merozoítos podrá invadir otros eritrocitos, empezando un nuevo ciclo. Esto permite que el número de eritrocitos infectados aumente logarítmicamente. En los humanos, el tiempo del desarrollo eritrocítico puede ser entre 48 y 72 horas y el número de merozoítos por esquizonte varia de 8 a 32 dependiendo de la especie de *Plasmodium*. Un bajo porcentaje de merozoítos, se diferencian a formas sexuales, macro (hembra) y micro (macho) gametocitos, los cuales son ingeridos por un nuevo mosquito e inician el ciclo esporogónico. En el intestino medio del mosquito se lleva a cabo la exflagelación de los microgametocitos entre 30 y 60 minutos después de la alimentación y cada macrogameto recibirá un microgameto formando así el cigoto entre 1-8 horas después de la infección. Posteriormente, este se alarga y toma una forma vermiforme, en esta etapa se denomina ooquinetos y este

proceso se lleva a cabo entre 9 y 24 horas. El ooquineto penetra las células epiteliales que cubren el intestino medio y se localiza debajo de la lámina basal de la pared externa del intestino. Después, entre, 24 y 36 horas de la infección, se forma el ooquiste inmaduro. A los 7-8 días post-infección los ooquistes se encuentran maduros y liberan los esporozoítos, los cuales van al hemocele y por medio de la hemolinfa migran a las glándulas salivales. Cuando el mosquito se alimenta, los fluidos salivales que transportan los esporozoítos son inoculados por el mosquito en el hospedero para reiniciar el ciclo (Sinden, 1999) (Figura 1).

Figura 1. Ciclo de vida de *Plasmodium spp.*



Fuente: Adaptado, Schofield & Grau, 2005

Clínica

Las manifestaciones producidas por la malaria varían, desde las formas agudas (crisis), al desarrollo de la forma crónica. La forma aguda se produce en individuos no inmunes, por ejemplo en viajeros a zonas endémicas o en niños, siendo particularmente virulenta y conllevando la mayor morbilidad y mortalidad (Stevenson y Riley, 2004).

La patogénesis de malaria por *P. falciparum* es una de las más estudiadas por parásito, y muchos factores contribuyen a la gravedad de la enfermedad. Las altas cargas de parásitos combinadas con la habilidad única de los eritrocitos infectados para adherirse a las paredes del endotelio contribuyen a la oclusión de la microvasculatura y al deterioro metabólico como consecuencia de la acidosis; todo esto conduce a las manifestaciones clínicas de la malaria grave (síndrome de distrés respiratorio agudo, insuficiencia renal y malaria cerebral. Además una importante respuesta de citoquinas a las proteínas liberadas por el parásito durante la ruptura de los esquizontes puede contribuir a una respuesta clínica adversa (Suh *et al*, 2004).

La enfermedad causada por *P. vivax* es raramente mortal, excepto cuando existe algún tipo de inmunosupresión. No obstante es responsable de recaídas usualmente de 2-5 meses después de la infección, ocasionando una enfermedad crónica debilitante y postrante, que frecuentemente induce parasitemias persistentes que afectan al paciente en sus labores, dado que induce hipersomnias, malestar general, hipodinamia, astenia, hipoxia y anemia crónica. Rara vez se pueden presentar complicaciones, tales como síndrome de esplenomegalia tropical, que generalmente lleva a una ruptura espontánea del bazo y diversos desórdenes hematopoyéticos, principalmente relacionados con trombocitopenia secundaria a la respuesta inmune (Shulman y Dorman, 2003)

Epidemiología de la malaria

La malaria constituye uno de los mayores problemas de salud pública en el mundo, no solo por la alta morbilidad y mortalidad, sino porque también genera un gran impacto socio-económico en los países sub-tropicales y tropicales donde la enfermedad es altamente endémica. Cerca de 3.3 millones de personas - la mitad de la población mundial - están en riesgo de malaria. Según el *Informe mundial sobre el paludismo 2012* (OMS, 2012), En 2010, había alrededor de 219 millones de casos de malaria (con un

margen de incertidumbre de 154 millones a 289 millones) y un estimado de 660.000 muertes por malaria (con un margen de incertidumbre de 490.000 a 836.000) (Tabla 1). El aumento de las medidas de prevención y control han llevado a una reducción en las tasas de mortalidad por malaria en más de un 25% a nivel mundial desde 2000 y en un 33% en la Región de África (OMS, 2012)

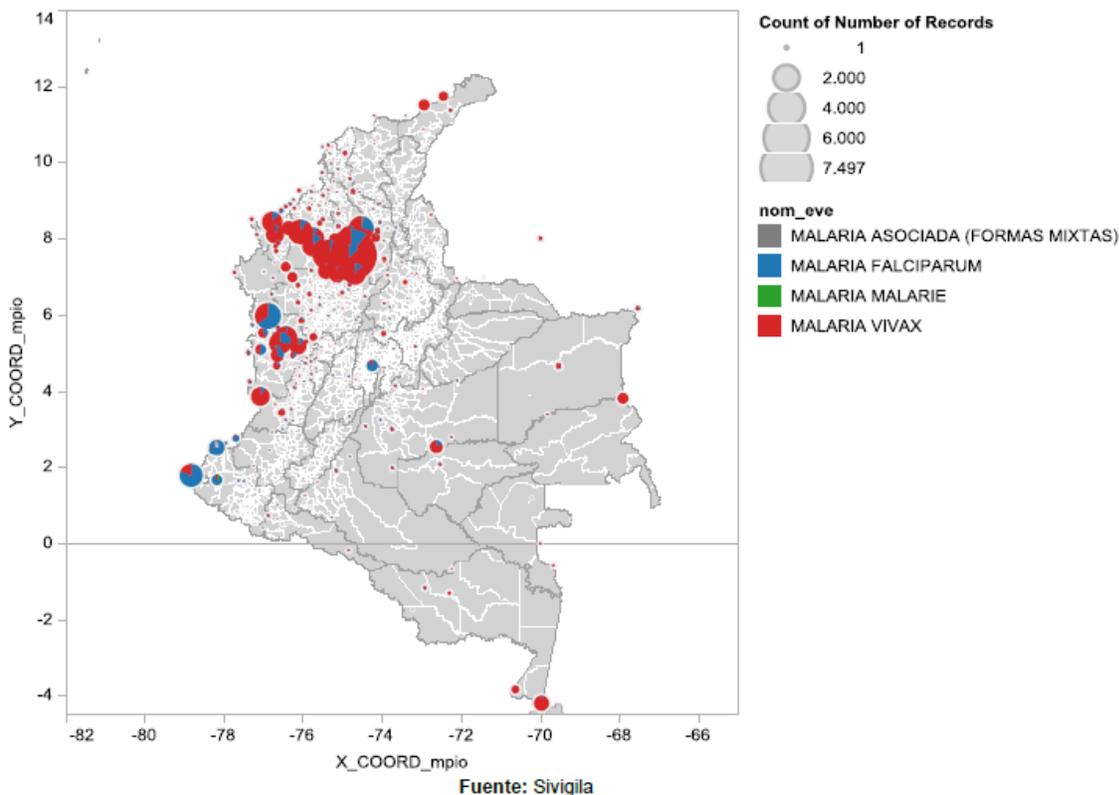
Tabla 1. Estimación de la OMS del número de casos de malaria y las muertes en 2010

Region	Estimated cases ('000s)				Estimated deaths			
	Estimate	Lower	Upper	% falciparum	Estimate	Lower	Upper	% <5
African	174 000	110 000	242 000	98%	596 000	429 000	772 000	91%
Region of the Americas	1 100	900	1 300	35%	1 100	700	1 800	29%
Eastern Mediterranean	10 400	6 400	16 600	83%	15 300	7 200	23 500	70%
European	0.2	0.2	0.2	–	0	0	0	–
South-East Asia	32 000	25 900	41 900	53%	43 000	31 100	60 300	32%
Western Pacific	1 700	1 300	2 100	79%	4 000	2 400	6 100	41%
World	219 000	154 000	289 000	90%	660 000	490 000	836 000	86%

Fuente: Reporte mundial de malaria OMS 2012.

En Colombia hasta la semana epidemiológica 49 de 2012 se han notificado al Sistema de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA) del Instituto Nacional de Salud, 54.973 casos de malaria, de los cuales 40.966 (74,5%) correspondieron a *P. vivax*, 13.395 (24,4%) a *P. falciparum*, 604 (1.31%) a la asociación y 8 (0,01) a *P. malariae*. De malaria complicada se han notificado 327 casos. Cabe resaltar que de las 14.852 mujeres en edad fértil (entre 10 y 54 años) que desarrollaron un cuadro de malaria, en el 5,43% de ellas se reportó que estaban embarazadas (SIVIGILA, 2012). La presentación de casos por municipio y especie se muestra en la figura 2.

Figura 2. Distribución de los casos de malaria por municipio y especie parasitaria.



Fuente: Boletín Epidemiológico Semana 49, SIVIGILA, Colombia 2012

Por departamento de procedencia a la semana epidemiológica 49 del 2012, Antioquia ha notificado el 43,3% de los casos, seguido por Chocó con 15,7%, Nariño con 12,2%, Córdoba con 9,8%, Bolívar con 6,7% de los casos. Estos cinco departamentos agrupan el 87,8% de casos notificados en el país (SIVIGILA, 2012). El total de casos de malaria notificados por departamento de procedencia hasta la semana epidemiológica 49 de 2012 se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Casos de malaria por especie parasitaria según departamento de procedencia

Entidad territorial de procedencia	Malaria asociada (Formas mixtas)	Malaria por <i>P. falciparum</i>	Malaria por <i>P. malariae</i>	Malaria por <i>P. vivax</i>	Total
Antioquia	143	1.862	2	21.820	23.827
Chocó	121	3.448		5.058	8.627
Nariño	4	6.223	2	484	6.713
Córdoba	19	506		4.882	5.407
Bolívar	188	590	1	2.908	3.687
Amazonas	3	41		1.216	1.260
Valle del Cauca	11	107		1.136	1.254
La Guajira		1		664	665
Risaralda	64	58		773	895
Guaviare	5	92		517	614
Cauca	11	318		57	386
Guainía	1	4		339	344
Meta	1	67		191	259
Vichada	14	21		201	236
Sucre	1	11		124	136
Santander	4	2		167	173
Exterior	2	11		70	83
Putumayo		9		59	68
Quindío	4	4		40	48
Norte de Santander				34	34
Caldas	2		1	24	27
Cesar		4		23	27
Tolima	1	1		16	18
Boyacá	1			21	22
Magdalena		1		21	22
Vaupés		1		44	45
Cundinamarca	1	5		19	25
Caquetá		3		15	18
Huila		2	1	8	11
Cartagena	3			7	10
Casanare		1		6	7
Santa Marta		1		8	9
Arauca				7	7
Atlántico			1	2	3
Bogotá		1		4	5
San Andrés				1	1
Total	604	13.395	8	40.966	54.973

Fuente: Sivigila

Fuente: Boletín Epidemiológico semana 49, SIVIGILA, Colombia 2012.

Epidemiología de la malaria gestacional

Cada año, cerca de 50 millones de mujeres embarazadas están expuestas a malaria en las áreas endémicas, tales como África, Oceanía, Asia, y Sur América (Desai *et al*, 2007, Steketee, Nahlen *et al*. 2001). En zonas de alta endemicidad de malaria el *P. falciparum* está implicado hasta en el 80% de los casos de malaria gestacional, sin embargo, en

zonas donde el *P. vivax* prevalece, solo el 40% de los casos de malaria en embarazadas son producidas por *P. falciparum* (Sholapurkar, Gupta et al. 1988).

Carmona *et al*, en 2009, mediante un meta análisis de los estudios realizados en América Latina (Tabla 3) reportan que dentro de los 7 estudios sobre malaria gestacional y congénita se evidenció alteraciones clínicas o de laboratorio en 4 de los estudios analizados con complicaciones por *P. falciparum* (Carmona-Fonseca y Maestre 2009).

Tabla 3. Estudios de malaria gestacional en América Latina, 1993-2004

Autor/año	CE (a)	Lugar, año	Malaria gestacional (MG)				Dato adicional
			Total casos	V% (b)	F% (b)	mt 10 ³ (c)	
Martínez 1998 ¹⁵	DR	Amazonia de Brasil, 1990-1996	168	14,4	85,6	0 V, 185 F	
Martínez 1998 ¹⁵	DC	Amazonia de Brasil, marzo-noviembre 1997	195	67,7	32,3	0	
Martínez, et al 2004 ¹⁶	DT	Manaos, Amazonia de Brasil, mar-nov 1997	195 con MG en 1699 malarías (12-41 años). Prevalencia 11,5%	82,5 mixta 0,07	16,8		Razón V:F 1:2,3 en embarazadas; 1:5,6 en no embarazadas
Jarude, et al 2003 ¹⁷	DP	Río Branco, Acre, Amazonia de Brasil, enero 1996-diciembre 2001	445 con MG en 33420 hospitalizadas, algunas con malaria y; en ellas, 445 embarazadas. Incidencia: 1,4%	52,8 mixta 3,4	43,8	2,2	Alteraciones clínicas y de laboratorio más frecuentes: en <i>P. falciparum</i> (p<0,05).
Padilla, et al 1997 ¹²	DP	Hospital Regional, Loreto, Amazonia de Perú	50	46	54		<i>P. falciparum</i> causó mayor riesgo de óbitos fetales, prematuridad, retardo del crecimiento intrauterino y muerte materna, sobre todo en primera gestación
García-Castro y Alfaro 1997 ¹³	DR	Hospital obstétrico, Guayaquil, Ecuador, 1990-1995	(d)				Complicaciones en MG: anemia, hipoglicemia, aborto, prematuridad. Mortalidad: 4%, las causas fueron encefalopatía y coma
González-Moncada, et al 1993 ¹⁴	DP	Hospital, Managua, diciembre 1992-noviembre 1993	(d)	83	17		Síntomas-signos MG: los mismos que en mujeres no embarazadas. Anemia: complicación más frecuente; 30% presentaron otras complicaciones graves.

(a) CE clase de estudio, DPC descriptivo prospectivo cohorte, DR descriptivo retrospectivo, DT descriptivo transversal, DP descriptivo prospectivo.

(b) V% porcentaje de casos de MG por *P. vivax*, F% porcentaje de casos de MG por *P. falciparum*

(c) Proporción o tasa de mortalidad por mil para MG.

(d) Solo fue posible obtener el resumen del artículo y allí no se informa el número de mujeres.

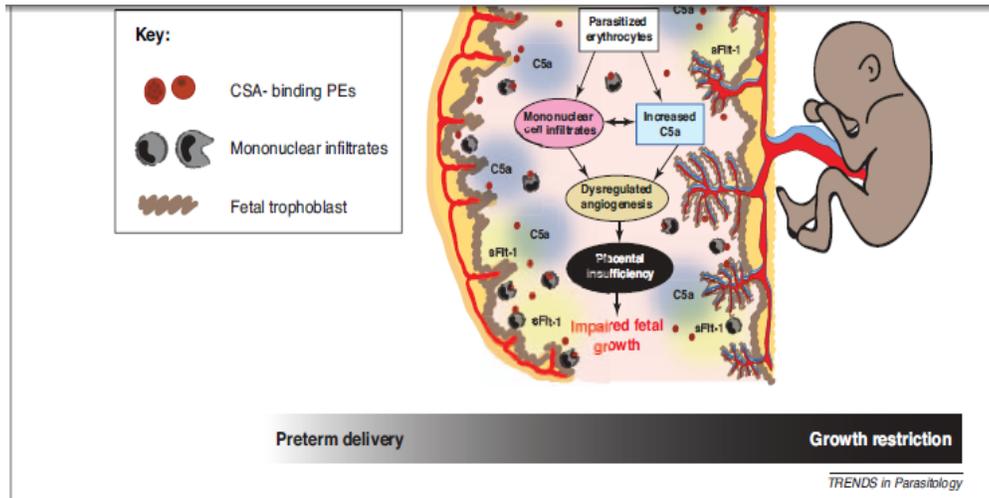
En Colombia son pocos los estudios publicados que abordan el tema. Un estudio realizado en Turbo, en 1986, presentó una tasa de 9% de Malaria Gestacional (MG) y 0,85% de Malaria Congénita (MC). En Bajo Cauca antioqueño se presentaron 40 casos de MG entre 1992 y 1994. En 2009, Carmona J. y Maestre A., refieren que entre los años 2005 y 2007, en donde se presentaron 220 casos de malaria gestacional en tres municipios de Urabá (Necoclí, Turbo, Carepa): 76% por *P. vivax*, 22% por *P. falciparum* y 2% de malaria mixta, 5 recién nacidos presentaron malaria congénita y 3 murieron (Carmona-Fonseca y Maestre, 2009).

Malaria gestacional y placentaria

Durante el embarazo se producen modificaciones fisiológicas en la gestante que permiten la tolerancia inmunitaria y la nutrición del feto, este estado de adaptación puede tener consecuencias como un déficit en hierro o en folato que se traducen en anemia, al mismo tiempo ocurre una inmunosupresión secundaria al embarazo (Cunningham *et al.* 1997), lo que produce una alta susceptibilidad a diversas infecciones entre ellas el paludismo (Menendez, 1995).

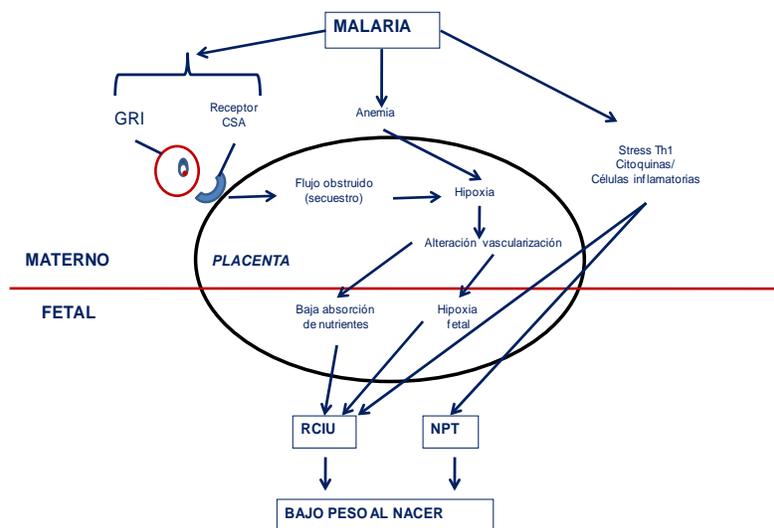
La malaria gestacional ha sido definida como la presencia de *Plasmodium* en sangre periférica materna y/o el hallazgo del parásito en la placenta (Brabin 1983), en esta los eritrocitos infectados con *P. falciparum* se adhieren específicamente al receptor (condroitin sulfato A, CSA) que se expresa en el sincitiotrofoblasto, llevando al secuestro de parásitos en el espacio intervelloso y produciendo otras complicaciones como la presencia de pigmento malárico en el sincitiotrofoblasto, el depósito fibrinoide intervelloso, la concentración de macrófagos en el espacio intervelloso y el engrosamiento de la lámina basal (Figura 3) (Conroy *et al.*, 2011). Todos estos eventos se asocian con una elevada morbilidad materna manifestada por anemia severa, hipoglicemia y malaria grave, así mismo con aumento en la morbimortalidad del producto de la gestación dada por abortos, mortinatos, bajo peso al nacer y malaria congénita (Figura 4) (Suguitan, Leke *et al.* 2003) (Tako, Zhou *et al.* 2005).

Figura 3. Activación del sistema inmune: un mediador crítico de los resultados adversos fetales en malaria placentaria



Fuente: Conroy *et al*, 2011.

Figura 4. Potenciales mecanismos patogénicos que afectan la placenta causando bajo peso al nacer



Fuente: Adaptado, Rogerson S., *et al.*, 2007

Complicaciones por malaria durante la gestación

En las mujeres embarazadas la malaria desencadena las mismas manifestaciones que se presentan en la población general como lo son fiebre, escalofrío y sudoración, aunque estas además pueden sufrir de anemia. En las zonas de paludismo con baja e irregular transmisión, donde se presentan epidemias, las mujeres tienen un bajo nivel de inmunidad adaptativa específica, cada infección parasitaria puede resultar en un acceso febril y se puede presentar malaria severa (Nosten *et al*, 2004). Por el contrario, en zonas de paludismo estable, es decir, transmisión elevada, se observan pocos accesos febriles y muy pocos casos de malaria severa, debido a la inmunidad adquirida de las mujeres embarazadas (Steketee, Wirima *et al*, 1996).

Dentro de las complicaciones que tiene la malaria para el feto se ha observado que en zonas palúdicas inestables, la enfermedad en el embarazo es asociada a una tasa elevada de abortos y de mortinatos; fenómeno menos frecuente en zonas de transmisión estable. Durante el embarazo, la mayoría de las infecciones palúdicas con parasitemias periféricas, conducen a que las placentas contengan una gran cantidad de glóbulos rojos parasitados. Las primigestantes son las más expuestas a las infecciones palúdicas por *P. falciparum* y las madres que dan a luz por las 2 o 3 primeras veces a las infecciones por *P. vivax* (Nosten y McGready, 2003). En todas las regiones palúdicas, la malaria durante el embarazo se acompaña de una importante reducción del peso al nacer de los niños; esta importante tasa de bajo peso al nacer (< 2500 g) tiene una doble causa: aumento de nacimientos prematuros y sobretodo retardo del crecimiento intrauterino ligado a la infección palúdica placentaria, además de la reducción del transporte de oxígeno y nutrientes (Khattab *et al*, 2012).

Tratamiento de la malaria durante el embarazo

Es necesario conocer aquellos medicamentos de menor efecto para la madre y el feto, la fármaco resistencia, su uso en el tratamiento y su papel en la quimioprofilaxis. Entre los medicamentos más frecuentemente usados están:

- La Cloroquina y Amodiaquina: 4-aminoquinolinas, no se les ha encontrado ninguna acción teratogénica o abortiva (Orozco RC, 1997; OMS, 1999).

- La quinina y quinidina: son ampliamente usados durante el embarazo en malaria grave. Debe administrarse con precaución dada la posibilidad de producir hipoglicemia y efectos cardiodepresores (WHO, 2000).
- La mefloquina, se recomienda usar durante el segundo y tercer trimestre de embarazo y en esquemas de quimioprofilaxis. Han sido descritas alteraciones neuropsiquiátricas, desde estados de ansiedad hasta cuadros psicóticos y convulsiones (OMS, 1999).
- La primaquina, es un medicamento usado para el tratamiento de las fases hepáticas de *P. vivax* y el *P. ovale* y como gametocida de *P. falciparum*. Su uso durante el embarazo está contraindicado de manera absoluta debido a la deficiencia relativa de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa en el feto que implicaría procesos hemolíticos (Fletcher, 1981).

Diagnostico por gota gruesa

El diagnóstico de la malaria se ha realizado, durante años, utilizando métodos clásicos de microscopía como la gota gruesa, que es una metodología sencilla de realizar, económica, rápida, que permite la identificación de la especie del parásito. Bajo condiciones óptimas, la sensibilidad de la gota gruesa detecta entre 10 a 30 parásitos por microlitro de sangre, lo que, aproximadamente, equivale a 0,001% de glóbulos rojos infectados (Montoya *et al*, 2008). Por otra parte, se requiere de personal capacitado, particularmente cuando las parasitemias son bajas ya que es posible obtener resultados falsos-negativos. Las limitaciones de esta técnica hacen cada vez más necesario la implementación de nuevos métodos, como los moleculares, debido a lo poco eficientes y específicos de estos diagnósticos en algunos casos (Lima *et al*, 2011)

Diagnostico por PCR convencional

Dentro de las alternativas diagnósticas moleculares para las especies de *Plasmodium* se han empleado métodos serológicos y de identificación de ácidos nucleicos (PCR). La PCR se basa en la amplificación de secuencias blanco de ADN. Esta técnica se ha realizado en varios lugares para el diagnóstico de rutina o para evaluar el rendimiento de la microscopía o *RDT* (Test de diagnóstico rápido) (Campos *et al*, 2011; Mohammad *et al*,

2011; Singh *et al*, 2010). Su valor radica en la alta sensibilidad, ya que detecta de 3 a 4 parásitos por μL de sangre (0,0005% a 0,0015% de glóbulos rojos infectados) (Lima *et al*, 2008). Sin embargo con esta técnica no se obtienen resultados cuantitativos, es poco práctico cuando se requieren diagnósticos de urgencia y detecta falsos positivo Montoya *et al*, 2008.

Diagnostico por PCR en tiempo real (qPCR)

Una variante a la técnica de PCR es la PCR en tiempo real cuantitativa (qPCR) que tiene el potencial de superar las restricciones de otras técnicas de PCR ofreciendo mayor sensibilidad y especificidad, mejor detección de niveles bajos de parasitemia y además permite diferenciar entre especies cuando se presentan infecciones mixtas (Mangold *et al*, 2005; Yanow *et al*, 2009). Todas estas ventajas son esenciales para el tratamiento adecuado y seguimiento del paciente. A esta técnica se le atribuyen otras ventajas sobre las demás como por ejemplo, la qPCR implica un solo proceso técnico, mientras que la PCR convencional involucra por lo menos dos con la realización de electroforesis en gel de agarosa, además limita el manejo de reactivos tóxicos como el bromuro de etidio complicando su manejo a nivel hospitalario. La qPCR se realiza en un sistema cerrado lo que disminuye el riesgo de contaminación.

En algunos estudios, la qPCR ha demostrado una sensibilidad del 93.88% y una especificidad del 100%. Otros autores han reportado valores más altos: sensibilidad de 96.6% (Boonma *et al*, 2007), 98.5% (Han *et al*, 2007) y 99.41% (Khairnar *et al*, 2009). Lo más promisorio de la técnica es la identificación de parásitos no detectados por las técnicas de gota y PCR convencional.

Aunque la implementación de esta técnica implique más costos confiere una ventaja significativa en términos de diagnóstico por su límite de detección en comparación con otras técnicas como la microscopia (Taylor *et al*, 2011; Krishna *et al*, 2009). En zonas endémicas de malaria, la qPCR permite la identificación de una alta proporción de mujeres embarazadas con niveles de parasitemia por debajo del umbral de la microscopía, siendo útil para prevenir los resultados adversos de la malaria en el embarazo (Mayor *et al*, 2009).

FORMULACION DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

La malaria representa un gran problema de salud pública en Colombia siendo una de las mayores causantes de morbilidad y mortalidad. Se considera que la malaria es endémica en el 85% del territorio nacional, principalmente en áreas rurales, siendo las zonas con la mayor transmisión, las riveras de los ríos Sinú y Cauca, en el Urabá, la costa Pacífica (WHO, 2008). Dentro de la problemática de la malaria, otro de los asuntos que actualmente tiene prioridad en resolverse es la mujer embarazada con la enfermedad en zonas de alto riesgo, pues la malaria en el embarazo, sus implicaciones sobre la salud de la madre y el recién nacido pasó de ser de interés solo para algunos investigadores, a ser un problema de salud pública mundial por las repercusiones sobre las morbimortalidades materna y la del recién nacido.

En el mundo al cerca de 50 millones de mujeres embarazadas están expuestas cada año a la infección con *Plasmodium* (Desai *et al*, 2007). Ésta es la infección parasitaria más común de mujeres embarazadas en zonas endémicas; dado que ésta se encuentran atravesando cambios inmunológicos, pues representarían peligro de aborto, muerte fetal o partos prematuros, además del bajo peso en el neonato. Algunos estudios muestran que aproximadamente el 86% de las primigestantes y el 52% de las multigestantes están en riesgo de adquirir esta infección anualmente (Uneke, 2008).

Durante un embarazo normal se observan cambios específicos en la respuesta inmune para lograr una implantación exitosa del feto, por lo tanto, durante este periodo ocurre un grado de inmunomodulación que aumenta la susceptibilidad en mujeres embarazadas a ciertas infecciones, incluida la producida por *Plasmodium*. En madres no infectadas la expresión de las citoquinas de la vía TH1 se asocian al aborto espontáneo, ya que tienen efectos citotóxicos directos en los organismos intracelulares y en el trofoblasto, mientras que las citoquinas de la vía TH2 son esenciales para el mantenimiento del embarazo (Suguitan, 2003). La infección por *Plasmodium* en la mujer gestante cambia el equilibrio en la respuesta de las citoquinas aumentando las de la vía TH1, produciendo complicaciones tales como: enfermedades maternas agudas, enfermedades infecciosas congénitas, la muerte del neonato e inclusive su muerte (Rogerson, 2007).

El diagnóstico de la infección se realiza de manera rutinaria mediante la examinación de

placas en gota gruesa; sin embargo, existen otra prueba más, como la inmunocromatografía, que mide la presencia de proteína rica en histidina-2 unida a un antígeno pan-malárico, la cual ha demostrado casi un 90% de sensibilidad para diagnosticar malaria placentaria (Mockenhaupt *et al*, 2002). Estos hallazgos dependen de la parasitemia en placentas, pero se convierten en una herramienta útil para encontrar casos de infección placentaria exclusiva, sin parasitemia periférica. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) muestra una mayor sensibilidad para diagnosticar malaria gestacional, pero su costo dificulta su implementación en los programas de control de la enfermedad (Mankhambo *et al*, 2002).

Un diagnóstico rápido y preciso es un componente fundamental de las estrategias de lucha contra la malaria. El inicio del tratamiento de la malaria en gran medida depende de una buena prueba de laboratorio que confirme el diagnóstico. Sin embargo, en muchos países endémicos, el diagnóstico clínico es el único método utilizado para decidir sobre los tratamientos, como las técnicas de laboratorio utilizadas para confirmar la sospecha clínica son consideradas demasiado laboriosas o no lo suficientemente sensibles, en los últimos años, una variedad de pruebas de diagnóstico rápido como la reacción en cadena de la polimerasa se han ido implementando ya que es una técnica que permite el análisis de numerosas muestras en forma simultánea, y tiene una alta sensibilidad y especificidad. Por lo tanto, puede ser utilizada en diversos estudios epidemiológicos como por ejemplo post-tratamiento para verificar la eliminación del parásito, así como para distinguir entre reinfección, recrudescimiento, o resistencia y permite el seguimiento de las cepas del parásito a través de una población (Carrasquilla *et al*, 2000, Hawkes y Kain, 2007).

Teniendo en cuenta que en Colombia no se ha estimado el nivel de parasitemia para las distintas complicaciones por Malaria gestacional, ni los efectos que estos tienen en el desarrollo de la gestación para el embrión; es importante la implementación de un diagnóstico rápido y confiable son necesarios para el adecuado tratamiento de la enfermedad, lo cual permitirá prevenir las posibles complicaciones causadas por la infección, proponemos entonces, utilizar la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) como herramienta en el diagnóstico de la infección malárica en las gestantes de Turbo (Antioquia), Nariño (Tumaco) y Puerto Libertador (Córdoba) regiones con alta transmisión de malaria.

OBJETIVO GENERAL:

- Implementar la PCR cuantitativa para el diagnóstico de malaria en gestantes en zonas endémicas.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- Estandarizar las condiciones para cuantificar ADN del parásito en sangre periférica y placenta por medio de qPCR.
- Identificar la especie de *Plasmodium* asociada a la infección de malaria gestacional, por medio de qPCR.
- Analizar las parasitemias mediante qPCR y su relación con el tipo de parásito encontrado.
- Correlacionar los resultados obtenidos por las técnicas: microscopía, PCR convencional y qPCR en el diagnóstico de la malaria, para determinar cuál de estas técnicas tiene mayor sensibilidad.

METODOLOGÍA

Tipo de estudio

Se realizó un estudio transversal y descriptivo.

Área de estudio

Puerto Libertador, Córdoba: el municipio de Puerto Libertador está situado a 170 km de la capital departamental, Montería, con una extensión total de 2.062 km², una altura a 66 msnm y una temperatura promedio de 27°C, con una humedad relativa que oscilan entre el 80% y el 86%. Las muestras obtenidas de este departamento fueron colectadas específicamente en el municipio de Puerto Libertador (09°14'17"N y 75°43'33" O) que se considera de alto riesgo para malaria ya que concentra la mayoría de los casos que se presentan en el departamento de Córdoba (Secretaría de Desarrollo de la Salud, 2011).

Tumaco, Nariño: Tumaco está ubicado al suroeste del país, entre las regiones Andinas y la costa Pacífica, precisamente esta región presenta amplias zonas eco-epidemiológicas con transmisión de malaria, debido a la temperatura, humedad relativa, pluviosidad,

orografía, hidrografía y selva húmeda tropical, las cuales favorecen la proliferación de vectores anofelinos. La transmisión de la malaria en Nariño se focaliza en los municipios costeros del departamento de Nariño, como Tumaco, La Tola, El Charco, Maguí, Roberto Payan, Barbacoas, Santa Barbara, Mosquera y Francisco Pizarro (Situación de la malaria en la costa pacífica de Nariño 2001). En este departamento las muestras fueron colectadas en el municipio de Tumaco.

Turbo, Antioquia: la región de Urabá está localizada en un sitio de confluencias entre los departamentos de Antioquia, Córdoba, Choco y el Tapón de Darién. Esta región está clasificada como de alto riesgo para malaria (índice de parasitario anual IPA mayor de 10 por mil expuestos) (Carmona- Fonseca y Maestre 2009). Las muestras de Urabá fueron obtenidas en el municipio de Turbo.

Figura 5. Departamentos en los que se realizó el estudio y ubicación de las poblaciones con áreas rurales de influencia en rosado.



Fuente: diseñado por el autor en, <http://mapasinteractivos.didactalia.net/>

Población de estudio

La población de estudio constó de mujeres gestantes y no gestantes con signos y síntomas indicativos de infección por malaria, que asistieron a los Hospitales locales de Puerto Libertador en Córdoba (Camu Divino Niño) , Tumaco en Nariño (Hospital San Andres de Tumaco) y Turbo en Antioquia (Hospital Francisco Valderrama) y que dieron su consentimiento para participar en el estudio

Muestras para el estudio

Se obtuvieron muestras de 64 pacientes, los tipos de muestras que se utilizaron para el estudio fueron: sangre periférica, sangre de placenta y sangre de cordón umbilical, para el caso de mujeres gestantes (Tabla 4).

Criterios de inclusión

- Mujeres gestantes y no gestantes con signos y síntomas indicativos de infección por malaria.
- No haberse sometido a tratamiento antimalarico.
- Participar voluntariamente.
- Haber firmado el consentimiento informado.

Criterios de exclusión

- Retiro voluntario del estudio.
- No haber firmado el consentimiento informado.

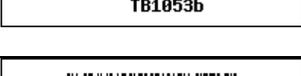
Tabla 4. Caracterización de los pacientes del estudio

#	Barcode	Código paciente	Procedencia	Paciente
1	 PL0157a	157	Puerto Libertador	No gestante
2	 PL0166a	166	Puerto Libertador	No gestante

3	 PL0169a	169	Puerto Libertador	No gestante
4	 PL0184a	184	Puerto Libertador	No gestante
5	 PL0280a	280	Puerto Libertador	No gestante
6	 PL0162a	162	Puerto Libertador	Gestante
7	 PL0167a	167	Puerto Libertador	Gestante
8	 PL0177a	177	Puerto Libertador	Gestante
9	 PL0192a	192	Puerto Libertador	Gestante
10	 PL0194a	194	Puerto Libertador	Gestante
11	 PL0252a	252	Puerto Libertador	No gestante
12	 PL0253a	253	Puerto Libertador	No gestante
13	 PL0254a	254	Puerto Libertador	No gestante
14	 PL0255a	255	Puerto Libertador	No gestante
15	 PL0256a	256	Puerto Libertador	No gestante
16	 PL0257a	257	Puerto Libertador	No gestante
17	 PL0199a	199	Puerto Libertador	Gestante
18	 PL0205a	205	Puerto Libertador	Gestante
19	 PL0206a	208	Puerto Libertador	Gestante
20	 PL0211a	211	Puerto Libertador	Gestante
21	 PL0216a	216	Puerto Libertador	Gestante
22	 TC6130b	6130	Tumaco	Gestante

23	 TC5347b	5347	Tumaco	Gestante
24	 TC7374b	7374	Tumaco	Gestante
25	 TC2988b	2988	Tumaco	Gestante
26	 TC1598b	1598	Tumaco	Gestante
27	 TC4871b	4871	Tumaco	Gestante
28	 TC7780b	7780	Tumaco	Gestante
29	 TC0188b	0188	Tumaco	Gestante
30	 TC5124b	5124	Tumaco	Gestante
31	 TC9713b	9713	Tumaco	Gestante
32	 TC5606b	5606	Tumaco	Gestante
33	 TC8133b	8133	Tumaco	Gestante
34	 TC0038b	8038	Tumaco	Gestante
35	 TC3631b	3631	Tumaco	Gestante
36	 TC0516b	0516	Tumaco	Gestante
37	 TC9948b	9948	Tumaco	Gestante

38	 TC8223b	8223	Tumaco	Gestante
39	 TC6131b	6131	Tumaco	Gestante
40	 TC3911b	3911	Tumaco	Gestante
41	 TC7178b	7178	Tumaco	Gestante
42	 TC6757b	6757	Tumaco	Gestante
43	 TC6789b	6789	Tumaco	Gestante
44	 TC1390b	1390	Tumaco	Gestante
45	 TB1054b	1-054	Turbo	Gestante
46	 TB1047b	1-047	Turbo	Gestante
47	 TB7002b	G-7002	Turbo	No gestante
48	 TB4002b	G-4002	Turbo	No gestante
49	 TB4004b	G-4004	Turbo	No gestante
50	 TB1048b	1-048	Turbo	Gestante
51	 TB1052b	1-052	Turbo	Gestante
52	 TB1046b	1-046	Turbo	Gestante

53	 TB1049b	1-049	Turbo	Gestante
54	 TB4001b	G-4001	Turbo	No gestante
55	 TB4003b	G-4003	Turbo	No gestante
56	 TB4005b	G-4005	Turbo	No gestante
57	 TB1055b	1-055	Turbo	Gestante
58	 TB7001b	G-7001	Turbo	No gestante
59	 TB7004b	G-7004	Turbo	No gestante
60	 TB7003b	G-7003	Turbo	No gestante
61	 TB1050b	1-050	Turbo	No gestante
62	 TB1051b	1-051	Turbo	Gestante
63	 TB1053b	1-053	Turbo	Gestante
64	 TB1054b	SPVP	Turbo	Gestante

Recolección de las muestras

Las muestras fueron obtenidas a través de extracción de sangre periférica de las gestantes y no gestantes primero por punción con lanceta del pulpejo del dedo medio de la mano para realizar la gota gruesa, y posteriormente fijada en papel filtro para extraer el ADN. Las muestras de sangre de la placenta o del cordón se tomaron impregnando

igualmente papel de filtro a partir del cual se realizó posteriormente la extracción de ADN. El papel de filtro impregnado con la sangre se conservó a temperatura ambiente (28 a 32 °C) en el sitio de toma de la muestra hasta su traslado al laboratorio de grupo Salud y Comunidad e Inmunovirología, Universidad de Antioquia, en la ciudad de Medellín.

Análisis de gota gruesa

La lectura de la gota gruesa se efectuó una vez tomada la muestra. El diagnóstico fue hecho por una persona capacitada en la preparación, lectura e informe de la gota gruesa. El conteo de los parásitos se hizo con base en 200 leucocitos y para informar la parasitemia por mL, se empleó como valor de referencia 8.000 leucocitos. La muestra se consideró negativa cuando no se observaron formas del parásito en más de 200 campos microscópicos revisados (Montoya *et al*, 2008).

Extracción de ADN

La extracción del ADN se llevó a cabo a partir de medio círculo de papel filtro impregnado con sangre total, equivalente a un volumen aproximado de 50 µL de sangre total. Para la extracción se utilizó la resina de intercambio iónico Chelex al 20%, de acuerdo a protocolos previamente publicados (Sakihama *et al*, 2001)

Diseño de oligonucleótidos

Para el diseño de oligonucleótidos se escogió el gen de la subunidad 18S del ARN ribosomal, ya que contiene regiones tanto altamente conservadas como variantes y al menos 5 copias de este gen están distribuidos en diferentes cromosomas del genoma de *Plasmodium* (Mangold *et al*, 2005). Además se escogieron el gen MSP-1 para *P. falciparum* y RAP-2 para *P. vivax* como otra alternativa para hacer la identificación de los parásitos.

Inicialmente se buscaron las secuencias de estos genes en la base de datos de NCBI, luego fueron alineadas por medio del programa BIOEDIT con el que se obtuvo una secuencia consenso de cada uno de los genes. A continuación estas secuencias fueron analizadas por el programa Primer3, el cual arrojó una pareja de oligonucleótidos que cumplía con los parámetros que nosotros le indicamos como longitud, Temperatura de

hibridación, entre otras. Posteriormente estos oligonucleótidos fueron verificados haciéndoles un alineamiento contra todos los genomas reportados en la base del NCBI para corroborar que fueron específicos para *Plasmodium*. Finalmente los oligonucleótidos seleccionados fueron PLA-A, PLA-B para la detección de género; FAL- fw, FAL-re, MSP1-F, MSP1-R para la detección de *P. falciparum*; VIV- fw, VIV- re, RAP2- F, RAP2- R para la detección de *P. vivax*, sin embargo cuando probamos MSP1-F, MSP1-R, RAP2- F, RAP2- R, no tuvimos un buen rendimiento de estos oligonucleótidos, en consecuencia no fueron utilizados en los experimentos.

Tabla 5. Lista de oligonucleótidos diseñados en este estudio

Nombre	Secuencia (5' - 3')	Tamaño del fragmento	Referencia
Plasmo 1	GTTAAGGGAGTGAAGACGATCAGA	173 pb	(Shokoples <i>et al</i> , 2009)
Plasmo 2	AACCCAAAGACTTTGATTTCTCATAA		
FAL F	CTTTTGAGAGGTTTTGTTACTTTGAGTAA	99 pb	(Snounou <i>et al</i> , 1993)
FAL R	TATCCATGCTGTAGTATTCAAACACAA		
VIV F	ACGCTTCTAGCTTAATCCACATAACT	142 pb	(Snounou <i>et al</i> , 1993)
VIV R	ATTTACTCAAAGTAACAAGGACTTCCAAGC		
PLU 5	CCTGTTGTTGCCTTAAACTTC	1100 pb	(Snounou <i>et al</i> , 1993)
PLU 6	TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG		
FAL 1	TTA AACTGGTTTGGGAAAACCAAATATT	205 pb	(Snounou <i>et al</i> , 1993)
FAL 2	ACACAATGAACTCAATCATGACTACCCGTC		
VIV 1	CGCTTCTAGCTTAATCCACAT AAC TGA TAC	120 pb	(Snounou <i>et al</i> , 1993)
VIV 2	ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA		
PLA-A	ACTCAACACGGGAAAACACTACT	132	Datos reportados en

PLA-B	TCG TTC GTT ATCG GAATTAACC		este trabajo
FAL- fw	ATTGCTTTTGAGAGGTTTTGTT	197 pb	Datos reportados en este trabajo
FAL-re	GCCCCAAAGCTACTCCTAT		
VIV- fw	TGAATTCGGTTGATTTGCTTACTT	103 pb	Datos reportados en este trabajo
VIV- re	CGCGAAAAGAAACAGTATGAA		
RAP2- F	TTCGTGCGAGCCTTCACTAT	173 pb	Datos reportados en este trabajo
RAP2- R	ATGTATCCCCAAAAGCGTTGC		
MSP1-F	TTTCAACAACCAATGCGTAA	190 pb	Datos reportados en este trabajo
MSP1-R	TCTTCGGTACATGTGGCATC		

pb: pares de base

PCR convencional

La PCR convencional para la identificación de género se realizó siguiendo las siguientes condiciones: la master mix contenía un tampón 1X, MgCl₂ mM, dNTPs 125 µM, *Taq* DNA polimerasa 0,02 UI y (0.1-10 ng) de ADN. Los oligonucleótidos utilizados fueron PLU 5 y PLU 6 (Tabla 5).

Después de preparar la mezcla patrón (*master mix*), ésta se llevó al termociclador con las siguientes condiciones una desnaturalización inicial de 95 °C por 5 min, seguida de 24 ciclos a 94 °C por 1 min, 58°C por 2 min, 72 °C por 2 min, seguido de una hibridización final de 58 °C por 2 min y una extensión final de 72°C por 2 min.

A continuación se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% para la identificación de los productos de PCR durante 40 minutos utilizando un marcador de peso molecular de 100pb y el colorante Zvision®. En esta se visualizaron los fragmentos de ácidos nucleicos mediante luz ultravioleta permitiendo observar la presencia o ausencia de los parásitos de malaria por medio de la amplificación del género.

Posteriormente se realizó una PCR para la identificación de especies: *P. vivax* y *P. falciparum*, ésta se llevó a cabo según las siguientes condiciones: Tampón 1X, MgCl₂ mM, dNTPs 125 µM, *Taq* DNA polimerasa 0,02UI y 3 µL de ADN. Se utilizaron los

siguientes oligonucleótidos FAL1 y FAL2 para *P. falciparum*, y VIV1 y VIV2 para *P. vivax*, ver tabla 5.

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 95 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 58 °C por 2 min, 72 °C por 2 minutos, por último una hibridización final de 58 °C por 2 min y una extensión final de 72° por 5 minutos (Kramer y Coen, 2001)

A continuación se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% para la identificación de los productos de PCR, se utilizó un marcador de peso molecular de 100pb y el colorante Zvision®. En esta se visualizaron los fragmentos de ácidos nucleicos mediante luz ultravioleta permitiendo observar la presencia o ausencia de los parásitos de malaria y de la especie correspondiente: *P. falciparum* y *P. vivax*.

Clonación de genes para cuantificar ADN del parásito presente en las muestras.

Amplificación del gen 18S del ARN ribosómico de *P. falciparum* y *P.vivax*.

Para clonar los amplicones del gen 18S de *P. falciparum* y *P.vivax* se prepararon mezclas de amplificación de ADN de *P.falciparum* y *P.vivax* y los siguientes componentes: Taq Polimerasa, dNTPs, MgCl₂, agua y mezcla de oligonucleótidos (FAL-fw/FAL-re), (VIV-fw/VIV-re) para *P.falciparum* y *P.vivax* respectivamente. Posteriormente se realiza la clonación con el kit Clone JET PCR (Fermentas)

Obtención de transformantes

Los productos de la amplificación del gen 18S fueron ligados al vector pJET1.2/blunt (Thermo Scientific) y las construcciones resultantes fueron empleadas para obtener transformantes de *Escherichia coli* BL21. Las mezclas de ligación de cada amplicón fueron preparadas en un volumen total de 20 µL e incluían 7 µL de cada amplicón, 10 µL de Buffer de reacción y 1 µL de la enzima de *blunting*, luego se incuban a 70°C por 5 min y se colocan en hielo donde se le adiciona a la mezcla 1 µL del vector pJET1.2/blunt y 1 µL de la ADN ligasa T4. La mezcla se deja a temperatura ambiente durante 30 min.

Posteriormente se le adiciona 10 µL de la mezcla de ligación a 50 µL de células de *E. coli* quimio-competentes (CaCl₂), se ponen en hielo durante 30 min y luego se pasan a 42°C durante 45 seg e inmediatamente nuevamente a hielo por 5 min. A esta mezcla se le

adicionan 200 μL de medio Luria-Bertani (LB) y se dejan en agitación a 37°C durante 1 hora; después se centrifuga 1 min a 13000 rpm, se descarta el sobrenante y el precipitado celular se resuspende en la gota remante y se siembra en una caja de agar LB/Ampicilina con perlas de cristal.

Selección de colonias transformantes de *E. coli* BL21 y purificación del plásmido.

Las colonias transformadas se toman con un asa y se incuban en un tubo Falcon con 5 mL de LB/Ampicilina a una concentración de 110 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 37°C y con agitación durante 12 horas aproximadamente. Para cada plásmido se centrifuga el cultivo a 4000 rpm durante 10 min, se descarta el sobrenadante y se resuspende el *pellet* celular en 250 μL de medio para resuspensión y se transfiere la solución a un tubo de microcentrifuga, luego se le adiciona el tampón de lisis y se mezcla suavemente por inversión, se le adicionan 350 μL de solución neutralizante y se mezcla nuevamente por inversión hasta que aparezca un precipitado blanco floculante. Esta mezcla se centrifuga 10 min a 13000 rpm y el sobrenadante se adiciona en una columna azul (kit QIAprep® Spin Miniprep), esta se centrifuga durante 1 min a 13000 rpm y se descarta el sobrenadante. A la columna se le adicionan 500 μL de la solución de lavado y se centrifuga a 13000 rpm durante 1 min, luego se descarta la solución de lavado. Adicionamos 750 μL de buffer de lavado con etanol y centrifugamos por 1 min a 13000 rpm. Descartamos el sobrenadante y volvemos a centrifugar a 13000 rpm por 1 min y nos aseguramos de haber eliminado todo el etanol. Posteriormente pasamos la columna a un vial y procedemos con la elución adicionando 50 μL de agua libre de nucleasas y dejando reposar por 1 min. Finalmente se centrifuga a 13000 rpm por 1 min y se colecta en un tubo *Eppendorf* de 1.5 mL.

Pureza y concentración del ADN plasmidico

La pureza y concentración del ADN fue determinada con el espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop, Thermo Scientific) empleando agua MilliQ® como blanco y 1 μL de cada solución por duplicado. Posterior a esto se realiza una PCR para verificar los fragmentos clonados y se observan mediante electroforesis en TAE-Agarosa 2% con tinción de Zvision®.

Curvas de calibración para qPCR.

Se realizaron diluciones logarítmicas seriadas de los plásmidos en agua estéril, y se amplificaron con los oligonucleótidos de cada especie, de esta forma se obtuvieron curvas de calibración que permiten cuantificar la cantidad de ADN presente en cada muestra.

PCR en tiempo real (qPCR)

El ADN se amplificó en un termociclador (Biorad CFX 96). Cada reacción se preparó en un volumen de 7.5 μ L de Maxima SYBR Green/ROX[®] qPCR Master Mix (2X) de Fermentas, 1 μ L (0.1-10 ng) de ADN y 1.2 μ L (0.4 μ M) de cada cebador según el caso, ver la Tabla 3. Para la amplificación de género se utilizaron las parejas de iniciadores Plasmio F, Plasmio R y PLA-A, PLA-B. Para la amplificación de especies, para *P. falciparum* FAL-F y FAL-R, FAL- fw y FAL-re para *P. vivax* VIV-F y VIV- R y VIV-fw, VIV-re.

Las condiciones de la PCR consistieron en una desnaturalización inicial a 95 °C por 10 min, seguido de una amplificación de 40 ciclos a 94 °C por 30 seg, 60 °C por 30 seg y 72 °C por 30 seg, con una detección de la fluorescencia al final de cada ciclo. La amplificación es seguida de una curva de fusión con un incremento gradual de la temperatura de 0.2 °C por dos segundos desde 65°C hasta 90°C.

Se estableció un corte de 38 ciclos para definir muestras positivas para *Plasmodium spp.* Los análisis de las curvas de melting (T_m) fueron utilizados para definir cada especie (Mangold *et al*, 2005).

Los resultados de la amplificación fueron automáticamente analizados por el software CFX Manager 2.1

Determinación de la parasitemia por medio de las curvas estándar.

La cuantificación de las parasitemias se hizo por medio de controles internos con concentraciones iniciales de ADN conocidas, es decir curvas estándar de cada plásmido. El programa CFX manager va registrando el incremento de la fluorescencia en cada ciclo (proporcional al aumento de ADN) el cual se refleja gráficamente en curvas cinéticas de la reacción para cada una de las muestras y estándares.

El ciclo en el que se empieza a detectar el aumento de fluorescencia se denomina ciclo umbral o Ct (*threshold cycle*) y es inversamente proporcional a la concentración inicial de ADN blanco presente en la muestra. Por lo tanto, con la curva estándar, al interpolar los valores de Ct de cada muestra se puede inferir la concentración inicial de ADN (Sanchez, 2006). Teniendo la concentración inicial de cada muestra expresada en número de copias del gen 18s por microlitro y considerando que cada parasito tiene 5 copias de este gen (Mangold *et al*, 2005) dividimos el número de copias de ADN por 5 y de esta forma se estima el número de parásitos (Gama *et al*, 2007).

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se utilizaron los resultados de la amplificación de las muestras por qPCR comparados con los resultados de la PCR convencional y la gota gruesa. El análisis se hizo por medio del programa estadístico EPIDAT con una significancia estadística <0,05, y un intervalo de confiabilidad de 95% (95% IC) (Carmona-Fonseca y Maestre, 2009) con el que se determinó la sensibilidad y especificidad de la PCR convencional y la qPCR en relación a la gota gruesa.

Las formulas a continuación fueron las utilizadas para los tratamientos con EPIDAT:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{Verdaderos positivos} \times 100\%}{\text{Verdaderos positivos} + \text{falsos positivos}}$$

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{Verdaderos negativos} \times 100\%}{\text{Verdaderos negativos} + \text{falsos positivos}}$$

Simultáneamente los resultados de la amplificación por qPCR fueron cuantificados y se compararon las parasitemias entre gestantes y no gestantes, además de la carga parasitaria entre especies: *P. falciparum* y *P. vivax* utilizando el programa PRISM®.

En el programa PRISM se aplicó la prueba de Mann-Whitney para determinar si existió diferencias entre muestras independientes. Para calcular el estadístico se obtienen los valores de U para cada una de las dos muestras:

$$U_1 = R_1 - \frac{n_1(n_1 + 1)}{2}$$

$$U_2 = R_2 - \frac{n_2(n_2 + 1)}{2}$$

Dónde: U_1 y U_2 = valores estadísticos de U, Mann-Whitney, n_1 = tamaño de la muestra del grupo 1, n_2 = tamaño de la muestra del grupo 2, R_1 = sumatoria de los rangos del grupo 1, R_2 = sumatoria de los rangos del grupo 2. El programa estadístico nos da un nivel de significación para los valores de U, de acuerdo a este valor se rechaza o acepta la hipótesis nula con punto de corte $p < 0.05$ (Barrios y Garcia, 2009).

Consideraciones Éticas

Este protocolo de investigación se rigió por lo dispuesto por el Ministerio de Salud Pública en la Resolución No 008430 de 1993. Las pacientes fueron informadas acerca de las características generales del estudio, solo se incluyeron en él, las pacientes que aceptaron participar voluntariamente. En todos los casos se obtuvo el consentimiento informado por escrito (Ver anexo 1, consentimiento informado).

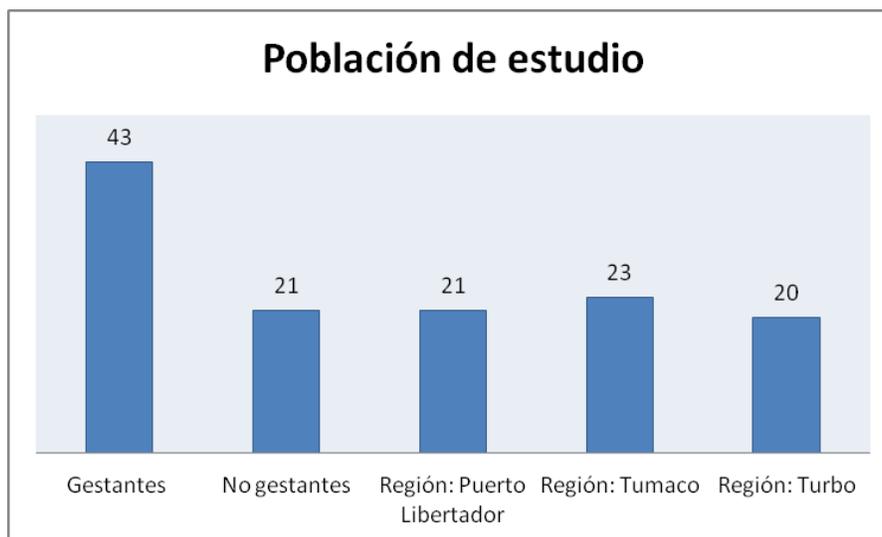
A las pacientes que participaron en el estudio se les realizó diagnóstico gratuito para la infección por *P. falciparum* y *P. vivax*. Los tratamientos o exámenes adicionales fueron costeados por la EPS o el régimen al cual pertenecía la paciente.

RESULTADOS

Muestras y población de estudio

Las muestras fueron tomadas de 43 gestantes y 21 no gestantes, de ellas 21 procedían de Puerto Libertador (Córdoba), 23 de Tumaco (Nariño) y 20 de Turbo (Antioquia).

Grafica 1. Población de estudio.



Gota gruesa

De las 64 muestras analizadas 35 fueron positivas para malaria y 29 fueron negativas. De las muestras positivas, 25 fueron positivas para *P. falciparum* y 10 para *P. vivax* (Tabla 6). El desarrollo de la prueba no presentó ninguna inconsistencia entre todas las muestras analizadas, tanto positivas y negativas.

Tabla 6. Resultados del análisis de gota gruesa.

#	Código paciente	Procedencia	Paciente	Tipo de muestra	Resultado gota gruesa	
					Especie	Parasitemia Parásitos/ μ L
1	157	Puerto Libertador	No gestante	sangre [~]	<i>P. falciparum</i>	Dato no disponible
2	166	Puerto Libertador	No gestante	sangre [~]	<i>P. falciparum</i>	Dato no disponible
3	169	Puerto Libertador	No gestante	sangre [~]	<i>P. falciparum</i>	Dato no disponible
4	184	Puerto Libertador	No gestante	sangre [~]	<i>P. falciparum</i>	Dato no disponible
5	280	Puerto Libertador	No gestante	sangre [~]	<i>P. falciparum</i>	Dato no disponible
6	162	Puerto Libertador	Gestante	placenta ^o	Negativo	Negativo

7	167	Puerto Libertador	Gestante	sangre~	Negativo	Negativo
8	177	Puerto Libertador	Gestante	placenta°	<i>P. falciparum</i>	Dato no disponible
9	192	Puerto Libertador	Gestante	sangre~	<i>P. vivax</i>	Dato no disponible
10	194	Puerto Libertador	Gestante	sangre~	<i>P. vivax</i>	Dato no disponible
11	252	Puerto Libertador	No gestante	sangre~	<i>P. vivax</i>	Dato no disponible
12	253	Puerto Libertador	No gestante	sangre~	<i>P. vivax</i>	Dato no disponible
13	254	Puerto Libertador	No gestante	sangre~	<i>P. vivax</i>	Dato no disponible
14	255	Puerto Libertador	No gestante	sangre~	<i>P. vivax</i>	Dato no disponible
15	256	Puerto Libertador	No gestante	sangre~	<i>P. vivax</i>	Dato no disponible
16	257	Puerto Libertador	No gestante	sangre~	<i>P. vivax</i>	Dato no disponible
17	199	Puerto Libertador	Gestante	sangre~	Negativo	Negativo
18	205	Puerto Libertador	Gestante	sangre~	Negativo	Negativo
19	208	Puerto Libertador	Gestante	sangre~	Negativo	Negativo
20	211	Puerto Libertador	Gestante	sangre~	Negativo	Negativo
21	216	Puerto Libertador	Gestante	cordón°	Negativo	Negativo
22	6130	Tumaco	Gestante	sangre~	<i>P. falciparum</i>	800
23	5347	Tumaco	Gestante	sangre~	<i>P. vivax</i>	1600
24	7374	Tumaco	Gestante	sangre~	<i>P. falciparum</i>	1440
25	2988	Tumaco	Gestante	sangre~	<i>P. falciparum</i>	1360
26	1598	Tumaco	Gestante	sangre~	<i>P. falciparum</i>	240
27	4871	Tumaco	Gestante	sangre~	<i>P. falciparum</i>	1248
28	7780	Tumaco	Gestante	sangre~	<i>P. falciparum</i>	880

29	0188	Tumaco	Gestante	sangre~	Negativo	Negativo
30	5124	Tumaco	Gestante	sangre~	<i>P. falciparum</i>	720
31	9713	Tumaco	Gestante	sangre~	Negativo	Negativo
32	5606	Tumaco	Gestante	sangre~	<i>P. falciparum</i>	1440
33	8133	Tumaco	Gestante	sangre~	<i>P. falciparum</i>	15280
34	8038	Tumaco	Gestante	sangre~	<i>P. falciparum</i>	7700
35	3631	Tumaco	Gestante	sangre~	Negativo	Negativo
36	0516	Tumaco	Gestante	sangre~	Negativo	Negativo
37	9948	Tumaco	Gestante	sangre~	Negativo	Negativo
38	8223	Tumaco	Gestante	sangre~	Negativo	Negativo
39	6131	Tumaco	Gestante	sangre~	Negativo	Negativo
40	3911	Tumaco	Gestante	sangre~	Negativo	Negativo
41	7178	Tumaco	Gestante	sangre~	Negativo	Negativo
42	6757	Tumaco	Gestante	sangre~	Negativo	Negativo
43	6789	Tumaco	Gestante	sangre~	Negativo	Negativo
44	1390	Tumaco	Gestante	sangre~	Negativo	Negativo
45	1-054	Turbo	Gestante	sangre~	Negativo	Negativo
46	1-047	Turbo	Gestante	sangre~	Negativo	Negativo
47	G-7002	Turbo	No gestante	sangre~	<i>P. falciparum</i>	31.309
48	G-4002	Turbo	No gestante	sangre~	<i>P. falciparum</i>	16.831
49	G-4004	Turbo	No gestante	sangre~	<i>P. falciparum</i>	12.475
50	1-048	Turbo	Gestante	sangre~	Negativo	Negativo
51	1-052	Turbo	Gestante	sangre~	Negativo	Negativo
52	1-046	Turbo	Gestante	sangre~	Negativo	Negativo
53	1-049	Turbo	Gestante	sangre~	Negativo	Negativo
54	G-4001	Turbo	No gestante	sangre~	<i>P. falciparum</i>	2.018

55	G-4003	Turbo	No gestante	sangre~	<i>P. falciparum</i>	18.720
56	G-4005	Turbo	No gestante	sangre~	<i>P. falciparum</i>	1.116
57	1-055	Turbo	Gestante	sangre~	Negativo	Negativo
58	G-7001	Turbo	No gestante	sangre~	<i>P. falciparum</i>	2.974
59	G-7004	Turbo	No gestante	sangre~	<i>P. falciparum</i>	3.400
60	G-7003	Turbo	No gestante	sangre~	<i>P. falciparum</i>	589
61	1-050	Turbo	No gestante	sangre~	Negativo	Negativo
62	1-051	Turbo	Gestante	sangre~	Negativo	Negativo
63	1-053	Turbo	Gestante	sangre~	Negativo	Negativo
64	SPVP	Turbo	Gestante	sangre~	<i>P. vivax</i>	Dato no disponible

~ Muestras extraídas de sangre periférica

° Muestras extraídas de sangre de ese tejido

Grafica 2. Densidad parasitaria determinada por gota gruesa. Las parasitemias estipuladas por gota gruesa presentan un valor mínimo de 240 parásitos/ μ L de sangre (muestra 1598) y un valor máximo de 31.309 parásitos/ μ L de sangre (muestra G-7002).



PCR convencional

Por medio de la PCR convencional se diagnosticaron 16 muestras con el parásito para el municipio de Puerto Libertador, 8 muestras fueron positivas para *P. falciparum*, 8 para *P. vivax* y 5 negativas, para la ciudad de Tumaco se encontraron 10 positivas para *P. falciparum*, 1 mixta (*P. vivax* – *P. falciparum*) y 12 negativas, finalmente para el municipio de Turbo se obtuvieron 9 muestras positivas para *P. falciparum*, 1 para *P. vivax* y 10 negativas (Tabla 7). En este análisis 2 muestras de Puerto Libertador que fueron negativas por gota gruesa fueron positivas para *P. falciparum* y una muestra de Tumaco que fue positiva para *P. falciparum* por gota, dio mixta por esta técnica.

Tabla 7. Resultados de PCR convencional

#	Código paciente	Procedencia	Paciente	Tipo de muestra	Diagnostico PCR
1	157	Puerto Libertador	No gestante	sangre~	<i>P. falciparum</i>
2	166	Puerto Libertador	No gestante	sangre~	<i>P. falciparum</i>
3	169	Puerto Libertador	No gestante	sangre~	<i>P. falciparum</i>
4	184	Puerto Libertador	No gestante	sangre~	<i>P. falciparum</i>
5	280	Puerto Libertador	No gestante	sangre~	<i>P. falciparum</i>
6	162	Puerto Libertador	Gestante	Placenta°	<i>P. falciparum</i> *
7	167	Puerto Libertador	Gestante	sangre~	<i>P. falciparum</i> *
8	177	Puerto Libertador	Gestante	placenta°	<i>P. falciparum</i>
9	192	Puerto Libertador	Gestante	sangre~	<i>P. vivax</i>
10	194	Puerto Libertador	Gestante	sangre~	<i>P. vivax</i>
11	252	Puerto Libertador	No gestante	sangre~	<i>P. vivax</i>
12	253	Puerto Libertador	No gestante	sangre~	<i>P. vivax</i>
13	254	Puerto Libertador	No gestante	sangre~	<i>P. vivax</i>
14	255	Puerto Libertador	No gestante	sangre~	<i>P. vivax</i>
15	256	Puerto Libertador	No gestante	sangre~	<i>P. vivax</i>
16	257	Puerto Libertador	No gestante	sangre~	<i>P. vivax</i>
17	199	Puerto Libertador	Gestante	sangre~	Negativo
18	205	Puerto Libertador	Gestante	sangre~	Negativo
19	208	Puerto Libertador	Gestante	sangre~	Negativo
20	211	Puerto Libertador	Gestante	sangre~	Negativo
21	216	Puerto Libertador	Gestante	cordón°	Negativo
22	6130	Tumaco	Gestante	sangre~	<i>P. falciparum</i>
23	5347	Tumaco	Gestante	sangre~	<i>P. vivax</i> ⁺ <i>P. falciparum</i>

24	7374	Tumaco	Gestante	sangre~	<i>P. falciparum</i>
25	2988	Tumaco	Gestante	sangre~	<i>P. falciparum</i>
26	1598	Tumaco	Gestante	sangre~	<i>P. falciparum</i>
27	4871	Tumaco	Gestante	sangre~	<i>P. falciparum</i>
28	7780	Tumaco	Gestante	sangre~	<i>P. falciparum</i>
29	0188	Tumaco	Gestante	sangre~	Negativo
30	5124	Tumaco	Gestante	sangre~	<i>P. falciparum</i>
31	9713	Tumaco	Gestante	sangre~	Negativo
32	5606	Tumaco	Gestante	sangre~	<i>P. falciparum</i>
33	8133	Tumaco	Gestante	sangre~	<i>P. falciparum</i>
34	8038	Tumaco	Gestante	sangre~	<i>P. falciparum</i>
35	3631	Tumaco	Gestante	sangre~	Negativo
36	0516	Tumaco	Gestante	sangre~	Negativo
37	9948	Tumaco	Gestante	sangre~	Negativo
38	8223	Tumaco	Gestante	sangre~	Negativo
39	6131	Tumaco	Gestante	sangre~	Negativo
40	3911	Tumaco	Gestante	sangre~	Negativo
41	7178	Tumaco	Gestante	sangre~	Negativo
42	6757	Tumaco	Gestante	sangre~	Negativo
43	6789	Tumaco	Gestante	sangre~	Negativo
44	1390	Tumaco	Gestante	sangre~	Negativo
45	1-054	Turbo	Gestante	sangre~	Negativo
46	1-047	Turbo	Gestante	sangre~	Negativo
47	G-7002	Turbo	No gestante	sangre~	<i>P.falciparum</i>
48	G-4002	Turbo	No gestante	sangre~	<i>P.falciparum</i>
49	G-4004	Turbo	No gestante	sangre~	<i>P.falciparum</i>
50	1-048	Turbo	Gestante	sangre~	Negativo

51	1-052	Turbo	Gestante	sangre [~]	Negativo
52	1-046	Turbo	Gestante	sangre [~]	Negativo
53	1-049	Turbo	Gestante	sangre [~]	Negativo
54	G-4001	Turbo	No gestante	sangre [~]	<i>P. falciparum</i>
55	G-4003	Turbo	No gestante	sangre [~]	<i>P. falciparum</i>
56	G-4005	Turbo	No gestante	sangre [~]	<i>P. falciparum</i>
57	1-055	Turbo	Gestante	sangre [~]	Negativo
58	G-7001	Turbo	No gestante	sangre [~]	<i>P.falciparum</i>
59	G-7004	Turbo	No gestante	sangre [~]	<i>P.falciparum</i>
60	G-7003	Turbo	No gestante	sangre [~]	<i>P.falciparum</i>
61	1-050	Turbo	No gestante	sangre [~]	Negativo
62	1-051	Turbo	Gestante	sangre [~]	Negativo
63	1-053	Turbo	Gestante	sangre [~]	Negativo
64	SPVP	Turbo	Gestante	sangre [~]	<i>P.vivax</i>

* Muestras que no respondieron al diagnóstico por técnica clásica

* Muestra mixta por esta técnica, no detectada por gota gruesa

[~] Muestras extraídas de sangre periférica

^o Muestras extraídas de sangre de ese tejido

Figura 6. Gel de PCR convencional correspondiente a 2 muestras positivas para *P. vivax*. Gel al 2% de agarosa teñido con Zvision. M: marcador de peso molecular de 100pb, carril 1: control positivo para *P. vivax* (cultivo), carril 2- 3: muestras (5347, SPVP).

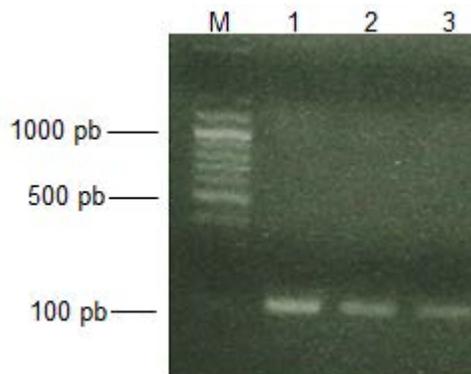
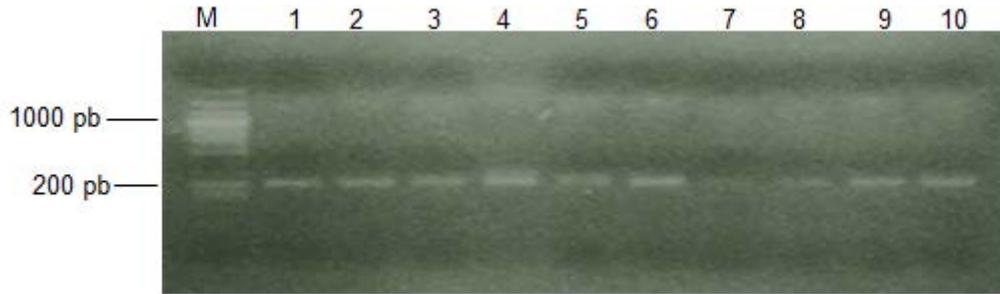


Figura 7. Gel de PCR correspondiente a 9 muestras positivas para *P. falciparum* Gel al 2% de agarosa teñido con Zvision. M: marcador de peso molecular de 100 pb, carril 2: control positivo para *P. falciparum* (cultivo), carril 3-10: muestras (157, 162*,167*, 177, 6130, 5347^Ω, 2988, 7002, 4002).

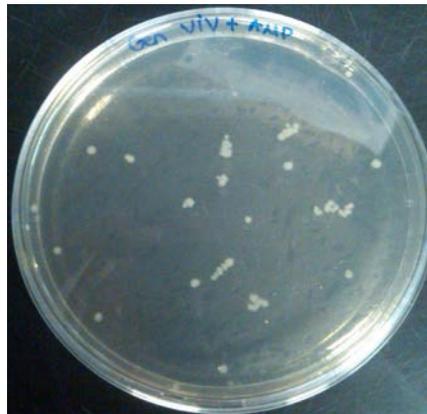


* Muestras negativas por gota gruesa.

^Ω Muestra diagnosticada mixta (*P. falciparum*- *P. vivax*) por PCR.

Obtención de transformantes

Figura 8. Colonias de *E. coli* transformadas con el plásmido pJET 1.2/blunt + fragmento 103 pb 18S rRNA



Clonación

Se verifico el éxito de la clonación utilizando unos oligonucleotidos proporcionados por el kit que amplificaban una región de 118 pb, si el gen se había unido al plásmido, en el gel de agarosa debía observarse una banda correspondiente a los 118 pb más el tamaño del fragmento que se quería clonar (*P. falciparum* = 197 pb, *P. vivax* = 103 pb) ya que este debía incorporarse en el sitio de clonación a 371 pb entre P T7 y eco471R. Posterior a la clonación para el caso de *P. falciparum* debía observarse una banda de 315 pb (Figura 9) y para *P. vivax* una banda 221 pb (Figura 10).

Figura 9. Gel de PCR para verificar fragmento clonado de *P. falciparum*. Gel al 2% de agarosa teñido con Zvision. M: marcador de peso molecular de 100 pb, carril 1-4 y 6: colonias obtenidas que incorporaron el plásmido sin el gen, carril 5: colonia positiva para el plásmido con el gen.

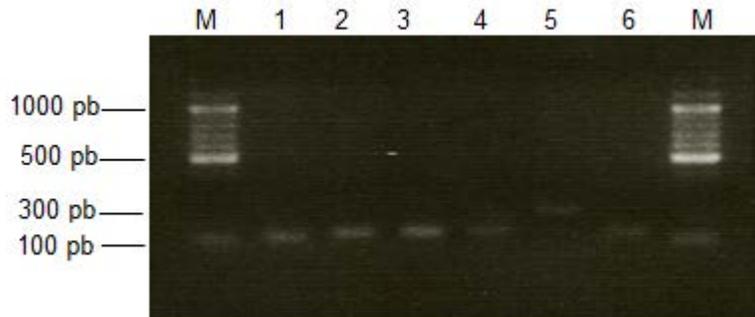
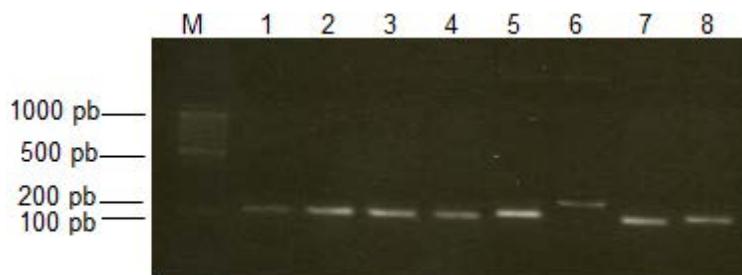


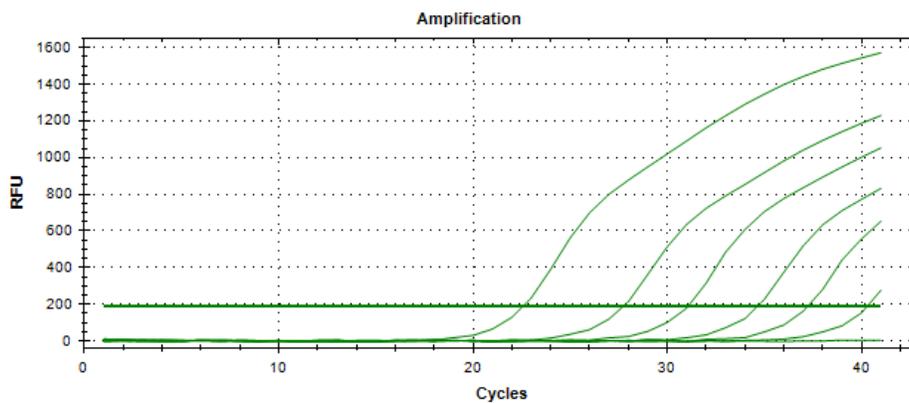
Figura 10. Gel de PCR para verificar fragmento clonado de *P. vivax*. Gel al 2% de agarosa teñido con Zvision. M: marcador de peso molecular de 100 pb, carril 1-5 y 7: colonias obtenidas que incorporaron el plásmido sin el gen, carril 6: colonia positiva para el plásmido con el gen.



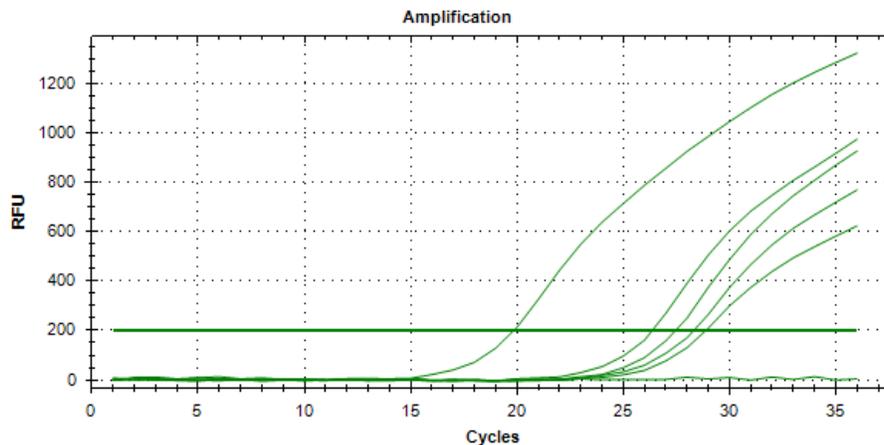
PCR en tiempo real

En la qPCR, de las 64 muestras analizadas, fueron positivas para malaria 37 y 27 negativas. De las muestras positivas, se diagnosticaron 8 para *P. falciparum* y 8 para *P. vivax*, pertenecientes al municipio de Puerto Libertador (Graficas 3 y 7). Además 2 de estas muestras, la del paciente 162 de placenta y la 167 de sangre periférica, que fueron negativas por gota gruesa, dieron positivas para *P. falciparum*. De la región de Tumaco se diagnosticaron 10 muestras con *P. falciparum* y 1 mixta, esta última (paciente 5347) fue positiva para *P. vivax* por gota, pero dio mixta por esta técnica (Graficas 4 y 8). Por otra parte para el municipio de Turbo se encontraron 9 muestras positivas para *P. falciparum* (Grafica 5) y 1 para *P. vivax* (Grafica 9). Todas las muestras fueron analizadas por duplicado y se probaron con los oligonucleotidos de género (Plasmo 1, Plasmo 2 y PLA-A, PLA-B,) y de cada especie (FAL-F, FAL-R FAL-fw, FAL-re, VIV-F, VIV- R VIV-fw, VIV-re) (Tabla 5)

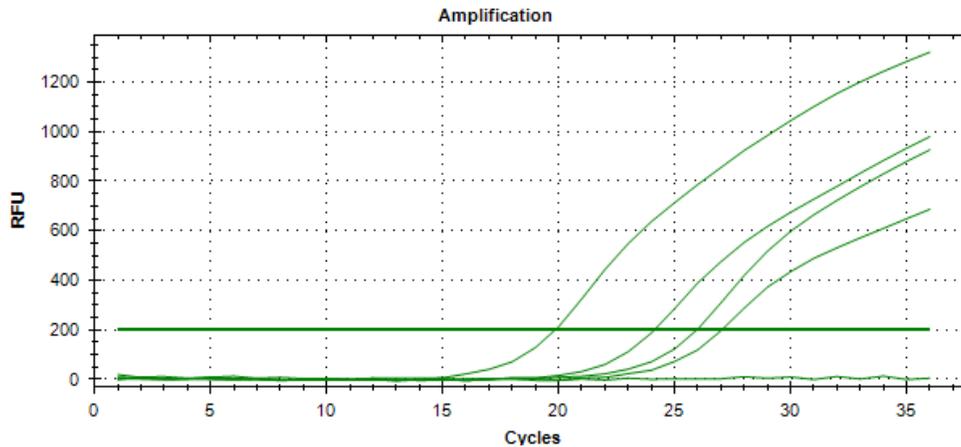
Grafica 3. Perfiles de amplificación por qPCR, para 4 muestras de Puerto Libertador positivas para *P. falciparum*. De izquierda a derecha se observan los perfiles de amplificación. Perfil 1, ADN control positivo (plásmido) que alcanzó el umbral de amplificación o ct (*cycle threshold*) en el ciclo 22, perfil 2: muestra 157 con un ct de 27, perfil 3: muestra 184 con un ct de 31, perfil 4: muestra 162 con un ct de 34, perfil 5: muestra 167 con un ct de 37 y perfil 6: muestra 199 que se consideró negativa ya que sobrepasó los 38 ciclos considerados como límite para las muestras positivas.



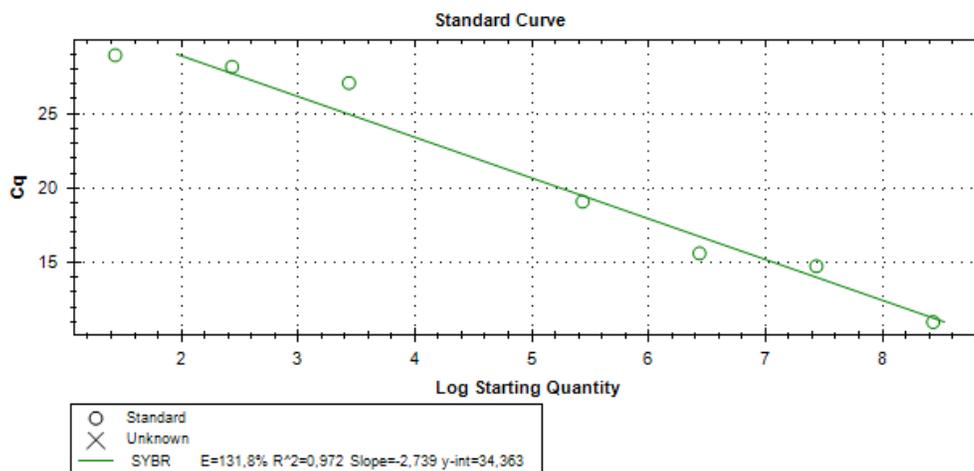
Grafica 4. Perfiles de amplificación para 4 muestras de Tumaco positivas para *P. falciparum*. De izquierda a derecha se observan los perfiles de amplificación de ADN. Perfil 1: control positivo (plásmido) con un ct de 20 ciclos, perfil 2-5: muestras 4871, 8133, 5606, 5347 y el control negativo con una fluorescencia de cero que no sobrepasa el umbral de detección.



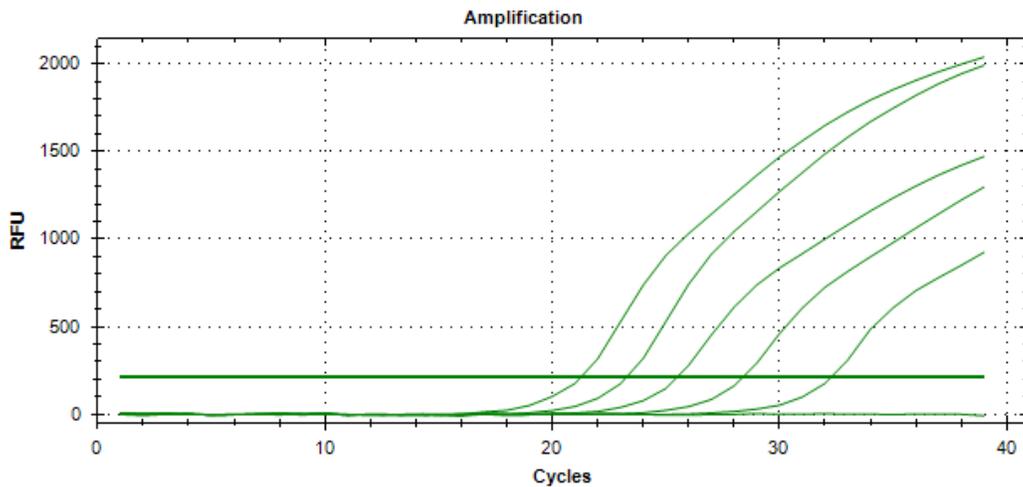
Grafica 5. Perfiles de amplificación para 3 muestras de Turbo positivas para *P. falciparum*. De izquierda a derecha se observan los perfiles de amplificación. Perfil 1: control positivo (plásmido) perfil 2-4: muestras 7002, 7003, 4002 y el control negativo con una fluorescencia de cero que no sobrepasó el umbral de detección.



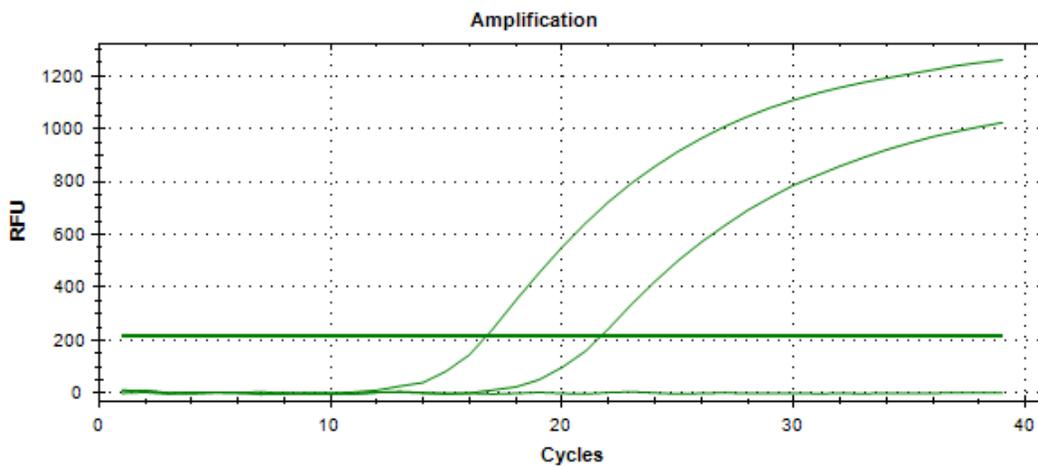
Grafica 6. Curva estándar para cuantificación de ADN de *P. falciparum*. Los datos arrojados por el software determinan una eficiencia de amplificación del 131.8% y un $R^2=0.972$.



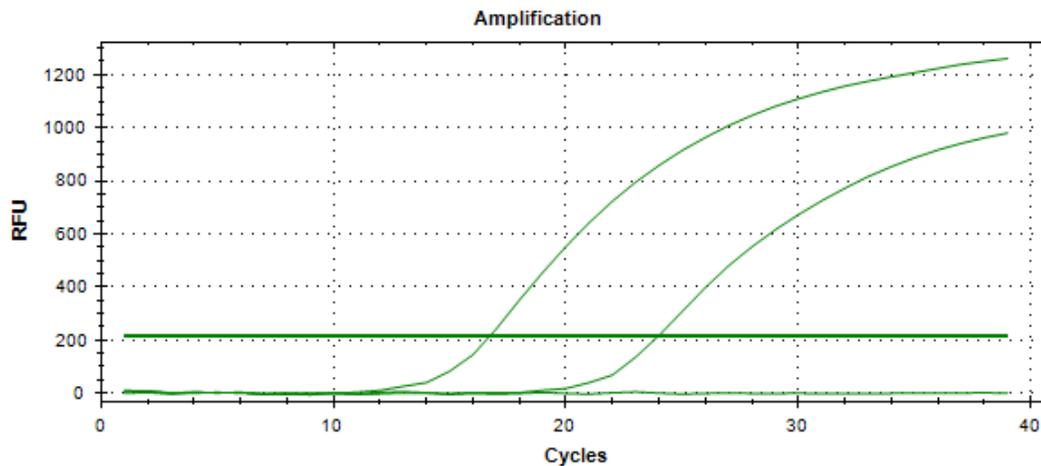
Grafica 7. Perfiles de amplificación para 4 muestras de Puerto Libertador positivas para *P. vivax*. De izquierda a derecha se observan los perfiles de amplificación. Perfil 1: control positivo (plásmido) que alcanzo el umbral de amplificación en ciclo 21, perfiles 2-5: muestras 252, 194, 253, 256 y el control negativo con una fluorescencia de cero que no sobrepasa el umbral de detección.



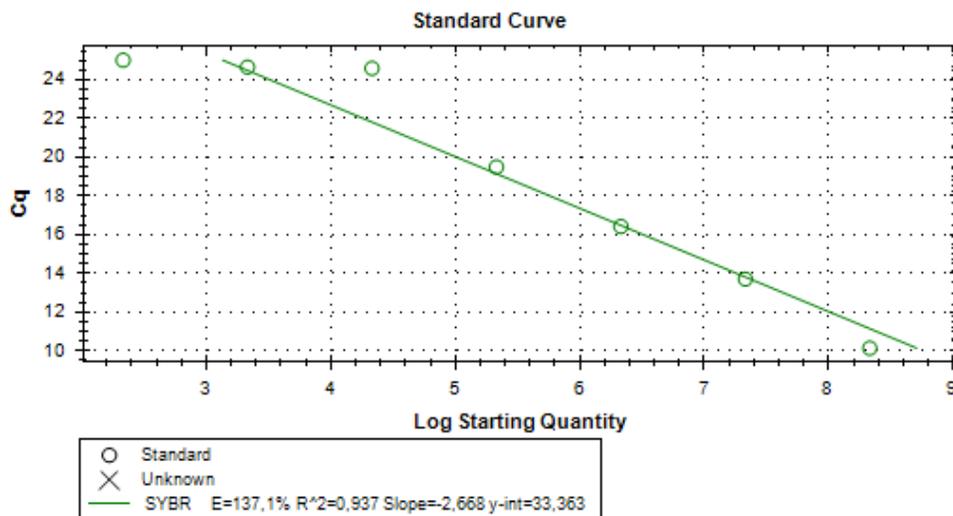
Grafica 8. Perfil de amplificación para la muestra de Tumaco positiva para *P. vivax*. De izquierda a derecha se observan los perfiles de amplificación. Perfil 1: control positivo (plásmido) que alcanzo el umbral de amplificación en ciclo 16, perfil 2: muestras 5347 con un ct de 21 y el control negativo con una fluorescencia de cero que no sobrepasa el umbral de detección.



Grafica 9. Perfil de amplificación para la muestras de Turbo positiva para *P. vivax*. De izquierda a derecha se observan los perfiles de amplificación. Perfil 1: control positivo (plásmido) que alcanzo el umbral de amplificación en ciclo 16, perfiles 2: muestra SPVP con un ct de 24 y el control negativo con una fluorescencia de cero que no sobrepasa el umbral de detección.



Grafica 10. Curva estándar para cuantificación de ADN de *P. vivax*. Los datos arrojados por el software determinan una eficiencia de amplificación del 137.1% y un $R^2 = 0.937$.



Determinación de la parasitemia por medio de las curvas estándar.

El ADN genómico y las curvas de los plásmidos mostraron una alta eficiencia y coeficientes de correlación superiores a 0.9 lo que indica una alta correlación lineal entre la cuantificación de los estándares y las muestras analizadas (Gráficas 6 y 10), por consiguiente la cuantificación de parásitos es apropiada para ambas especies.

Tabla 8. Cuantificación de las parasitemias analizadas por qPCR.

#	Código paciente	Procedencia	Paciente	Tipo de muestra	Diagnostico qPCR	Cuantificación (Parásitos/ μ L)
1	157	Puerto Libertador	No gestante	sangre [~]	<i>P. falciparum</i>	409
2	166	Puerto Libertador	No gestante	sangre [~]	<i>P. falciparum</i>	358
3	169	Puerto Libertador	No gestante	sangre [~]	<i>P. falciparum</i>	10
4	184	Puerto Libertador	No gestante	sangre [~]	<i>P. falciparum</i>	29
5	280	Puerto Libertador	No gestante	sangre [~]	<i>P. falciparum</i>	10
6	162	Puerto Libertador	Gestante	Placenta ^o	<i>P. falciparum</i> [*]	9
7	167	Puerto Libertador	Gestante	sangre [~]	<i>P. falciparum</i> [*]	8
8	177	Puerto Libertador	Gestante	placenta ^o	<i>P. falciparum</i>	8
9	192	Puerto Libertador	Gestante	sangre [~]	<i>P. vivax</i>	6140
10	194	Puerto Libertador	Gestante	sangre [~]	<i>P. vivax</i>	1383
11	252	Puerto Libertador	No gestante	sangre [~]	<i>P. vivax</i>	4507
12	253	Puerto Libertador	No gestante	sangre [~]	<i>P. vivax</i>	544
13	254	Puerto Libertador	No gestante	sangre [~]	<i>P. vivax</i>	17
14	255	Puerto Libertador	No gestante	sangre [~]	<i>P. vivax</i>	31
15	256	Puerto Libertador	No gestante	sangre [~]	<i>P. vivax</i>	264
16	257	Puerto Libertador	No gestante	sangre [~]	<i>P. vivax</i>	10

17	199	Puerto Libertador	Gestante	sangre~	Negativo	NA
18	205	Puerto Libertador	Gestante	sangre~	Negativo	NA
19	208	Puerto Libertador	Gestante	sangre~	Negativo	NA
20	211	Puerto Libertador	Gestante	sangre~	Negativo	NA
21	216	Puerto Libertador	Gestante	cordón°	Negativo	NA
22	6130	Tumaco	Gestante	sangre~	<i>P. falciparum</i>	29
23	5347	Tumaco	Gestante	sangre~	<i>P. vivax</i> ⁺ <i>P. falciparum</i>	7094 18
24	7374	Tumaco	Gestante	sangre~	<i>P. falciparum</i>	31
25	2988	Tumaco	Gestante	sangre~	<i>P. falciparum</i>	33
26	1598	Tumaco	Gestante	sangre~	<i>P. falciparum</i>	63
27	4871	Tumaco	Gestante	sangre~	<i>P. falciparum</i>	350
28	7780	Tumaco	Gestante	sangre~	<i>P. falciparum</i>	19
29	0188	Tumaco	Gestante	sangre~	Negativo	NA
30	5124	Tumaco	Gestante	sangre~	<i>P. falciparum</i>	31
31	9713	Tumaco	Gestante	sangre~	Negativo	NA
32	5606	Tumaco	Gestante	sangre~	<i>P. falciparum</i>	73
33	8133	Tumaco	Gestante	sangre~	<i>P. falciparum</i>	160
34	8038	Tumaco	Gestante	sangre~	<i>P. falciparum</i>	676
35	3631	Tumaco	Gestante	sangre~	NA	NA
36	0516	Tumaco	Gestante	sangre~	NA	NA
37	9948	Tumaco	Gestante	sangre~	NA	NA
38	8223	Tumaco	Gestante	sangre~	NA	NA
39	6131	Tumaco	Gestante	sangre~	NA	NA
40	3911	Tumaco	Gestante	sangre~	NA	NA
41	7178	Tumaco	Gestante	sangre~	NA	NA
42	6757	Tumaco	Gestante	sangre~	NA	NA

43	6789	Tumaco	Gestante	sangre~	NA	NA
44	1390	Tumaco	Gestante	sangre~	NA	NA
45	1-054	Turbo	Gestante	sangre~	NA	NA
46	1-047	Turbo	Gestante	sangre~	NA	NA
47	G-7002	Turbo	No gestante	sangre~	<i>P.falciparum</i>	487
48	G-4002	Turbo	No gestante	sangre~	<i>P.falciparum</i>	154
49	G-4004	Turbo	No gestante	sangre~	<i>P.falciparum</i>	124
50	1-048	Turbo	Gestante	sangre~	NA	NA
51	1-052	Turbo	Gestante	sangre~	NA	NA
52	1-046	Turbo	Gestante	sangre~	NA	NA
53	1-049	Turbo	Gestante	sangre~	NA	NA
54	G-4001	Turbo	No gestante	sangre~	<i>P. falciparum</i>	92
55	G-4003	Turbo	No gestante	sangre~	<i>P. falciparum</i>	1043
56	G-4005	Turbo	No gestante	sangre~	<i>P. falciparum</i>	91
57	1-055	Turbo	Gestante	sangre~	NA	NA
58	G-7001	Turbo	No gestante	sangre~	<i>P.falciparum</i>	714
59	G-7004	Turbo	No gestante	sangre~	<i>P.falciparum</i>	1182
60	G-7003	Turbo	No gestante	sangre~	<i>P.falciparum</i>	242
61	1-050	Turbo	No gestante	sangre~	NA	NA
62	1-051	Turbo	Gestante	sangre~	NA	NA
63	1-053	Turbo	Gestante	sangre~	NA	NA

64	SPVP	Turbo	Gestante	sangre [~]	<i>P.vivax</i>	1184
----	------	-------	----------	---------------------	----------------	------

* Muestras que no respondieron al diagnóstico por técnica clásica

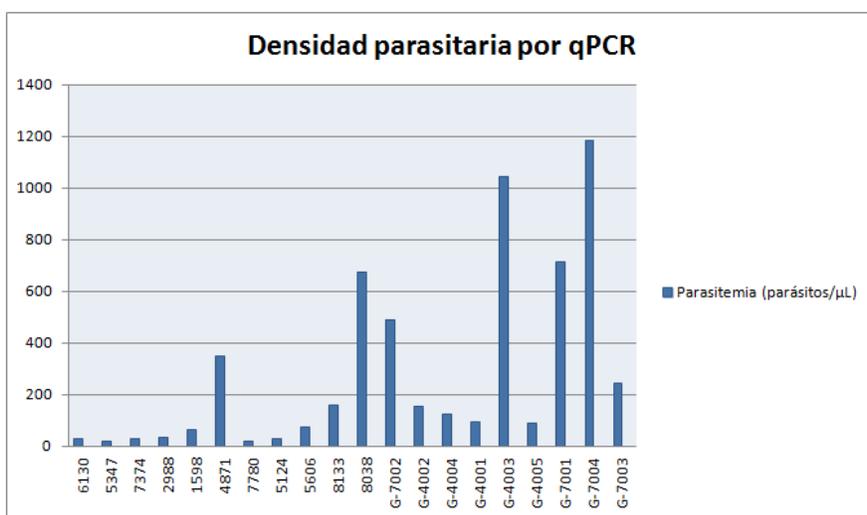
† Muestra mixta por esta técnica, no detectada por gota gruesa

[~] Muestras extraídas de sangre periférica

^o Muestras extraídas de sangre de ese tejido

NA: No amplificó

Grafica 11. Densidad parasitaria determinada por qPCR. Las parasitemias estimadas presentan un valor mínimo de 8 parásitos/μL de sangre (muestras 167-177) y un valor máximo de 7.094 parásitos/μL de sangre (muestra G-7002).



Análisis de EPIDAT

Por medio del software EPIDAT se obtuvo la sensibilidad y especificidad de la PCR convencional y la qPCR en relación a la gota gruesa como prueba estándar. Para ambas técnicas se obtuvo una sensibilidad del 100% y una especificidad del 93.10% con un nivel de confianza del 95.0%.

Tabla 9. Resultados de EPIDAT

Nivel de confianza: 95.0%

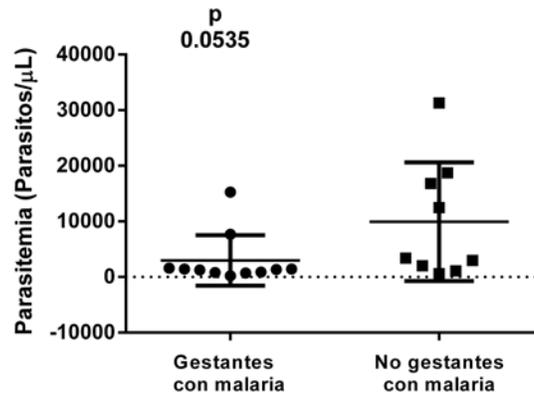
	Prueba de referencia: Gota gruesa		
Prueba diagnóstica: qPCR	Enfermos	Sanos	Total
Positivo	35	2	37
Negativo	0	27	27
Total	35	29	64

Valor	IC (95%)		
Sensibilidad (%)	100.00	98.57	100.00
Especificidad (%)	93.10	82.16	100.00

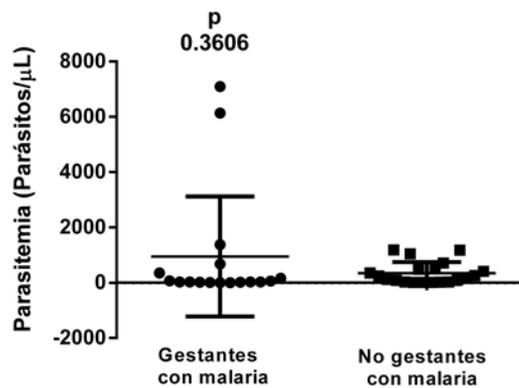
Análisis de PRISM

Se analizaron las parasitemias obtenidas por gota gruesa y por qPCR en dos grupos: gestantes con malaria y no gestantes con malaria para examinar si existía diferencia entre estas (Gráficas 12 y 13).

Grafica 12. Comparación de las parasitemias obtenidas por gota gruesa entre gestantes y no gestantes. La densidad parasitaria fue comparada por medio de la prueba de Mann-Whitney arrojando un valor p de 0.0535 lo que indica que no hay diferencia significativa en las parasitemias de estos dos grupos.



Grafica 13. Comparación de las parasitemias obtenidas por qPCR entre gestantes y no gestantes. La densidad parasitaria fue comparada por medio de la prueba de Mann-Whitney arrojando un valor p de 0.3606 lo que indica que no hay diferencia significativa en las parasitemias de estos dos grupos.



DISCUSIÓN

La malaria en el embarazo es uno de los principales problemas de salud pública en los países endémicos como Colombia. En zonas de baja transmisión, la infección por *P. falciparum* durante el embarazo suele presentarse como una enfermedad sintomática grave que puede causar la muerte de la madre y el feto. Zonas como Puerto Libertador, Turbo y Tumaco son consideradas de alta transmisión ya sea por *P. falciparum* o por *P. vivax* (Secretaría de Desarrollo de la Salud, 2011, Situación de la malaria en la costa pacífica de Nariño 2001, Carmona-Fonseca y Maestre, 2009). En estas áreas de alta transmisión, pocas infecciones por *P. falciparum* dan lugar a fiebre y muerte materna, pero el recién nacido puede verse seriamente afectada por el retraso del crecimiento intrauterino, parto prematuro, incluso la muerte. Conjuntamente en estas zonas donde la transmisión es estable, la mayoría de las infecciones son asintomáticas (Desai *et al*, 2007). En nuestro caso no se tuvo acceso a la sintomatología de las pacientes, pues la revisión médica de cada una de ellas se realizó en su región de domicilio. Sin embargo tenemos conocimiento de que la mayoría de las pacientes no presentaban los síntomas de la enfermedad y se acercaban a los respectivos hospitales para consultas relacionadas con su embarazo, por esto el examen de microscopía se realizaba como análisis complementario, mas no porque se presentaran los síntomas de la enfermedad. La microscopía es uno de los métodos más ampliamente utilizados y es considerado el “*gold estándar*” para el diagnóstico de la malaria. Esta técnica tiene algunas ventajas tales como la posibilidad de la determinación de la densidad de parásitos y especies. Sin embargo, necesita microscopistas experimentados, e incluso técnicos altamente capacitados no pueden identificar al nivel de especie, además, pueden verse discrepancias en la cuantificación cuando son realizadas por varios técnicos (O`meara *et al*, 2006). Nosotros no podemos hacer una evaluación de la forma en que fue realizada la cuantificación del parásito por gota gruesa, dado que esta se realizó en diferentes sitios y por microscopistas distintos, por el contrario la cuantificación del parásito por qPCR fue realizado por una sola persona y siguiendo el mismo protocolo en todos los casos. Otra de las limitaciones que presenta la gota gruesa, es su sensibilidad, que no puede pasar por debajo de 10-15 parásitos por μL . Es de resaltar que en nuestro estudio hubo dos muestras (162-167) que dieron negativas por gota gruesa (Tabla 6) pero positivas para *P. falciparum* por las técnicas moleculares (Tabla 7 y 8) , es estas muestras la concentración

del parásito es incipiente, requiriendo una observación más repetitiva por la técnica de gota gruesa (más allá de 200 campos), hasta encontrar mínimamente un microorganismo; en el caso de ser menor a un parásito por μL o donde no hay células del parásito (ADN remanente) (Mangold *et al*, 2005), la única forma de detectarlo sería por PCR o qPCR, como sucedió en nuestro caso. Es posible que la paciente 167 al ser gestante no revele parasitemia periférica debido a que la infección por *P. falciparum* en mujeres embarazadas se presenta de forma diferente que en las mujeres no embarazadas, ya que los parásitos de *P. falciparum* expresan una proteína codificada por los genes de la familia *var* que se unen a la molécula CSA presente en la placenta favoreciendo el secuestro de parásitos, lo que se conoce como malaria placentaria (Rogerson *et al*, 2007). Por lo tanto, las parasitemias de mujeres embarazadas pueden encontrarse por debajo del límite de detección de microscopía (Uneke, 2008) (Ommo *et al*, 2008), como ocurrió con esta paciente.

Las dos muestras 162 y 167, denotan la importancia de usar métodos diagnósticos más sensibles, debido a que estas infecciones submicroscópicas no siempre son detectadas por métodos convencionales. La PCR convencional aparece como otra alternativa para realizar el diagnóstico de malaria, pero requiere una infraestructura extra, inclusive mayor que la requerida por la qPCR y además también un buen conocimiento de la técnica, a pesar de estas limitaciones ha demostrado ser exitosa en todo el mundo incluido nuestro país (Montoya *et al*, 2008; Kyabayinze *et al*, 2011). Algunos estudios a nivel mundial, han establecido la alta sensibilidad de la PCR estimándose en una detección de 3 a 4 parásitos por μL de sangre (0,0005% a 0,0015% de glóbulos rojos infectados) y una especificidad que oscila entre el 90 y 95%. Sin embargo con esta técnica no se obtienen resultados cuantitativos, es poco práctica cuando se requieren diagnósticos de urgencia y detecta falsos positivos (Kolaczinski *et al*, 2004). Para nuestras muestras analizadas con PCR convencional podemos decir que no tuvimos dificultad en usar la técnica, pero su gran limitante es que impide hacer una correlación con gota gruesa y qPCR. Salvo un resultado positivo o negativo, no se puede sacar mayor información comparado con gota gruesa y la qPCR que si pueden estimar la parasitemia del paciente.

La qPCR ya es convencional para el diagnóstico de varios agentes infecciosos (Snounou *et al*, 1993) empleando sondas y oligonucleótidos específicos. Ya ha sido bien

estandarizado el uso de qPCR en el diagnóstico de la malaria, especialmente para *P. falciparum*, *P. vivax* y *P. ovale* como se muestra en el estudio de Mangold, *et al*, 2005, en el cual se emplean sondas para la visualización de la amplificación del ADN durante la qPCR con sonda tipo TaqMan. Las sondas aumentan la especificidad al ADN blanco y además permiten hacer un diagnóstico múltiple, por otra parte su utilización requiere una estandarización rigurosa y su implementación es muy costosa. A diferencia del estudio de Mangold *et al*, nosotros, utilizamos el SYBR Green para la visualización de los productos de la PCR ya que es un método mucho más económico que utilizar sondas TaqMan. En cuanto a la sensibilidad y especificidad la qPCR es más sensible (hasta 20 parásitos/mL de sangre) (Andrews *et al*, 2005), y más específica que la microscopía, especialmente en casos de infecciones mixtas, se tiende a indicar que la infección está dada solo por uno de los parásitos, porque uno dificulta el diagnóstico del otro (Shokoples *et al*, 2009, Yanow *et al*, 2009). Cabe destacar que en nuestro trabajo la qPCR pudo detectar eficazmente la muestra mixta 5347 que no fue detectada por gota, la densidad parasitaria cuantificada por qPCR para esta muestra fue de 7.094 parásitos/ μ L de *P. vivax* y 18 parásitos/ μ L de *P. falciparum* (Tabla 8). Es de suma importancia la acertada distinción entre especies en las infecciones mixtas así como la cuantificación, para formular el tratamiento adecuado, especialmente en las zonas donde los parásitos exhiben resistencia a los medicamentos (Dormond *et al*, 2011).

En algunos estudios a nivel mundial la qPCR, ha mostrado una sensibilidad del 93,88% y una especificidad del 100%. Otros autores reportan valores más altos: sensibilidad que llegan al 96,6% (Boonma *et al*, 2007), 98,5% (Han *et al*, 2007) y 99,41% (Khairnar *et al*, 2009). Un estudio reciente realizado en Córdoba, Colombia produjo una sensibilidad para qPCR de 93% y una especificidad del 100% (Taylor *et al*, 2011). Realizando la misma valoración para nuestro estudio la sensibilidad de la qPCR fue del 100% y la especificidad del 93.10 con un intervalo de confianza del 95% en relación a la gota gruesa como la prueba estándar (Tabla 9).

Los niveles de detección de la qPCR, mostraron ser muchísimo más bajos para *P. falciparum* que los niveles detectados por gota gruesa (Grafica 2 y 11), dado que la qPCR pudo detectar hasta 8 parásitos/ μ L de sangre a diferencia de la gota gruesa donde la parasitemia mínima reportada en nuestros datos fue de 240 parásitos/ μ L. Es importante

tener en cuenta que la muestra es posteriormente fijada y secada en papel, luego llevada al laboratorio para su extracción, lo cual puede generar la degradación previa del ADN antes de su extracción. En el caso de parasitemias entre gestantes y no gestantes se ha reportado que las gestantes presentan bajas densidades de parásitos en sangre periférica (Kattenberg *et al*, 2011) pero no encontramos en reportes recientes ningún estudio en el que se soportara estadísticamente estas variaciones en la parasitemia. Nosotros quisimos hacer una aproximación a este patrón y no encontramos diferencias significativas en la carga parasitaria entre gestantes y no gestantes con los resultados obtenidos por qPCR, analizados por el software PRISM el cual arroja un valor $p=0.3606$ (Grafica 13), mientras que para la gota gruesa aunque el valor p fue mayor a 0.05 ($p=0.0535$) (Grafica 12) no se aleja mucho del valor p , permitiendo inferir ya algunas diferencias aun no totalmente significativas; variables como el tamaño de la muestra entre otras deberán ser aumentadas para obtener un valor de p exacto esperado. La idea es aumentar el número de pacientes para poder hacer una comparación más robusta.

De acuerdo a los resultados obtenidos la utilización de la qPCR permitiría una aplicación más confiable para el diagnóstico de la malaria gestacional, ya que la detección de los casos submicroscopicos no pasarían desapercibidos; además la necesidad de conocer la carga parasitaria para suministrar el tratamiento adecuado de antimaláricos, ya que estos medicamentos pueden llegar a ser tóxicos para el feto en formación.

Finalmente al comparar la prueba clásica con las pruebas moleculares, se observa un mayor grado de sensibilidad de las pruebas moleculares para la detección de *P. falciparum* porque detecto parasitemias submicroscopicas y mixtas no detectadas por gota gruesa.

Conclusiones

- El utilizar nuevos oligonucleótidos y nuevas regiones permitieron la detección eficiente del parásito con resultados confiables y reproducibles con los reportados en otros estudios.

- Aunque el estudio privilegia el análisis de muestras con las técnicas moleculares no se puede desmeritar el resultado obtenido por la técnica clásica que sigue siendo muy buena.
- Las parasitemias obtenidas con gota gruesa y qPCR muestran una tendencia similar, aunque puede haber una cuantificación subestimada para qPCR y sobrestimada para gota gruesa.
- La qPCR es confiable para la identificación de diferentes especies, siguiendo todos los procedimientos en una técnica segura y sin dificultad podría aplicarse en campo.

Perspectivas y recomendaciones

- Se pueden explotar los beneficios de la qPCR para estudios epidemiológicos a gran escala en áreas endémicas ya que esta técnica permite el análisis de una gran cantidad de muestras de una manera rápida y confiable.
- Sería interesante acompañar el estudio con pacientes gestantes que se les pueda medir la parasitemia en distintos periodos hasta llegar al nacimiento y analizar la placenta para determinar qué tan frecuentemente queda ADN remanente.

BIBLIOGRAFIA

Andrews L, Andersen RF, Webster D et al. 2005. Quantitative real-time polymerase chain reaction for malaria diagnosis and its use in malaria vaccine clinical trials. *Am J Trop Med Hyg*; 73: 191–198.

Arango E, Maestre A, Carmona-Fonseca J. 2010. Efecto de la infección submicroscópica o policlonal de *Plasmodium falciparum* sobre la madre y el producto de la gestación: revisión sistemática. *Rev. bras. epidemiol.*; 13(3): 373-386.

Barrios E, García J. 2009. Formulario y Tablas de Probabilidad para el Curso de Estadística II. Instituto Tecnológico Autónomo de México. Versión 1.00.

Bianca E. Gama a, Felipe do E.S. Silva-Pires et al. 2007. Real-time PCR versus conventional PCR for malaria parasite detection in low-grade parasitemia. *Experimental Parasitology* 116 427–432

Blair Trujillo, S. 2002. "Malaria y Embarazo." *Asociación Colombiana de Infectología* 6: 168-173.

Blanquiceth Y, Corredor M, Murillo O, Maestre A. 2012. Comparación de métodos diagnósticos, clásicos y moleculares para la identificación de malaria gestacional en pacientes de Córdoba, Colombia (Somatido).

Boletín epidemiológico No 49 de la malaria en Colombia. 2012. SIVIGILA.

Boonma P, Christensen PR, Suwanarusk R, Price RN, Russell B, LekUthai U. 2007. Comparison of three molecular methods for the detection and speciation of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*. *Malar J.*; 6: 124.

Bourgeois N, Boutet A, Bousquet P, Bassets D, Douard-Enault C, Charachon S, et al. 2010. Comparison of three real-time PCR methods with blood smears and rapid diagnostic test in *Plasmodium sp.* *Infection. Clin Microbiol Infect.*; 16: 1305–1311

Brahin BJ. 1983. An analysis of malaria in pregnancy in Africa. *Bull WHO.* 61(6): 1005-1016.

Campos IM, Uribe ML, Cuesta C, Franco A, Carmona J, Maestre A. 2011. Diagnosis of Gestational, Congenital, and Placental Malaria in Colombia: Comparison of the Efficacy of Microscopy, Nested Polymerase Chain Reaction, and Histopathology. *Am J Trop Med. Higiene.*; 84(6): 929–93

- Carmona-Fonseca J, Maestre A.** 2009. Prevention of *Plasmodium vivax* malaria recurrence: Efficacy of the standard total dose of primaquine administered over 3 days. *Acta Tropica*.; 112: 188–192.
- Carmona-Fonseca Jaime, Maestre A.** 2009. Incidencia de la malaria gestacional, congénita y placentaria en urabá (Antioquia, Colombia), 2005-2007. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*. 60(1): 19-33.
- Carrasquilla G, Banguero M, Sanchez P, Carvajal F, Barker RH Jr.** 2006. Efectos de una intervención educativa y de participación comunitaria en el control de la malaria en Buenaventura, Colombia. *Biomédica* vol.26, n.3, pp. 366-378.
- Conroy AL, McDonald CR, Silver KL, Liles WC, Kain KC.** 2011. Complement activation: a critical mediator of adverse fetal outcomes in placental malaria? *Trends Parasitol*; 27(7):294-9.
- Cunningham F.G. Cunningham, J. Whitridge Williams.** 1997 *Williams Obstetrics*, 19th Ed. Appleton and Lange. Texas, USA. p 1352.
- Desai M, ter Kuile FO, Nosten F, McGready R, Asamo K, Brabin B, Newman RD.** 2007. Epidemiology and burden of malaria in pregnancy. *Lancet Infect Dis* , 7:93-104
- Desai, M., F. O. ter Kuile, et al.** (2007). "Epidemiology and burden of malaria in pregnancy." *Lancet Infect Dis* 7(2): 93-104.
- Diagne N, Rogier C, Gisse B, Trape JF.** 1997. Incidence of clinical malaria in pregnant women exposed to intense perennial transmission. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 91:166-170.
- Dormond L, Jatou-Ogay J, Vallie S, Genton B, Bille J, Greub G.** 2011. Multiplex real-time PCR for the diagnosis of malaria: correlation with microscopy. *Clin Microbiol Infect*. 17:469–475
- Elbashir H, Salih M, Elhassan E, Mohammed A, Elbashir M, Adam I.** 2011. Polymerase chain reaction and histology in diagnosis of placental malaria in an area of unstable malaria transmission in Central Sudan. *Diagnostic Pathology*, 6:128
- Fletcher KA.** 1981. Studies on the pharmacokinetics of primaquine. *Bull World Health Organ*. 59(3):407-412
- Han ET, Watanabe R, Sattabongkot J, Khuntirat B, Sirichaisinthop J, Iriko H, et al.** 2007. Detection of four *Plasmodium* species by genus- and species-specific loop-mediated isothermal amplification for clinical diagnosis. *J Clin Microbiol*.; 45: 2521-2528.

Hawkes M, Kain KC. Advances in malaria diagnosis. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2007 Jun;5(3):485-95.

Ho M, White NJ. 1999. Molecular mechanisms of cytoadherence. *Am J Physiol Cell Physiol.* 276:1231-1242.

Kassa Desta , P. B., Mesele Tsehaynesh , Hailu Ermias , and Wolday Dawit. 2006. Characterization of Peripheral Blood Lymphocyte Subsets in Patients with Acute *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* Malaria Infections at Wonji Sugar Estate, Ethiopia *Clinical and Vaccine Immunology* 13:3: 376-379

Kattenberg J, Ochodo E, Boer K, Schallig H, Mens P, Leeflang M. 2011. Systematic review and meta-analysis: rapid diagnostic tests *versus* placental histology, microscopy and PCR for malaria in pregnant women.

Khairnar K, Martin D, Lau R, Ralevski F, Pillai DR. 2009. Multiplex real-time quantitative PCR, microscopy and rapid diagnostic immuno-chromatographic tests for the detection of *Plasmodium* spp: performance, limit of detection analysis and quality assurance. *Malar Journal.*; 8: 284.

Khattab A, Kreamsner PG, Meri S. 2012. Complement activation in primiparous women from a malaria endemic area is associated with reduced birthweight.

Kramer, M. F. Coen, D. M. 2001. *Current Protocols in Molecular Biology.* 15.1.1-15.1.14 Copyright by John Wiley & Sons, Inc.

Kyabayinze D, Tibenderana J, Nassali M, Linette K, Riches C, Montague M, et al. 2011. Placental *Plasmodium falciparum* malaria infection: Operational accuracy of HRP2 rapid diagnostic tests in a malaria endemic setting. *Malar J.* 10:306

Larkin, G. L. and P. E. Thuma 1991. "Congenital malaria in a hyperendemic area." *Am J Trop Med Hyg* 45(5): 587-92.

Le Hesran, J. Y., M. Cot, et al. 1997. "Maternal placental infection with *Plasmodium falciparum* and malaria morbidity during the first 2 years of life." *Am J Epidemiol* 146(10): 826-31

Lima G et al. 2011. Malaria diagnosis from pooled blood samples: comparative analysis of real-time PCR, nested PCR and immunoassay as a platform for the molecular and serological diagnosis of malaria on a large-scale. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* Costa-Nascimento M, Di Santi S. 106(6): 691-700.

Lima G, Levi J, Geraldi MP, Sanchez MC, Segurado A, Hristoy A, et al. 2011. Malaria diagnosis from pooled blood samples: comparative analysis of real-time PCR, nested PCR

and immunoassay as a platform for the molecular and serological diagnosis of malaria on a large-scale. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro Costa-Nascimento M, Di Santi S.; 106(6): 691-700.

Ljungström I, Perlmann H, Schlichtherle M, Scherf A, Wahlgren M. 2004. Methods in malaria research. Fourth Edition. MR4 / ATCC Manassas, Virginia

Mangold Ka, Manson R, Koay E, Stephens L, Regner MA, Thomson R, et al. 2005. Real-time pcr for detection and identification of *Plasmodium* spp. J of clin microbiol.; 43(5): 2435–2440.

Mayor A, Serra E, Bardaji A, Sanz S, Puyol L, Cisterò P, et al. 2009. Sub-microscopic infections and long-term recrudescence of *Plasmodium falciparum* in Mozambican pregnant women. Malar Journal.; 8:9.

McGregor IA. 1984. Epidemiology, malaria and pregnancy. Am J Trop Med Hyg. 33(4):517-525.

McNamara, D. T., L. J. Kasehagen, et al. 2006. "Diagnosing infection levels of four human malaria parasite species by a polymerase chain reaction/ligase detection reaction fluorescent microsphere-based assay." Am J Trop Med Hyg 74(3): 413-21.

Menendez, C. 1995. "Malaria during pregnancy: a priority area of malaria research and control." Parasitol Today 11(5): 178-83.

Alam, M. S., Mohon A, Mustafa S, Khan W, Islam N, Karim M, Khanum H, Sullivan D, Haque R. 2011. Real-time PCR assay and rapid diagnostic tests for the diagnosis of clinically suspected malaria patients in Bangladesh. *Malaria Journal*, 10:175

Mockenhaupt FP, Rong B, Till H, Eggelte TA, Beck S, Gyasi-Sarpong C, Thompson Montoya A, Menco J, Osorio N, Zuluaga M, Duque J, Torres G, et al. 2008. Concordancia entre gota gruesa, inmunocromatografía y reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de malaria. Biomedica.; 28:252-61

Mota MM, Pradel G, Vanderberg J, Hafalla J, Frevert U, Nussenzweig R, Nussenzweig V, Rodriguez A . 2001. Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. Science. 291(5501):141-4.

Multiplexed real-time PCR assay for discrimination of *Plasmodium* species with

Mutabingwa, T. K., M. C. Bolla, et al. 2005. Maternal malaria and gravidity interact to modify infant susceptibility to malaria. PLoS Med 2(12): e407.

Nosten, F. and R. McGready. 2003. Burden of malaria during pregnancy in areas of stable and unstable transmission in Ethiopia during a nonepidemic year." *J Infect Dis* 188(8): 1259-61; author reply 1561-2.

Nosten F, Rogerson S, et al. 2004. Malaria in pregnancy and the endemicity spectrum: what can we learn? *Trends Parasitol* 20(9): 425-32.

Okell LC, Ghani AC, Lyons E, Drakeley CJ. 2009. Submicroscopic infection in *Plasmodium falciparum*-endemic populations: a systematic review and meta-analysis. *J Infect Dis.* 200: 1509–1517

Omo-Aghoja LO, Abe E, Feyi-Waboso P, Okonofua FE. 2008. The challenges of

Organizacion de las Naciones Unidas ONU. 2010. Departamento de Información Pública de las naciones unidas.

Organización panamericana de la salud (OPS). 2010. Guía de atención clínica de la malaria. Colombia.

Organización mundial de la salud. OMS. Reporte mundial de malaria 2012. Ginebra, Suiza

Orozco RC. 1997. Malaria congénita, Tópicos de Infectología, Universidad de Antioquía.

Pasapera J, Rojas JL, Rojas I, Vidal L, Pareja David. 2007. eledetección óptica y su aplicación en malaria transmitida por *Plasmodium vivax*.

Payá Antonio, Carreras Ramón. 2004. Paludismo y gestación. *Ginecología y Obstetricia Clínica* 5(4):204-210.

Rogerson SJ, Hviid L, Duffy PE, Leke RF, Taylor DW. 2007. Malaria in pregnancy: pathogenesis and immunity. *Lancet Infect Dis*, 7:105-117.

Rogerson, S. J., L. Hviid, et al. 2007. Malaria in pregnancy: pathogenesis and immunity. *Lancet Infect Dis* 7(2): 105-17.

Rogerson, S. J., V. Mwapasa, et al. 2007. Malaria in pregnancy: linking immunity and pathogenesis to prevention. *Am J Trop Med Hyg* 77(6 Suppl): 14-22.

Sakihama N, Mitamura T, Kaneko A, Horii T, Tanabe K. 2001. Long PCR amplification of *Plasmodium falciparum* DNA extracted from filter paper blots. *Exp Parasitol* 97(1): 50-54.

Salto M. 2006. Estandarización de la técnica de PCR en tiempo real para la detección cuantitativa de *Babesia bigemina* en muestras sanguíneas. Universidad Veracruzana.

Schofield L, Grau GE. 2005. Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat Rev Immunol.*; 5(9):722-35.

Secretaría de Desarrollo de la Salud. Departamento de Córdoba. 2011. Estudios previos de conveniencia y oportunidad..

Shokoples SE, Ndao M, Kowalewska-Grochowska K, Yanow SK. 2009. Multiplexed real-time PCR assay for discrimination of *Plasmodium* species with improved sensitivity for mixed infections. *J Clin Microbio.* 47: 975–980.

Sholapurkar, S, Gupta N et al. 1988. Clinical course of malaria in pregnancy--a prospective controlled study from India. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 82(3): 376-9.

Shulman E y Dorman K. 2003. Importance and prevention of malaria in pregnancy. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 97(1): 30-5.

Shulman C, Dorman k, et al. 1999. Intermittent sulphadoxine-pyrimethamine to prevent severe anaemia secondary to malaria in pregnancy: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 353(9153): 632-6.

Shulman E, Graham J, et al. 1996. Malaria is an important cause of anaemia in primigravidae: evidence from a district hospital in coastal Kenya." *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90(5): 535-9.

Singh N, Shukla MM, Shukla MK, Mehra RK, Sharma S, Bharti PK, Singh MP, Singh A, Gunasekar A. 2010. Field and laboratory comparative evaluation of rapid malaria diagnostic tests versus traditional and molecular techniques in India. *Malar J*, 9:191

Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, Thaithong S, Brown KN. 1993. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol.* 61(2):315-20.

Steketee W, Wirima J et al. 1996. The problem of malaria and malaria control in pregnancy in sub-Saharan Africa. *Am J Trop Med Hyg* 55(1 Suppl): 2-7.

Stevenson MM, Riley EM. 2004. Innate immunity to malaria. *Nature Rev*, 4: 169-80.

Suguitan, A. L., Jr., R. G. Leke, et al. 2003. Changes in the levels of chemokines and cytokines in the placentas of women with *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis* 188(7): 1074-82.

Takem E, D'Alessandro U. 2011. Malaria in Pregnancy. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases.* 5(1).

Tako, A, Zhou A et al. 2005. Risk factors for placental malaria and its effect on pregnancy outcome in Yaounde, Cameroon. *Am J Trop Med Hyg* 72(3): 236-42.

Tan, S. O., R. McGready, et al. (2008). Thrombocytopaenia in pregnant women with malaria on the Thai-Burmese border. *Malar J* 7: 209.

Taylor B, Martin K, Arango E, Agudelo O, Maestre A, and Yanow E. Real-time PCR detection of *Plasmodium* directly from whole blood and filter paper samples. *Malaria Journal* 2011; 10:244

Ulmen U, Von G.C, Bedu-Addo G. Bienzle, U. 2002. Diagnosis of placental malaria. *Journal Clinical Microbiology.* 40(1):306-8..

Uneke CJ. 2007. Impact of Placental *Plasmodium falciparum* Malaria on Pregnancy and Perinatal Outcome in Sub-Saharan Africa. *Yale J of Biol and Med;* 80: 39-50.

Uneke CJ. 2008. Diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria in pregnancy in

Van Eijk, A. M., J. G. Ayisi, et al. 2002. Malaria and human immunodeficiency virus infection as risk factors for anemia in infants in Kisumu, western Kenya. *Am J Trop Med Hyg* 67(1): 44-53.

Wahlgren M and Permman P. 1999. *Malaria, Molecular and clinical aspects* 1 st edition. Editorial Harwood academics publishers. Amsterdam.

WHO, Guidelines for the treatment of malaria, Second edition. 2010: Geneva, Switzerland. p. 1-32.

World Health Organization. 2012. 10 facts on malária Switzerland

World Health Organization. 2002. Roll Back Malaria, a global partnership. Switzerland

World Health Organization. 2002. The world health report. Switzerland

World Health Organization. 2008. Malaria global Report 2008. Switzerland

WN, Bienzle U. 2000. Submicroscopic *Plasmodium falciparum* infections in pregnancy in Ghana. *Trop Med Int Health.* 5:167–173. doi: 10.1046/j.1365-3156**Mockenhaupt F.P,**

Anexo 1

Consentimiento informado FORMULARIO CONSENTIMIENTO INFORMADO

Diagnóstico de malaria gestacional por métodos moleculares y clásicos en las pacientes afectadas de las regiones endémicas de Antioquia, Córdoba y Nariño

Investigadores: Mauricio Corredor UdeA, Oscar Murillo UCC, Amanda Maestre B. UdeA.

Los investigadores de los Grupos Salud y Comunidad y Genética y Bioquímica de Microorganismos de la Universidad de Antioquia, mediante la Investigación: "Diagnóstico de malaria gestacional por métodos moleculares y clásicos en las pacientes afectadas de las regiones endémicas de Antioquia, Córdoba y Nariño", pretenden buscar un método alternativo para diagnóstico de la enfermedad malaria en madres gestantes como Ud., que sea más sensible y rápido, en caso de que Ud. sea positivo (tiene el parásito). Esta información servirá para mejorar el diagnóstico y tratamiento de la malaria causada por *Plasmodium falciparum* y *P. vivax*, que son los parásitos que produce mayores complicaciones como el paludismo cerebral y puede causar hasta la muerte. El portar el parásito como madre gestante puede representar un problema grave para desarrollo de su hijo, causándole retraso en el crecimiento, complicaciones cerebrales, anemia, retraso mental e incluso la muerte.

Esta investigación se llevará a cabo con muestras de sangre de pacientes gestantes con malaria por *P. falciparum* y *P. vivax* que viven en las regiones de Antioquia, Córdoba, Nariño y Chocó. Estas muestras de sangre serán transportadas hacia Medellín, donde se realizarán exámenes especiales para estudiar. Los exámenes que se realizarán reciben el nombre de gota, PCR y qPCR.

Usted como gestante puede tener malaria o paludismo causada por *P. falciparum* y *P. vivax* y pensamos que puede hacer parte de este estudio, si está de acuerdo.

Su participación es voluntaria y no tendrá ningún costo para usted ni su familia y pueden retirarse en cualquier momento del estudio. Si decide no participar, no tendrá ningún inconveniente y recibirá igualmente el tratamiento recomendado para esta enfermedad.

Antes de otorgar su consentimiento en el estudio, es importante que lea y comprenda la siguiente explicación sobre el estudio y los procedimientos.

- Si Usted decide participar en el estudio se les tomarán dos (2) centímetros cúbicos de sangre de una vena del antebrazo para hacer el examen de gota gruesa, que es el examen utilizado normalmente para el diagnóstico del paludismo y para realizar los exámenes especiales en Medellín (PCR y qPCR). Los exámenes que se le realizarán no le generarán ningún costo adicional y podrá conocer los resultados si lo desea. Se mantendrá ante todo la confidencialidad de su información y sus datos y su identificación jamás será revelada. Las muestras de sangre en ningún momento se usarán para estudios de tipo genético de humanos, para fines comerciales ni para ningún otro fin.

- Los resultados de los exámenes únicamente serán conocidos por los investigadores y su nombre o los de sus familiares no se darán a conocer por ningún motivo. Toda la información necesaria será guardada de manera confidencial con códigos que solo conocerá el investigador principal.

- El procedimiento para la toma de la muestra representa un riesgo mínimo para usted y su bebé y el personal que lo realiza tiene mucha experiencia para ello. Siempre se utilizarán agujas, jeringas y lancetas estériles y desechables y los riesgos consisten en dolor leve y enrojecimiento en el sitio del pinchazo para tomar la muestra de sangre. La investigación se hará responsable de las complicaciones que surjan de la toma de la muestra, siempre y cuando sean derivadas directamente de ella.

- Para el momento de su parto tomaremos una pequeña muestra de sangre de la placenta, el cual no afectará para nada su vida y mucho menos la de su bebe. La información obtenida también servirá para la mejorar la salud suya y de su bebe.

- Usted debe saber que la firma de este consentimiento no otorga ningún derecho legal, ni libera a los investigadores, ni a las instituciones de la obligación por negligencia o cualquier acto o conducta mal realizada con las muestras y la información entregadas por usted y, como ya se dijo, puede retirarlo en cualquier momento, dando por terminada la participación sin recibir ningún tipo de sanción.

- Los beneficios que usted recibirá serán que todos los días, durante el tratamiento y los controles, se le realizará una evaluación clínica y gota gruesa de control con el fin de evaluar la respuesta al tratamiento.

- El tratamiento para la malaria siempre se dará según las normas del Ministerio de Protección Social, antes Ministerio de Salud. En caso de no haber mejoría con el

tratamiento, le será suministrado gratuitamente otro de los tratamientos antimaláricos recomendados también por el Ministerio.

- En caso de surgir algún problema médico no relacionado con la toma de las muestras ni con la investigación, pero relacionado con la enfermedad que usted padece (por ejemplo malaria complicada por tener compromiso hepático, cerebral o renal), la investigación se compromete a remitirlo a la IPS, ARS o EPS que lo atiende a usted o a su bebe, según las normas de la seguridad social.

- El proyecto no usa ninguna manipulación, tratamiento experimental o procedimientos que puedan afectar la vida de los madres gestantes ni la de sus bebes.

- Usted no recibirá dinero ni ningún tipo de compensación por la participación en el estudio.

- Para autorizar su participación en este estudio usted debe firmar este documento del cual se le entregará una copia firmada.

- Si usted tiene alguna pregunta, puede hacerla antes de firmar este consentimiento o puede contactar, en cualquier momento, a las personas encargadas del estudio en La Universidad de Antioquia, Mauricio Corredor o Amanda Maestre en Medellín, por vía email: mauriciocorredorrodriguez@gmail.com o a los teléfonos 4-2196634, 4-2195626, 4-2196024 o 4-2196025.

Firmando este documento, usted manifiesta que leyó, entendió y acepta las condiciones del estudio, que le han quedado resueltas las preguntas a satisfacción y que acepta voluntariamente participar en el presente estudio. Como constancia se le entregará una copia del presente documento.

Firma y C.C. del paciente

Fecha (día/ mes/ año/)

Firma y C.C. del investigador

Fecha (día / mes / año)