

# **Caracterización genética de *Plasmodium vivax*, a partir de aislamientos clínicos de pacientes de los municipios de Tierralta y Puerto Libertador Córdoba entre el período 2018-2019**

**Zuluaga- Avendaño Shally<sup>1,2</sup>, Agudelo-García Olga María<sup>2</sup>**

## **Introducción**

La malaria humana es una enfermedad parasitaria que puede ser causada por cinco especies: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium Ovale* y *Plasmodium knowlesi*. La infección se transmite de una persona a otra a través de la picadura de mosquitos hembras del género *Anopheles*, las especies que se asocian al mayor número de casos de malaria en el mundo son *P. falciparum* en los países de África y *P. vivax* en Asia y las Américas (1). Esta enfermedad se considera de gran impacto e importancia a nivel mundial, ya que supone un problema epidemiológico, social y de salud.

La enfermedad puede cursar tanto con cuadros asintomáticos, como sintomáticos hasta cuadros más graves que pueden llevar a la muerte (2). Las características clínicas de la enfermedad van a depender de la especie que causa la infección, las características genéticas de los parásitos y el hospedador, la concentración de parásitos en sangre y el estado inmunológico de la persona (3).

La infección causada por *Plasmodium* durante la gestación ha sido reportada como una causa importante de anemia materna, bajo peso al nacer y partos prematuros, por lo cual es considerado como un factor de riesgo para la mortalidad y morbilidad tanto materna como infantil. En Colombia *P. vivax* es la especie que causa el mayor número de casos y además en las mujeres puede causar malaria gestacional y placentaria (4-6).

La infección por *P. vivax* en el mundo se estima que puede estar entre 80-90 millones de casos por año, convirtiéndose en la segunda especie con el mayor número de casos reportados de malaria (7). En Colombia, la malaria sigue siendo un grave problema de salud pública, debido a que cerca del 85% del territorio rural se encuentra por debajo de los 1.600 m.s.n.m y presenta condiciones climáticas, geográficas y epidemiológicas propicias para la transmisión de la enfermedad, estando así gran parte de la población en área de riesgo (8).

La diversidad genética de *P. vivax* se ha documentado en estudios basados en los análisis de algunos genes como el *msp1* y *msp3*-alfa (9-11) o algunas proteínas (12-14). En los últimos años también se han utilizado los microsatélites los cuales son secuencias cortas de DNA repetidas en tándem, generalmente con un tamaño entre 2 a 8 pares de bases, su

polimorfismo consiste en la variación en el número de repeticiones de la secuencia que puede encontrarse en un individuo y en otro, tienen como características que son altamente polimórficos, selectivamente neutros y abundantes en el genoma. Estos marcadores moleculares tienen un campo amplio de estudio ya que no solo se han usado a nivel de la genética poblacional, sino también para identificación parental, mapeo genético entre otras (15-17), se ha encontrado como una herramienta para estudiar subpoblaciones en una misma especie, mirar su evolución y su diversidad genética.

Entre los años 2001 y 2003 en cuatro países India, Tailandia, Laos y Colombia se hizo un estudio de nueve microsatélites donde se evaluaron los marcadores 1,501, 3,502 y 3,27 en 345 muestras con infección para *P. vivax*, se genotiparon con el fin de contrastar la estructura genética de *P. vivax* en los diferentes países, encontrándose para el microsatélite 1,501 un rango de tamaño de 76-195 pb, para el 3,502 de 128 a 265 pb y para el 3,27 de 85 a 240 pb. En cuanto a la diversidad (número medio de alelos) fue alta en todos los países, excepto en el Amazonas (Colombia) y la heterocigosidad esperada (la probabilidad de que dos alelos seleccionados al azar de una población sean diferentes) fue alta en todos los países, los alelos que se encontraron fueron 20–28 alelos en el locus 3, 27, de 10–15 alelos en el locus 1,501, y 7–14 alelos en el locus 3,502 (18).

En cuanto a Colombia tenemos que estos marcadores han sido evaluados en grupos poblacionales diferentes incluyendo gestantes, donde encontraron alelos exclusivos de este grupo de estudio, se encontró alta diversidad genética ya que encontraron diferentes números de alelos por marcador, además cuando evaluaron la heterocigosidad esperada como otra medida de diversidad genética obtuvieron un valor mayor al 50% en cada uno de los microsatélites evaluados (6).

Todos estos estudios han documentado la alta variabilidad genética de *P. vivax* por medio de los microsatélites incluyendo el microsatélite 1,501-3,502 y 3,27, sin embargo, la comparación de la diversidad genética de los marcadores puede diferir entre los lugares de investigación la extrapolación de la información se hace complicado, ya que la diversidad puede depender de los marcadores evaluados, de la dinámica de la población de estudio en cuanto a la carga parasitaria, sistema inmune e incluso de la técnica empleada, las mismas condiciones ecológicas para el desarrollo del vector del parásito entre otros factores que pueden influir.

En Colombia aún son pocos los estudios que tenemos de la variabilidad genética de *P. vivax*, especialmente en población gestante, siendo este un grupo descrito con mayor susceptibilidad a la infección y con graves desenlaces no solo para la gestante sino para el

producto de la gestación, es por esto que el estudio genético de las poblaciones parasitarias que circulan en nuestras regiones es importante seguir investigándolo, con el propósito de mejorar estrategias de control que sean más eficaces, basadas en la vigilancia de la variabilidad genética, usando herramientas moleculares y enfoques de epidemiología molecular. Por eso, en este trabajo se propuso caracterizar genéticamente aislamientos clínicos de *P. vivax* obtenidos a partir de pacientes gestantes y no gestantes de dos municipios de Córdoba, empleando como marcadores moleculares para la genotipificación 3 microsatélites que han sido estudiados previamente.

## **Materiales y métodos**

Se realizó un estudio descriptivo transversal, donde se caracterizó la diversidad genética de aislamientos clínicos de *P. vivax* en población gestante y no gestante, empleando para la genotipificación tres microsatélites.

### **Sitio de estudio**

Este estudio se realizó en población gestante y no gestante atendida en los hospitales de los municipios de Tierralta y Puerto Libertador ambos ubicados en el departamento de Córdoba, entre los años 2018 y 2019. Estos municipios hacen parte de la región denominada Urabá-Altos Sinú y San Jorge-Bajo Cauca, la cual representa cerca del 60% de los casos en Colombia con una transmisión alta y estable (19).

### **Población y muestra**

Este estudio incluyó 15 gestantes y 15 no residentes del municipio de Tierralta y Puerto Libertador Córdoba, quienes acudieron al puesto de diagnóstico de los municipios y fueron positivos para malaria por *P. vivax* mediante gota gruesa y posteriormente confirmadas por PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) en sangre periférica.

### **Criterios de inclusión y exclusión**

Como criterios de inclusión se consideraron que los participantes del estudio debían ser residentes permanentes de las zonas endémicas de malaria, que fueran diagnosticadas con infección malárica única por *P. vivax*, ausencia de signos de peligro o signos de malaria grave según los criterios adoptados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y que no estuvieran recibiendo ningún tipo de tratamiento antimalárico a la hora de ingresar al estudio. Para la inclusión se verificó la información diligenciada e indagando al paciente nuevamente sobre su lugar de residencia, manifestaciones clínicas y tratamiento.

El único criterio de exclusión que se tenía era que el participante rechazara firmar el consentimiento informado.

## **Recolección de los datos**

A los participantes se les presentó el consentimiento informado donde se les explicó las condiciones para el estudio, luego de que aceptaron y firmaron se diligenció un formulario codificado y estandarizado el cual ya había sido sometido a evaluación en estudios previos, dicho formulario contaba con preguntas dicotómicas, politómicas y abiertas con las cuales se pretendía indagar sobre las variables demográficas, antecedentes de exposición a la malaria y todos los signos y síntomas que presentaban cada uno de los participantes. El diligenciamiento se desarrolló de forma individual con el acompañamiento de personal entrenado en caso de presentarse alguna duda.

## **Procesamiento de las muestras**

Se obtuvieron muestras de venopunción en tubo EDTA con las cuales se realizaron placas de gota gruesa y extendido de sangre periférica, para la determinación de la especie y la parasitemia. También se tomaron muestras en papel filtro whatman N° 3 para la extracción de DNA de sangre periférica, todas las muestras se enviaron al laboratorio de Salud y Comunidad en Medellín, los papeles de filtro se guardaron en bolsas plásticas y se almacenaron a -4°C para lograr su conservación.

## **Pruebas para el diagnóstico de malaria**

Las láminas de gota gruesa fueron leídas por microscopistas entrenados, la densidad parasitaria se determinó contando el número de parásitos en 200 leucocitos, con base en un recuento promedio de 8000 leucocitos/  $\mu\text{L}$  de sangre (20).

Para el diagnóstico por qPCR, se utilizó el DNA extraído previamente por el método de Chelex-saponina (21) descrito en el protocolo PO-3216-SC-02 versión 01 del grupo Salud y Comunidad.

Para la amplificación de los ácidos nucleicos del parásito se usó el protocolo de qPCR estandarizado por nuestros colaboradores en Alberta, Canadá (22), que corresponde a un ensayo Taqman. Para todas las reacciones de PCR se usó un equipo ABI 7500 FAST con las condiciones universales de ciclaje (95°C por 15 seg, 60°C por 1 min). El volumen final de reacción fue de 25  $\mu\text{L}$ , con 12,5  $\mu\text{L}$  de master mix universal Taqman (Applied Biosystems) y 5  $\mu\text{L}$  de ADN molde. Las muestras con un valor de Ct menor a 45 se analizaron en una nueva qPCR para determinar que la especie fuera *P. vivax*. La lista de los cebadores y las sondas se presenta en la (**Tabla 1**).

## **Caracterización molecular**

Con el DNA obtenido por el método de Chelex-Saponina, se realizó qPCR para determinar la infección única por *P. vivax*. Después de tener el diagnóstico molecular de

infección única por *P. vivax*, se analizaron los microsatélites 1,501, 3,502 y 3,27 mediante PCR anidada, donde se utilizaron cebadores específicos para cada uno de ellos; los cuales se encontraban previamente reportados en la literatura (23) (**Tabla 2**). La reacción de la PCR se realizó con un volumen final de 20  $\mu\text{L}$ , la cual contenía un buffer 1x, el  $\text{MgCl}_2$  estaba a una concentración de 3,5mM para los microsatélites 1,502 y 3,502 y 3 mM para el microsatélite 3,27; los dNTPs se usaron a 200  $\mu\text{M}$ , de cada cebador 0,25  $\mu\text{M}$  y de la Taq polimerasa HotStar 0,075UI/ $\mu\text{L}$ . Para la primera reacción se utilizaron 3  $\mu\text{L}$  de DNA, luego se utilizó 1  $\mu\text{L}$  del producto de la primera PCR para la segunda amplificación. El programa de los ciclos fue el siguiente: paso 1 desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min, paso 2 desnaturalización 95°C por 1 min, paso 3 alineamiento 58°C durante 1 min, paso 4 extensión a 72°C por 1 min, paso 5 la extensión final a 72°C durante 5 min, y el paso final a 4°C. Los pasos 2 al 4 se repiten durante 30 ciclos.

Los análisis de PCR se realizaron en un termociclador Biometric, los productos de la PCR se almacenaron a 4°C protegidos de la luz, después se hizo electroforesis capilar en un analizador genético utilizando LIZ 600 como estándar interno de tamaño. Los resultados se analizaron por medio del software GeneMapper (Applied Biosystems versión 1.5), los electroferogramas también se analizaron visualmente, los picos por encima de 1000 UFR (unidades relativas de fluorescencias) se consideraron como verdaderos productos de amplificación. Se consideró la presencia de múltiples alelos cuando en un locus se observó más de un pico y la altura del pico menor supera al menos 33% de la altura del pico predominante (10). Los alelos se agruparon manualmente en función de su longitud de repeticiones, 7pb para el microsatélite 1,501, 8pb para el microsatélite 3,502 y 4 pb el microsatélite 3,27. Posteriormente, empleando el software GenAIEx se obtuvieron las frecuencias alélicas, haplotípicas y los valores de heterocigosidad esperada para cada microsatélite evaluado en los grupos de estudio.

### **Análisis estadístico**

Los datos fueron analizados usando el programa estadístico SPSS y Excel como herramienta para el diseño de gráficos tablas entre otros. Se aplicó un análisis univariado mediante la estimación de frecuencias absolutas y relativas para las variables cualitativas y medidas de resumen como mediana, rango intercuartílico, percentiles para las cuantitativas, dependiendo de la prueba de normalidad de los datos la prueba de Shapiro Wilk.

Las variables sociodemográficas se considerarán como independientes y asumieron los valores o categorías correspondientes a su naturaleza, por ejemplo, sexo (masculino o

femenino), edad (numérica), lugar de procedencia, las variables clínicas también asumieron su categoría según ausencia o presencia.

La diferencia de medianas en una variable cuantitativa para dos grupos independientes se evaluó con la prueba no paramétrica U de Mann Whitney. Las decisiones sobre significancia estadística se tomaron con una probabilidad del 5% ( $p < 0.05$ ).

Para el análisis de diversidad genética de los aislamientos caracterizados genéticamente con los tres microsatélites, se empleó el software GenAIEx 6.5 (24) para obtener las frecuencias alélicas, haplotípicas y los valores de heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) para cada microsatélite evaluado en los grupos de estudio. Además, toda la estadística descriptiva de los datos obtenidos se procesó y analizó con SPSS.

## **Resultados**

### **Características generales de la población gestante y no gestante**

El grupo de las gestantes estaba conformado por 15 mujeres, donde la mediana de la edad fue 21 años (rango de 18 a 23), se encontró que 5 (33,3 %) estaban en el primer trimestre de embarazo, 2 (13,3 %) en el segundo trimestre y 8 (53,4 %) en el tercero. Las 15 mujeres fueron diagnosticadas por medio de gota gruesa y confirmado su diagnóstico por la técnica de qPCR.

De las gestantes evaluadas se encontró de acuerdo a la paridad que el 33% (5/15) eran primíparas, el 33% (5/15) eran secundíparas y 7 % (1/15) eran multíparas, el resto de porcentaje 27% (4/15) de mujeres no respondieron, en cuanto a los episodios de aborto y mortinato no refieren haberlo presentado, también se evaluó el peso al nacer de los bebés productos de gestaciones con infección, el cual tuvo una mediana de 3000 g (con un rango de 2765-3522 g). En cuanto al nivel de hemoglobina encontrado fue de 10 g/dL (con un rango de 9-10,7 g/dL), la anemia se evidenció independiente del número de partos registrados por cada una de las mujeres embarazadas. Las características de la población gestante se resumen en la **(Tabla 3)**.

La edad en el grupo de no gestantes fue de 28 años, (rango de 18 a 39), se observa que fue mayor respecto al grupo de gestantes, de la misma manera fueron diagnosticados por gota gruesa y confirmada la infección por medio de qPCR.

El nivel de infección cuantificado por gota gruesa (parásitos /  $\mu\text{L}$  de sangre) para el grupo de gestantes de 5080 parásitos/  $\mu\text{L}$  de sangre siendo mayor que la mediana del grupo de población no gestantes con 2780 parásitos/  $\mu\text{L}$  de sangre. En cuanto al tiempo de residencia se encontró que la población gestante ha vivido en esas zonas maláricas hace 3 años con un

rango entre 1 a 7 años y la población no gestante ha vivido cerca de 1 año y medio en ese lugar con rango de 2 meses a 17 años. En cuanto a los casos de infección malarica se obtuvo en ambos grupos han sufrido como mínimo un ataque de infección en su vida (**Tabla 4**). La gran mayoría de la población del estudio son residentes de la zona rural y pertenecen al régimen de salud subsidiado.

No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre la edad, parasitemia, tiempo de residencia y el número de veces que les ha dado malaria entre ambos grupos de estudios (gestante y no gestante).

Con relación a las manifestaciones clínicas se encontró que de las 15 gestantes 54% (8/15) presentaron la tríada (fiebre, sudoración, escalofríos), cefalea 87% (13/15), náuseas 27% (4/15), dolor osteomuscular 67% (10/15), 40% dolor abdominal (6/15) y astenia 60% (9/15), en el grupo de la población no gestantes se registraron más personas con la tríada 80% (12/15), igual proporción de no gestantes en comparación con las gestantes refirieron presentar cefalea 87% (13/15) y dolor osteomuscular 67% (10/15), náuseas 47% (7/15) y dolor abdominal 47% (7/15) y ninguno refirió astenia (**Gráfico 1**).

#### **Diversidad genética de *Plasmodium vivax***

El éxito del genotipado para cada marcador varió entre el 93% a 100% para muestras de gestantes y no gestantes. En el grupo de gestantes en 1 sola muestra no se logró amplificar un marcador, en cuanto al nivel de infección Plasmodial en esta muestra se tenía que era mucho menor al compararlo con los de las otras muestras. En el grupo de no gestantes se obtuvo amplificación de los 3 marcadores en las 15 muestras evaluadas, los niveles de parasitemia eran muy similares entre ellos.

En la diversidad genética para *P. vivax* se encontró que, en cuanto al número de alelos observados por grupo de estudio, en las gestantes hay una mayor variabilidad en el microsatélite 3,27 ya que se encontraron 13 alelos diferentes, ya en los microsatélites 1,501 y 3,502 se encontraron igual número de alelos siendo menos variables.

Para el grupo de no gestantes el microsatélite más variable fue el 1,501 encontrándose 8 alelos diferentes, seguido del microsatélite 3,27 con 7 alelos y finalmente el 3,502 con 5 alelos diferentes, considerándose este último el menos variable en dicho grupo de estudio. El número de alelos diferentes detectados en el grupo de las gestantes varió de 5 a 13 y en las no gestantes de 5 a 8. En cuanto a las infecciones policlonales fueron más comunes en el grupo de no gestantes (**Tabla 5**).

Cuando se comparó el alelo predominante de cada marcador molecular en los grupos de estudios, se encontró que tanto gestantes como no gestantes compartieron el mismo alelo

para el microsatélite 3,502, mientras que para el microsatélite 1,501 y el microsatélite 3,27 se encontraron alelos predominantes de diferentes tamaños (**Tabla 5**).

Para seguir explorando los datos de diversidad obtenidos con la frecuencia alélica y la distribución alélica para los 3 microsatélites en cada uno de los grupos evaluados calculamos la heterocigosidad esperada ( $H_e$ ), esta medida permite establecer la probabilidad de que dos clones seleccionados al azar de una población presenten alelos diferentes. En nuestro estudio se observaron altos valores de  $H_e$ , donde en el grupo de gestantes vario entre 80% y 90% destacando la  $H_e$  más alta para el microsatélite 3,27 y en el grupo de no gestantes la  $H_e$  vario entre 79% y 86% (**Tabla 5**).

También se buscaron los haplotipos los cuales son las combinaciones de los diferentes alelos encontrados en cada marcador, donde se encontraron en total 10 haplotipos para los 3 marcadores de *P. vivax* evaluados, de los cuales se encontró que 6 haplotipos que no se comparten entre los dos grupos de estudio y 4 haplotipos se repiten en al menos 2 muestras. En las gestantes el haplotipo que más predominó fue el H1 y en el grupo de no gestantes el H5, también se encontró que el H9 y H10 fueron haplotipos encontrados solo en el grupo de no gestantes y H2, H4, H6 Y H7 fueron encontrados sólo en las gestantes (**Tabla 6**).

## **Discusión**

La diversidad genética parasitaria afecta los desenlaces clínicos de la malaria, la respuesta a los antimaláricos y el desarrollo de la inmunidad naturalmente adquirida o inducida por vacunas. Por ello, se han estado destinando herramientas que ayuden a entender la biología, la genética y la epidemiología de los parásitos del género *Plasmodium*. Dentro de los estudios de epidemiología molecular en este campo se destacan los marcadores moleculares, especialmente los microsatélites, los cuales debido a su neutralidad de presión de selección y a su alto polimorfismo se han convertido en una buena herramienta para investigar la diversidad, la historia evolutiva y la multiplicidad de las infecciones causadas por estos parásitos (17, 23, 25). Este estudio tuvo como objetivo caracterizar la diversidad genética de aislamientos clínicos de *P. vivax* en muestras de sangre periférica obtenidas de población gestante y no gestante en dos municipios de Córdoba, mediante el análisis de tres marcadores moleculares previamente reportados en otras investigaciones donde han descrito una alta diversidad genética de *P. vivax* en el mismo tipo de aislamientos (6, 10, 26, 27).

Este estudio evaluó algunas complicaciones que se han descrito durante el embarazo asociado a malaria. Se observó aquí que las gestantes tenían anemia; hallazgo que concuerda con lo reportado en otras investigaciones (5, 28). Aunque la anemia en las gestantes puede



estar presente de manera fisiológica, y por condiciones nutricionales de las gestantes en estas regiones, en muchos estudios se ha confirmado la contribución que la infección malárica tiene sobre los niveles de hemoglobina maternos, generando un riesgo, tanto para la gestante como el producto de la gestación. A pesar que en nuestro estudio no encontramos bajo peso al nacer (<2500g); pudimos observar que en los bebés producto de gestaciones con infección, el peso al nacer estaba disminuido respecto a reportes que han hecho donde han evaluado pesos de bebés nacidos de mujeres no infectadas. Estudios realizados en Tailandia, India y Asia describieron como frecuentes la anemia y el bajo peso al nacer (5, 29, 30). Sin embargo, no encontramos estudios que relacionen la presentación de anemia y bajo peso al nacer u otras complicaciones durante la gestación con genotipos parasitarios exclusivos. Con los resultados de este trabajo, tampoco fue posible explorar asociaciones entre la genética del parásito y los desenlaces del embarazo, dado el número limitado de muestras.

En este trabajo además se encontraron diferentes manifestaciones clínicas, las cuales son muy similares entre los grupos gestante y no gestante. Estos resultados concuerdan con otros autores que describen las mismas manifestaciones clínicas durante la infección malárica (31). A pesar de estos hallazgos no encontramos estudios previos donde hayan reportado una asociación entre genotipos específicos del parásito con las manifestaciones clínicas. De acuerdo con los resultados que obtuvimos no se logró hacer ninguna asociación ya que las manifestaciones clínicas encontradas son muy similares entre los dos grupos de estudio, tampoco se relacionó la presencia de algún genotipo como el causante del síntoma ya que el estudio contaba con un número de muestras pequeño. Es importante tener en cuenta que las manifestaciones pueden estar influenciadas por factores como el estado inmunológico de la persona, la carga parasitaria, la especie causante de la infección y la exposición (32-35).

Se ha descrito que el grado de exposición genera más posibilidad de sufrir la infección malárica, en este estudio encontramos que cerca del 73% (22/30) de las gestantes y no gestante residían en la zona rural, estando así altamente expuestos a la malaria, el 63% (19/30) de los participantes tenían antecedentes de infección en algún momento de su vida. En este estudio no se evaluó si los genotipos parasitarios que circulan en la zona rural son iguales a los que circulan en zona urbana.

Lo que se conoce hasta ahora es que la infección malárica durante la gestación se asocia con alto riesgo de morbilidad materno-infantil, se reconoce que las mujeres durante la gestación se da una alteración del balance de la respuesta inmune, asociándose esto con una menor eficacia en la eliminación de los parásitos de la malaria, también se asocia con complicaciones graves de la enfermedad (4).

Estudios sobre la diversidad genética plasmodial plantean que el alto número de presentaciones alélicas observadas por *locus* y el alto valor de heterocigosidad esperada indican que los parásitos circulantes de *P. vivax* ponen de manifiesto la complejidad molecular de la infecciones causadas por esta especie, aunque los valores encontrados en dichos estudios no arrojaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos gestante y no gestante (27).

En nuestro estudio intentamos investigar si los aislados de *P. vivax* obtenidos de mujeres gestantes infectadas podrían mostrar características genotípicas diferentes en comparación con las mujeres no gestantes. Los resultados de nuestro estudio demuestran que el número de alelos encontrados por marcador fue alto para ambos grupos de estudio, al igual que cuando se compararon todas las muestras se encontró una mayor proporción de alelos en el grupo de gestantes, lo cual concuerda con estudios que se han hecho en Tailandia y Myanmar en los mismos grupos (17). También se observaron altos valores de heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) en ambos grupos gestante y no gestante para los tres microsatélites estudiados, es de destacar que el microsatélite 3,27 en la población gestante presentó la  $H_e$  más alta ( $H_e=0,90$ ) en comparación con la hallada para el grupo de no gestantes ( $H_e=0,84$ ), lo cual puede inferir que la variabilidad genética de los aislamientos clínicos de las gestantes es alta en comparación con las no gestantes, junto con las frecuencias alélicas encontradas se observa la complejidad de las dinámicas de las infecciones en las diferentes poblaciones.

En este trabajo también se calcularon las frecuencias de las infecciones policlonales, como una medida de la complejidad de la infección, en términos genéticos y de la variabilidad genética de los clones que circulan alrededor de una población. Se observó que fue mayor el número de clones encontrados en el grupo de no gestantes, aunque con estos resultados no se logró establecer una diferencia estadísticamente significativa. Hay autores que plantean que los niveles de parasitemia están asociados con una forma directamente proporcional con la presentación de más o menos clones, en este caso el grupo de no gestantes tenían un nivel de parasitemia más bajo respecto al grupo de gestantes y aun así se detectaron más clones (36, 37). Estos resultados contradicen lo reportado en otros estudios donde han encontrado asociación entre los niveles bajos de parasitemia y menor cantidad de clones detectados, el hallazgo anterior puede explicarse por el tamaño de la muestra donde algunos valores de las parasitemias aberrantes pudieron direccionar los resultados.

Otro aspecto importante de este de este estudio fue la combinación de los diferentes alelos (haplotipos) encontrados para los 3 marcadores. Encontramos 10 haplotipos en total, donde 6 no se repetían entre las gestantes y no gestantes y 4 se compartieron en al menos dos

muestras de ambos grupos, a pesar que no encontramos otros estudios donde describieran estos haplotipos ni su asociación con algún grupo de estudio en particular, si observamos con nuestros resultados que algunos haplotipos eran exclusivos de gestantes y otros de no gestantes, aunque no podemos hacer una asociación directa de estos resultados entre la presentación del haplotipo y el grupo de estudio debido a que la investigación se hizo con un número pequeño de muestras (n), se pensaría que al aumentar el (n) podríamos obtener una mejor visión de los resultados.

Lo que se ha descrito es que la diversidad es una estrategia de las especies sometidas constantemente a la presión del sistema inmune y de los medicamentos, una estrategia con la cual buscan su supervivencia es aumentando sus tasas de diversidad genética, con esas variaciones están mostrando que se están adaptando (38).

Los resultados de nuestro estudio demuestran que *P. vivax* tiene una alta diversidad, un alto grado de potencial evolutivo, lo que puede permitirle adaptarse rápidamente a los cambios ambientales, a las nuevas estrategias e intervenciones contra la malaria, es por eso que estudios que contribuyan a entender la estructura genética de los parásitos de la malaria, se hace esencial para el mejoramiento y la creación de nuevas políticas de salud pública y para disminuir la resistencia acelerada a los medicamentos (39). Para fortalecer estos hallazgos se hace relevante la evaluación de estos marcadores genéticos en las diferentes regiones endémicas del país, por grupos de estudio y en diferentes periodos de tiempo para así desarrollar una mejor interpretación de la dinámica del parásito y sus genotipos entre los diferentes grupos de estudio, hacer asociaciones entre los desenlaces clínicos de la malaria, la respuesta al tratamiento entre otros.

Una limitación importante del estudio fue la cantidad de muestras que se evaluaron, y que sólo evaluamos un periodo de tiempo, sin embargo estos resultados permiten hacer un acercamiento a la comprensión de la diversidad genética de *P. vivax* entre las gestantes y no gestantes de una zona endémica, suma al conocimiento sobre la epidemiología de *P. vivax* y puede servir como datos de referencia para poblaciones de alta endemicidad, los parámetros moleculares establecidos como las frecuencias alélicas, la heterocigosidad, la multiplicidad de infecciones podrían ser útiles en el monitoreo de intervenciones, control y vigilancia.

## **Conclusiones**

- Los hallazgos de este estudio confirman la utilidad del análisis de los microsatélites como una herramienta genética para investigar las estructuras poblacionales de *P. vivax*.

- El uso de herramientas moleculares y la implementación de marcadores moleculares como los microsatélites permiten un mayor acercamiento a la genética y al comportamiento del parásito en un área determinada.
- *P. vivax* presenta una alta diversidad genética en el grupo de gestantes, lo que puede reflejar la complejidad y la mayor susceptibilidad a la infección.

## **Declaraciones**

### **Aspectos éticos**

El protocolo para la toma de muestras y procedimientos de investigación se rige por lo dispuesto en la Resolución N°008430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia, de acuerdo a los artículos 11, 15, 16, 25,32 de esta resolución esta investigación está catalogada como de riesgo mínimo para los participantes.

El proyecto fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto de Investigaciones Médicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia.

### **Consentimiento para publicación**

No aplica

### **Disponibilidad de datos**

Todos los datos que se generaron del estudio están incluidos y publicados en este artículo

### **Conflictos de interés**

Los autores afirman que no tienen ningún tipo de conflicto de interés

### **Financiación**

Grupo Salud y Comunidad-César Uribe Piedrahita, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

### **Contribuciones de los autores**

SZ y OA realizaron y desarrollaron el diseño del proyecto, el trabajo de campo y el análisis de las muestras y de los resultados. Todos los autores leyeron y aprobaron el manuscrito.

### **Detalles del autor:**

1. Estudiante de Microbiología y bioanálisis, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

2. Grupo Salud y Comunidad-César Uribe Piedrahita, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

**Agradecimientos:**

A todas las personas que aceptaron participar en el estudio, a las personas que nos ayudaron al desarrollo del trabajo de campo, los cuales hicieron posible la captación de los sujetos y la recolección de las muestras, a los integrantes de los hospitales de los municipios donde se llevó a cabo el estudio, gracias por su apoyo y colaboración en el desarrollo del proyecto.

**Tabla 1:** secuencia de cebadores y sondas usadas para el diagnóstico molecular de la infección por *Plasmodium vivax*

<b>Secuencia de 5' a 3'</b>	
<i>Plasmodium</i> <i>spp</i>	<b>F:</b> GTTAAGGGAGTGAAGACGATCAGA
	<b>R:</b> CTTACTTCTACGTGCCCACT
	<b>P:</b> FAM-ACCGTCGTAATCTTAACCATAAACTATGCCGACTAG-TAMRA
<i>Plasmodium</i> <i>vivax</i>	<b>F:</b> CCGACTAGGCTTTGGATGAAAGATTTTA
	<b>R:</b> AACCCAAAGACTTTGATTTCTCATAA
	<b>P:</b> TAMRA-AGCAATCTAAGAATAAACTCCGAAGAGAAAATTCT-BHQ2

**Tabla 2:** secuencia de cebadores y sondas usadas para los microsatélites de *Plasmodium vivax*

<b>Microsatélites</b>	<b>Secuencia 5' a 3'</b>
1,502	<b>F:</b> (Primera PCR): TCCTGTAACCTCCTGCTCTGT <b>R:</b> CTTACTTCTACGTGCCCACT <b>F:</b> (Segunda PCR) NED-AATTGTAGTTCAGCCCATTG
3,502	<b>F:</b> (Primera PCR): CCATGGACAACGGGTTAG <b>R:</b> TCCTACTCAGGGGAATACT <b>F:</b> (Segunda PCR) FAM-GTGGACCGATGGACCTAT
3,27	<b>F:</b> (Primera PCR): TTTTCAACTTGCTGCCCCCTG <b>R:</b> CGTCATCGTCATTGCTCTGGAG <b>F:</b> (Segunda PCR): FAM-GGACATTCCAAATGTATGTGCAGTCG

**Tabla 3:** características generales de las gestantes participantes en este estudio

Parámetros	Gestante (n=15)
	Mediana (RIC)
Semanas de gestación	28 (12-31)
Niveles de hemoglobina (g/dL)	10 (9-10,7)
Peso del bebé (g)	3000 (2765-3522)
Gestaciones	2 (1-3)
Partos	1 (1-2)

**Tabla 4:** características generales de los grupos de estudio gestantes y no gestantes

Características	Grupo de estudio		Valor de $p^*$
	Gestante n=15	No gestante n=15	
	Mediana (RIC)		
Edad (años)	21(18-23)	28 (18-39)	0,23
Parasitemia/uL de sangre	5080 (2600-10800)	2780 (1346-4673)	0,07
Tiempo de residencia (Meses)	36 (12-84)	18 (2-204)	0,65
# Veces que le ha dado malaria	2 (1-2)	2 (1-2)	0,74

\*Significación estadística ( $p < 0,05$ ) en la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para

Los dos grupos

**Tabla 5:** comparación de la diversidad genética de cada microsatélite, de acuerdo al grupo de estudio gestante y no gestante

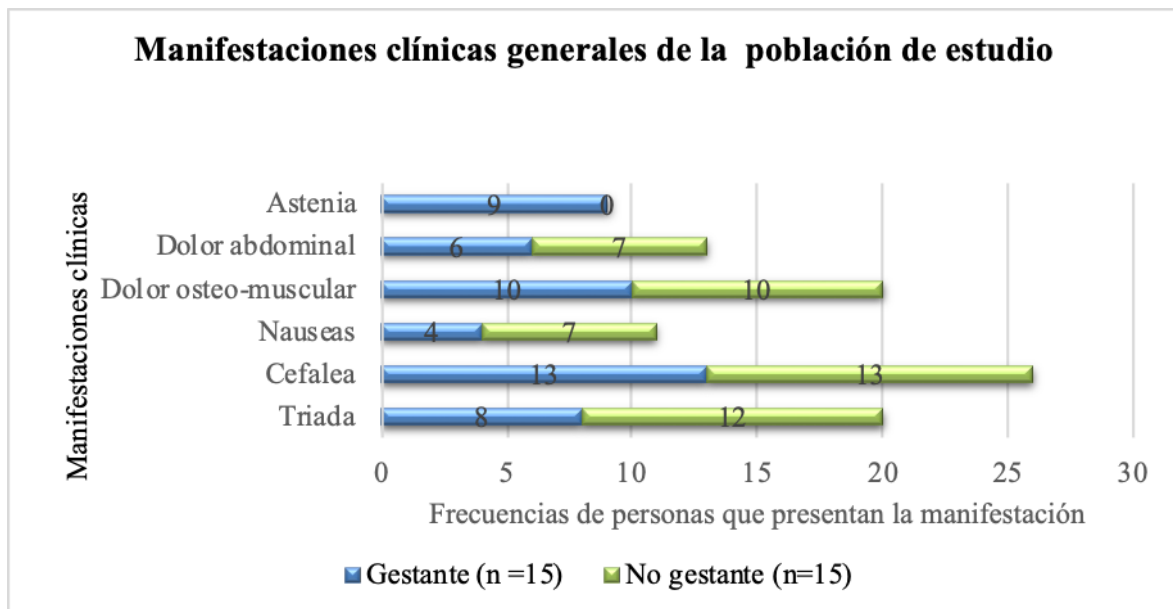
	<b>Gestantes (n=15)</b>		
	<b>1,501</b>	<b>3,502</b>	<b>3,27</b>
% de éxito en la amplificación	100%	100%	93
# de alelos encontrados	5	5	13
Alelo predominante (pb)	105	136	340
% de muestras policlonales	0	6,6 (1)	6,6 (1)
Heterocigosidad esperada (He )	0,80	0,80	0,90
	<b>No gestantes (n=15)</b>		
	<b>1,501</b>	<b>3,502</b>	<b>3,27</b>
% de éxito en la amplificación	15	15	15
# de alelos encontrados	8	5	7
Alelo predominante (pb)	98	136	364
% de muestras policlonales	20(3)	13,3 (2)	6,6 (1)
Heterocigosidad esperada (He)	0,86	0,79	0,84



**Tabla 6:** haplotipos encontrados para los marcadores

#	Haplotipos 1,501-3,502,3,27	Grupos de estudio	
		Gestante	No Gestante
H1	105-136-340	3	1
H2	105-144-332	1	0
H3	119-160-288	1	3
H4	105-136-60	1	0
H5	98-136-364	2	5
H6	105-128-312	1	0
H7	84-128-316	1	0
H8	84-128-300	1	1
H9	84-136-336	0	1
H10	98-128-300	0	1

**Gráfico 1:** manifestaciones clínicas generales de la población gestante y no gestante



Frecuencia de las manifestaciones clínicas de acuerdo al grupo de estudio, las gestantes reportaron todos los síntomas, la triada corresponde aquellos que presentaron simultáneamente fiebre, escalofríos y sudoración.

## Referencias

1. Rogerson SJ, Mwapasa V, Meshnick SR. Malaria in pregnancy: linking immunity and pathogenesis to prevention. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;77(6 Suppl):14-22.
2. INS. Informe de evento Malaria, Colombia. 2017.
3. MPSC, INS, OPS. Protocolo para la vigilancia en salud pública de malaria 2011:1-25.
4. Menendez C, Ordi J, Ismail MR, Ventura PJ, Aponte JJ, Kahigwa E, et al. The Impact of Placental Malaria on Gestational Age and Birth Weight. *The Journal of Infectious Diseases.* 2000;181(5):1740-5.
5. Desai M, ter Kuile FO, Nosten F, McGready R, Asamo K, Brabin B, et al. Epidemiology and burden of malaria in pregnancy. *Lancet Infect Dis.* 2007;7(2):93-104.
6. Arango EM, Samuel R, Agudelo OM, Carmona-Fonseca J, Maestre A, Yanow SK. Genotype comparison of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* clones from pregnant and non-pregnant populations in North-west Colombia. *Malar J.* 2012;11:392.
7. Oliveira TR, Fernandez-Becerra C, Jimenez MCS, Del Portillo HA, Soares IS. Evaluation of the acquired immune responses to *Plasmodium vivax* VIR variant antigens in individuals living in malaria-endemic areas of Brazil. *Malaria Journal.* 2006;5(1):83.
8. J P, A R, C U. Malaria en Córdoba: situación epidemiológica y medidas de prevención. Informe Quincenal Epidemiológico Nacional INS. 2001;6:49-55.
9. Cristiano FA, Pérez MA, Nicholls RS, Guerra AP. Polymorphism in the *Plasmodium vivax* msp 3: gene in field samples from Tierralta, Colombia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 2008;103:493-6.
10. Imwong M, Snounou G, Pukrittayakamee S, Tanomsing N, Kim JR, Nandy A, et al. Relapses of *Plasmodium vivax* Infection Usually Result from Activation of Heterologous Hypnozoites. *The Journal of Infectious Diseases.* 2007;195(7):927-33.
11. Maestre A, Sunil S, Ahmad G, Mohammed A, Echeverri M, Corredor M, et al. Inter-allelic recombination in the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 gene among Indian and Colombian isolates. *Malaria Journal.* 2004;3(1):4.
12. Espinosa Garcia AM, Yanett Sierra A, Barrero C, Alexandra Cepeda L, María Cantor E, Lombo T, et al. Expression, polymorphism analysis, reticulocyte binding and serological reactivity of two *Plasmodium vivax* MSP-1 protein recombinant fragments. *Vaccine.* 2003;21:1033-43.
13. Havryliuk T, Ferreira MU. A closer look at multiple-clone *Plasmodium vivax* infections: detection methods, prevalence and consequences. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 2009;104:67-73.
14. Martinez P, Suarez CF, Gomez A, Cardenas PP, Guerrero JE, Patarroyo MA. High level of conservation in *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 4 (PvMSP4). *Infect Genet Evol.* 2005;5(4):354-61.

15. Bhargava A, Fuentes. *Mutational Dynamics of Microsatellites*. Humana Press Inc. 2010;44(3):250-66.
16. Buschiazzo E, Gemmell N. Erratum: The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes (*BioEssays* (October 2006) 28, 10 (1040-1050)). 2006;28.
17. A.Chistiakov D, Hellemans B, A.M.Volckaert F. *Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics*. Elsevier. 2006;255(1-4):1-29.
18. Imwong M, Nair S, Pukrittayakamee S, Sudimack D, Williams JT, Mayxay M, et al. Contrasting genetic structure in *Plasmodium vivax* populations from Asia and South America. *International Journal for Parasitology* 37. 2007;37:1013–22.
19. Carmona-Fonseca J. La Región Urabá Antioqueño-Cuencas altas de los ríos Sinú y San Jorge-Bajo Cauca Antioqueño : guarida del paludismo colombiano. *Revista de la Universidad Industrial de Santander Salud*. 2017;49:577-89.
20. G L-AFS. *Diagnóstico Microscópico de los parásitos de la malaria en la sangre*. OPS/OMS. 1988.
21. Plowe CV, Djimde A, Bouare M, Doumbo O, Wellems TE. Pyrimethamine and Proguanil Resistance-Confering Mutations in *Plasmodium falciparum* Dihydrofolate Reductase: Polymerase Chain Reaction Methods for Surveillance in Africa. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1995;52(6):565-8.
22. E Shokoples S, Ndao M, Kowalewska-Grochowska K, K Yanow S. Multiplexed Real-Time PCR Assay for Discrimination of *Plasmodium* Species with Improved Sensitivity for Mixed Infections. *Journal of clinical microbiology*. 2009;47:975-80.
23. Koepfli C, Mueller I, Marfurt J, Goroti M, Sie A, Oa O, et al. Evaluation of *Plasmodium vivax* Genotyping Markers for Molecular Monitoring in Clinical Trials. *The Journal of Infectious Diseases*. 2009;199(7):1074-80.
24. Peakall R, Smouse PE. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research--an update. *Bioinformatics*. 2012;28(19):2537-9.
25. Bourgard C, Albrecht L, Kayano ACAV, Sunnerhagen P, Costa FTM. *Plasmodium vivax* Biology: Insights Provided by Genomics, Transcriptomics and Proteomics. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018;8:34-.
26. Restrepo E, Imwong M, Rojas W, Carmona-Fonseca J, Maestre A. High genetic polymorphism of relapsing *P. vivax* isolates in northwest Colombia. *Acta Trop*. 2011;119(1):23-9.
27. Thanapongpichat S, McGready R, Luxemburger C, Day NPJ, White NJ, Nosten F, et al. Microsatellite genotyping of *Plasmodium vivax* infections and their relapses in pregnant and non-pregnant patients on the Thai-Myanmar border. *Malaria Journal*. 2013;12(1):275.
28. Nosten FR, McGready JA, Simpson KL, Thwai S, Balkan T, Cho LH, et al. Effects of *Plasmodium vivax* malaria in pregnancy. *Elsevier*. 1999;354(9178):546-9.

29. Nosten DF, McGready R, Simpson J, Thwai K, Balkan S, Cho T, et al. Effects of Plasmodium vivax malaria in pregnancy. 1999;354(9178):546-9.
30. Singh N, K Mehra R, Srivastava N. Malaria during pregnancy and infancy, in an area of intense malaria transmission in central India. Annals of tropical medicine and parasitology. 2001;95:19-29.
31. Jaime C-F. La malaria en Colombia, Antioquia y las zonas de Urabá y Bajo Cauca: panorama para interpretar la falla terapéutica antimalárica. Parte 1. Iatreia. 2003;16:299-318.
32. Ventura. AMRdS, Silva. AYNPRSU, Calvosa. VSP, Filho. MGS, Souza JMd. Malária por Plasmodium vivax em crianças e adolescentes - aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. Jornal de Pediatria. 1999; 75(3):187-94.
33. Chandramohan D, Carneiro I, Kavishwar A, Brughha R, Desai V, Greenwood B. A clinical algorithm for the diagnosis of malaria: results of an evaluation in an area of low endemicity. Trop Med Int Health. 2001;6(7):505-10.
34. Hazra BR, Chowdhury RS, Saha SK, Ghosh MB, Mazumder AK. Changing scenario of malaria: a study at Calcutta. Indian J Malariol. 1998;35:111 - 6.
35. Robinson P, Jenney AW, Tachado M, Yung A, Manitta J, Taylor K, et al. Imported malaria treated in Melbourne, Australia: epidemiology and clinical features in 246 patients. J Travel Med. 2001;8(2):76-81.
36. Guerra-Neira A, Rubio JM, Royo JR, Ortega JC, Aunon AS, Diaz PB, et al. Plasmodium diversity in non-malaria individuals from the Bioko Island in Equatorial Guinea (West Central-Africa). Int J Health Geogr. 2006;5:27.
37. Mayor A, Aponte JJ, Fogg C, Saúte F, Greenwood B, Dgedge M, et al. The epidemiology of malaria in adults in a rural area of southern Mozambique. Malaria Journal. 2007;6(1):3.
38. Arnott A, Barry A, Reeder J. Understanding the population genetics of Plasmodium vivax is essential for malaria control and elimination. Malaria journal. 2012;11:14.
39. Cui L, Escalante AA, Imwong M, Snounou G. The genetic diversity of Plasmodium vivax populations. Trends Parasitol. 2003;19(5):220-6.