

COMPARACION DE DIFERENTES SONDAS DE DNA PARA LA DETECCION DE *Plasmodium falciparum*

L. EUGENIO ANDRADE**, LIBIA E. CARDONA* & CLAUDIA H. VERGARA*

Las sondas pRepHind, Rep20, p242B1-1, pPF-14, clon 26 y clon 34 se compararon a fin de examinar su capacidad para detectar *P. falciparum* en estudios de campo. Noventa y cuatro muestras de pacientes procedentes de Tumaco, región endémica de malaria situada en la Costa Pacífica Colombiana y 78 muestras provenientes de Villavicencio (Llanos Orientales), se estudiaron en experimentos de hibridación en "dot-blot".

Las sondas Rep 20, p242B1-1, pRepHind y pPF-14 detectaron hasta 17 pg de DNA purificado de *P. falciparum*, mientras que los clones 26 y 34 detectaron 425 pg de DNA. Las sondas pPF-14, p242B1-1, pRepHind y Rep 20 mostraron niveles comparables de detección en muestras de sangre infectada. La sensibilidad mostró variaciones desde 75-94% en sujetos con parasitemias mayores de 10.000 par./ μ l. a 15-42% en sujetos con parasitemias menores de 100 par./ μ l. Las sondas pPF-14 y p242B1-1 mostraron la mayor sensibilidad, mientras que los clones 26 y 34 presentaron niveles de detección significativamente menores. Todas las sondas demostraron ser altamente específicas. Los niveles de detección fueron dependientes del tratamiento de la muestra. El tratamiento consiste en eliminación del suero, lisis con Triton X-100, digestión con Proteinasa K, extracción con Fenol y Cloroformo, y precipitación con etanol condujo a niveles de detección del 100% cuando se realizó en muestras con parasitemias igual y/o mayores de 1.000 par./ μ l.

INTRODUCCION

Las manifestaciones más severas de la malaria, se hallan asociadas en Colombia a la especie *P. falciparum*, que es responsable de una mayor morbilidad y mortalidad. La evaluación en el campo de la endemidad de este parásito, así como el monitoreo de los nuevos medios de control como la vacuna o el empleo de drogas, requieren de nuevos métodos para detección de parásitos que permitan evaluar un número grande de muestras procedentes de poblaciones expuestas a la transmisión de malaria. Varios autores han propuesto el uso de sondas de DNA para la detección de *P. falciparum* como una alternativa eficaz de alta es-

pecificidad y sensibilidad, Franzen et al. (1984), Enea (1986). Barked et al. (1986), Oquendo et al (1986), Zolg et al. (1987). Las características de las sondas propuestas están resumidas en la tabla 1, donde puede observarse que todas ellas están constituidas por plásmidos que contienen insertos de diferente longitud que poseen múltiples copias de la secuencia repetitiva de 21 p.b. característica de *P. falciparum*, que se describe a continuación, Zolg et al. (1987):

```
5' A C T A A C A T A G G T C T T A C T T T C 3'  
      T T      A                A  A  
      G G      C                G  G  
      C                                C
```

* Sección de Biología Molecular, Departamento de Microbiología, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.
**Departamento de Biología, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.

TABLA 1

CLONES QUE CONTIENEN FRAGMENTOS DE DNA REPETITIVO DE *Plasmodium falciparum*

SONDA	INSERTO	VECTOR	AUTORES
p242B1-1	Rep 5 Kb de T ₁ Tailandia	pBR322	V. Enea
pPF14	Rep ? de FCR 3 de Gambia	pBR322	R. Barker D. Wieth
Rep 20	Rep 21 bp 7 Kb HG-13 de Gambia	pBR325	P. Oquendo J. Scaife
pRepHind	Rep 21 bp 1.7 Kb F-32 de Tanzania	pBR322	L. Franzen
CLON 26	REp 21 bp 147 bp de Tanzania I	M-13 mp18	W. Zolg E. Andrade
CLON 34	Rep 21 bp 294 bp de Tanzania I	M-13 mp18	W. Zolg E. Andrade

En el presente trabajo seis sondas: pRepHind, pPF-14, Rep 20, p242B1-1, clon 26 y clon 34 se compararon en base a su sensibilidad y especificidad para detectar parásitos. Algunas de estas sondas habían sido parcialmente evaluadas en pruebas de campo. Por ejemplo, la sonda pPF-14 fue evaluada en Tailandia y Kenia con una sensibilidad del 29% para muestras que presentan una parasitemia menor de 400 par./ μ l, W.H.O. (1987). Holmberg et al. (1987) evaluaron la sonda pRepHind durante un estudio en Gambia y reportaron sensibilidades que varían de 100% en individuos con altas parasitemias a 59% en individuos que presentan muy baja parasitemia. Sethabutr et al. (1988) usaron un oligonucleótido sintético como sonda en un estudio de campo en Tailandia y encontraron una sensibilidad del 10% para parasitemias menores de 500 par./ μ l. Más recientemente, Lanar et al. (1989) reportaron que las sondas clon 26, pPF-14, p242B1-1 y PRF-1 detectaron parásitos solamente entre el 5-20% de las muestras positivas por lectura al microscopio después de ser cultivadas.

En el presente trabajo nos propusimos como objetivo evaluar las seis sondas mencionadas por medio

de ensayos de hibridación con el fin de determinar los niveles de detección de parásitos en muestras provenientes de Tumaco y Villavicencio.

De esta manera esperamos poder seleccionar la(s) sonda(s) más adecuada(s) para estudios epidemiológicos en términos de su sensibilidad y especificidad. La sensibilidad de la técnica de hibridación se evaluó usando muestras clínicas que cubren un amplio rango de parasitemias. De la misma manera el presente trabajo pretende comparar distintos tratamientos de muestra y condiciones de hibridación para hacerlos aplicables a condiciones de trabajo de rutina.

MATERIALES Y METODOS

Participantes y área de estudio

Se seleccionó la población de Tumaco (Costa Pacífica) para muestreo. Se tomaron un total de 94 muestras de sangre de pacientes que tenían un diagnóstico positivo de *P. falciparum* por observación de gota gruesa y que cubren un amplio rango de parasitemias. Se incluyeron también 78 muestras procedentes del hospital local de Villavicencio (Llanos Orientales).

Estas últimas consisten en 18 positivas para *P. falciparum* con parasitemias estimadas entre 1.000-10.000 par./ μ l, 60 muestras que presentan parasitemias de 100-1.000 par./ μ l, 5 controles negativos y 5 positivos para *P. vivax*.

Recolección de muestras

Muestras de 500 μ l se tomaron en EDTA, después de centrifugación y eliminación del suero los eritrocitos empacados se reconstituyeron al volumen inicial con agua destilada y desionizada y se almacenaron a -20°C por un mes. Las muestras de Villavicencio se tomaron en EDTA y la sangre completa se guardó a -20°C .

Tratamiento de las muestras procedentes de Tumaco

Los eritrocitos reconstituidos se descongelaron y se incubaron en presencia de Proteinasa K de acuerdo al procedimiento de Barker et al. (1986).

Tratamiento de las muestras procedentes de Villavicencio

Las muestras se fraccionaron y se trataron independientemente por los siguientes procedimientos:

- a) La sangre completa se descongeló y sometió a digestión con Proteinasa K de acuerdo al método de Barker.
- b) Las muestras se lisaron con Tritón x-100 y se sometieron a digestión con Proteinasa K. Posteriormente fueron extraídas con fenol y cloroformo y el DNA se precipitó con etanol en acetato de sodio 0.3 M. El DNA se suspendió en 200 μ l de buffer T.E., Holmberg et al (1987).

Extracción de DNA a partir de sangre infectada en cultivo in vitro

Los eritrocitos infectados procedentes de las cepas de *P. falciparum* FCB-1, FCR-3 y T-4 se lisaron y digirieron de acuerdo al procedimiento de Goman et al. (1982). El DNA del parásito se purificó por extracciones con fenol y cloroformo, seguido de tratamiento con RNAsa a 37°C por 30 min. y precipitación con etanol. las concentraciones del DNA se estimaron por absorbancias a 260 nm y por coloración con bromuro de etidio en geles de agarosa, Maniatis (1982).

Observación al microscopio

Las lecturas al microscopio fueron efectuadas por una microscopista altamente entrenada en un examen de doble ciego. Las observaciones se hicieron en gotas gruesas coloreadas con Giemsa usando un ocular de 10 X y un objetivo de inmersión de 100 X. Se contaron los parásitos presentes en 100 campos y para parasitemias muy bajas se contaron 200 campos. Para los cálculos se tuvo en cuenta que 100 campos corresponden aproximadamente a 0.2 μ l.

Dot Blot

Las muestras tratadas equivalentes a 35 μ l de sangre original se colocaron en membranas de hibridización de nitrocelulosa Hybond-C y se filtraron usando una aparato de "dot blot". Como controles positivos se

colocó en cada membrana sangre infectada in vitro, DNA purificado de *P. falciparum* y DNA homólogo de la misma sonda. Como controles negativos se utilizaron muestras de sangre no infectadas. Para evaluar los límites de detección para cada sonda, se colocaron cantidades decrecientes de DNA purificado de *P. falciparum* desde 280 ng hasta 0.7 pg. correspondiente a las cepas FCR-3, FCB-1 y T-4. Como controles de especificidad se utilizó 200 ng de DNA de fago lambda, 200 ng de DNA humano, una preparación de DNA de *P. vivax* y sangre no infectada. La desnaturalización y la neutralización se efectuaron de acuerdo a Maniatis et al. (1982).

Marcación

La marcaeión se realizó por el método de "nick translation" en presencia de (p32)dCTP. El DNA marcado fue purificado por precipitación con etanol y la actividad específica se midió sobre una alícuota precipitada en T.C.A. al 10% en un contador de centelleo Beckman LS 3801.

Hibridización

La prehibridización se realizó a 65°C durante 8 horas en una solución de leche descremada en polvo al 2% en 6X SSC, 0.2% SDS y 100 μ g/ml de DNA de esperma de salmón desnaturalizado. La hibridización se realizó en solución de leche descremada en polvo al 2% en 6X SSC, 100 μ g/ml de DNA de esperma de salmón desnaturalizado y 300 ng de sonda desnaturalizada marcada con una actividad específica de $1-5 \times 10^8$ c.p.m./ μ g (5×10^6 c.p.m./ml) durante 12 horas a 55°C para las sondas p242B1-1, pPF-14, pRep-Hind y Rep 20 y a 45°C para los clones 26 y 34. Los lavados se efectuaron a la temperatura de hibridización en 1X SSC, 0.5% SDS durante 15 min. tres veces y en 1X SSC durante 15 min. dos veces.

Autorradiografía y lectura de las señales de hibridización

Las membranas lavadas fueron expuestas por contacto con películas de rayos X Dupont con pantalla amplificadora Cronex HiPlus durante 16 horas a -70°C. Las señales autorradiográficas se leyeron visualmente y las intensidades se valoraron de 1 a 4 según la intensidad.

RESULTADOS

Las seis sondas estudiadas (Rep 20, pRepHind, p242B1-1, pPF-14, clon 26 y clon 34) presentan reacción cruzada. Todas ellas presentan alta especificidad puesto que ninguna de ellas hibridiza con DNA humano, DNA de lambda o con una preparación cruzada de DNA de *P. vivax* (Figura 1).

Las sondas pPF-14, p242B1-1, pRepHind y Rep 20 detectan hasta 17 pg de DNA purificado de *P. falciparum* mientras que las sondas clon 26 y clon 34 detectaron solamente hasta 425 pg. En la Figura 1 se observa la autorradiografía de la membrana hibridizada con Rep 20 correspondiente a las determinaciones de sensibilidad y especificidad. En el caso de las hibridizaciones comparativas con muestras de campo en

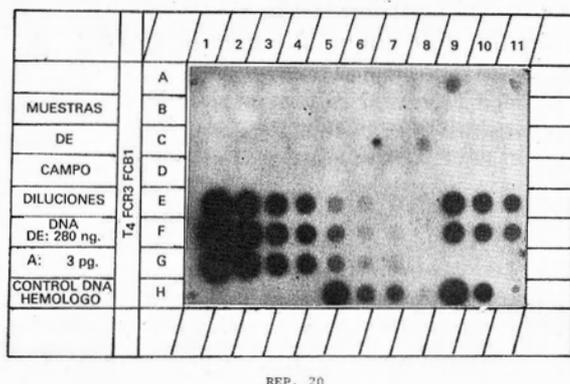


Figura 1: En las filas A, B, C y D de 1 al 11, se colocaron 44 muestras procedentes de Villavicencio y tratadas de acuerdo al tratamiento A en una cantidad equivalente a 30 μ l de sangre original. En las filas E, F y G del 1 al 8, se colocaron diluciones seriadas de DNA procedente de las cepas FCB-1, FCR-3 y T-4 respectivamente. 1) 280 ng, 2) 56 ng, 3) 11 ng, 4) 2.2 ng, 5) 440 pg, 6) 89 pg, 7) 17 pg y 8) 3.5 pg. En E-9, E-10 y E-11, se colocaron 10 μ l, 5 μ l y 2 μ l de eritrocitos infectados in vitro con la cepa FCB-1, 1% de parasitemia. En F-9, F-10 y F-11, se colocaron 10 μ l, 5 μ l y 2 μ l de eritrocitos infectados in vitro con la cepa FCR-3, 1% de parasitemia. En G-9, 200 ng de DNA humano, en G-10 300 μ l de una reparación cruda de DNA de *P. vivax* y en G-11, 200 ng DNA de esperma de salmón. En H-1 y H-2, 100 pg y 10 pg del Clon 26; en H-3 y H-4, 100 pg y 10 pg del Clon 34; en H-5 y H-6, 100 pg y 10 pg de p242B1-1; en H-7 y H-8, 100 pg y 10 pg de pPF-14; en H-9 y H-10, 100 pg y 10 pg de Rep 20 y en H-11 10 pg de pRepHind. La hibridización se efectuó con la sonda Rep 20 tal como se indica en el texto.

la Tabla 2 se muestra que las sondas pPF-14, p242B1-1, pRepHind y Rep 20 presentan niveles de detección comparables entre sí, mientras que los clones de 26 y 34 presentaron menor sensibilidad.

En la Tabla 3 se muestran los datos que indican variaciones de sensibilidad en relación al tratamiento de la muestra. Con el fin de obtener una medida semicuantitativa de la parasitemia, la intensidad de la señal de hibridización en la autorradiografía (valorada de 1 a 4) se correlacionó con el nivel de parasitemia estimado por microscopía (Fig 2). Para ilustrar mejor el origen de estos datos, en las Figuras 3, 4, 5, 6, 7 y 8 se muestran las autorradiografías correspondientes a 32 muestras procedentes de Tumaco tratadas como se indicó y colocadas en membranas de hibridización en réplicas iguales. Los datos de las lecturas correspondientes se presentan en la Tabla 4. Algunos casos especiales se señalan a continuación:

Las sondas pPF-14, p242B1-1, pRepHind y Rep 20 detectaron una muestra con parasitemia de 3 par./ μ l, con intensidades de 3 y 4. Sin embargo, en esta muestra no se observaron esquizontes ni gametocitos. Una muestra con parasitemia 5 par./ μ l se detectó únicamente por p242B1-1 con intensidad 1.

Una muestra con parasitemia 25 par./ μ l, fue detectada por pPF-14, pRepHind y p242B1-1 con intensidades de 3 y 4; en este caso la presencia de esquizontes se confirmó por microscopía, mientras que otra muestra que presentó también parasitemia de 25 par./ μ l, fue detectada solamente por pPF-14 y pRepHind con intensidades de 3 y 1 respectivamente. En este caso no se detectaron esquizontes.

Tres muestras con parasitemia alta se detectaron con baja intensidad: una muestra con parasitemia de 35.000 par./ μ l se detectó por pPF-14, pRepHind y p242B1-1, con intensidades de 2, 1 y 3 respectivamente. Igualmente una de las muestras con parasitemia de 11.000 par./ μ l, se detectó únicamente por pPF-14 y p242B1-1 con intensidad de 1 y otra muestra con parasitemia de 20.000 par./ μ l fue detectada solamente por pPF-14 con intensidad 1.

TABLA 2

Sensibilidad de seis sondas de hibridación para detectar *P. falciparum* en relación con los niveles de parasitemia. Los números indican la proporción de muestras positivas detectadas por hibridación del DNA sobre muestras positivas detectadas por microscopía. Entre paréntesis se muestran los porcentajes de sensibilidad

Densidad de Parásitos Parásitos/ μ l	SONDAS					
	pPF-14	pRepHind	Rep20	p242B1-1	Clone 26	Clone 34
< 100	4/13 (31 %)	4/13 (31 %)	2/12 (15 %)	5/12 (42 %)	0/13 (0 %)	1/13 (8 %)
100 – 1.000	20/34 (59 %)	20/34 (59 %)	13/33 (39 %)	21/31 (68 %)	7/34 (21 %)	6/34 (18 %)
1.000 – 10.000	24/31 (77 %)	24/31 (77 %)	20/31 (64 %)	*21/31 (70 %)	10/31 (32 %)	11/31 (35 %)
> 10.000	15/16 (94 %)	12/16 (75 %)	12/16 (75 %)	14/16 (88 %)	8/16 (50 %)	8/16 (50 %)

TABLA 3

Sensibilidad de hibridación de DNA en relación con el espécimen tratado. Los tratamientos A y B son como se describe en Métodos. Los números entre paréntesis indican la intensidad de los puntos, calificados de 1 a 4. Los fraccionarios presentan las muestras positivas detectadas por hibridación de DNA sobre las muestras positivas detectadas por microscopía. Entre paréntesis angulares se muestran los porcentajes de sensibilidad. Como se indicó, el ensayo de hibridación de DNA se realizó con Rep 20.

Rep 20 Muestras de Villavicencio							
Densidad de Parásitos Parásitos/ μ l	Número muestras Total	TRATAMIENTO A			TRATAMIENTO B		
		(1)	(2)	% Sens.	(1)	(2)	% Sens.
100 – 1000	60	1/60	–	[2%]	42/60	4/60	[77%]
1000 – 100000	18	9/18	1/18	[61%]	8/18	10/18	[100%]

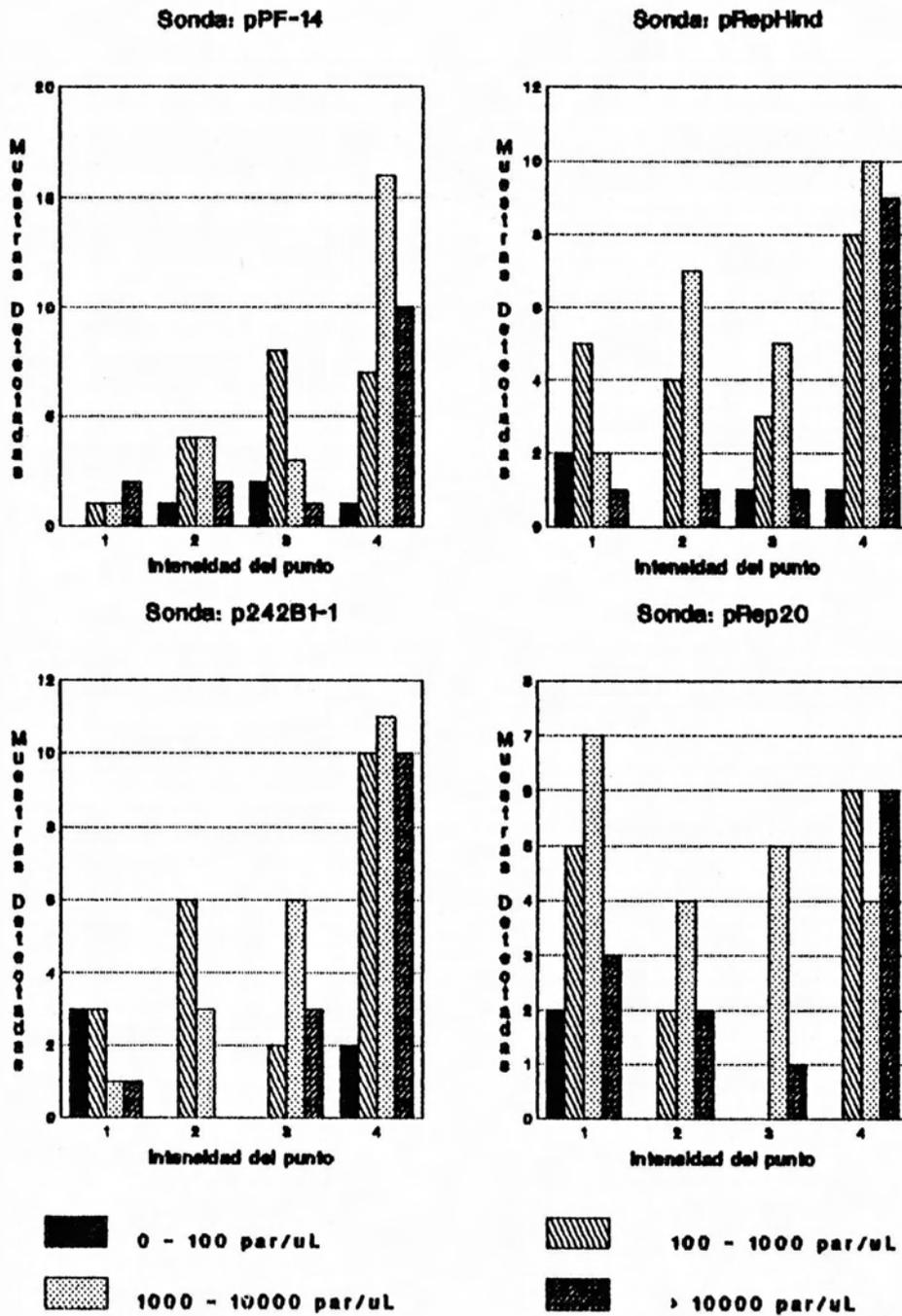


Fig. 2. Hibridación del DNA de *P. falciparum*

Correlación entre el nivel de parasitemia y la intensidad de los puntos en la autorradiografía, para cada una de las sondas utilizadas en los ensayos de hibridación del ADN

Figuras 3, 4, 5, 6, 7 y 8: Fotografías de las autorradiografías correspondientes a las hibridaciones en "dot-blot". Las muestras se colocaron en las membranas tal como se describe a continuación. En la Fila A (1-2): 10 µl de eritrocitos infectados *in vitro*, 3,5% de parasitemia, cepa FCR-3. A (3-4): 35 µl de sangre tratada no infectada. A (5): 1 ng de DNA puro de *P. falciparum* procedente de la cepas FCB-1, FCR-3 y T-4. A (6-7-8) 100 pg, 10 pg, 1 pg de DNA homólogo correspondiente a la sonda utilizada en cada caso. En la Fila B: muestras procedentes de Tumaco tratadas como se describe en materiales y métodos, 1 - 8. En la Fila C: muestras de Tumaco, 9 - 16. En la Fila D: muestras de Tumaco, 17-24. En la Fila E: muestras de Tumaco, 25-32. Los resultados obtenidos a partir de la observación de estas autorradiografías se presentan en la Tabla 4.

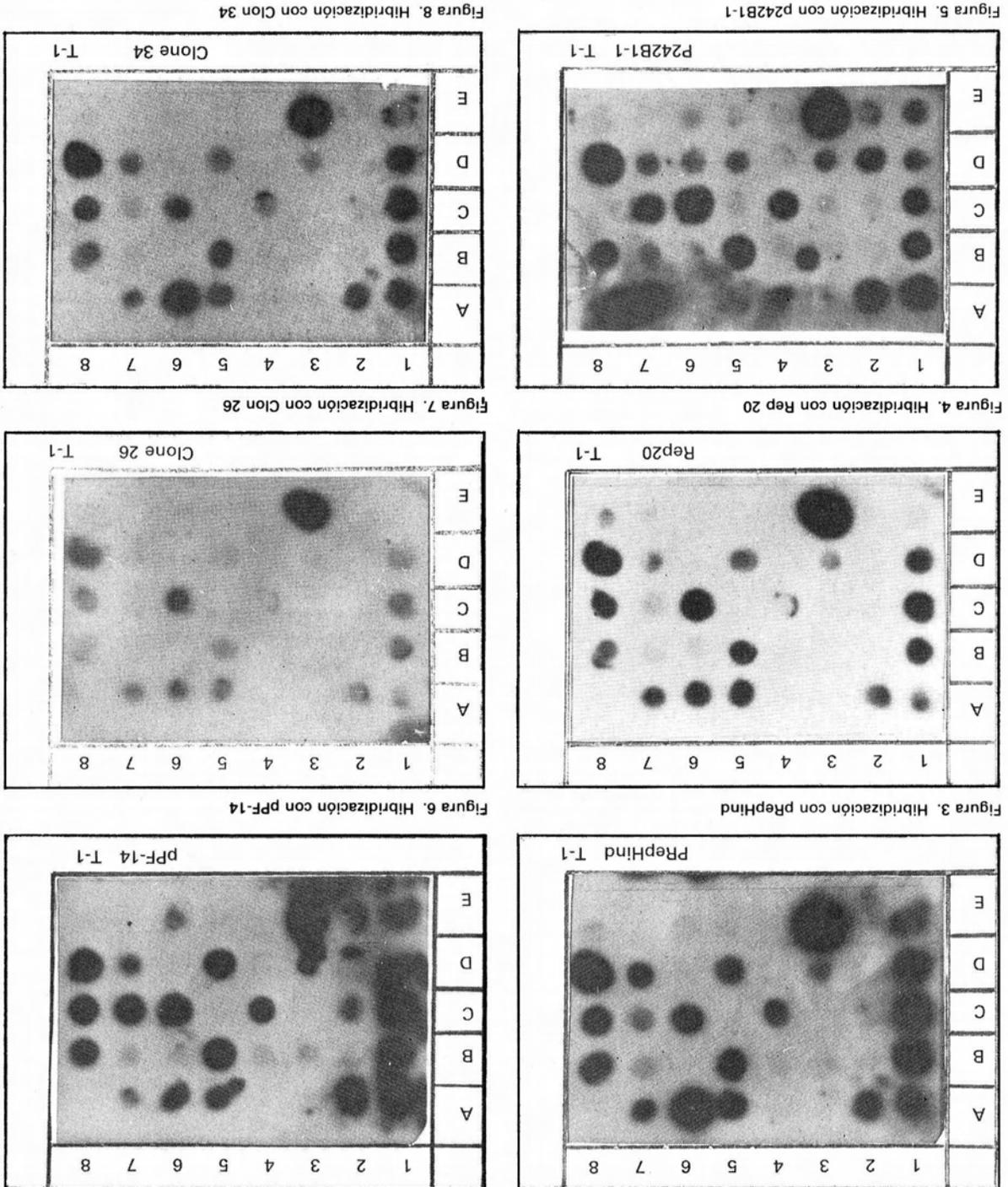


TABLA 4

Muestra	Par. / μ l	pPF-14	pRepHind	p242BI-1	Rep 20	Clone 34	Clone 26
1	20.000	++++	++++	++++	+++	+++	+
2	35.000	+	-	-	-	-	-
3	(+ / 2) *	+	+	-	-	-	-
4	520	+	+	+++	-	-	-
5	16.000	++++	++++	++++	+++	+++	+
6	20.000	+	+	+	+	-	-
7	8.000	+	++	++	+	-	-
8	6.500	+++	++++	+++	++	++	+
9	8.300	++++	++++	+++	+++	++++	+
10	(+) *	++	+	+	-	-	-
11	(+) *	-	-	+	-	-	-
12	(+) *	+++	++	+++	++	+	+
13	(+) *	-	-	-	-	-	-
14	135	++++	+++	++++	++++	+++	+++
15	22.000	++++	+	++++	+	+	-
16	4.000	++++	++++	-	+++	+++	++
17	9.100	++++	++++	++	+++	+++	+
18	36.400	+	-	+++	-	-	-
19	545	+++	++	++	+	+	+
20	45	-	-	+	-	-	-
21	6.120	+++	+++	++	++	+	+
22	75	-	-	++	-	-	-
23	(++) *	++	+++	++	+	+	-
24	(++) *	++++	++++	++++	++++	++++	+++
25	25	++++	++	++	-	+	-
26	25	++	+	++	-	-	-
27	4.145	++++	++++	++++	++++	++++	++++
28	25	-	-	-	-	-	-
29	(+) *	-	-	+	-	-	-
30	105	+	+	+	-	-	-
31	45	-	-	-	-	-	-
32	1.155	-	+	+	+	-	-

DISCUSION

En investigaciones previas se ha examinado la sensibilidad y especificidad de las sondas de DNA para la detección de *P. falciparum*, Franzen et al (1984), Barker et al (1986), Holmberg et al (1987), McLaughlin et al (1987), Sethabutr et al (1988), Lanar et al (1989), Barker et al (1989). Los resultados obtenidos en el presente trabajo no difieren significativamente de los hallazgos reportados anteriormente. Es decir, la especificidad de las sondas es muy alta no detectándose falsos positivos en las 172 muestras analizadas.

Como se puede observar en la Tabla 2, los intervalos de confianza al 95% se sobreponen para las sondas pPF-14, pRepHind, Rep 20 y p242BI-1, es decir que las sensibilidades no varían significativamente entre ellas. La sensibilidad del ensayo de hibridación para muestras que presentan alta parasitemia es solamente del 75-94% y para muestras que presentan parasitemias menores de 100 par./ μ l es del 15-42%. Holmberg et al (1987) reportan niveles de detección similares para muestras con parasitemias muy bajas, sin embargo, para muestras con altas parasitemias detecta el 100%. Los resultados de este trabajo están de acuerdo con

los reportados por Lanar et al. (1989). De las muestras procedentes de Villavicencio y que fueron procesadas de acuerdo al tratamiento B, se detectó el 77%, de las que presentan parasitemias entre 100-1.000 par./ μ l y el 100% de las muestras con parasitemias mayores de 1.000 par. μ l utilizando como sonda Rep 20, (Tabla 3). Por lo tanto podemos concluir que el tratamiento de la muestra influye sobre la sensibilidad, ya que las proteínas remanentes pueden adherirse a la membrana e impedir el acceso de la sonda a su objetivo. Sin embargo, el tratamiento B, que dió los mejores resultados, demanda mucho tiempo y es muy laborioso como para recomendarlo en estudios de campo.

El mayor atractivo de las sondas de DNA ha sido su esperada capacidad para detectar fácilmente bajas parasitemias que pasan desapercibidas frecuentemente en la lectura rápida de la gota gruesa realizada en el campo. No obstante hemos encontrado que entre el 58-85% de los casos que presentan parasitemias menores de 100 par./ μ l no son detectadas por las sondas a no ser que las muestras sean purificadas cuidadosamente. Con estos niveles de detección no podemos recomendar todavía el uso de sondas del DNA para estudios poblacionales ya que por ejemplo en áreas endémicas como la Costa Pacífica la mayoría de la población presenta parasitemias muy bajas o parasitemias no detectables por lectura rápida de la lámina al microscopio.

La correlación entre la intensidad de las señales de hibridación con el grado de parasitemia es débil, tal como se muestra en la Figura 2, lo cual indica la dificultad de cuantificar el ensayo de hibridación por observación de las intensidades de las señales autorradiográficas. Esta falta de correlación puede deberse a la variabilidad del número de copias de la secuencias repetitiva del 21 p.b. No se encontró correlación entre la presencia de gametocitos y/o esquizontes con la intensidad de la hibridación. Sería interesante investigar si esta falta de correlación se asocia a tratamientos previos con droga.

La sensibilidad observada de las sondas hace que su uso esté limitado a la detección de altas parasitemias generalmente asociadas a alta morbilidad. Puesto que estas sondas hibridan entre sí, es muy improbable que su uso combinado aumente significativamente los niveles de detección. Con el fin de aumentar la sensibilidad de la detección por medio de los ensayos de hibridación de ácidos nucleicos se requiere explorar el uso de otras secuencias diferentes a la repetitiva de

21 b.p. como serían las que ofrecen las regiones específicas de los RNA ribosomales u otras secuencias específicas amplificadas por la Reacción en Cadena de la Polimerasa. También es importante optimizar un tratamiento de las muestras que sea eficiente y económico.

SUMMARY

Probes pRepHind, Rep 20, p242B-1, pPF-14, clone 26 and 34 were compared for their ability to detect *P. falciparum* in field conditions. Ninety four clinical samples from patients living in the malaria endemic area of Tumaco (Pacific Coast) plus 88 from Villavicencio (Eastern Plains) were tested in "dot-blot" hybridization experiments. Probes Rep 20, p242B1-1, pRepHind and pPF-14 detected up to 17 pg of purified *P. falciparum* DNA, while clone 26 and clone 34 detected up to 425 pg DNA. Probes pPF-14, p242B1-1, pRepHind and Rep 20 exhibited comparable detection levels of parasites in infected blood samples. Sensitivity declined from 75-94% in subjects with parasitemias higher than 10.000 par./ μ l to 15-42% in subjects with parasitemias lower than 100 par./ μ l. PPF-14 and p242B1-1 showed the highest sensitivity, while clone 26 and 34 presented significantly lower sensitivities. All probes showed to be highly specific. Detection levels are dependent on specimen treatment. Treatment consisting of serum removal, Triton X-100 lysis, Proteinase K digestion, Phenol and Chloroform extractions followed by Ethanol precipitation yielded 100% sensitivity for specimens with parasite density higher than 1.000 par./ μ l.

(Key words: *P. falciparum*, DNA probes).

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación recibió el apoyo financiero del Programa Especial para la Investigación y Entrenamiento en Enfermedades Tropicales del Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo, el Banco Mundial y la Organización Mundial de la Salud. Agradecemos la colaboración del Departamento de Microbiología de la Universidad del Valle, Cali. Reconocimientos especiales para Fanny de Carvajal por la lectura de las parasitemias al microscopio. Nuestros agradecimientos especiales a los doctores Vincenzo Enea, John Scaife, Robert Barker, Irina Moleon y Werner Zolg por habernos suministrado generosamente las sondas.

BIBLIOGRAFIA

- Barker R, Suebsaneg L, Roone W, Alecrim G, Dourado H & Wirth D. Specific DNA probe for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria. *Science* 1986; 231: 1434-1436.
- Enea V. Sensitive and specific DNA probe for detection of *Plasmodium falciparum*. *Mol Cell Biol* 1986; 6: 321-324.
- Franzen L, Shabo R, Perlmann H, Wigzell H, Westin G, Aslund L, Persson T & Pettersson U. Analysis of clinical specimens by hybridisation with probe containing repetitive DNA from *Plasmodium falciparum*. *Lancet* 1984; 1: 525-528.
- Goman M, Langsley G, Hyde JE, Yankovsky NK, Zolg JW & Scaife JG. The establishment of genomic DNA libraries for the human malaria parasite *P. falciparum* and identification of individual clones by hybridization. *Mol Biochem Parasitol* 1982; 5: 391-400.
- Holmberg M, Shenton F, Franzen L, Janneh K, Snow R, Pettersson U, Wilzell H & Greenwood B. Use of DNA hybridization assay for the detection of *Plasmodium falciparum* field trials. *Am J Trop Med Hyg.* 1987; 37: 230-234.
- Lanar D, McLaughlin G, Wirth D, Barker R, Zolg W & Chulay J. Comparison of thick films, in vitro culture and DNA hybridization probes for detecting *Plasmodium falciparum* malaria. *Am J Trop Hyg.* 1989; 40: 3-6.
- Maniatis T, Fritsch EF & Sambrook J. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory. 1982.
- McLaughlin G, Collins WE & Campbell GH. Comparison of genomic, plasmid, synthetic, and combined DNA probes for detecting *Plasmodium falciparum* DNA. *Journal of Clinical Microbiology.* 1987; 25: 791-795.
- Oquendo P, Goman M, Mackay M, Langsley G, Walliker D & Scaife J. Characterization of a repetitive DNA sequence from the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1986; 18: 89-101.
- Sethabutr O, Brown A, Gingrich J, Webster K, Pooyindee N, Taylor D & Echeverria P. A comparative field study of radiolabeled and enzyme-conjugated synthetic DNA probes for the diagnosis of falciparum malaria. *Am J Trop Hyg.* 1988; 39: 227-231.
- Zolg W, Andrade E & Scott E. Detection of *Plasmodium falciparum* DNA using repetitive DNA clones as species specific probes. *Mol Biochem Parasitol.* 1987; 22: 145-151.
- W.H.O. L'emploi de sondes d'ADN pour le diagnostic du paludisme: Mémorandum d'une Réunion de l'OMS. *Bulletin de l'Organisation Mondiale de la Santé*, 1987; 65 (1): 27-38